

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

9 • 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

СЕНТЯБРЬ

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 30.08.2017.

Подписано в печать 12.09.2017.

Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 802.

**E-mail: oao-medsina@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-rf.ru**

**Подписка на электронную версию:**

**eibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.  
2017. № 9. 513—576.

**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"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 62  
9 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

SEPTEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:  
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:  
8-495-430-03-63,

E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.A. Zyukina*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief V. N. TITOV**

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

**БИОХИМИЯ**

Титов В.Н. Диагностическое прочтение нормального уровня артериального давления: метаболизм, гуморальные медиаторы, биологические функции и биологические реакции, локальные пулы межклеточной среды. . . . . 516

Ариповский А.В., Астахова Е.А., Колесник П.О., Кулагина Т.Р., Шушман И.В., Титов В.Н. Перспективный фторопластовый пористый носитель для консервации и пересылки проб плазмы крови: применение метода «сухой капли» с целью определения индивидуальных жирных кислот . . . 526

Герштейн Е.С., Колпаков А.В., Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алфёров А.А., Огнерубов Н.А., Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции. . . . . 536

**КОАГУЛОЛОГИЯ**

Сомонова О.В., Елизарова А.Л., Матвеева И.И., Корнюшенко У.А. Нарушения системы гемостаза и тромботические осложнения у онкологических больных, перенесших операцию на печени. . . . . 541

Груздева О.В., Фанаскова Е.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Пенская Т.Ю., Дылева Ю.А., Кузьмина А.А., Барбараш О.Л. Преимущество теста генерации тромбина для оценки гемостазиологического потенциала при проведении коронарного шунтирования у пациентов с ишемической болезнью сердца. . . . . 545

**ЦИТОЛОГИЯ**

Волков А.Н., Рытенкова О.И., Бабарыкина Т.А., Лысенко Д.И. Цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий при неразвивающейся беременности. . . . . 553

**ИММУНОЛОГИЯ**

Подлесных С.В., Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербakov Д.Н., Рязанов М.А., Петрова В.Д., Шойхет Я.Н., Johnston S.A., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Высокоспецифичный и чувствительный анализ репертуара сывороточных антител с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рак молочной железы. . . . . 557

Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксёнов В.В., Яковлев А.П., Луценко В.Д. Использование метода проточной цитометрии и диагностически значимых показателей системного клеточного иммунитета для диагностики острого эндометрита. . . . . 563

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В. Изучение биоплёнок *Vibrio cholerae* методом трансмиссивной электронной микроскопии. . . . . 568

Харсеева Г.Г., Кудря Е.В., Воронина Н.А., Доля Ю.А., Бут О.М., Гасретова Т.Д., Алутина Э.Л. *Corynebacterium riegellii* — необычный вид, выделенный от пациентки с туберкулёзом мочевыводящих путей (случай из практики). . . . . 574

**BIOCHEMISTRY**

Titov V.N. The diagnostic reading of normal level of arterial pressure: metabolism, humoral mediators, biological functions and biological reactions, local pools of intercellular medium

Aripovsky A. V., Astakhova E.A., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Shushman I.V., Titov V.N. The perspective fluoroplastic porous carrier for conservation and transfer of samples of blood plasma: application of "dry drop" technique with the purpose of detection of individual fatty acids

Gershtein E.S., Kolpakov A.V., Bezhanova S.D., Morozov A.A., Alferov A.A., Ognerubov N.A., Kazantseva I.A., Kushlinskii N.E. The growth factor of endothelium of vessels and its receptors type I and II in blood serum in patients with kidney cancer: clinical morphological correlations

**COAGUOLOGY**

Somonova O.V., Elizarova A.L., Matveeva I.I., Korniyushenko U.A. The disorders of hemostasis system and thrombotic complications in oncologic patients having liver operation

Gruzdeva O.V., Fanaskova E.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G., Penskaya T.Yu., Dyleva Yu.A., Kuzmina A.A., Barbarash O.L. The advantage of test on thrombin generation for evaluation of hemostasis potential under implementation of coronary bypass surgery in patients with ischemic heart disease

**CYTOLOGY**

Volkov A.N., Rytenkova O.I., Babarykina T.A., Lysenko D.I. The cytogenetic diagnostic of chromosome anomalies under non-developing pregnancy

**IMMUNOLOGY**

Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Anisimov D.S., Scherbakov D.N., Ryazanov M.A., Petrova V.D., Shoikhet Ya.N., Johnston S.A., Lazarev A.F., Shapoval A.I. The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer

Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksenov V.V., Yakovlev A.P., Lutsenko V.D. The application of flow cytometry technique and diagnostically significant indices of systemic cellular immunity for diagnostic of acute endometritis

**MICROBIOLOGY**

Golovin S.N., Simonova I.R., Titova S.V., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Trishina A.V. The analysis of biofilms *Vibrio cholerae* using technique of transmissive electronic microscopy

Kharseeva G.G., Kudrya E.V., Voronina N.A., Dolya Yu.A., But O.M., Gasretova T.D., Alutina E.L. *Corynebacterium riegellii* as an unusual species separated from female patient with tuberculosis of urinary tracts: a practice case

## БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., 2017

УДК 612.141.083

Титов В.Н.

### ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ПРОЧТЕНИЕ НОРМАЛЬНОГО УРОВНЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ: МЕТАБОЛИЗМ, ГУМОРАЛЬНЫЕ МЕДИАТОРЫ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, ЛОКАЛЬНЫЕ ПУЛЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ

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

*Физиологичный уровень артериального давления (АД) подтверждает отсутствие in vivo нарушений биологических функций гомеостаза, трофологии, эндоэкологии (биологические реакции экскреции и воспаления) и адаптации (биологические реакции компенсации и стресса). Нормальное АД отражает физиологичную проницаемость биослоя (эндотелий/подоциты, эндотелий/астроциты, эндотелий/пневмоциты и эндотелий/трофобласты) на границе единого и локальных пулов межклеточной среды. Клиническим биохимикам при формировании метаболического повышения АД непросто выявить, нарушение какой из четырех биологических функций локально не скомпенсировано на 2-м уровне регуляции метаболизма (в паракринно регулируемых сообществах клеток и органов) и требует компенсации — повышения АД с 3-го уровня регуляции метаболизма, с уровня организма, сосудодвигательного центра головного мозга. Для дифференциальной диагностики метаболической артериальной гипертензии (АГ) клиническим биохимикам необходимы новые методы диагностики. Основой их станет способ количественного и качественного определения аналитов в моче — метаболомика. Это способ жидкостной (флуидной) хроматографии небольших многочисленных водорастворимых аналитов (метаболитов и катаболитов) мочи с масс-спектрометрическими детекторами. Мы предлагаем при анализе хроматограмм не только дифференцировать отдельные пики, а также этиологически, патогенетически сгруппировывать их в диагностические кластеры, которые позволят, мы полагаем, охарактеризовать нарушение четырех биологических функций. И пусть в них присутствуют пики, которые еще не идентифицированы и диагностическое значение которых пока неясно. И чем большими по числу пиков станут этиологические, патогенетические кластеры метаболической АГ, тем дифференциальная диагностика станет более успешной. Нарушение четырех биологических функций, которые in vivo приходится компенсировать с уровня организма, и определяет столь высокую частоту метаболической АГ в популяции развитых стран мира.*

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия; метаболомика; локальные пулы межклеточной среды; биологические функции и биологические реакции; обзор.

**Для цитирования:** Титов В.Н. Диагностическое прочтение нормального уровня артериального давления: метаболизм, гуморальные медиаторы, биологические функции и биологические реакции, локальные пулы межклеточной среды. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 516-526. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-516-526>

Titov V.N.

THE DIAGNOSTIC READING OF NORMAL LEVEL OF ARTERIAL PRESSURE: METABOLISM, HUMORAL MEDIATORS, BIOLOGICAL FUNCTIONS AND BIOLOGICAL REACTIONS, LOCAL POOLS OF INTER-CELLULAR MEDIUM

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

*The physiological level of arterial pressure confirms absence in vivo of disorders of biological functions of homeostasis, tropology, endoecology, (biological reactions of excretion and inflammation) and adaptation (biological reactions of compensation and stress). The standard arterial pressure reflects physiological permeability of biolayer (endothelium/pneumocytes and endothelium/trophoblasts) on the interface of common and local pools of inter-cellular medium. Under development of increasing of metabolic arterial pressure it is a non-simple clinical biochemical task to establish which particular function out of four ones has no local compensation at the second level of regulation of metabolism (in paracrine regulating cenosises of cells and organs) and requires such a compensation as increasing of arterial pressure from the third level of regulation of metabolism, from level of organism, vasomotor center of brain. The clinical biochemical differential diagnostic of metabolic arterial hypertension requires new methods of diagnostic. These methods will be based on a mode of quantitative and qualitative detection of analytes in urine known as metabolomics. This is a mode of fluid chromatography of small numerous water-soluble analytes (metabolites and catabolites) of urine with mass-spectrometric detectors. It is proposed during analysis of spectrograms to differentiate particular peaks and to etiologically and pathogenetically group them in diagnostic clusters permitting as supposed to characterize disorder of four biological functions. And then let be present peaks still unidentified and with unclear diagnostic value. The more in number of peaks will be etiological and pathogenic clusters of metabolic arterial hypertension the more successful will be differentiated diagnostic. The disorder of four biological functions that in vivo are to be compensated from the level of organism, determines such a high rate of metabolic arterial hypertension in population of the developed countries.*

**Для корреспонденции:** Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. клин. биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ; e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

**Key words:** *arterial hypertension; metabolomics; local pool of inter-cellular medium; biological functions; biological reactions; review.*

**For citation:** Titov V.N. The diagnostic reading of normal level of arterial pressure: metabolism, humoral mediators, biological functions and biological reactions, local pools of inter-cellular medium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2017; 62 (9): 516-526. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-516-526>

**For correspondence:** Titov V.N., doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of clinical biochemistry of lipoproteins of the institute of clinical cardiology; e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

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

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

Received 14.06.2016  
Accepted 28.06.2016

На основании филогенетической теории общей патологии мы предлагаем рассмотреть становление на ступенях филогенеза всех биологических функций и биологических реакций с иных позиций физиологии [1]. Мы полагаем, что на ступенях филогенеза последовательно, раздельно произошло становление 7 биологических функций: 1) гомеостаза (в межклеточной среде для каждой из клеток всегда и всего достаточно); 2) трофологии, питания; 3) эндоэкологии (в межклеточной среде всегда «чисто»); 4) адаптации к эндогенным нарушениям и влиянию факторов внешней среды; 5) продолжения вида, размножения; 6) локомоции, движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов; 7) регуляции метаболизма с уровня нервной системы (НС) и когнитивной биологической функции центральной нервной системы (ЦНС) головного мозга; итогом совершенства ЦНС стало формирование интеллекта.

**Биологические функции и биологические реакции *in vivo*.** Биологическую функцию гомеостаза реализуют порой сотни биологических, биохимических, физико-химических реакций. В рамках узких физиологических значений они поддерживают все параметры анализов как в едином пуле межклеточной среды *in vivo*, так и в локальных ее пулах. Биологические реакции обеспечивают постоянство физико-химических параметров: pH, содержание электролитов, высокий градиент концентрации ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$  по обе стороны плазматической мембраны клеток, содержание в межклеточной среде и цитоплазме индивидуальных аминокислот, жирных кислот (ЖК), глюкозы и мочевины, мочево́й кислоты и  $O_2$ , активность ферментов в клетках, функцию внутриклеточных органелл, включая лизосомы, пероксисомы, микросомы эндоплазматической сети и митохондрии.

И не стоит говорить о гомеостазе электролитов или об обмене белка. Гомеостаз с позиций биологического, системного подхода рационально рассматривать как единое целое — оптимальное состояние межклеточной среды, стабильность параметров приватизированного каждой особью кусочка третьего мирового океана, в котором, как и миллионы лет ранее, продолжают жить все клетки *in vivo*. И если представители разных видов, включая и *Homo sapiens*, живут на суше, то все клетки их, как и многие миллионы лет ранее, продолжают жить в водах третьего мирового океана. И поддержание биологической функции гомеостаза, сохранение всех параметров приватизированного «кусочка» третьего мирового океана *in vivo*

— одна из первостепенных обязанностей каждого организма [2].

Представления об обмене белка, электролитов желательнее использовать ограниченно; это остаточные проявления столь долгого главенства биологического приема редукционизма. Обсуждению в первую очередь подлежит, мы полагаем, состояние *in vivo* биологических функций и биологические реакции; биохимию конкретных субстратов рационально рассматривать в курсе биохимии. В клинической биохимии, вероятно, основное значение рационально предавать регуляции метаболизма, выявлению основ диагностической ценности каждого из анализов, построению диагноза на постаналитическом уровне клинической лабораторной диагностики во всех областях клинической медицины.

Биологическую функцию трофологии (функцию питания) реализуют *in vivo* многие органы и системы органов; они контролируют разные физико-химические и биохимические параметры на 1-м уровне — в клетках (аутотрофно); на 2-м уровне регуляции метаболизма — в паракринно регулируемых сообществах клеток (ПС), в органах, системах органов; на 3-м уровне — в организме. Несмотря на сложности анатомического и функционального построения системы пищеварения, биологическую функцию трофологии в филогенезе *in vivo* реализуют всего две биологические реакции: биологическая реакция экзотрофии (внешнее питание) и биологическая реакция эндотрофии (внутреннее питание).

Биологическая реакция экзотрофии (биологической функции трофологии) реализуется после каждого приема пищи; функция гуморального медиатора инсулина проявляется тоже только в биологической реакции экзотрофии. Основное предназначение экзотрофии: а) совершить всасывание; б) перенести в лимфо- и кровотоке; в) депонировать в клетках все субстраты пищи: глюкозу, ЖК и аминокислоты. Физиологично через 4–6 ч после приема пищи количественные значения биохимических анализов в плазме крови (в межклеточной среде) указывают, что биологическая реакция экзотрофии завершена; субстраты метаболизированы или депонированы. Депонирование — специфичное действие биологической реакции экзотрофии; для глюкозы происходит образование глыбок гидрофильного гликогена в цитоплазме клеток. Депонирование насыщенных ЖК (НЖК) и мононенасыщенных ЖК (МЖК) (субстратов для наработки клетками энергии) происходит в жировых

клетках в форме капель неполярных триглицеридов (ТГ), эфиров НЖК и МЖК с трехатомным спиртом глицерином [3].

Биологическая реакция эндотрофии реализована *in vivo* при отсутствии приема пищи, в ночное время, при голодании, в период зимней спячки животных. В период эндотрофии синтез инсулина  $\beta$ -клетками островков Лангерганса продолжается, но секреции гормона не происходит;  $\beta$ -клетки депонируют инсулин в ассоциатах с ионами  $Zn^{++}$ . Действия инсулина в биологической реакции эндотрофии не происходит; физиологично в этой биологической реакции жировые клетки освобождают в кровоток и межклеточную среду преимущественно МЖК и НЖК. Важно понять, что в биологической реакции экзотрофии жировые клетки поглощают ЖК в форме неполярных ТГ в составе ЛП низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП). При реализации же биологической реакции эндотрофии все жировые клетки освобождают депонированные ЖК только в форме полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК). Инсулин в инсулинозависимых клетках активирует синтез олеиновой МЖК *in situ de novo* только из глюкозы, но не из эндогенной пальмитиновой НЖК.

Происходит синтез МЖК в последовательности: экзогенная глюкоза  $\rightarrow$  ацетилКоА  $\rightarrow$  эндогенная пальмитиновая НЖК  $\rightarrow$  эндогенная стеариновая НЖК  $\rightarrow$  олеиновая МЖК. Именно для синтеза олеиновой НЖК инсулин в биологической реакции экзотрофии столь активно инициирует поглощение клетками глюкозы. В биологической реакции эндотрофии часть освобожденной жировыми клетками эндогенной и экзогенной МЖК и экзогенной пальмитиновой НЖК в форме НЭЖК поглощают гепатоциты. Они этерифицируют МЖК и НЖК со спиртом глицерином, формируя ТГ; далее апоВ-100 структурирует ТГ в состав ЛПОНП, секретировав в кровь отдельно олеиновые, пальмитиновые, линолевые и линоленовые ЛПОНП [4].

Биологическую функцию эндозкологии, поддержание «чистоты» единого и локальных пулов межклеточной среды *in vivo* реализуют две биологические реакции: экскреции и воспаления. Биологическая реакция экскреции поддерживает «чистоту» межклеточной среды *in vivo*. Происходит это путем фильтрации катаболитов и малых эндогенных флогогенов (мол. масса менее 70 кДа) через мембрану гломерул нефрона в пул первичной мочи; далее следует выведение катаболитов и малых флогогенов с мочой [5].

Поскольку удалить эндогенные флогогены (инициаторы биологической реакции воспаления большой мол. массы; более 70 кДа) путем биологической реакции экскреции невозможно, *in vivo* происходит их сбор и утилизация *in situ* при реализации биологической реакции воспаления. Реализуют ее кластеры оседлых макрофагов; сформированы они на разных ступенях филогенеза при реализации биологической реакции сквенджер-эндоцитоза, функции рецепторов-мусорщиков [6]. Оседлые макрофаги в ПС, как функциональные фагоциты, активно поглощают макромолекулы белка, комплексы антиген-антитело, безлигандные ЛПОНП и ЛПНП, которые

не сформировали лиганды, тельца апоптоза, бактерии, риккетсии, вирусы и ксенобиотики.

Биологическую функцию адаптации реализуют две биологические реакции: многокомпонентная реакция стресса и разные биологические реакции компенсации. Биологическую реакцию компенсации при нарушении *in vivo* наиболее часто биологической реакции метаболизм  $\leftrightarrow$  микроциркуляция (М  $\leftrightarrow$  М) в дистальном отделе артериального русла инициируют специфичные сенсоры, активаторы и ингибиторы ферментов, а также биологически активные гуморальные медиаторы [7].

Биологическую реакцию компенсации в филогенетически раннем дистальном отделе артериального русла реализует эндотелий-зависимая вазодилатация; регулирует она микроциркуляцию локально в артериях и артериолах мышечного типа, в том месте, где та оказывается нарушенной [8]. Такой же, но более поздней в филогенезе биологической реакцией компенсации служит повышение АД в проксимальном отделе артерий эластического типа. Биологические реакции реализации биологической функции продолжения вида более рационально рассматривать отдельно, как и длительное становление когнитивной функции ЦНС.

Важным событием *in vivo* на поздних ступенях филогенеза стало формирование биологической функции локомоции, новых биологических реакций. Это: 1) становление регуляторного действия гуморального медиатора инсулина; 2) образование пулов инсулинозависимых клеток, в том числе пула подкожных адипоцитов; 3) стимуляция инсулином превращения эндогенно синтезированной из глюкозы С16: 0 *in vivo* пальмитиновой НЖК в  $\phi$ -9 С18: 1 олеиновую МЖК; 4) формирование эффективного олеинового варианта метаболизма ЖК взамен малоэффективного пальмитинового варианта.

При становлении биологической функции локомоции *in vivo* сформировался 3-й уровень регуляции метаболизма: на уровне организма, в структурах НС головного мозга. На ранних ступенях филогенеза ему предшествовала регуляция метаболизма на 1-м аутокринном уровне, на 2-м уровне ПС клеток, органов и систем органов. Две системы регулировали метаболизм только локально; на уровне организма сформировалась 3-я, системная регуляция биологической реакции М  $\leftrightarrow$  М при действии уже не биохимических, а гидродинамических, физических факторов регуляции.

**Артериальное давление в регуляции метаболизма на уровне организма.** На ступенях филогенеза при функциональном совершенствовании органов и систем органов в едином пуле межклеточной среды, в приватизированном «кусочке» третьего мирового океана сформировались и локальные пулы межклеточной среды. Ими стали: 1) пул первичной мочи в каналах ПС нефрона — паракринно регулируемого сообщества клеток; 2) пул спинномозговой жидкости; 3) пул амниотической среды плода при беременности; 4) пул большого круга циркуляции; 5) пул малого (легочного) круга кровообращения.

Все локальные пулы межклеточной среды имеют

свою, филогенетически раннюю гуморальную систему регуляции гидро- и гемодинамики; сформированы эти системы на 2-м уровне регуляции метаболизма, в ПС, органах, системах органов при действии ранних гуморальных медиаторов. Локальную гидродинамику регулируют гуморальные медиаторы с ПС клеток; они формируют биологические реакции компенсации нарушения метаболизма, основанные на биологической реакции эндотелий-зависимой вазодилатации в дистальном отделе артериального русла, в частности тубуло-гломерулярные механизмы обратной связи в ПС нефрона [9]. Шестым локальным пулом межклеточной среды *in vivo* служит локальный пул межклеточной среды глаза.

Варианты регуляции метаболизма при действии гуморальных медиаторов, активации, ингибировании биохимических реакций, реализованы главным образом на 2-м уровне в ПС. Регуляция метаболизма на 2-м, филогенетическом раннем уровне ПС, органов и систем с более высокого 3-го уровня организма реализована при действии главным образом вегетативной нервной системы и факторов гидравлического физического воздействия, коим служит АД.

Повышение АД в проксимальном отделе артериального русла, в артериях эластического типа — физический фактор компенсации метаболизма *in vivo* на 2-м уровне регуляции (в ПС — структурных и функциональных единицах каждого из органов) с 3-го, более высокого уровня регуляции метаболизма, с уровня организма. Иницирует компенсаторную реакцию АД локальное нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  в ПС, которую не в состоянии компенсировать биологическая реакция эндотелий-зависимой вазодилатации. Нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , снижение микроциркуляции *in vivo* фиксируют локальные баро-, хемо- и интеросенсоры в тканях.

На 3-м уровне регуляции *in vivo* рецепторы, выявив локальное нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , всю информацию путём афферентной сигнализации по волокнам вегетативной нервной системы передают прямо в сосудодвигательный центр и ретикулярную формацию головного мозга. Далее по волокнам симпатической нервной системы эфферентно исходит активирующая информация на сердце: а) повысить АД в проксимальном отделе артериального русла; б) увеличить гидродинамическое давление в дистальном отделе артериального русла; в) компенсировать локальное нарушение микроциркуляции в артериолах мышечного типа, что приводит к формированию биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ . Важно понять: если физиологично, локально, в ПС и органах устранить нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  при активности только эндотелий-зависимой вазодилатации на 2-м уровне регуляции метаболизма не получается, следует компенсация с 3-го уровня, с уровня организма. Однако это уже иная, системная компенсация нарушения биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , которая может иметь и нежелательные последствия.

**АД, регуляция метаболизма, биологическая функция эндоекологии, гомеостаза, функции адаптации и трофологии.** Определение АД у пациента

в пределах нормы (физиологичного интервала) дает клиницисту много диагностической информации о биологических функциях и биологических реакциях.

1. АД в пределах 120/80 мм рт. ст. информирует об отсутствии нарушения биологической функции эндоекологии, биологических реакции экскреции и реакции воспаления. Физиологичный уровень АД указывает: а) *in vivo* межклеточная среда не содержит повышенного количества катаболитов и флогенов малой мол. массы; б) тест микроальбуминурия — отрицателен; в) фильтрация через базальную мембрану клубочков, биологическая реакция экскреции не усилена; г) механизмы тубуло-гломерулярной обратной связи в нефроне не активированы, и секреция юкстагломерулярными клетками филогенетически раннего, гуморального медиатора, вазоконстриктора ангиотензина-II не увеличена [10].

2. Физиологичный уровень АД указывает: а) *in vivo* отсутствуют локальные очаги активации биологической реакции воспаления, инициированные эндогенно, не нарушена биологическая реакция  $M \leftrightarrow M$ ; б) содержание в плазме крови С-реактивного белка, определенного высокочувствительным методом, не повышено; как не увеличена в) секреция в ПС клеток семейства провоспалительных цитокинов; г) в крови не накапливаются безлигандные ЛПОНИ, ЛПНИ, иммунные комплексы (ЛП + антитела), и нет активации биологической реакции транцитоза через монослой эндотелия при сборе и утилизации эндогенных флогенов большой мол. массы в интима артерий [11].

3. Нормальный уровень АД представляет информацию о том, что: а) все параметры гомеостаза единого пула межклеточной среды — приватизированного особью «кусочка» третьего мирового океана, сохранены в пределах физиологичных величин, включая концентрацию ионов  $Na^+$ ; б) объем внутрисосудистой среды не превышает размеры внутрисосудистого русла; в) биологическая реакция эндотелий-зависимой вазодилатации, секреция эндотелием вазоконстриктора эндотелина и биодоступность оксида азота (NO), секретированного клетками эндотелия, для гладкомышечных клеток артериол мышечного типа высокая для компенсации локальных нарушений биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , а также поддержания физиологичного уровня гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла [12].

4. АД в пределах физиологичных параметров информирует, что бислойные клеточные структуры на границе единого и локальных пулов межклеточной среды, оптимально проницаемы; транцитоз через функциональные, разграничительные бислои клеток не нарушен [13, 14]. Это касается бислойных клеточных структур: а) эндотелий/подциты в гломерулах нефрона; б) эндотелий/астроциты в пуле спинномозговой жидкости, структуре гематоэнцефалического барьера; эндотелий/трофобласты в плаценте при беременности и бислое, эндотелий/пневмоциты [15, 16] в альвеолах легких.

5. Нормальные цифры АД указывают на физиологичную функцию гуморальных медиаторов, которые секретируют ПС клеток, органы и системы органов,

включая альдостерон, катехоловые амины, тиреоидные гормоны. Биологическая роль альдостерона — поддержание объёма единого пула межклеточной среды, недопущение его уменьшения. Биологическое предназначение альдостерона: гуморальный медиатор формирует условия, при которых особи *Homo sapiens* живут на суше, а все их клетки, как и миллионы лет ранее, функционируют в водах третьего мирового океана [17].

6. Физиологические параметры АД указывают на нормальную концентрацию в плазме крови и межклеточной среде ионов натрия и калия, как и содержание электролитов в цитоплазме клеток, включая активность энергоёмкой  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и отсутствие гипоксии во всех ПС, органах и системах органов [18, 19]. Функциональные взаимоотношения между потребностями организма в энергии для поддержания высокого градиента электролитов на плазматической мембране клеток, образование оптимального количества АТФ в митохондриях обеспечивает доминирование олеинового варианта метаболизма *in vivo* ЖК [20].

7. При нормальном АД адреналин, реализуя *in vivo* биологическую функцию адаптации, биологическую реакцию стресса, не способствует уменьшению объёма сосудистого русла и сохраняет количественные параметры циркулирующей крови [21]. Нормальный уровень АД указывает на физиологические величины периферического сопротивления кровотоку в дистальном отделе артериального русла, на физиологические величины отношения  $\text{NO}/\text{эндотелин}$  в артериолах мышечного типа в биологической реакции эндотелий-зависимой вазодилатации [22].

8. Физиологический уровень АД указывает на отсутствие активной гибели *in vivo* клеток как по типу запрограммированного в геноме апоптоза, так и по типу афизиологического некроза при активации биологической реакции воспаления. Нормальное АД означает отсутствие: а) активированного поглощения эндогенных флогогенов (резидентными) макрофагами при скевенджер-эндоцитозе эндогенных флогогенов; б) выхода из кровотока в ткани моноцитов гематогенного происхождения, которые по градиенту концентрации зазывает специфичный белок хемоаттрактант, секретированный оседлыми макрофагами; в) активации синдрома системной противовоспалительной защиты; г) компенсаторной противовоспалительной защиты; д) неактивную функцию Толл-подобных рецепторов [23], которые различают макромолекулы по принципу «свой — не свой», формируя далее физиологическое состояние биологической реакции системы комплемента и опсонизации эндогенных флогогенов большой мол. массы [24].

9. В условиях физиологического уровня АД активность гормонозависимой липазы в филогенетически ранних висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника физиологична. Освобожденные из ВЖК жирные кислоты в форме НЭЖК в межклеточной среде связывает липид-переносящий белок альбумин и доставляет к клеткам; они окисляют ЖК в митохондриях, нарабатывая при этом физиологическое количество

АТФ. Гепатоциты секретируют олеиновые и пальмитиновые ЛПОНП, которые переносят НЖК + МЖК к инсулинозависимым клеткам.

Если идти от противного, если АД достоверно повышено, первопричиной этого *in vivo* может быть нарушение каждой из приведенных биологических реакций — как по отдельности, так и в составе афизиологических комплексов. И разобраться в причинах повышения АД в проксимальном отделе артериального русла, а далее — в компенсаторном, системном повышении и гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла, в артериолах мышечного типа, в нарушениях биологических реакций и биологических функций не столь просто. Сделать это исследователи, экспериментаторы и клиницисты не смогли.

Первопричина инициации эссенциальной АГ *in vivo* — локальные нарушения биологической реакции  $\text{M} \leftrightarrow \text{M}$ . Происходит это во всех ПС клеток, в органах и системах органов при нарушении регуляции метаболизма на 2-м уровне ПС и органов, когда компенсаторных возможностей биологической реакции эндотелий-зависимой вазодилатации в дистальном отделе артериального русла, артериолах мышечного типа (локальных перистальтических насосах) явно недостаточно для компенсации нарушенной микроциркуляции в одном, нескольких ПС клеток или в органе [25].

В этой ситуации с 3-го уровня организма следует компенсаторная реакция; происходит она путём повышения АД в проксимальном отделе артериального русла. И первично нарушения метаболизма часто становятся причиной вторичного нарушения биологической реакции эндотелий-зависимой вазодилатации, нарушения микроциркуляции. Это даёт основание более обоснованно именовать эссенциальную АГ метаболической артериальной гипертонией.

Напомним, что этиологический фактор заболевания — тот, без которого не происходит развития патологического процесса. В термине «саногенез» [26] мы суммируем все динамичные компенсаторные реакции *in vivo*, которые формируются при афизиологическом воздействии факторов внешней среды; направлены они на восстановление нарушенных внешним воздействием биологических функций и биологических реакций.

**Нарушение *in vivo* биологических функций, биологических реакций и компенсаторное повышение АД с уровня организма.** Филогенетический, этиологический фактор формирования патогенеза метаболической АД — несоответствие механизмов компенсации нарушения биологической реакции  $\text{M} \leftrightarrow \text{M}$  на 2-м и 3-м уровнях регуляции метаболизма. На 2-м уровне биологическая реакция эндотелий-зависимой вазодилатации компенсирует нарушения  $\text{M} \leftrightarrow \text{M}$  локально, в дистальном отделе артериального русла; с 3-го уровня регуляции компенсация локальных нарушений происходит только системно, во всем артериальном русле: вначале в проксимальном отделе, а затем и в дистальном.

И если биологическая реакция эндотелий-

зависимой вазодилатации независимо от этиологического фактора спазмирования артериолы мышечного типа восстанавливает микроциркуляцию локально путём активации вазодилатации, улучшения биодоступности NO для гладкомышечных клеток артериолы, т. е. патогенетично, то с 3-го уровня регуляции метаболизма из сосудодвигательного центра продолговатого мозга следует симпатическая иннервация на сердце. Она означает: микроциркуляцию в спазмированной артериоле восстановить путем «продавливания» за счет повышения гидродинамического давления системно в дистальном отделе русла артерий. Нефизиологичная, непатогенетическая, системная компенсация локально нарушенной биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  и служит основным этиологическим фактором метаболической АГ.

**Нарушение биологической функции эндоэкологии биологической реакции экскреции и компенсаторное повышение АД, метаболическая АГ.** Эксперименты, проведенные на крысах линии Хашимото со спонтанной АГ, можно трактовать так, что повышение содержания эндогенных флогогенов малой и большой мол. массы в плазме крови служит фактором, который инициирует возрастание АД. Вначале АД увеличивается в проксимальном, далее — в дистальном отделе артериального русла [27]. У крыс линии Хашимото дистанционное измерение АД показало: а) при рождении все животные имеют физиологичное АД, как и крысы контрольной линии Вистар-Аоки; б) повышение АД, симптоматика метаболической АГ происходит в возрасте 6—8 нед параллельно повышению в плазме крови и межклеточной среде эндогенных флогогенов малой мол. массы [18].

Относительно локализации патологического процесса *locus minoris resistentia*, причины повышения АД у крыс со спонтанной гипертензией с возраста 6—8 нед и далее постоянно к единому мнению экспериментаторы не пришли. Однако выявлено хроническое повышение у крыс линии Хашимото уровня гломерулярной фильтрации в нефроне. Фильтрация через мембрану клубочков активна; она возрастает пропорционально величине гидростатического давления над мембраной. И временами фильтрация в клубочках превышает возможности пассивной реабсорбции в извитых, проксимальных канальцах нефрона.

В этих условиях реальна потеря части пула межклеточной среды при экскреции с мочой. При длительном, хроническом «замусоривании» межклеточной среды, активации биологической функции эндоэкологии, биологической реакции экскреции на 2-м уровне регуляции метаболизма, в ПС нефрона формируются две компенсаторные реакции. Первая — активация в нефроне тубуло-гломерулярных механизмов обратной связи. Юкстагломерулярные клетки нефрона активируют каскад реакций протеолиза: проренин → ренин → ангиотензин-I → ангиотензин-II. Последний спазмирует афферентную артериолу нефрона так, чтобы фильтрация первичной мочи через мембрану гломерул не превышала возможности пассивной реабсорбции мочи в проксимальных канальцах.

Одновременно секреция альдостерона клубочко-

вой зоной коры надпочечников усиливает реабсорбцию из первичной мочи ионов  $Na^+$ . Гидратная оболочка иона удерживает 7 молекул  $H_2O$ ; так при действии альдостерона вместе с ионами  $Na^+$  в пул межклеточной среды возвращается и вода, сохраняя *in vivo* постоянными размеры единого пула межклеточной среды. Одновременно секреция ядрами гипоталамуса филогенетически ранних гуморальных медиаторов — вазопрессина и окситоцина, реализует аквапорины и выведение воды из самого проксимального отдела нефрона, регулируя, в первую очередь, параметры единого пула межклеточной среды.

Постоянное «замусоривание» среды флогогенами малой мол. массы, повышение АД, увеличение гидростатического давления над мембраной клубочков, усиление биологической реакции экскреции, активация тубуло-гломерулярных механизмов обратной связи — активирует секрецию в клетках нефрона вазоспастического ангиотензина-II. Спазмируя компенсаторно афферентную артериолу в ПС нефрона, медиатор приводит активную фильтрацию в гломерулах в соответствие с пассивной реабсорбцией первичной мочи в проксимальных канальцах. Одновременно ангиотензин-II, спазмируя афферентную артериолу, повышает периферическое сопротивление потоку крови в дистальном отделе артериального русла и понижает в нем гидродинамическое давление крови [28].

И опять симпатическая иннервация с сосудодвигательного центра мозга на сердце, с уровня организма, повысит АД. Это будет продолжаться все время, пока нарушение биологической функции эндоэкологии, биологической реакции экскреции будет поддерживать в межклеточной среде повышенное содержание эндогенных флогогенов малой мол. массы. Можно говорить, что накопление в межклеточной среде биологического «мусора» малой мол. массы при нарушении биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  на 1-м, 2-м уровне активирует компенсаторное увеличение АД с уровня организма [29]. Независимо от того, в каком из ПС или органов *in vivo* локально нарушена биологическая реакция  $M \leftrightarrow M$ , метаболическую АГ инициирует сосудодвигательный центр головного мозга путем активации эфферентной симпатической иннервации сердца как центрального насоса в системе кровообращения. Возможности с 3-го уровня регуляции метаболизма, с НС, воздействовать на раннюю в филогенезе реакцию эндотелийзависимой вазодилатации на 2-м уровне регуляции метаболизма *in vivo* нет.

Повышение периферического сопротивления кровотоку в спазмированных ангиотензином-II афферентных артериолах нефрона инициирует компенсаторную реакцию с 3-го уровня, с уровня организма, из сосудодвигательного центра. Несоответствие локальной компенсации биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  на 2-м уровне, в ПС и почках и системной компенсации с 3-го уровня, с уровня организма, служит причиной длительного нарушения — метаболической АГ и по сути порочного круга с медленным прогрессированием патологического процесса. Естественно, не все звенья в формировании порочного круга при метабо-

лической АД мы знаем; поэтому повышение АД без достаточных на то оснований продолжают рассматривать как результат первичной патологии почек.

**Эндогенные флогогены большой мол. массы, активация биологических реакций воспаления и трансцитоза; реакция АД.** Афизиологичное накопление в крови эндогенных флогогенов большой мол. массы — безлигандных, пальмитиновых ЛПОИП при избыточном содержании в них пальмитиновой НЖК формирует гиперлиппротеинемию (ГЛП). Удалить секретированные гепатоцитами безлигандные ЛПОИП из внутрисосудистой среды можно только путем реализации биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления. Утилизацию эндогенных флогогенов большой мол. массы осуществляют филогенетически ранние оседлые макрофаги; расположены они в интима артерий эластического типа. Необходимо преодолеть монослой эндотелия и осуществить сбор физиологично денатурированных, опсонизированных, безлигандных ЛПОИП путем биологической реакции трансцитоза.

Биологическая реакция трансцитоза — преодоление монослоя эндотелия, возникла далеко не на ранних ступенях филогенеза: при формировании замкнутой системы кровотока — на уровне организма, 3-м на ступенях филогенеза уровне регуляции метаболизма. Поэтому при выраженном накоплении во внутрисосудистом пуле межклеточной среды безлигандных ЛПОИП в ответ на афферентную информацию с интерорецепторов сосудодвигательный центр НС с 3-го уровня инициирует повышение АД и физически активирует трансцитоз (пиноцитоз) безлигандных ЛПОИП через монослой эндотелия в интиму артерий эластического типа [30].

Трансцитоз флогогенов большой мол. массы происходит не через межклеточные промежутки; эндотелиоциты осуществляют пиноцитоз через цитозоль клеток. В биологической реакции трансцитоза суммированы реакции эндоцитоза и экзоцитоза монослоем эндотелия [31]. В биологической реакции трансцитоза задействованы и гуморальные медиаторы, которые регулируют биологическую реакцию  $M \leftrightarrow M$  на аутокринном (клеточном) и уровне ПС клеток и органов. На клеточном уровне в трансцитозе и далее в фагоцитозе задействованы структуры кавеол и кластриновые системы; изменяется локально состав ФЛ (формирование лизофосфатидилхолинов) в плазматической мембране.

Можно полагать, что *in vivo* при замусоривании локального пула внутрисосудистой среды эндогенными флогогенами большой мол. массы регуляция метаболизма с уровня организма активирует биологическую реакцию трансцитоза, выведение флогогенов в интиму артерий путём системного повышения АД в проксимальном и дистальном отделах артериального русла. Повышение АД — реакция компенсации при сборе флогогенов в интима. Далее следует утилизация их при скевнджер-эндоцитозе (фагоцитозе) оседлыми макрофагами в интима артерий. В биологической функции эндоекологии повышение АД служит реакцией компенсации в реализации как биологической

реакции экскреции, так и биологической реакции воспаления.

**Проницаемость бислойных структур клеток на границе локальных пулов межклеточной среды и компенсаторное повышение АД.** Снижение проницаемости бислоя клеток *in vivo* на границе единого и локальных пулов межклеточной среды — основа формирования биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  *in vivo*. В них происходит первичное нарушение реакции метаболизма и далее вторичное изменение гидродинамики в локальных пулах межклеточной среды. Происходит это в пуле первичной мочи, спинномозговой жидкости, в среде амниона. При формировании реакции  $M \leftrightarrow M$  функциональное общение пулов межклеточной среды во многом затруднено нарушением физико-химических параметров бислойной структуры клеток.

Формирование бислоя клеток произошло позже образования замкнутого кровообращения; постоянным, облигатным участником его оказывается монослой эндотелия [32]. Согласно методологическому приему общей биологии, единой технологии становления в филогенезе функциональных систем, компенсаторными реакциями при нарушении проницаемости бислоя с уровня организма из сосудодвигательного центра мозга служат эфферентная симпатическая иннервация сердца, повышение АД в проксимальном отделе, гидродинамического (гидравлического давления) в дистальном отделе артериального русла и активация биологической реакции трансцитоза [33].

Нарушения физико-химических параметров бислойных структур на границе единого и локальных пулов межклеточной среды *in vivo* составляют основу формирования симптоматических форм АГ. И хотя топология нарушения биологической функции  $M \leftrightarrow M$  при симптоматических формах АГ более ясна, чем при метаболической (эссенциальной) АГ, основой ее также оказываются первичные нарушения метаболизма на аутокринном уровне вплоть до гибели клеток; далее следует нарушение микроциркуляции на уровне всего локального пула межклеточной среды.

Компенсаторная реакция с 3-го уровня регуляции метаболизма, с уровня организма, формирует почечную форму АД при патологии бислоя эндотелий/ подоциты клубочков нефрона; легочную форму АГ при нарушении функции бислоя эндотелий/пневмоциты; снижение проницаемости бислоя эндотелий/трофобласты формирует АГ беременных; патологии бислоя эндотелий/астроциты, формирует мозговую форму АГ.

Компенсаторное повышение АД с 3-го уровня регуляции имеет целью восстановить проницаемости бислоя путем системного повышения АД и гидростатически, физически продавить трансцитоз флогогенов одновременно через два монослоя клеток. Добиться этого удается только при существенно более высоких значениях АД, чем при компенсации трансцитоза через монослой эндотелия, например при выведении афизиологичных, безлигандных, пальмитиновых ЛП в интиму артерий. И не почки повышают АД — с позиций филогенетической теории общей патологии

этого быть не может. Это НС головного мозга с 3-го уровня регуляции метаболизма *in vivo* предпринимает последние попытки стимулировать хотя бы остаточную биологическую функцию экскреции, хотя бы минимальную проницаемость бислоя эндотелий/подоциты в клубочках нефронах, иницируя клинические проявления «злокачественной» АГ.

**Биологическая реакция АД компенсирует нарушение биологических функций гомеостаза, трофологии, эндоэкологии и адаптации.** Согласно филогенетической теории общей патологии, если частота нозологической формы неинфекционного заболевания в популяции превышает 5—7%, основу этиологии и патогенеза ее составляет нарушения биологических функций и биологических реакций. И не стоит искать причину в новых генетических маркерах; если они и будут найдены, частота их в популяции не станет выше 0,2% или же роль их в физиологических процессах окажется вспомогательной.

В группе мужчин в возрасте до 40 лет с систолическим АД близким к 140 мм рт. ст. мы, используя современные методы функциональной диагностики и клинической биохимии, не можем пока определить те клинические симптомы, которые бы прояснили этиологические факторы АГ. Тем более мы не располагаем методами, которые позволяют дифференцировать формы АД, сформированные на основе нарушения *in vivo* каждой из биологических функций.

Нарушения биологической функции гомеостаза можно выявить в форме этиологических факторов с целью начать патогенетически обоснованное лечение метаболической АГ как можно раньше. При этом желательно не ингибировать только проявления биологической реакции компенсации — активацию в разных тканях *in vivo* синтеза филогенетически раннего гуморального, вазоспастического медиатора ангиотензина-II. Ингибирование компенсаторной реакции, синтеза ангиотензина-II при метаболической АГ служит для улучшения качества жизни пациентов. Разобраться же желательно в особенностях регуляции тех процессов, которые первыми инициируют нарушения биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  и для компенсации которых и формируется метаболическая АГ.

Нарушения биологической функции трофологии реально выявить при исполнении методов липидологии, в первую очередь уделяя внимание: а) нарушениям метаболизма ЖК; б) спектру позиционных изомеров ТГ; в) физико-химическим нарушениям превращениям апоВ-100 ЛП в крови. Накопление в крови безлигандных, пальмитиновых ЛПОНП и блокада поглощения их клетками — причина компенсаторного, системного повышения АД с целью активировать, в частности, биологическую реакцию транцитоза через монослой эндотелия при сборе флогогенов в интима артерий и последующей утилизации их оседлыми макрофагами *in situ*.

Нарушения биологической функции эндоэкологии предстоит научиться объективно оценивать на основании накопления в межклеточной среде флогогенов малой и большой мол. массы. Делать это желательно до того, как они начнут активировать биологическую

функцию эндоэкологии, биологическую реакцию воспаления и весь комплекс нарушений врожденного и приобретенного иммунитета, до того как замусоривание межклеточной среды спровоцирует компенсаторную реакцию АД с уровня сосудодвигательного центра.

Нарушения биологической функции адаптации можно оценить на основании комплексной оценки содержания минерало- и глюкокортикоидов, катехоламинов, включая фракцию метокси-производных гуморальных медиаторов, концентрации в крови ПНЖК как субстрата для синтеза биологически активных эйкозаноидов, оксида азота и эндотелина, уровня НЭЖК в плазме крови, компенсаторного увеличения в межклеточной среде содержания мочевой кислоты и на основе иных тестов клинической биохимии.

**Эмоциональная АГ — форма метаболической артериальной гипертензии.** В последнее время мало говорят об эмоциональной, стресс-индуцированной АГ. Согласно филогенетической теории общей патологии это нарушение биологической функции эндоэкологии, биологической реакции стресса. И, казалось бы, самое простое — детально оценить секрецию возможно большего числа филогенетически ранних медиаторов. Однако активация секреции стрессорных, гуморальных, симпатомиметических медиаторов — явление кратковременное, а повышение АД становится длительным, порой постоянным. Мы полагаем, стоит обратить внимание на различие понятий «эмоциональная» и «стресс-индуцированная» АГ. Если эмоциональная АГ — это производное краткой симпатической реакции (уменьшение объема артериального русла при неизменном объеме крови в сосудах), то стресс-индуцированная АГ — длительное афизиологичное состояние вне действия симпатической активации.

При формировании биологической реакции стресса последний может быть тепловым, холодным, физическим эмоциональным и т. д., каждая из клеток *in vivo*, реализуя биологическую функцию адаптации, запускает синтез протеинов большого семейства шаперонов [34]. Шапероны — специфичные протеины, функция которых состоит в формировании и сохранении физиологичной третичной и четвертичной структур белков, правильной ассоциации и диссоциации сложных молекул белка. Шапероны синтезируют все клетки, и особенности их функции — нековалентное присоединение к белкам, их физиологичное разделение на фрагменты четвертичной структуры с использованием гидролиза АТФ.

Физиологичная роль белков-шаперонов — в сложных для клеток условиях сохранить третичную и четвертичную структуру (конформацию) биологически важных молекул белка в цитоплазме клеток и в составе органелл. Белки-шапероны с мол массой 65—135 кДа, как «присоски», фиксируют макромолекулы белка, сохраняя в течение всего периода фолдинг макромолекул белка — их третичную и четвертичную структуры. По окончании биологической реакции стресса клетки избавляются от шаперонов, выводя их в межклеточную среду, нарушая параметры био-

логической функции эндозекологии, одновременно биологическую реакцию экскреции и биологическую реакцию воспаления.

Для устранения нарушений биологических реакций экскреции и воспаления с 3-го уровня регуляции метаболизма, с уровня организма сосудодвигательный центр головного мозга инициирует компенсаторное повышение АД. И *in vivo* при формировании психоэмоциональной биологической реакции стресса за каждым инцидентом его тянется длительный шлейф белков-шаперонов. Удалить их из пула межклеточной среды можно только путем одновременной активации биологических реакций экскреции и биологической реакции воспаления. Для одновременной активации биологических функций экскреции шаперонов малой и большой мол. массы симпатическая, эфферентная информация с уровня сосудодвигательного центра, с уровня организма повышает АД системно и в дистальном отделе артериального русла. Эмоциональная форма АД — это сочетанная, компенсаторная активация с уровня головного мозга биологической реакции экскреции и одновременно биологической реакции воспаления. Эмоциональная АГ — это форма метаболической АГ.

**Выяснение патогенеза метаболической АГ на основе способа метабономики — персонализированной дифференциальной диагностики.** Нормальный уровень систолического и диастолического АД, который клиницисты воспринимают, не обсуждая, клиническим биохимикам дает большой объем информации. Нормальный уровень АД исключает функциональные нарушения, подтверждая физиологичное состояние метаболизма, в том числе и биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ . Физиологичный уровень АД подтверждает отсутствие *in vivo* нарушений биологических функций гомеостаза и трофологии, биологических функций эндозекологии (биологических реакций экскреции и воспаления) и адаптации. При метаболической АГ для клинических биохимиков, как и клиницистов, не просто сказать, нарушение какой из четырех биологических функций не устранено локально на 2-м уровне регуляции метаболизма, в ПС клеток и органов и требует компенсаторного (системного?) повышения АД с 3-го уровня регуляции метаболизма, с уровня организма и сосудодвигательного центра головного мозга. Клиническим биохимикам необходимо формировать новые методы диагностики.

Персонализированная диагностика — биологический, методологический подход; основан он на анализе большого объема диагностической, клинко-биохимической информации о различии в филогенезе, об этиологических факторах и определенном единении патогенеза метаболических пандемий, болезней цивилизации [35]. Мы надеемся, что персонализированная диагностика, возможно, не скоро, но позволит дифференцировать в когорте пациентов молодого возраста четыре группы, у которых метаболическая АГ сформирована преимущественно на основе нарушения биологических функций: а) гомеостаза; б) трофологии; в) эндозекологии; г) адаптации [36].

Мы надеемся, что персонализированная диагно-

стика со временем позволит начать лечение пациентов с метаболической АГ не только путем блокады *in vivo* компенсаторных реакций. В процессе патогенетически обоснованного и, вероятно, не идентичного настоящему лечению будет возможно компенсировать первичные нарушения биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , избежать компенсации нарушения биологических функций и биологических реакций с 3-го уровня регуляции метаболизма, с уровня организма, головного мозга; ими могут быть: а) ядра продолговатого мозга; б) нейросекреты гипоталамуса; в) функция ретикулярной формации.

Для реализации подобного метода дифференциальной диагностики форм метаболической АГ, особенностей нарушения биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  медицинским и клиническим биохимикам предстоит отработать новый диагностический метод. Основан он будет на таком способе определения аналитов, как метаболомика (аналитический тандем жидкостной (флуидной) хроматографии небольших по размерам, водорастворимых аналитов (метаболитов и катаболитов) в моче и масс-спектрометрической, количественной и качественной тандемной оценки индивидуальных хроматограмм) [37, 38].

Количество пиков на хроматограмме в способе метаболомики близко к тысяче; дифференцировать их нелегко; в то же время перечень аналитов (метаболитов), которые можно количественно определить, включает все тесты, которые необходимы для дифференцирования четырех форм метаболической АГ. Мы предлагаем при анализе метаболитов и катаболитов в моче дифференцировать не только отдельные пики на хроматограмме, а этиологически, патогенетически сгруппировывать их путем математического моделирования, анализа в диагностически значимые кластеры тестов.

Диагностические кластеры позволят, мы полагаем, охарактеризовать нарушение четырех биологических функций. И пусть в кластерах присутствуют пики, которые еще не идентифицированы и индивидуальное диагностическое значение которых мы пока не знаем. И чем больше пики по числу тестов станут этиологические, патогенетические кластеры форм метаболической АГ, тем дифференциальная диагностика может быть более эффективной. На основании катаболитов и метаболитов в моче можно охарактеризовать и нарушения метаболизма ЖК, липидов и ЛП. Однако для этого необходимо еще работать; дифференциальная диагностика форм метаболической АГ — задача не для одного научного коллектива, не одного научного учреждения; это — эволюционный подход [39]. Да, она трудна, это сочетанное нарушение четырех биологических функций, многих биологических реакций. В то же время, согласно именно сочетанию нарушенных функций, частота метаболической АГ столь высока в популяциях всех развитых страна мира. И в этом программном исследовании сохранения здоровья популяции победит тот коллектив, групповой интеллект которого окажется более глубоким. Успехов нам, коллеги.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5—6, 8—14, 16, 19—24, 29—30, 32—33, 36—38 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз*. М.: ИНФРА-М; 2014.
2. Титов В.Н. *Биологические функции (экзотрофия, гомеостаз, эндоэкология), биологические реакции (экскреция, воспаление, трансцитоз) и патогенез артериальной гипертонии*. М.—Тверь: Триада; 2009.
3. Терешина Е.В., Иваненко С.И. Возрастное ожирение — наследие эволюционного прошлого. *Биохимия*. 2014; 79(7): 739—52.
4. Ткачук В.А., Воротников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. *Сахарный диабет*. 2014; (2): 29—38.
5. Земсков А.М., Земсков В.М., Золоедов В.И., Бжозовский Е. Ассоциативное участие различных систем организма в развитии патологии. *Успехи современной биологии*. 2003; 123(2): 138—46.
15. Чазова И.Е., Мычка В.Б. *Метаболический синдром*. М.: Медиа Медика; 2004.
17. Шхвацбая И.К., Чихладзе Н.М. *Гиперальдостеронизм и артериальная гипертония (диагностика и лечение)*. М.: Медицина; 1984.
18. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. *Первичная гипертония как патология клеточных мембран*. М.: Медицина; 1987.
25. Титов В.Н. Инверсия представлений о биологической роли системы ренин → ангиотензин-II → альдостерон и функции артериального давления как регулятора метаболизма. *Евразийский кардиологический журнал*. 2015; (3): 51—61.
26. Акмаев И.Г., Александров А.С., Алчинова И.Б., Бочаров Е.В., Карганов М.Ю., Крыжановский Г.Н. и др. *Санология*. М.: Наука; 2014.
27. Титов В.Н., Дугин С.Ф. Синдром транслокации, липополисахариды бактерий, нарушения биологических реакций воспаления и артериального давления (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (4): 21—37.
28. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Артериальная гипертония*. М.: ИНФРА-М; 2014.
31. Плескова С.Н., Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Функциональные особенности планарных рафтов и кавеол в клеточной физиологии. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(6): 590—8.
34. Титов В.Н., Крылин В.В. Стресс, белки-шапероны, нарушение биологической функции эндоэкологии и биологических реакций экскреции, воспаления и артериального давления (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (5): 20—36.
35. Мухин Н.А., Фомин В.В. Персонализированная медицина в клинической нефрологии. *Терапевтический архив*. 2012; 84(6): 5—9.
39. Поппер К.Р. *Объективное знание. Эволюционный подход*. М.: Эдиториал УРСС; 2002.
3. Tereshina E.V., Ivanenko S.I. Age-related obesity — a legacy of the evolutionary past. *Biokhimiya*. 2014; 79(7): 739—52. (in Russian)
4. Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V. Molecular mechanisms of resistance to insulin. *Sakharnyy diabet*. 2014; (2): 29—38. (in Russian)
5. Yannoutsos A., Levy B.I., Safar M.E., Slama G., Blacher J. Pathophysiology of hypertension: interactions between macro and microvascular alterations through endothelial dysfunction. *J. Hypertens*. 2014; 32(2): 216—24.
6. Fenyo L.M., Gafencu A.V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunology*. 2013; 218: 1376—84.
7. Zemskov A.M., Zemskov V.M., Zolodov V.I., Bzhovskiy E. Associative participation of the various systems of the body in the development of pathology. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2003; 123(2): 138—46. (in Russian)
8. Lacolley P., Safar M.E., Regnault V., Frohlich E.D. Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2009; 297(5): H1567—75.
9. Crowley S.D., Coffman T.M. The inextricable role of the kidney in hypertension. *J. Clin. Invest*. 2014; 124(6): 2341—7.
10. Virdis A., Neves M.F., Duranti E., Bernini G., Taddei S. Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(13): 2382—9.
11. Schiffrin E.L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin. Sci. (Lond)*. 2014; 126(4): 267—74.
12. Suarez-Alvarez B., Liapis H., Anders H.J. Links between coagulation, inflammation, regeneration, and fibrosis in kidney pathology. *Lab. Invest*. 2016; 96(4): 378—90.
13. Deli M.A., Abraham C., Kataoka Y., Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2005; 25(1): 59—127.
14. Dobrinskikh E., Okamura K., Kopp J.B., Doctor R.B., Blaine J. Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 2014; 306(9): F941—51.
15. Chazova I.E., Mychka V.B. *Metabolic Syndrome [Metabolicheskiy sindrom]*. Moscow: Media Medika; 2004. (in Russian)
16. Morrell N.W., Adnot S., Archer S.L., Dupuis J., Jones P.L., MacLean M.R. et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2009; 54(1 Suppl): S20—31.
17. Shkhvatsebaya I.K., Chikhladze N.M. *Hyperaldosteronism and Hypertension (diagnosis and treatment) [Giperaldosteronizm i arterial'naya gipertoniya (diagnostika i lechenie)]*. Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian)
18. Postnov Yu.V., Orlov S.N. *Primary Hypertension is a Pathological Cell Membranes [Pervichnaya gipertoniya kak patologiya kletochnykh membrane]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
19. Funder J.W. Apparent mineralocorticoid excess. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*. 2016; S0960-0760(16)30056-5.
20. Tenenbaum A., Klempfner R., Fisman E.Z. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Diabetol*. 2014; 13: 159—69.
21. Adler A.J., Taylor F., Martin N., Gottlieb S., Taylor R.S., Ebrahim S. Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane. Database. Syst. Rev*. 2014; (12): CD009217.
22. Safar M.E., Temmar M., Kakou A., Lacolley P., Thornton S.N. Sodium intake and vascular stiffness in hypertension. *Hypertension*. 2009; 54(2): 203—9.
23. Kim F., Pham M., Luttrell I., Bannerman D.D., Tupper J., Thaler J. et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ. Res*. 2007; 100(11): 1589—96.
24. Yin J., Peng Y., Wu J., Wang Y., Yao L. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and  $\beta$ -cell dysfunction. *J. Leukoc. Biol*. 2014; 95(1): 47—52.
25. Titov V.N. inversion of the concept about biological role of renin → angiotensin-II → aldosterone system and function of arterial blood pressure as a metabolism regulator. *Evraziyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2015; (3): 51—61. (in Russian)

REFERENCES

1. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. The Pathogenesis of the Diseases of Civilization. Atherosclerosis. [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez bolezney tsivilizatsii. Ateroskleroz]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
2. Titov V.N. *Biological Functions (exotrophy, homeostasis, endoecology), Biological Reactions (excretion, inflammation, transcytosis) and Pathogenesis of Hypertension [Biologicheskie funktsii (ekzotrofiya, gomeostaz, endoekologiya), biologicheskie reaktsii (ekskretyiya, vospalenie, transstisitoz) i patogenez arterial'noy gipertonii]*. Moscow-Tver': Triada; 2009. (in Russian)

26. Akmaev I.G., Aleksandrov A.S., Alchinova I.B., Bocharov E.V., Karganov M.Yu., Kryzhanovskiy G.N. et al. *Sanology [Sanologiya]*. Moscow: Nauka; 2014. (in Russian)
27. Titov V.N., Dugin S.F. Translocation syndrome, bacterial lipopolysaccharide, inflammation disorders of biological reactions and blood pressure (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (4): 21—37. (in Russian)
28. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. Pathogenesis of Metabolic Pandemics. Hypertension [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Arterial'naya gipertoniya]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
29. Blázquez-Medela A.M., García-Sánchez O., Quirós Y., Blanco-Goza V., Prieto-García L., Sancho-Martínez S.M. et al. Increased Klk9 Urinary Excretion Is Associated to Hypertension-Induced Cardiovascular Damage and Renal Alterations. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(41): e1617.
30. Chu Y., Jiang H., Ju J., Li Y., Gong L., Wang X. et al. A metabolomic study using HPLC-TOF/MS coupled with ingenuity pathway analysis: Intervention effects of *Rhizoma Alismatis* on spontaneous hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; 117: 446—52.
31. Pleskova S.N., Krylov V.N., Deryugina A.V. Features Planar rafts and caveolae in cell physiology. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(6): 590—8. (in Russian)
32. Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010; 468(7323): 562—6.
33. Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C. et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010; 468(7323): 557—61.
34. Titov V.N., Krylin V.V. Stress, chaperone proteins, the biological function of a violation Endoecology and excretion of biological reactions, inflammation and blood pressure (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (5): 20—36. (in Russian)
35. Mukhin N.A., Fomin V.V. Personalized medicine in clinical neurology. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2012; 84(6): 5—9. (in Russian)
36. Launay D., Humbert M., Hachula E. Pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis. *Presse Med.* 2006; 35(12 Pt 2): 1929—37.
37. Zhou C., Li G., Li Y., Gong L., Huang Y., Shi Z. et al. A high-throughput metabolomic approach to explore the regulatory effect of mangiferin on metabolic network disturbances of hyperlipidemia rats. *Mol. Biosyst.* 2015; 11(2): 418—33.
38. Dong H., Zhang A., Sun H., Wang H., Lu X., Wang M. et al. Ingenuity pathways analysis of urine metabolomics phenotypes toxicity of Chuanwu in Wistar rats by UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition methods. *Mol. Biosyst.* 2012; 8(4): 1206—21.
39. Popper K.R. *Objective Knowledge. The Evolutionary Approach. [Ob'ektivnoe znanie. Evolyutsionnyy podkhod]*. Moscow: Editorial URSS; 2002. (in Russian)

Поступила 01.06.16

Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.387.014.8

Ариповский А.В.<sup>1</sup>, Астахова Е.А.<sup>2</sup>, Колесник П.О.<sup>3</sup>, Кулагина Т.Р.<sup>4</sup>, Шушман И.В.<sup>3</sup>, Титов В.Н.<sup>5</sup>

## ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФТОРОПЛАСТОВЫЙ ПОРИСТЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ КОНСЕРВАЦИИ И ПЕРЕСЫЛКИ ПРОБ ПЛАЗМЫ КРОВИ: ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА «СУХОЙ КАПЛИ» С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, г. Оболенск, Московская область;

<sup>2</sup>ВГОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>Ужгородский национальный университет, г. Ужгород, Закарпатская область, Украина;

<sup>4</sup>ФГУН «Институт биофизики клетки» РАН, г. Пущино, Московская область;

<sup>5</sup>ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва

Для консервирования и пересылки по почте проб биологических жидкостей (прежде всего плазмы крови) в аналитическую лабораторию предлагается существенно модифицировать известный метод «сухой капли» крови (DBS, dried blood spot method) за счет использования отечественного фторопластового фильтрующего материала типа МФФК-Г в качестве пористого носителя жидкой биологической пробы. Синтетический материал не содержит химически активных молекулярных фрагментов и обладает вчетверо большей влагоемкостью, чем фильтровальная и хроматографическая бумага. Так, фторопластовый пористый диск массой 15 мг пригоден для нанесения 70—100 мкл (вместо 15—20 мкл) жидкости. Предварительная пропитка такого диска раствором антиоксиданта — 0,5—0,9% 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола в хлороформе — позволяет сильно повысить устойчивость высших полиненасыщенных жирных кислот (ЖК) в нанесенной на диск сухой пробе плазмы или эритроцитарной массы. Время хранения готового диска с сухой пробой на воздухе при комнатной температуре в этом случае возрастает с 3—4 до 35—40 дней, время хранения в морозильной камере — от 50—60 дней до полугода и более. Хранение сухих образцов в герметичных флаконах или виалах, продутых техническим пропан-бутаном, также увеличивает время хранения образцов примерно на порядок. Метод позволяет количественно определять содержание индивидуальных ЖК во фракции этерифицированных и неэтерифицированных ЖК, а также общего и свободного холестерина в пробах биологических жидкостей.

Ключевые слова: жирные кислоты; газовая хроматография; метод сухой капли; атеросклероз; фторопластовая фильтровальная бумага; консервирование биологических жидких проб.

Для корреспонденции: Ариповский Александр Викторович, канд. хим. наук., вед. науч. сотр. ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Россанэпиднадзора РФ, 142279, e-mail: [aripovskiy@rambler.ru](mailto:aripovskiy@rambler.ru)

**Для цитирования:** А.В. Ариповский, Е.А. Астахова, П.О. Колесник, Т.П. Кулагина, И.В. Шушман, В.Н. Титов. Перспективный фторопластовый пористый носитель для консервирования и пересылки проб плазмы крови: применение «метода сухой капли» с целью определения индивидуальных жирных кислот. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 526-536. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-526-536>

Aripovsky A.V.<sup>1</sup>, Astakhova E.A.<sup>2</sup>, Kolesnik P.O.<sup>3</sup>, Kulagina T.P.<sup>4</sup>, Shushman I.V.<sup>3</sup>, Titov V.N.<sup>5</sup>

THE PERSPECTIVE FLUOROPLASTIC POROUS CARRIER FOR CONSERVATION AND TRANSFER OF SAMPLES OF BLOOD PLASMA: APPLICATION OF "DRY DROP" TECHNIQUE WITH THE PURPOSE OF DETECTION OF INDIVIDUAL FATTY ACIDS

<sup>1</sup>The state research center of applied microbiology and biotechnology of the Gossanepidnadzor of Russia, Obolensk, Russia

<sup>2</sup>The I.I. Mechnikov North-Western state medical university of Minzdrav of Russia, 191015 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>The Uzhgorodskii national university, Uzhgorod, Russia

<sup>4</sup>The institute of biophysics of cell of the Russian academy of sciences, Puschino, Russia

<sup>5</sup>The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

*It is proposed for preserving samples of biological fluids (blood plasma first of all) and mailing them to analytical laboratory to significantly modify a well-known technique of "dried blood spot" (DBS) at the expense of application of home-made fluoroplastic filtering material type MFFK-G as a porous carrier of fluid biological sample. The synthetic material contains no chemically active molecular fragments and it has four times greater water capacity than filter and chromatographic paper. Thus, fluoroplastic porous disc of mass of 15 mg is suitable to carrying of 70-100 mkl (instead of 15-20 mkl) of fluid. The preliminary impregnation of such a disc with solution of antioxidant - 0.5% - 0.9% 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol in chloroform - permits to strongly increase stability of higher poly-saturated fatty acids in applied of dry plasma sample or erythrocytic mass on the disc. In that case, time of storage of ready-made disc with dry sample under room temperature increases up to 35-40 days and time of storage in freezer - from 50-60 days to half a year and longer. The storage of dry samples in airtight bottles of vials air-blown with technical propane-butane, also increases time of storage of samples approximately on a degree. This method permits to qualitatively determine content of individual fatty acids in the fraction of etherized and non-etherized fatty acids and also total and free cholesterol in samples of biological fluids.*

**Key words:** *fatty acids; gas chromatography; dried blood spot technique; atherosclerosis; fluoroplastic filter paper; preservation of biological samples*

**For citation:** Aripovsky A.V., Astakhova E.A., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Shushman I.V., Titov V.N. The perspective fluoroplastic porous carrier for conservation and transfer of samples of blood plasma: application of "dry drop" technique with the purpose of detection of individual fatty acids. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9): 526-536. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-526-536>

**For correspondence:** Aripovsky A.V., candidate of chemical sciences, leading researcher. e-mail: [aripovsky@rambler.ru](mailto:aripovsky@rambler.ru)

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

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

Received 01.03.2017  
Accepted 15.03.2017

Более 100 лет назад сформулировано принципиальное положение о том, что атеросклероз является следствием нарушения неких фундаментальных процессов липидного обмена в организме человека или животного. Смысл понятия такого нарушения мог быть очевидным образом сведен к патологическому уменьшению или, наоборот, увеличению концентраций определенных биологически активных соединений из класса липидов: в качестве лабораторно-диагностических маркеров патогенеза поэтому представлялось естественным использование концентрационных параметров липидов, ответственных за патогенез атеросклероза. Практика, однако, показала, что конкретизировать химическую природу таких маркеров — и даже наиболее «информативный» в этом отношении подкласс липидов — совсем не просто!

Лабораторная диагностика стала в некотором смысле заложницей в ходе столкновения различных биохимических представлений и теорий атерогенеза. Но если концепции удавалось менять относительно быстро, легко и безболезненно, то приемы лабораторной диагностики в ходе эволюции постоянно демонстрировали (что естественно для медицинской практики) откровенный консерватизм и ригидность. Не пытаюсь стимулировать дис-

куссию о сильных и слабых сторонах различных теорий этиологии и патогенеза атеросклероза, попробуем оценить, сколь адекватны существующим концепциям применяемые на практике методы клинической диагностики.

Варианты холестериновой теории гласят, что патология вызвана чрезмерным потреблением холестерина (ХС) с пищей или недостаточной скоростью его оттока из тканей. Поэтому в качестве диагностических маркеров используют концентрацию общего ХС в крови или концентрации ХС в составе липопротеинов низкой и высокой плотности, ЛПНП и ЛПВП, ответственных за эффективность переноса этого вещества из печени к клеткам (и обратно).

Более современные концепции связывают процесс развития этой патологии с иными факторами, перечисленными ниже.

1. Атеросклероз вызван избытком алиментарных насыщенных жирных кислот (ЖК) С8—С22, почерпнутых из мясной и жирной молочной пищи (или из гидрогенизированных масел) при недостатке полиненасыщенных ЖК С20—С22. Маркером служит отношение насыщенных и полиненасыщенных ЖК (НЖК и ПНЖК) в плазме крови.

2. Атеросклероз инициирован дефицитом ПНЖК ω<sup>3</sup>-серии на фоне преобладания ПНЖК ω<sup>6</sup>-серии в пи-

ще; следует определять долю  $\omega^3$ -ПНЖК в сумме всех ЖК образца или соотношение ПНЖК  $\omega^6$ - и  $\omega^3$ -серий.

3. Атеросклероз прямым или косвенным образом связан с соотношением основных подклассов липидов в плазме; поэтому следует определять суммарную абсолютную концентрацию неэтерифицированных кислот (НЭЖК), а также содержание конкретных НЖК, мононенасыщенных ЖК (МЖК) и ПНЖК в этой липидной фракции.

Даже если не касаться иных концепций атерогенеза (теория окислительного стресса предполагает контроль параметров перекисного окисления липидов, гормональные теории — определение уровня стероидов и стероидов в плазме крови, теории микроэлементозов — выявление биологически значимых уровней йода, фтора и т.д.), становится очевидным, что современное состояние лабораторной диагностики атерогенеза соответствует приблизительно второму десятилетию XX века, т. е. времени абсолютного доминирования холестериновой теории.

В 2016 г. опубликовано [1] наше представление о том, что активация атерогенеза произошла в тот момент, когда преимущественно травоядный в филогенезе *Homo sapiens* стал потреблять афизиологично много плотоядной, мясной пищи. Филогенетически поздние липопротеины очень низкой плотности травоядных, призванные переносить эндогенные (синтезированные в печени из глюкозы) олеиновые триглицериды (ТГ), не могут столь же физиологично переносить ТГ на основе экзогенной пальмитиновой кислоты — одного из основных жирнокислотных компонентов мясной и молочной пищи.

В рамках всех сколько-нибудь современных концепций атерогенеза наиболее информативными в качестве маркеров патологического процесса представляются уже не параметры холестеринového обмена (общий и свободный холестерин, ЛПНП и ЛПВП), а скорее параметры обмена жирнокислотного — как величины суммарного содержания ТГ или НЭЖК, так и концентрации химически индивидуальных ЖК различных структурных типов.

Весьма вероятно, что в дальнейшем окажутся диагностически востребованными результаты определения концентраций НЖК или МЖК, однако исследования последних десятилетий недвусмысленно свидетельствуют также о важнейшей роли отдельных ПНЖК в процессах возникновения и, наоборот, устранения множества патологических состояний человеческого организма [2—4]. Общеизвестна роль ПНЖК  $\omega^3$ - и  $\omega^6$ -серий в патогенезе и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний и неинфекционных болезней — аутоиммунного ревматоидного артрита, язвенного колита, болезни Крона и нейродегенеративного процесса при болезни Альцгеймера, деменции, депрессии и шизофрении.

Хорошо документированы возможности определения «жирнокислотного статуса» пациентов путем количественного выявления состава ЖК в одной из фракций крови. Подобные исследования выполняются, например, на основе вычисления: а) «омега-3-индекса» [5] — процентного содержания  $\omega^3$ -эйкозапентаеновой

и  $\omega^3$ -докозагексаеновой ПНЖК в сумме ЖК эритроцитарных мембран; б) отношения концентрации  $\omega^6$ -арахидоновой ПНЖК к сумме концентраций  $\omega^3$  — 20:5 и  $\omega^3$  — 22:6 ПНЖК в плазме крови [4, 6].

Этим методом с высокой степенью достоверности могут быть предсказаны риски сердечно-сосудистых заболеваний, острого коронарного синдрома и внезапной смерти, вероятность экламптических осложнений беременности [7], опасность суицидальных попыток, острых психозов и депрессий [8].

В то же время приходится констатировать, что современная медицинская диагностика, повсеместно оперируя маловыразительными параметрами общего липидного состава (концентрации общего ХС, ТГ, ЛПНП и ЛПВП), практически не использует данные о ЖК-составе тех или иных фракций крови. Такое положение представляется тем более удивительным, что в странах Европы и США уже организованы схемы пересылки биологических образцов (авиатранспортом, в глубоко замороженном состоянии) и их хроматографического экспресс-анализа с целью определения концентраций наиболее важных в диагностическом отношении ЖК.

При всей перспективности хроматографического исследования спектра ЖК пациентов следует учитывать и серьезные проблемы этого подхода. Стандартизированные определения ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, ТГ выполняются спектрофотометрически — с использованием сравнительно простых и неприхотливых специализированных приборов, не требующих (в отличие от гораздо более изощренного хроматографического анализа) очень чистых реактивов, сложной пробоподготовки и высокой квалификации лаборантов. И хотя стандартная аппаратура для капиллярной газовой хроматографии никак не может считаться дорогостоящей, ее эксплуатация все же предполагает специальную подготовку операторов, наличия линий очистки газов (гелия, водорода и воздуха), схемы предварительной химической дериватизации липидов биологического образца (перевода жирнокислотных остатков фосфолипидов, ТГ, эфиров ХС в летучие метиловые эфиры ЖК). Поэтому перспективы организации газохроматографических подразделений в клинических лабораториях лечебных учреждений по меньшей мере сомнительны.

В наших условиях значительно более разумной кажется возможность копирования зарубежного опыта, т. е. организация ряда аналитических центров, располагающих соответствующим оборудованием и специалистами нужной квалификации, и эффективной системы транспортировки анализируемых материалов. Подобный вариант оказывается привлекательным еще и потому, что может и не потребовать перевозки глубоко замороженных (в сосудах Дьюара с жидким азотом или сухим льдом) биологических образцов: определение ЖК в фракциях крови требует всего нескольких десятков микролитров исследуемой жидкости, а такие объемы уже можно консервировать и транспортировать «методом сухой капли крови» (DBS, dried blood spot method) [9].

В «каноническом» варианте этого метода каплю

крови (обычно около 10 мг) наносят на диск из фильтровальной или хроматографической бумаги приблизительно того же веса (иногда пропитанный антиоксидантом), сушат на воздухе 0,5—1 ч. После этого образец может в течение некоторого времени храниться и транспортироваться в герметичном сосуде без риска его микробиологической или окислительной деструкции.

Метод «сухой капли» [10—12] достаточно широко применяют биологи и медики как в условиях полевых эпидемиологических работ, так и в ходе лабораторных исследований тех или иных нарушений метаболизма липидов. При использовании этого метода были продемонстрированы: 1) идентичность жирнокислотного состава венозной и капиллярной крови (т. е. анализ такого рода не требует забора крови из вены); 2) возможность прямой переэтерификации липидов высушенной крови непосредственно на диске в ходе химической дериватизации образца — без предварительной экстракции липидов из биологической матрицы; 3) эффективность пропитки исходной хроматографической бумаги раствором антиоксиданта ВНТ (2,6-ди-*t*-бутил-4-гидрокситолуола) перед нанесением биологической жидкости: она позволяет подавить окислительную полимеризацию ПНЖК и уменьшить изменения состава жидкого образца в ходе его хранения.

В то же время в ходе знакомства с литературой по использованию метода DBS для исследования жирнокислотного и липидного состава крови возникает стойкое ощущение некоего его несовершенства и незавершенности: похоже, метод создавался биологами и медиками, а профессиональные химики в этом процессе участия не принимали. Действительно, за все время применения метода ни одним из авторов не были даже сформулированы следующие очевидные вопросы.

Влагоемкость целлюлозной бумаги всех типов велика и редко превышает 50% (т. е. для консервирования 1 мл водного раствора требуется использовать около 1 г бумаги); еще меньше влагоемкость пористого слоя силикагеля на пластине для тонкослойной хроматографии, которые изредка также применяли в методе DBS. В этом состоит один из несомненных недостатков метода, сильно затрудняющий определение состава минорных липидных фракций (например, неэтерифицированных ЖК): слишком мала доза биологического образца, наносимого на диск разумной величины и массы. В то же время среди пористых химических полимеров встречаются материалы с существенно большей влагоемкостью, и их применение могло бы привести к ощутимому увеличению чувствительности хроматографических определений с использованием DBS-метода.

Целлюлоза вырабатывается из древесины, биологического материала, и потенциально может содержать микропримеси не экстрагируемых липидов. Этот факт не имеет ни малейшего значения при использовании метода для контроля микробиологических, токсических, лекарственных загрязнений биологической жидкости, однако оказывается в высшей

степени нежелательным при определении микроколичеств липидов, нанесенных на целлюлозу в составе исследуемого образца.

В ходе прямой (без предварительной экстракции липидов) химической дериватизации образца на диске следует иметь в виду, что целлюлозная основа диска отнюдь не является химически инертной: каждый моносахаридный фрагмент включает гликозидную связь и три свободных гидроксила, т. е. 4 активных группировки, способных участвовать в реакциях метилирования и переэтерификации (требующих [13] обработки исследуемого объекта весьма агрессивными реагентами в достаточно жестких условиях).

Действительно, гликозидные связи разрушаются при действии кислых метилирующих агентов, а гидроксильные группы целлюлозы могут конкурировать с гидроксильными метанола при переводе карбоновых кислот в их сложные эфиры. Необходимое условие количественной дериватизации химического вещества обычно формулируют [13] следующим образом: отношение мольных количеств дериватизирующего реактива и дериватируемого вещества (с учетом числа химически активных группировок в молекуле) не должно быть менее 100 — в этом случае обеспечивается достаточно высокий, превышающий 95% теоретического, выход летучего производного. Несложно подсчитать, что для метилирования липидов в сухом остатке 50 мкл жидкой плазмы крови (типичное содержание липидов — 3—4 г/л) понадобится всего 0,2—0,3 ммоль, т. е. десятки микролитров, дериватирующего реактива. Для метилирования того же остатка в присутствии 50 мг целлюлозной бумаги — уже порядка 100 ммоль, 5—10 мл реактива! Резко увеличенный расход реактивов, разбавление и загрязнение получаемого производного в данном случае обусловлены химическими особенностями материала матрицы: эти недостатки можно считать потенциально устранимыми при условии использования химически инертного пористого носителя пробы.

Пропитка целлюлозного пористого носителя гидрофобным антиоксидантом из истинного раствора в органическом растворителе приведет к кристаллизации антиоксиданта в виде дифференцированных крупных частиц на гидрофильной гидроксильной поверхности носителя. В то же время липиды в плазме крови (не говоря уже о клетках крови) находятся отнюдь не в виде истинного раствора, а в форме устойчивого коллоида, будучи включенными во внутренние полости ЛП. При последовательной пропитке пористого материала водонерастворимым антиоксидантом и плазмой крови частицы антиоксиданта и ЛП на высушенной поверхности окажутся пространственно разобщенными; эффективность антиоксидантного действия в этом случае становится проблематичной. Поэтому интерес вызывают гидрофобные пористые носители с частично гидрофилизованной (для эффективного смачивания водой) поверхностью: в таких объектах можно ожидать гораздо более равномерного распределения антиоксиданта и липида по поверхности твердого носителя.

Пористые синтетические материалы, не содержа-

щие химически активных группировок, используют в химической промышленности во всем мире для фильтрации агрессивных жидкостей, в том числе горячих растворов минеральных кислот и щелочей, окислителей и органических растворителей. Фильтрующие и мембранные материалы такого рода (различной химической природы — полиолефины, полиамиды, полисульфоны, фторопласты) в России выпускает, например, владимирский НТЦ «Владипор» (<http://www.vladipor.ru>); по понятным причинам наиболее перспективными кажутся фторопластовые фильтрующие материалы на основе сополимера тетрафторэтилена и винилидендифторида («полимер Ф42Л»), армированного полипропиленовыми или полиамидными нитями. Гидрофилизированные пористые мембраны этого типа (под маркой МФФК-Г), судя по данным производителя, хорошо смачиваются водными растворами, характеризуются необычно высокой влагоемкостью (до 85%) и химической устойчивостью в отношении кислот, щелочей, спиртов и углеводов — стандартных реагентов для перевода липидов биологических проб в метиловые эфиры ЖК.

В данной работе мы излагаем результаты использования фторопластового фильтрующего материала МФФК-Г в качестве носителя пробы биологической жидкости (БЖ) в методе «сухой капли» вместо традиционной фильтровальной или хроматографической бумаги. Продемонстрирована применимость данного материала для количественного определения индивидуальных компонентов обеих фракций ЖК образца (как общих, так и неэтерифицированных кислот), а также свободного ХС.

*Материал и методы.* В качестве носителя БЖ в методе «сухой капли» использовали материал фильтров МФФК-Г производства НПФ «Владипор» (<http://www.vladipor.ru/catalog/show/&cid=015&id=2>) и образцы фильтровальной бумаги «Ватман», «Фильтрак», «Чёрная лента» разных производителей. В ходе изготовления дисков и при химической дериватизации образцов применяли реагенты реактивной чистоты (производства «Мерк» и «Сигма-Олдрич») — гидроксид и метоксид натрия, метанол, хлороформ, 14% раствор трехфтористого бора в метаноле, бис-*N,O*-(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), 2,6-ди-*t*-бутил-4-метилфенол (ВНТ), пиридин, трисмаргароилглицерин, стигмастерин. Растворители (хлороформ, *n*-гексан, толуол) перед употреблением подвергали перегонке с 20-сантиметровым дефлегматором. Создание инертных атмосфер в сосудах с образцами выполняли с использованием стандартной вакуумной линии (остаточное давление — 1,2 торр).

Хроматографические измерения проводили на аналитическом газовом хроматографе «Вариан 3900»; использовалась 15-метровая кварцевая капиллярная колонка «Супелковакс™ 10» (с внутренним диаметром 0,25 мм) и пламенно-ионизационный детектор. Применяли стандартную температурную программу: от 100°C (задержка 0,5 мин) до 245°C (задержка 10 мин) со скоростью 10°C/мин.

*Приготовление носителей проб (пористых дисков).* Для получения «круглых» дисков стопку фто-

ропластовой фильтровальной бумаги МФФК-Г про-резали хорошо отточенным пробочным сверлом с диаметром 16—18 мм; с тем же успехом бумагу мож-но разрезать на квадраты со стороной около 15 мм. Получаемые таким образом фрагменты полимерного фильтрующего материала площадью 2—2,5 см<sup>2</sup> (для простоты также именуемые далее дисками) характе-ризует масса 12—16 мг; они пригодны для нанесения жидкой пробы объемом до 80—90 мкл. Приготовлен-ные диски помещали в аппарат Сокслета и экстраги-ровали смесью хлороформа и метанола, 3:1, в течение 2 ч, после чего переносили их в сушильный шкаф, удаляя растворитель при 50—60°C.

Все операции с носителями после стадии экстрак-ции выполняли с помощью пинцета, избегая прика-саться к дискам руками. Помещали стопку дисков на стеклофильтр воронки Шотта диаметром 2,5—4 см, смачивали материал избытком 0,1—1% раствора 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола в хлороформе, вакуу-мировали воронку и отжимали диски с помощью сте-клянной пробки соответствующего размера. Сушили диски в вакууме до исчезновения запаха хлороформа, хранили в темном месте в герметично закупоренной посуде (возможно использовать «зип-лок»-пакеты).

*Нанесение жидких биологических проб на носи-тель.* Сухие диски равномерно располагали на теф-лоновой пластинке или полосе тефлоновой пленки, предварительной промытой хлороформом. Использо-вание для этой цели стеклянных, металлических или даже полиэтиленовых поверхностей крайне не-желательно из-за их сравнительно высокой адгезион-ной способности (в этих случаях высушенные диски могут с трудом отделяться от твердой поверхности и даже фрагментироваться).

Пробу консервируемой жидкости наносили в центр диска автоматической пипеткой: фторопласто-вый диск МФФК-Г указанных размеров и массы (око-ло 15 мг) пригоден для нанесения 70–90 мкл жидкой пробы, на целлюлозный носитель той же массы мож-но нанести лишь 15—20 мкл жидкости. Диски суши-ли на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5—2 ч; пробы на целлюлозном носителе полностью высыхают за 20—30 мин, на фторопластовой матрице за — 50—60 мин.

*Хранение образцов в инертной атмосфере.* Для консервирования дисков в инертной атмосфере их помещали в пенициллиновые флаконы, которые уку-поривали стандартным способом; в качестве альтер-нативы могут быть использованы стеклянные виалы с винтовыми крышками и толстыми (не менее 2—3 мм) прокладками из вулканизированного каучука. В лабо-раторных условиях замену воздушной фазы во фла-коне на пропан-бутановую газовую смесь выполняли с помощью обычной вакуумной линии, состоящей из форвакуумного насоса, трехходового крана и камеры со смесью газообразных углеводородов С3—С4 (из баллона или газовой зажигалки). Уплотняющую про-кладку флакона или виалы перфорировали инъекци-онной иглой (с металлической муфтой внешним диа-метром 5 мм или с пластмассовой муфтой, обрезан-ной до того же внешнего диаметра), после чего сосуд

через муфту иглы присоединяли к 3-ходовому крану с помощью вакуумного шланга с внутренним диаметром, равным 3 мм. Систему вакуумировали и заполняли инертным газом (переключением 3-ходового крана), затем иглу из прокладки извлекали.

Приготовление больших массивов сухих образцов в лабораторных условиях может быть выполнено с помощью стандартного вакуум-эксикатора: в каждый из сосудиков вводили — сквозь прокладку — отдельную иглу, всю батарею флаконов помещали в эксикатор (его вакуумировали и заполняли инертной смесью газов описанным выше методом). После снятия крышки эксикатора иглы быстро извлекали.

Для продувки флаконов в полевых условиях может быть использован другой прием. Каучуковую крышку упоренного флакона (виала) с дисками можно проколоть двумя инъекционными иглами, после чего муфту одной из игл (доходящей почти до дна пузырька — в отличие от второй, заглубленной лишь на несколько миллиметров) соединить с соплом горелки стандартной одноразовой газовой зажигалки отрезком эластичной силиконовой трубки с внутренним диаметром 0,8—1,2 мм и толщиной стенки около 1 мм (например, [www.coleparmer.com](http://www.coleparmer.com)). Полностью заряженная газовая зажигалка легко обеспечивает поток газа, равный 50—100 мл/мин. Флакон с пробами продуть потоком инертного газа в течение 3—4 мин.

*Химическая дериватизация сухих проб на дисках с целью определения жирнокислотного состава липидов.* Использована модификация ранее описанного метода [10, 14, 15]. Диск с высушенной на нем пробой биологической жидкости пинцетом помещали в сосудик для работы под давлением (стеклянная пробирка или виала вместимостью 3—5 мл с завинчивающейся крышкой, снабженной самоуплотняющейся тефлоновой — на силиконовой основе — прокладкой), уплотняли стеклянной палочкой. В сосуд добавляли раствор внутреннего стандарта (30—50 мкг трисмаргароилглицерина в 30—50 мкл толуола с добавлением 100—150 мкг антиоксиданта ВНТ), 100 мкл толуола и 300 мкл 0,5 N раствора метоксида натрия в метаноле (может быть заменен таким же объемом 0,5 N метанольного раствора едкого натра) и нагревали в настольном термоблоке или сушильном шкафу в течение 20 мин при 70°C. Охлаждали, прибавляли 400 мкл 14% метанольного раствора трехфтористого бора и снова нагревали 20 мин при 70°C. Повторно охлаждали, прибавляли к смеси 800 мкл н-гексана и 800 мкл дистиллированной воды, встряхиванием экстрагировали метиловые эфиры в органическую фазу и добивались полного разделения водно-спиртовой и органической фаз кратковременным (1—2 мин) центрифугированием в низкооборотной центрифуге. Если полное разделение водно-органической эмульсии при этом не достигалось, к смеси прибавляли каплю 95% этилового спирта и повторяли центрифугирование. В углеводородной фазе хроматографически определяли содержание метиловых эфиров ЖК С14—С24.

*Дериватизация сухих проб при определении свободного ХС и индивидуальных кислот во фракции НЭЖК.* Экстракцию проводили с использованием варианта

метода Фолча [16], дериватизацию — варианта метода Куксиса [17]. Диск с биологическим материалом (сухой остаток 50—100 мкл плазмы крови) помещали в сосуд для работы под давлением, куда добавляли раствор 5—10 мкг свободной маргариновой кислоты и 10—20 мкг стигмастерина (или ситостанола) в 50 мкл толуола, а также 2 мл смеси хлороформа с метанолом, 2: 1, содержащей 2 мг уксусной кислоты.

Нагревали раствор до 60°C, выдерживали в течение 5 мин, потом давали медленно охладиться (30 мин); далее экстракт промывали изотоническим раствором хлористого натрия (0,4 мл), пипеткой отбирали большую часть хлороформного экстракта в виал с герметично завинчивающейся крышкой. Упаривали раствор досуха в вакууме и силанизировали остаток действием смеси 20 мкл пиридина и 30 мкл БСТФА в течение 1 ч при 80°C. Определяли свободный холестерин и неэтерифицированные ЖК в виде триметилсилильных эфиров методом внутреннего стандарта (стандарты — маргариновая кислота для свободных ЖК, стигмастерин или холестеранол — для ХС) после хроматографирования на неполярной метилсиликоновой колонке с пламенно-ионизационным детектированием.

*Результаты и обсуждение. Влагодность матрицы, объем жидкой пробы, чувствительность хроматографического определения.* Результаты определения влагодности (отношения массы воды, впитанной носителем, к массе сырого образца) полимерного материала МФФК-Г вполне согласуются с данными производителя. При нанесении жидкой пробы на диск МФФК-Г, помещенный на не смачиваемую водой поверхность, массовая доля жидкой фазы в полученном образце достигала 84—85% (для материала, отжатого на фильтрующей пластине вакуумированной воронки Шотта, эта величина равна 76—77%). Та же величина для образцов целлюлозной фильтровальной бумаги разных производителей, как правило, составляла 50—55%, не превышая 60% (к этой величине близка влагодность пористого иммобилизованного слоя силикагеля на пластинах для тонкослойной хроматографии).

Таким образом, при пропитке целлюлозной и фторопластовой фильтрующей бумаги водными образцами приходится соблюдать следующие соотношения масс носителя и жидкой фазы: около 1:1 для целлюлозного материала и около 1:5 — для материала синтетического. Небольшой диск МФФК-Г массой 15—20 мг пригоден для нанесения 70—100 мкл крови, плазмы, культуральной среды или иного водного образца. При использовании дисков из целлюлозной бумаги наносимая на диск доза крови или плазмы, как правило, оказывается на порядок меньшей, не превышая 15—20 мкл: в ряде случаев столь малые объемы исследуемого материала ощутимо затрудняют определение минорных жирнокислотных компонентов пробы.

*Взаимозаменяемость носителей для консервирования биологических жидкостей методом «сухой капли».* Выполнено квалифицированное сравнение результатов хроматографического определения ЖК

Таблица 1

**Относительное уменьшение концентрации ПНЖК при хранении сухой плазмы крови на диске и усреднённые относительные погрешности определения индивидуальных ЖК**

Время хранения сухого образца на диске, сут <sup>1</sup>	$[C_t - C_0]/C_0, \%$ <sup>2</sup>					
	ЖК					СУММА С14—С24 ЖК
	$\omega^6$ -18:2	$\omega^6$ -20:3	$\omega^6$ -20:4	$\omega^3$ -22:5	$\omega^3$ -22:6	
0	0	0	0	0	0	0
4	2,1	4	4,5	5	5,1	-1
10	6,5	7,3	7,7	7,4	8,9	-0,7
20	8,1	6,8	15	9,5	12	-1,4
30	7,6	8,0	18	12	11	2,3
40	7,7	8,8	20	16	14	3
100	12	10	32	28	36	3,6
$\Delta^{0,95}/C_0^{cp}$ , погрешность определения ЖК <sup>3</sup>	$4,2 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,7$	$4,5 \pm 1,4$	$9,6 \pm 2,2$	$6,8 \pm 1,3$	$4,2 \pm 1,0$

Примечание. <sup>1</sup> — комнатная температура, антиоксидант отсутствует; <sup>2</sup> — 6 независимых образцов (каждый — в 5 повторах); <sup>3</sup>  $\Delta^{0,95}$  — полуширина доверительного интервала среднего  $C_0$  для надёжности  $p \geq 0,95$ , отнесённая к величине  $C_0^{cp}$  (средние арифметические для 6 независимых образцов, каждый — в 5 повторах).

в одном и том же образце БЖ с использованием различных методов предварительного обезвоживания образца — непосредственной вакуумной сушкой капли жидкости в реакционном сосуде или высушиванием пористых материалов, импрегнированных жидким образцом (целлюлозная фильтровальная бумага, фторопластовая бумага, пластинки для ТСХ с

закрепленным слоем силикагеля). Сравнительное исследование не показывает каких-либо аналитически ощутимых различий: все перечисленные методы при прочих равных условиях приводят к метрологически идентичным результатам; результаты определения неэтерифицированных ЖК, общего и свободного холестерина плазмы с использованием фторопластового

Таблица 2

**Время гарантированной неизменности состава ЖК плазмы крови и эритроцитарной массы (ЭМ) при различных условиях хранения**

Тип образца	Условия хранения	Допустимое время хранения, сут <sup>1</sup>
Камера кельвина, -70°C		
Плазма жидкая (замороженная)	На воздухе, без антиоксиданта ВНТ, доверху заполненные виалы или пробирки Эппендорфа	более 200
ЭМ замороженная	—"	более 200
Плазма высушенная, на диске <sup>2</sup>	На воздухе, без ВНТ	более 200
ЭМ высушенная, на диске <sup>2</sup>	—"	более 200
Морозильная камера, -18°C		
Плазма жидкая (замороженная)	На воздухе, без антиоксиданта ВНТ, доверху заполненные виалы	более 100
ЭМ замороженная	На воздухе, без ВНТ, доверху заполненные виалы	более 100
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	60
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ <sup>3</sup>	более 140
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	50
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	более 140
Комнатная температура (18—22°C)		
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	4
Плазма высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	40
Плазма высушенная, на диске	Без ВНТ в смеси пропан-бутан (пенициллиновые флаконы)	35
Плазма высушенная, на диске	С ВНТ в смеси пропан-бутан (пенициллиновые флаконы)	более 140
Плазма высушенная, на диске	Без ВНТ, в запаянной ампуле (водород + катализатор Pt/C) <sup>4</sup>	более 200
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, без ВНТ	менее 4
ЭМ высушенная, на диске	На воздухе, с ВНТ	30

Примечание. <sup>1</sup> — время хранения образца до достижения условия  $[C_0 - C_t]/C_0 = \Delta^{0,95}/C_0^{cp}$ . Здесь  $[C_0 - C_t]/C_0$  — относительное уменьшение концентрации наиболее чувствительной к окислению ЖК (С20:4 или С22:6),  $\Delta^{0,95}/C_0^{cp}$  — относительная погрешность определения концентрации этой ЖК, т. е. полуширина доверительного интервала среднего  $C_0$  для надёжности  $p \geq 0,95$ , отнесённая к величине  $C_0^{cp}$  (среднее для 6 независимых образцов), см. табл. 1. <sup>2</sup> — диск из фторопластовой бумаги МФФК-Г массой 12—16 мг, 60 мкл БЖ, высушено на воздухе в течение 2 ч. Диски упакованы в полиэтиленовые зип-лок-пакеты, проницаемые для кислорода. <sup>3</sup> — диск предварительно пропитан 0,80% раствором ВНТ в хлороформе (что соответствует нагрузке около 600 мкг антиоксиданта на диск). <sup>4</sup> — остаточное количество газообразного кислорода удалялось за счет связывания водородом в присутствии платинированного угля (10% Pt, 5 мг).

пористого материала также метрологически неотличимы от полученных на классическом целлюлозном носителе.

Одновременно экспериментальная проверка показала, что среди исследованных образцов фильтровальной бумаги самых разных производителей (импортные сорта фильтровальной бумаги «Ватман», «Ферак», отечественные фильтрующие материалы «Черная лента», «Белая лента») приблизительно в 15% случаев встречаются объекты с достаточно высоким — до 0,0005% — содержанием липидов, не экстрагируемых в аппарате Сокслета (в состав таких липидов обычно входят только тривиальные кислоты C16:0, C18:0, C18:1). Данный уровень «фоновых» липидов уже нельзя считать пренебрежительно малым; появление подобных отклонений непредсказуемо, и его вероятность, как показывает опыт, мало зависит от марки исследуемого материала.

*Хранение сухих образцов на фторопластовых дисках.* Термин «консервирование» обычно подразумевает совокупность мер по обеспечению неизменности химического и биохимического состава образца с целью его длительного хранения и транспортировки. Эффективное консервирование должно устранить возможность микробиологической или ферментативной деградации материала (что в обсуждаемом случае достигается обезвоживанием образца) и предотвратить разрушение его лабильных компонентов агрессивными газами атмосферы (кислород, озон, сероводород и т. п.).

Известно, что стабилизации жирнокислотного состава биологических образцов можно достигнуть, эффективно подавляя радикальное окисление и окислительную полимеризацию полиненасыщенных ЖК — результат их взаимодействия с газообразным кислородом, катализируемого ионами металлов переменной валентности. В недавнем обзоре [12] приведена обширная и добросовестная компиляция результатов экспериментальных работ по стабилизации жирнокислотного состава липидов разнообразными методами, среди которых фигурируют хранение образцов при пониженных температурах, введение в образцы жирорастворимых антиоксидантов и комплексонов (описаны даже попытки радикального решения проблемы за счет хранения образцов в запаянных полипропиленовых пакетах или пробирках, продутых чистым азотом).

В то же время результаты работ, касающихся стабильности липидов при различных условиях их консервации, можно назвать чрезвычайно разрозненными и противоречивыми (например, [12, 18—21]), скорее напоминающими чисто качественное описание. Аналитики в практической работе, как правило, руководствуются более строгими критериями, тем более что исследования до сих пор касались преимущественно устойчивости замороженных (а не высушенных) жидких образцов. Потому казалось интересным практическое выяснение вопроса, какие значения температур и концентраций антиоксиданта обеспечивают неизменность жирнокислотного состава жидкой (точнее, замороженной) плазмы и эритроцитарной

массы в ходе 10, 30, 100 дней хранения и как обеспечить неизменность состава тех же образцов при использовании метода «сухой капли» на целлюлозной и фторопластовой бумаге.

В первую очередь следовало бы более корректно определить само понятие «неизменность жирнокислотного состава образца». Многие авторы (например, [19]), констатируя 5—9% уменьшение абсолютной концентрации какой-либо из ПНЖК образца в ходе его хранения, игнорируют тот факт, что определение минорных термолабильных компонентов биологической пробы никогда не бывает абсолютно точным: погрешность выявления ЖК (в зависимости от объема материала, методик дериватизации и хроматографирования) обычно составляет 4—10 отн. %, т. е. регистрируемые изменения могут объясняться обычной погрешностью определения.

В качестве «критерия неизменности состава ЖК биологического образца» при хранении мы предлагаем следующую формулировку. Содержание конкретной ЖК можно считать неизменным к моменту времени  $t$ , если экспериментально определяемая величина ее относительной убыли  $[C_0 - C_t]/C_0$  (где  $C_0$  и  $C_t$  — абсолютные концентрации данной ЖК в начале эксперимента и в момент  $t$  соответственно) не превышает погрешности определения концентрации этой кислоты используемым методом. Погрешность определения считается равной половине доверительного интервала среднего значения определяемой величины (при 95% надежности), отнесенной к абсолютной величине среднего значения.  $[C_0 - C_t]/C_0 \Delta^{0,95}/C_0^{cp}$

В табл. 1 приведены данные о погрешностях определения конкретных ЖК с использованием метода, описанного в экспериментальной части, и о динамике изменения состава плазмы человеческой крови в ходе хранения (DBS-метод на фторопластовой бумаге МФФК-Г в отсутствие антиоксиданта).

В табл. 2 приведены результаты использования данного критерия для оценки сохранности ПНЖК в жидких (замороженных) и сухих образцах плазмы и эритроцитарной массы при разных условиях хранения.

Наиболее надежным методом хранения жидких и сухих образцов любой природы следует признать замораживание в морозильной камере кельвинатора: признаков деградации ПНЖК после длительного хранения при  $-70^\circ\text{C}$  наблюдать не удается даже в отсутствие стабилизирующих добавок антиоксиданта ВНТ.

Чрезвычайно интересным и важным в практическом отношении представлялся вопрос о возможности более или менее длительного хранения дисков с сухими образцами плазмы и эритроцитарной массы при комнатной температуре: решение такой задачи резко упростило бы проведение полевых работ и пересылку образцов.

Экспериментальная проверка показывает, что состав ЖК сухой плазмы или эритроцитарной массы можно считать неизменным после 30—40 дней хранения на воздухе при  $18\text{—}22^\circ\text{C}$  при условии предварительной пропитки дисков 0,8% раствором

антиоксиданта ВНТ в органическом растворителе: это относится ко всем дискам, как целлюлозным, так и фторопластовым (в отсутствие антиоксиданта ПНЖК плазмы крови и эритроцитарной массы подвергаются глубокому окислению уже в течение нескольких дней). Таким образом, появляется техническая возможность пересылки образцов БЖ с целью их последующего жирнокислотного анализа в обычных почтовых письмах или бандеролях.

Очень перспективной (и до сих пор не исследованной сколько-нибудь профессионально) можно считать возможность длительного хранения биологических проб в анаэробных условиях. Литературные указания на низкую эффективность данного метода [21] едва ли можно считать убедительными, поскольку в качестве тары авторы использовали тонкостенные пластиковые пакеты и пробирки: полимерные пленки за редчайшими исключениями легко проницаемы для кислорода, азота и других постоянных газов [22]. Представлялась интересной попытка исключения или сильного замедления диффузии газов сквозь упаковочный материал. Это могло быть достигнуто, например, запаиванием образца в стеклянной ампуле с инертным газом; альтернативный вариант — помещение образца в узкогорлый стеклянный сосуд (виала, пенициллиновый пузырек), герметически укупоренный (с использованием достаточно толстой — не менее 2—3 мм — каучуковой прокладки) и продутый инертным газом. Склонность неполярных газов к диффузии сквозь каучук уменьшается при его вулканизации и резко падает с увеличением эффективного поперечного сечения молекул газа [22]. Можно было полагать, что фреон или даже обычная пропан-бутановая смесь в данном случае окажутся предпочтительнее, чем традиционно используемые для этой цели азот, аргон или углекислота (действительно, количественные измерения подтвердили это предположение). Кроме того, смесь сжиженных углеводородов С<sub>3</sub>—С<sub>4</sub>, в отличие от инертных газов в стандартных баллонах, несложно было бы использовать для создания инертных газовых сред и в полевых условиях.

В атмосфере электролитического водорода, свободного от О<sub>2</sub>, ампулированный образец высушенной на диске плазмы крови действительно не демонстрировал признаков деградации и после весьма длительного хранения (см. табл. 2). В то же время любой из описанных методов продувки пенициллиновых пузырьков технической пропан-бутановой смесью резко увеличивал срок безопасного хранения образца в пузырьке, а комбинация двух различных приемов (т. е. предварительная пропитка диска антиоксидантом и последующее хранение диска в сосудике с газообразным углеводородом) позволила, по-видимому, приблизиться к параметрам стабильности, достигнутым для упомянутого ампулированного образца.

Описанный в экспериментальной части метод консервирования проб в пузырьках, заполненных газообразной смесью пропана с бутаном, не требует лабораторного оборудования и легко может быть использован в отсутствие электроэнергии и в усло-

виях эпидемиологических работ. Даже стандартный пенициллиновый флакон вместимостью около 10 мл пригоден для консервирования 20—30 сухих проб; заполнение нескольких десятков пузырьков данной газовой смесью в лабораторных условиях оказывается простой рутинной процедурой, которая может быть выполнена в течение нескольких минут.

Наиболее сложной задачей неожиданно оказалось поддержание стабильности состава замороженных образцов в ходе их хранения в морозильной камере при –18°C. Воспроизводимость результатов в этом случае чрезвычайно часто оказывалась совершенно неудовлетворительной. Квалифицированное исследование данного вопроса привело к нетривиальному выводу: сохранность ПНЖК в замороженных образцах БЖ сильнейшим образом зависела не только от герметичности сосуда, но и от соотношения объемов жидкой (замороженной) и воздушной фаз в пузырьке: низкая (10—15%) степень заполнения сосуда замороженной БЖ — причина сравнительно быстрой (30—60 дней) деградации биологического образца. Одновременно замораживание жидкостей в пенициллиновых пузырьках или узкогорлых виалах различной вместимости, заполненных «до сужения горлышка» (на 95%) и плотно укупоренных с использованием прокладок большой толщины (≥2 мм), позволяет многократно увеличить срок безопасного хранения образцов даже без использования добавок антиоксиданта.

В остальном же результаты экспериментов по длительному хранению фракций крови в условиях морозильной камеры были близкими к описанным [20, 21]. Действительно, введение небольших концентраций антиоксиданта позволяло надолго устранить окисление ПНЖК в плазме (см. табл. 2) при –18°C. Применение морозильной камеры можно рекомендовать как метод 3—4-месячного хранения высушенных на дисках фракций крови при условии введения в каждый образец антиоксиданта ВНТ в количестве 100—250% суммарного содержания липидов в этом образце: для метода «сухой капли» это отвечает предварительной пропитке диска 0,3—0,8% раствором ВНТ в спирте или хлороформе. Замороженные жидкие образцы при соблюдении указанного условия о полном заполнении сосудов оказываются заметно менее чувствительными к окислительной деградации, по сравнению с сухими образцами на дисках.

Практическое использование этих результатов, видимо, позволит устранить основные препятствия к широкому использованию хроматографического определения как общих, так и неэтерифицированных ЖК (а также свободного холестерина) в практике клинической диагностики.

Если некая лаборатория (опытное производство) будет производить и рассылать достаточное количество дисков из фторопластовой фильтрующей бумаги, несложно отработать систему почтовой пересылки (в обычных бумажных конвертах) приготовленных и высушенных образцов — с нанесенными на диски пробами плазмы, крови, эритроцитарной

массы и других БЖ — в аналитические лаборатории: ведь устойчивость ПНЖК в сухих пробах теперь не вступает в противоречие с типичным для России временем доставки почтовых отправок (10—15 дней).

Время диктует новые идеи и предлагает новые методы диагностики. Может быть, и в самом деле пора объединить идеи и усилия для разработки методов профилактики и ранней диагностики метаболических пандемий — атеросклероза и атероматоза, метаболической артериальной гипертензии, метаболического синдрома, ожирения, неалкогольной жировой дистрофии печени, синдрома инсулинорезистентности и эндогенной гиперурикемии?

#### Выводы

1. Использование отечественной фторопластовой бумаги типа МФФК-Г (фильтрующий материал для химически агрессивных жидкостей) в качестве носителя проб высушенных биологических жидкостей в методе «сухой капли» оказывается в высшей степени перспективным (в сравнении с применением традиционной целлюлозной бумаги), сильно облегчая хроматографическое определение индивидуальных общих и неэтерифицированных ЖК, общего и свободного холестерина.

2. Очевидные преимущества полимерного пористого материала такого типа — резко повышенная влагоемкость (позволяющая вчетверо увеличить объем наносимой пробы), полное отсутствие примесных липидов и химически активных функциональных групп, способных к взаимодействию с дериватирующими реактивами в процессе перевода липидов в метиловые эфиры жирных кислот.

3. Высшие ПНЖК биологических жидкостей в методе «сухой капли» на фторопластовой бумаге, импрегнированной антиоксидантом, не подвергаются аналитически фиксируемому окислительному изменению на протяжении 35—40 дней (комнатная температура, на воздухе).

4. Представляется вполне реальным не только приготовление достаточно стабильных проб (как в лабораторных, так и в полевых условиях), но и пересылка подобных проб в обычных почтовых письмах для последующего определения индивидуальных ЖК в аналитических лабораториях.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—5; 7—13; 15—21 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н., Эмануэль В.Л. Патогенез атеросклероза активирован, когда филогенетически травоядные животные начинают в избытке поедать мясную (плотоядную) пищу. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 553.
6. Титов В.Н., Ариповский А.В., Каба С.И., Колесник П.О., Веждед М.И., Ширяева Ю.К. Индивидуальные жирные кислоты в плазме крови, эритроцитах и липопротеинах. Сравнение результатов больных ишемической болезнью сердца и добровольцев. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 7: 3—8.
14. Ариповский А.В., Колесник О.П., Веждед М.И., Титов В.Н.

Метод подготовки проб для хроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3—6.

22. Рейтлингер С.А. *Проницаемость полимерных материалов*. М.: «Химия»; 1974.

#### REFERENCES

1. Titov V.N., Emanuel V.L. The pathogenesis of atherosclerosis is activated when phylogenetical herbivores start to eat meat in excess (carnivorous) food. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 553. (in Russian)
2. Galli C., Calder P.C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann. Nutr. Metab.* 2009; 55: 123—39.
3. Simopoulos A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 70: 560—9.
4. Masood A., Stark K.D., Salem N. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J. Lipid Res.* 2005; 46: 2299—305.
5. Harris W.S., von Schacky C. The omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease. *Preventive Medicine*. 2004; 39: 212—20.
6. Titov V.N., Aripovskiy A.V., Kaba S.I., Kolesnik P.O., Vezhdel M.I., Shiryaeva J.K. Individual fatty acids in plasma, erythrocytes and lipoproteins. Comparison of the results of coronary heart disease patients and volunteers. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 7: 3—8. (in Russian)
7. Lorentzen B., Drevon C.A., Endersen M.J., Henriksen T. Fatty acid pattern of esterified and free fatty acids in sera of women with normal and pre-eclamptic pregnancy. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 1995; 102(7): 530—7.
8. Colin A., Reggers J., Castronovo V., Ansseau M. Lipids, depression and suicide (review). *Encephale*. 2003; 29(1): 49—58.
9. Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Hirtz C. Current and future use of «dried blood spot» analysis in clinical chemistry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(10): 1897—1909.
10. Bailey-Hall E., Nelson E.B., Ryan A.S. Validation of rapid measure of blood PUFA levels in humans. *Lipids*. 2008; 43(2): 181—6.
11. Crowe F.L., Skeaff C.M., Green T.J., Gray A.P. Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predicts serum cholesterol concentrations in population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(4): 887—9.
12. Metherel A.H., Stark K.D. A stability of blood fatty acids during storage and potential mechanisms of degradation: a review. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2016; 104: 33—43.
13. Knapp D.R. *Handbook of analytical derivatization reactions*. «A Wiley-Interscience publication»; 1979.
14. Aripovskiy A.V., Kolesnik O.P., Vezhdel M.I., Titov V.N. Method of preparing samples for the chromatographic determination of the fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3—6. (in Russian)
15. Marangoni F., Colombo C., Galli C. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip of humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Anal. Biochem.* 2004; 326(2): 267—72.
16. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497—509.
17. Kuksis A., Myher J.J., Marai L., Geher K. Estimation of plasma free fatty acids as the trimethylsilyl (TMS) esters. *Anal. Biochem.* 1976; 70(2): 302—12.
18. Min Y., Ghebremeskel K., Geppert J., Khalil F. Effect of storage temperature and length on fatty acid composition of fingertip blood collected on filter paper. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2011; 84(1-2): 13—8.
19. Bell J.G., Mackinlay E.E., Dick J.R., Younger I., Lands B. Using a fingertip whole blood sample for rapid fatty acid measurement: method validation and correction with erythrocyte polar

- lipid composition in UK subjects. *Brit. J. Nutr.* 2011; 106(9): 1408—15.
20. Otto S.J., van Drongelen M.M., van Houwelingen A.C., Hornstra G. Effect of storage of venous and capillary blood samples — the influence of deferoxamine and butylated hydroxytoluene on the fatty acid alterations in red-blood-cell phospholipids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997; 35: 907—13.
21. Metherel A.H., Hogg R.C., Buzikievich L.M., Stark K.D., Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dry blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids Health Dis.*, 12: 22. Published on-line, 2013, Feb 20, doi: 10.1186/1476-511X-12-22.
22. Reytlinger S.A. *The permeability of the polymeric materials. [Pronizae-most' polimernykh materialov]*. Moscow: Khimiya; 1974. (in Russian)

Поступила 01.03.17

Принята к печати 15.03.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.61-006.04-078.33:578.2.08

Герштейн Е.С.<sup>1</sup>, Колпаков А.В.<sup>1</sup>, Бежанова С.Д.<sup>1</sup>, Морозов А.А.<sup>2</sup>, Алфёров А.А.<sup>1</sup>, Огнерубов Н.А.<sup>3</sup>, Казанцева И.А.<sup>2</sup>, Кушлинский Н.Е.<sup>1</sup>

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ 1-ГО И 2-ГО ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва, Россия

<sup>3</sup>Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, 392000, Тамбов, Россия

*Успехи в лечении рака почки связаны с использованием антиангиогенных препаратов, поэтому изучение и поиск новых молекулярных маркеров, характеризующих его ангиогенную активность, не теряет актуальности. Цель настоящего исследования — сравнительная оценка содержания VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями новообразований. Обследованы 94 больных раком и 10 больных доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 80 человек. Концентрацию исследуемых белков определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Quantikine® (R&D Systems, США). Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных раком почки было достоверно выше, чем в группе контроля. Уровень VEGF также был повышен у больных доброкачественными опухолями. При пороговом уровне VEGF, равном 365 пг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 67%, специфичность — 70%. Со стадией заболевания и индексами T и N положительно коррелировал только уровень VEGFR1. Взаимосвязь уровня маркеров с гистологическим строением и степенью дифференцировки рака почки не установлена. Таким образом, VEGF и его рецепторы имеют ограниченное диагностическое значение при раке почки, но могут быть использованы для мониторинга и прогноза эффективности антиангиогенной терапии.*

**Ключевые слова:** рак почки; VEGF; VEGFR1; VEGFR2; сыворотка крови; диагностические характеристики.

**Для цитирования:** Герштейн Е.С., Колпаков А.В., Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алфёров А.А.<sup>1</sup>, Огнерубов Н.А., Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(9): 536-541. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-536-541>

Gershtein E.S.<sup>1</sup>, Kolpakov A.V.<sup>1</sup>, Bezhanova S.D.<sup>1</sup>, Morozov A.A.<sup>2</sup>, Alferov A.A.<sup>1</sup>, Ognerubov N.A.<sup>3</sup>, Kazantseva I.A.<sup>2</sup>, Kushlinskiy N.E.<sup>1</sup>

THE GROWTH FACTOR OF ENDOTHELIUM OF VESSELS AND ITS RECEPTORS TYPE I AND II IN BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER: CLINICAL MORPHOLOGICAL CORRELATIONS

<sup>1</sup>The N.N. Blokhin Russian oncological center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The M.F. Vladimirkii Moscow oblast research clinical institute, 129110 Moscow, Russia

<sup>3</sup>The G.R. Derjavina Tambovskii state university, 392000 Tambov, Russia

*The progress in treatment of kidney cancer is related to application of anti-angiogenic medications. Therefore, investigation and searching for new molecular markers characterizing its angiogenic activity is actual still. The purpose of study is to compare VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in blood serum of healthy people, patients with cancer and benign tumors of kidney and to analyze their relationship with main clinical morphological characteristics of neoplasms. The study sampling consisted of 94 patients with cancer and 10 patients with benign tumors of kidney. The control group included 80 individuals. The concentration of analyzed proteins was determined using QuantikineT (R&D Systems, USA), a reagents' kit for direct immune enzyme analysis. The content of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in blood serum of patients with cancer of kidney was reliably higher than in control group. The level of VEGF also was increased in patients with benign tumors. Under threshold level of VEGF of 365 pg/ml the diagnostic sensitivity of detection of primary cancer of kidney amounted to 67% and specificity - 70%. The stage of disease and T and N*

*indices were correlated only with VEGFR1 level. The relationship between level of markers and histological structure and degree of differentiation of cancer of kidney was not established. Therefore, VEGF and its receptors have a limited diagnostic value under cancer of kidney but they can be applied for monitoring and prognosis of efficiency of anti-angiogenic therapy.*

**Key words:** *cancer of kidney; VEGF; VEGFR1; VEGFR2; blood serum; diagnostic characteristics.*

**For citation:** *Gershtein E.S., Kolpakov A.V., Bezhanova S.D., Morozov A.A., Alferov A.A., Ognerubov N.A., Kazantseva I.A., Kushlinskii N.E. The growth factor of endothelium of vessels and its receptors type I and II in blood serum in patients with kidney cancer: clinical morphological correlations. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 536-541. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-536-541>*

**For correspondence:** *Gershtein E.S., doctor of biological sciences, professor, leading researcher of the laboratory of clinical biochemistry. e-mail: [esgershtein@gmail.com](mailto:esgershtein@gmail.com)*

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

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

Received 03.05.2017  
Accepted 15.05.2017

**Введение.** Рак почки занимает 3-е место среди опухолей мочеполовой системы и составляет около 3% всех злокачественных новообразований взрослого населения в России и во всем мире. Долгое практически бессимптомное течение становится причиной поздней диагностики рака почки: около 40% пациентов на момент постановки диагноза имеют большую первичную опухоль или отдаленные метастазы. К сожалению, после хирургического лечения метастазы развиваются и у 30% больных локализованным почечно-клеточным раком, а возможности адъювантного терапевтического лечения опухолей почки до недавнего времени были ограничены их низкой чувствительностью к стандартной химио- и лучевой терапии.

Успехи в лечении рака почки, в первую очередь, его наиболее распространенного светлоклеточного варианта, достигнутые в последние годы, связаны с использованием антиангиогенных препаратов, ингибирующих активность тирозинкиназных рецепторов факторов роста, вовлеченных в процесс ангиогенеза [1, 2]. Теоретической предпосылкой для применения этих препаратов у больных светлоклеточным раком почки стал тот факт, что ключевую роль в этиологии данного заболевания играет инактивирующая мутация в гене опухоль-супрессорного белка VHL, тесно связанного с гипоксическим фактором HIF-1 $\alpha$  и индукцией ангиогенеза [3]. Однако, несмотря на значительные успехи антиангиогенной терапии рака почки, многие вопросы, связанные с диагностикой, прогнозом заболевания и эффективности лечения, до настоящего времени не решены [4–6]. В связи с этим изучение и поиск новых молекулярных маркеров рака почки, в первую очередь, показателей, связанных с его ангиогенной активностью, по-прежнему актуальны.

В регуляции ангиогенеза участвуют многие известные факторы роста и цитокины, такие как основные и кислые факторы роста фибробластов, эпидермальный фактор роста,  $\alpha$ - и  $\beta$ -трансформирующие факторы роста, тромбобитарный фактор роста эндотелиальных клеток/тимидинфосфорилаза, фактор некроза опухолей, интерлейкины и др. Однако важнейшим положительным регулятором ангиогенеза бесспорно служит фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF).

Экспериментальные исследования показали, что VEGF — индуктор роста клеток эндотелия — увеличивает проницаемость сосудов и, по-видимому, участвует в поддержании выживаемости эндотелиальных клеток *in vivo* и *in vitro*. Биологические эффекты VEGF опосредованы специфическими мембранными рецепторами,

принадлежащими к классу рецепторных тирозинкиназ.

Известно, что в регуляции опухолевого ангиогенеза принимают участие два типа рецепторов VEGF — VEGFR1/Flt-1 и VEGFR2/Flk-1/KDR, биологическая роль которых, по-видимому, различна. VEGFR1 индуцирует протеазную активность в эндотелиальных клетках и стимулирует миграцию в опухолевую ткань макрофагов, а VEGFR2 вызывает дифференцировку, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов. Ряд фактов указывает на то, что VEGF обладает не только проангиогенной активностью, но может и непосредственно участвовать в ауто/паракринной регуляции пролиферации опухолевых клеток, воздействуя на соответствующие рецепторы, находящиеся на их мембранах [7].

Результаты клинико-лабораторных исследований свидетельствуют о роли VEGF в развитии рака почки и неблагоприятном прогностическом значении высокой тканевой экспрессии этого белка [6, 8, 9]. Роль и происхождение растворимых форм рецепторов VEGF, циркулирующих в периферической крови в норме и при различных патологических состояниях, до конца не изучены. Возможно, эти молекулы являются природными антагонистами VEGF и противодействуют его ангиогенной активности. В целом данные литературы о клиническом значении уровня VEGF и его рецепторов в физиологических жидкостях и тканях больных раком почки остаются противоречивыми [10–13].

Цель данного исследования — сравнительная оценка содержания VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

**Материал и методы.** Обследованы 94 больных раком почки (54 мужчины и 40 женщин) в возрасте от 29—81 лет (медиана — 59 лет) и 10 больных доброкачественными новообразованиями почки (3 мужчины и 7 женщин) в возрасте 42—84 лет (медиана — 60 лет). У всех больных рак почки подтвержден данными гистологического исследования удаленной хирургическим методом первичной опухоли и ее метастазов согласно «Новой классификации опухолей урогенитальной системы Всемирной организации здравоохранения 2016 г.» [14]. По гистологическому строению большинство злокачественных опухолей почки представляли собой светлоклеточный почечно-клеточный рак (78/82,9%), хромобластный почечно-клеточный рак выявлен в 7/7,5%, папиллярный почечно-клеточный рак — в 9/9,6%.

У 53 пациентов почечно-клеточный рак выявлен в I

Таблица 1

**Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных опухолями почки и группы контроля**

Обследованные группы	n	VEGF, пг/мл	VEGFR1, пг/мл	VEGFR2, пг/мл
Больные первичным раком почки (группа 1)	94	510 285—857	104 80,5—131	13,4 9,0—16,9
Больные доброкачественными опухолями почки (группа 2)	10	474 355—573	96,2 70,2—120	12,4 8,4—16,2
Контроль (К)	80	272 179—423	83,0 54,1—112	10,6 8,3—13,6
p		$p_{1vsK} < 0,00001$ $p_{2vsK} < 0,05$	$p_{1vsK} < 0,01$	$p_{1vsK} < 0,01$

стадии, у 10 — во II стадии, у 15 — в III стадии и у 16 пациентов — в IV стадии.

В контрольную группу вошли 80 практически здоровых доноров (27 мужчин и 53 женщины) в возрасте 19—77 лет (медиана — 42 года). Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Концентрацию исследуемых белков в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа «Human VEGF Immunoassay», «Human VEGFR1 Immunoassay», «Human VEGFR2 Immunoassay» (Quantikine®, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

У 24 больных раком почки также определяли содержание VEGF в опухоли и гистологически неизменной паренхиме почки. Для проведения иммуноферментного анализа образцы тканей лизировали, как описано ранее [12, 15]. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна—Уитни и Краскела—Уолисса, проведение ROC-анализа, тест корреляции рангов Спирмена. Статистически значимым считали уровень  $p < 0,05$ . Во всех таблицах представлены показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей.

**Результаты.** Содержание всех исследованных маркеров (VEGF, VEGFR1, VEGFR2) в сыворотке крови первичных больных раком почки было достоверно повышено по сравнению с контрольной группой. Содержание VEGF, но не его рецепторов, достоверно превышало показатели контрольной группы также и у больных доброкачественными новообразованиями почки (табл. 1).

В связи с тем, что процессы физиологического ангиогенеза связаны с полом и возрастом, перед проведением дальнейшего анализа важно отметить, что в обследованной нами группе больных новообразованиями почки никакого влияния пола и возраста на

уровни исследуемых маркеров не обнаружено. В то же время у женщин группы контроля уровень VEGFR1 достоверно отрицательно коррелировал с возрастом ( $R = -0,62$ ;  $p = 0,006$ ).

Наиболее выраженное увеличение сывороточной концентрации по сравнению с контрольной группой обнаружено для VEGF у больных почечно-клеточным раком — его медианный уровень у больных первичным раком почки был в 1,9 раза выше, чем в контрольной группе (см. табл. 1). Для VEGFR1 и VEGFR2 превышение составляло всего около 25%. Таким образом, единственным потенциальным серологическим маркером среди исследованных показателей активности ангиогенеза служит VEGF.

В табл. 2 представлены диагностические характеристики различных пороговых уровней VEGF по отношению к первичным злокачественным и доброкачественным опухолям почки. В качестве возможных пороговых уровней были выбраны показатели 95% доверительного интервала (ДИ), верхнего квартиля и 90% персентиля нормы.

Наилучшее соотношение чувствительности (67%) и специфичности (70%) отмечено при пороговом уровне VEGF 365 пг/мл, соответствующем 95% ДИ среднего показателя контрольной группы. Однако данный пороговый уровень превышен также у 70% больных доброкачественными опухолями почки, т.е. специфичность по отношению к этому «патологическому» контролю составляет всего 30%.

Таким образом, проведенный анализ продемонстрировал, с одной стороны, значительное увеличение концентрации трех маркеров ангиогенеза в сыворотке крови больных не только злокачественными, но и доброкачественными новообразованиями почки. С другой стороны, специфичность их повышения недостаточна для использования данных маркеров в диагностических целях. Однако можно предполагать, что изучаемые маркеры, в первую очередь VEGF, могут быть полезны для мониторинга больных, получающих антиангиогенные препараты, а также для прогноза чувствительности к такому лечению [16, 17].

В связи с этим значительный интерес представляло выяснение вопроса о том, в какой мере изменение концентрации VEGF в периферической крови отражает процессы, происходящие в ткани опухоли. Нам удалось

Таблица 2

**Чувствительность и специфичность VEGF (пг/мл) в качестве серологического маркера новообразований почки (%)**

Обследованные группы	Чувствительность		
	VEGF > 644 пг/мл (90%)	VEGF > 423 пг/мл (75%)	VEGF > 365 пг/мл (95%ДИ)
Больные первичным раком почки	41	62	67
Больные доброкачественными опухолями почки	20	60	70
	Специфичность		
«Рак — зло- ровые»	90	80	70

Таблица 3

Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных первичным раком почки в зависимости от показателей распространенности опухолевого процесса

Показатель распространности	n	VEGF, пг/мл	VEGFR1, пг/мл	VEGFR2, пг/мл
Стадия				
I	53	511 266—823	101 74,2—114	11,2 8,6—23,2
II	10	481 285—508	110 93,2—115	15,5 7,6—18,3
III	15	835 243—653	123 89,1—165	13,5 11,1—16,6
IV	16	549 300—1082	131 95,3—151	13,8 11,3—16,8
p		$p_{I,II,III} = 0,0005$ $p_{IV,III} = 0,01$	$p_{I,II,III,IV} < 0,05$	$p > 0,05$
Распространенность опухоли (T)				
T <sub>1</sub>	49	555 292—839	101 75,7—110	13,9 9,6—18,3
T <sub>2</sub>	17	494 325—815	115 95,6—144	13,5 11,7—18,1
T <sub>3</sub>	25	523 221—996	123 95,3—165	12,2 8,3—14,5
T <sub>4</sub>	3	269 244—371	72 59,6—89,8	11,4 7,4—14,9
p		$p > 0,05$	$p_{T_{3,4}} = 0,002$	$p > 0,05$
Метаастазы в лимфатических узлах (N)				
N <sub>0</sub>	78	529 292—857	104 83,0—125	13,4 9,6—17,8
N <sub>1</sub>	8	419 244—450	83,7 60,5—168	13,9 10,9—14,5
N <sub>2</sub>	8	563 276—948	143 107—208	10,1 6,4—14,6
p		$> 0,05$	$p_{N_{2,1}} = 0,03$	$p_{N_{2,0}} = 0,11$
Отдаленные метастазы (M)				
M <sub>0</sub>	84	510 266—839	105 83,7—130	13,1 8,9—16,8
M+	10	522 300—1081	119 75,8—168	14,2 11,3—18,1
p		$> 0,1$	$> 0,1$	$> 0,1$

определить содержание VEGF в цитозолях опухоли и гистологически неизменной паренхиме почки у 24 обследованных больных почечно-клеточным раком. Как и в проведенном нами ранее пилотном исследовании [12,

15], уровень VEGF был достоверно и значительно повышен в опухолях 96% (23/24) пациентов по сравнению с гомологичной нормальной тканью почки (11,1—1692 пг/мг белка, медиана — 611 пг/мг белка и 9,1—11 пг/мг белка, медиана — 48,4 пг/мг белка соответственно;  $p < 0,0001$ ). Однако статистически значимой корреляции концентрации VEGF в сыворотке крови и ткани опухоли не обнаружено ( $R = 0,33$ ;  $p > 0,1$ ). Следовательно, как и при изучении большинства биологических маркеров, следует признать, что уровень VEGF в периферической крови является результирующей различных процессов, а не только его продукции тканью опухоли.

Следует отметить, что уровни VEGF и VEGFR1 в сыворотке крови больных раком почки слабо, но достоверно положительно коррелировали ( $R = 0,28$ ;  $p = 0,006$ ), в то время как в контрольной группе такая корреляция отсутствовала, но была выявлена положительная взаимосвязь между уровнями VEGFR1 и VEGFR2 ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,019$ ). Таким образом, можно высказать предположение об изменении взаимосвязей между различными показателями активности ангиогенеза у больных раком почки.

На следующем этапе исследования проведен анализ соотношения уровней VEGF и его рецепторов в сыворотке крови с основными показателями распространенности почечно-клеточного рака (табл. 3). Значимой тенденции к увеличению сывороточной концентрации VEGF с увеличением стадии заболевания не обнаружено, однако следует отметить, что медианный уровень этого маркера у больных с III стадией достоверно превышал показатели не только пациентов с менее распространенным процессом, но также был достоверно выше, чем у больных IV стадией. Уровень VEGF превышал пороговый уровень 365 пг/мл только у 73% больных с III стадией, тогда как частота его превышения при I, II и IV стадиях рака почки составила 74, 80 и 94% соответственно.

Уровень VEGFR1 достоверно возрастал с увеличением стадии рака почки ( $p = 0,018$  по тесту Краскела—Уоллиса) и был достоверно выше у больных I—II, чем III—IV стадиями опухолевого процесса. Уровень VEGFR2 достоверно не зависел от стадии заболевания.

Что касается отдельных показателей распространенности рака почки по системе TNM, то достоверные различия выявлены только для VEGFR1: его уровень был выше у больных с T<sub>3</sub> (опухоль распространяется на главные вены или вторгается в надпочечник либо окружающую ткань, но не прорастает почечную фасцию), чем у больных с T<sub>1</sub> (опухоль максимальным размером до 7 см, ограниченная почкой), а также у пациентов с множественным метастатическим поражением лимфатических узлов (N<sub>2</sub>) по сравнению с пациентами без регионарных метастазов (N<sub>0</sub>).

По гистологическому строению большинство злокачественных опухолей почки представляли собой светлоклеточный почечно-клеточный рак — 78/82,9%, хромофобный почечно-клеточный рак выявлен в 7/7,5%, папиллярный почечно-клеточный рак — в 9/9,6% наблюдений.

Достоверных различий сывороточных концентраций VEGF и его рецепторов в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли не обнаружено (табл. 4). Следует лишь отметить, что наиболее высокие медианные уровни всех маркеров наблюдали при папиллярном почечно-клеточном раке, а уровень VEGF был наиболее высоким у больных с высокодифференцированными опухолями (G1).

Таблица 4

**Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных раком почки в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли**

Критерий	n	VEGF, пг/мл	VEGFR1, пг/мл	VEGFR2, нг/мл
Гистологическое строение опухоли				
Светлоклеточный почечно-клеточный рак	78	508 267—857	104 87,9—151	13,3 8,8—16,9
Хромофобный почечно-клеточный рак	7	401 292—883	107 30,5—265	12,8 9,0—25,6
Папиллярный почечно-клеточный рак	9	667 486—728	125 114—135	14,6 12,2—17,4
Степень дифференцировки опухоли				
G1	9	823 419—1146	117 97,1—135	15,8 10,9—17,4
G2	59	506 288—832	103 79,0—124	13,0 8,7—16,7
G3	15	501 349—779	114 92,5—163	13,5 8,3—15,3
G4	11	524 240—1155	115 101—141	12,5 10,2—20,1

**Заключение.** При исследовании содержания VEGF и его рецепторов 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком и здоровых доноров продемонстрировано значительное увеличение концентрации этих маркеров ангиогенеза, в первую очередь самого VEGF, в сыворотке крови больных не только злокачественными, но и доброкачественными новообразованиями почки. Однако чувствительность и специфичность VEGF в качестве маркера рака почки не превышали 70%, а его уровень не зависел от стадии заболевания. Не обнаружено и значимой корреляции между содержанием этого маркера в сыворотке крови и ткани опухоли, что свидетельствует о неопухоловом происхождении, по крайней мере, части циркулирующего в крови VEGF. В наибольшей степени с распространенностью рака почки был связан уровень растворимого рецептора VEGFR1, однако превышение показателей контрольной группы для этого маркера составляло не более 25%, что ограничивает его диагностические возможности. Уровень растворимого VEGFR2, играющего, по нашим данным, значимую роль при раке молочной железы и яичников [18], при раке почки меняется незначительно. Несмотря на вышеуказанные ограничения, мы полагаем, что исследованные в настоящей работе маркеры, в первую очередь VEGF, могут быть полезны для мониторинга больных раком почки, получающих антиангиогенные препараты, а также для прогноза чувствительности к такому лечению.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—6, 8—13, 16, 17  
см. REFERENCES)

- Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Овчинникова Л.К., Овсий О.Г., Ермилова В.Д., Генс Г.П., Кушлинский Н.Е. Белки-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода и некоторые компоненты VEGF-сигнального пути в опухолях молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160(12): 773—8.
- Бежанова С.Д. Опухоли почек. Новая классификация опухолей урогенитальной системы Всемирной организации здравоохранения 2016 г. *Архив патологии*. 2017; 79(2): 48—52.
- Кушлинский Н.Е., Трапезникова М.Ф., Герштейн Е.С., Глыбин П.В., Казанцева И.А., Кычаков А.А., Морозов А.П. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2 типа при раке почки. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2008; 5: 31—3.
- Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н. Фактор роста эндотелия сосудов как основной регулятор ангиогенеза и клинически значимый показатель при различных злокачественных новообразованиях. *Технологии живых систем*. 2013; 2: 18—33.

REFERENCES

- Domblides C., Gross-Goupil M., Quivy A., Ravaud A. Emerging antiangiogenics for renal cancer. *Expert Opin. Emerg. Drugs*. 2013; 18(4): 495—511.
- Moch H., Montironi R., Lopez-Beltran A., Cheng L., Mischo A. Oncotargets in different renal cancer subtypes. *Curr. Drug Targets*. 2015; 16(2): 125—35.
- Oya M. Renal cell carcinoma: biological features and rationale for molecular-targeted therapy. *Keio J. Med.* 2009; 58(1): 1—11.
- Aziz S.A., Sznol J.A., Adeniran A., Parisi F., Kluger Y., Camp R.L., Kluger H.M. Expression of drug targets in primary and matched metastatic renal cell carcinoma tumors. *BMC Clin. Pathol.* 2013; 13: 3.
- Virman J.P., Bono P., Luukkaala T.H., Sunela K.L., Kujala P.M., Kellokumpu-Lehtinen P.I. Combined Angiogenesis and Proliferation Markers' Expressions as Long-Term Prognostic Factors in Renal Cell Cancer. *Clin. Genitourin Cancer*. 2016; 14(4): e283—e289.
- van der Mijl J.C., Mier J.W., Broxterman H.J., Verheul H.M. Predictive biomarkers in renal cell cancer: insights in drug resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2014; 17(4-6): 77—88.
- Scherbakov A.M., Gershtein E.S., Korotkova E.A., Ovsii O.G., Ermilova V.D., Gens G.P., Kushlinskiy N.E. Regulatory Proteins of Epithelial-Mesenchymal Transition and Some Components of VEGF Signaling Pathway in Breast Cancer. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 160(12): 773—8. (in Russian)
- Sharpe K., Stewart G.D., Mackay A., Van Neste C., Rofe C., Berney D., Kayani I., Bex A., Wan E., O'Mahony F.C., O'Donnell M., Chowdhury S., Doshi R., Ho-Yen C., Gerlinger M., Baker D., Smith N., Davies B., Sahdev A., Boleti E., De Meyer T., Van Criekinge W., Beltran L., Lu Y.J., Harrison D.J., Reynolds A.R., Powles T. The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19(24): 6924—34.
- Tran H.T., Liu Y., Zurita A.J., Lin Y., Baker-Neblett K.L., Martin A.M., Figlin R.A., Hutson T.E., Sternberg C.N., Amado R.G., Pandite L.N., Heymach J.V. Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 2012; 13(8): 827—37.
- Zurita A.J., Jonasch E., Wu H.K., Tran H.T., Heymach J.V. Circulating biomarkers for vascular endothelial growth factor inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009; 115(10 Suppl): 2346—54.
- van der Veldt A.A., Vrolijk L., de Haas R.R., Koolwijk P., van de Eertwegh A.J., Haanen J.B., van Hinsbergh V.W., Broxterman H.J., Boven E. Sunitinib-induced changes in circulating endothelial cell-related proteins in patients with metastatic renal cell cancer. *Int. J. Cancer*. 2011; 131(4): E484—493.

12. Kushlinskii N.E., Trapeznikova M.F., Gershtein E.S., Glibin P.A., Kazantseva I.A., Kilichbekov M.B. Vascular endothelial growth factor and its type 2 receptor in tumors and serum of patients with renal cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145(6): 744—7.
13. Fujita N., Okegawa T., Terado Y., Tambo M., Higashihara E., Nutahara K. Serum level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor for the prediction of post-operative recurrence in renal cell carcinoma. *BMC Res. Notes.* 2014; 7: 369.
14. Bezhanova S.D. Tumors of the kidney. The new 2016 WHO classification of tumors of the genitourinary system. *Arkhiv Patologii.* 2017; 79(2): 48—52. (in Russian)
15. Kushlinskii N.E., Trapeznikova M.F., Gershtein E.S., Glibin P.A., Kazantseva I.A., Kichakov A.A., Morozov A.P. Vascular endothelial growth factor and its type 2 receptor in renal cancer. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii.* 2008; 5: 31—3. (in Russian)
14. Golshayan A.R., Brick A.J., Choueiri T.K. Predicting outcome to VEGF-targeted therapy in metastatic clear-cell renal cell carcinoma: data from recent studies. *Future Oncol.* 2008; 4(1): 85—92.
15. Kontovinis L.F., Papazisis K.T., Touplikioti P., Andreadis C., Mouratidou D., Kortsaris A.H. Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. *BMC Cancer.* 2009; 9: 82.
16. Gershtein E.S., Kushlinsky D.N. Vascular endothelial growth factor as a key angiogenesis regulator and clinically valuable marker in different malignant neoplasms. *Technologii zhivyykh system.* 2013; 2: 18—33. (in Russian)

Поступила 03.05.17  
Принята к печати 15.05.17

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.36-006.04-089.168-06:616.151.511

Сомонова О.В., Елизарова А.Л., Матвеева И.И., Корнюшенко У.А.

### НАРУШЕНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ТРОМБОТИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ, ПЕРЕНЁСШИХ ОПЕРАЦИЮ НА ПЕЧЕНИ

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва

*Хирургические вмешательства у больных со злокачественными опухолями печени вызывают развитие различных форм синдрома ДВС со значительным повышением концентрации маркеров внутрисосудистого свёртывания крови на фоне резкого снижения активности факторов протромбинового комплекса, уровня естественных антикоагулянтов и компонентов фибринолитической системы. У 12 больных с подострой формой ДВС-синдрома развились тромбозы вен различной локализации. Применение низкомолекулярных гепаринов в сочетании с концентратом антитромбина III и свежезамороженной плазмой снижает интенсивность внутрисосудистого свёртывания крови, приводит к восстановлению факторов свёртывания и является эффективным и адекватным методом лечения тромбозов и тромбоэмболии лёгочной артерии (ТЭЛА) у онкологических больных. Значительное повышение уровня Д-димера, фактора Виллебранда на фоне резкого снижения протромбиновой активности, содержания антитромбина III и уровня плазминогена являются гемостазиологическими факторами развития тяжёлой печёночной недостаточности, своевременная диагностика и коррекция которых позволяет улучшить результаты хирургического лечения больных со злокачественными опухолями печени.*

**Ключевые слова:** *резекция печени; система гемостаза; тромботические осложнения; печёночная недостаточность.*

**Для цитирования:** *Сомонова О.В., Елизарова А.Л., Матвеева И.И., Корнюшенко У.А. Нарушения системы гемостаза и тромботические осложнения у онкологических больных, перенёсших операцию на печени. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 541-545. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-541-545>*

*Somonova O.V., Elizarova A.L., Matveeva I.I., Korniyushenko U.A.*

#### THE DISORDERS OF HEMOSTASIS SYSTEM AND THROMBOTIC COMPLICATIONS IN ONCOLOGIC PATIENTS HAVING LIVER OPERATION

The N.N. Blokhin Russian oncologic research center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

*The surgical interventions in patients with malignant tumors of liver cause a development of various forms of disseminated intravascular coagulation (DIC) with significant increasing of concentration of markers of intravascular blood coagulation against the background of dramatic decreasing of activity of factors of prothrombin complex, level of natural anti-coagulants and components of fibrinolytic system. The thrombosis of veins of various localization developed in 12 patients with subacute form of DIC. The application of low-molecular heparin in combination with concentrate of anti-thrombin III and freshly frozen plasma decreases intensity of intra-vascular blood coagulation and results in reduction of factors of coagulation and is an efficient and adequate method of treatment of thrombosis and thromboembolism of pulmonary artery in oncologic patients. The significant increasing of level of D-dimer, von Willebrand factor against the background of dramatic decreasing of prothrombin activity, content of anti-thrombin III and level of plasminogen are hemostasiologic factors of development of severe liver insufficiency. The corresponding timely diagnostic and correction permits to ameliorate results of surgical treatment of patients with malignant tumors of liver.*

**Для корреспонденции:** *Сомонова Оксана Васильевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ; e-mail: somonova@mail.ru*

**Key words:** *liver resection; system of hemostasis; thrombotic complications; liver insufficiency*

**For citation:** *Somonova O.V., Elizarova A.L., Matveeva I.I., Korniyushenko U.A. The disorders of hemostasis system and thrombotic complications in oncologic patients having liver operation. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 541-545. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-541-545>*

**For correspondence:** *Somonova O.V., doctor of medical sciences, leading researcher. e-mail: somonova@mail.ru*

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

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

Received 15.04.2017  
Accepted 25.04.2017

Ежегодно в России регистрируется более 50 тыс. заболеваний раком толстой кишки, при этом около 20—50% пациентов при первичном обращении имеют метастазы в печень [1, 2]. Резекция печени остается единственным методом, позволяющим значительно увеличить продолжительность жизни больных (5-летнюю выживаемость) до 74% [3, 4]. Частота послеоперационных осложнений у больных, перенёвших расширенную гемигепатэктомию, варьирует в интервале 14,4—45% [5]. В структуре послеоперационных осложнений и причин летальности ведущее место занимают печёночная недостаточность разной степени выраженности, острые кровотечения, тромбоз воротной вены, тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбозомболия лёгочной артерии, в патогенезе которых немаловажное значение принадлежит нарушениям в системе гемостаза [6, 7]. Печень играет ключевую роль в регуляции гемостаза. Учитывая, что в печени синтезируется большинство факторов свёртывания крови и ингибиторов, а также белков, участвующих в фибринолизе, своевременная диагностика и коррекция нарушений в системе гемостаза позволят снизить частоту осложнений и тем самым улучшить результаты хирургического лечения больных со злокачественными опухолями печени.

**Цель** настоящей работы — выяснить роль нарушений системы гемостаза в патогенезе послеоперационной печёночной недостаточности, а также тромбгеморрагических осложнений у больных со злокачественными опухолями печени.

**Материал и методы.** Под нашим наблюдением находилось 120 больных со злокачественными опухолями печени (мужчин — 56, женщин — 64), из них 20 пациентов с первичными опухолями печени и 100 пациентов — с метастатическим колоректальным раком печени. Контрольная группа состояла из 40 практически здоровых людей. Возраст больных колебался в интервале 21—78 лет. Среди больных преобладали больные с III—IV стадией заболевания — 75 (62,5%) больных. Обширные резекции печени (право- и левосторонняя гемигепатэктомию простая и расширенная) были выполнены у 100 (83,3%) больных. Резекция нескольких сегментов печени выполнена у 20 (16,6%) больных. При гистологическом исследовании первичных опухолей установлен низкодифференцированный или высокодифференцированный гепатоцеллюлярный рак (у 10 больных) и холангиоцеллюлярный рак (у 10 больных). При гистологическом исследовании метастатических очагов выявлена аденокарцинома кишечного типа с различной степенью дифференцировки. Оценка показателей системы гемостаза проведена по 10 параметрам, наиболее точно отражающим состояние основных звеньев системы гемостаза: прокоагулянтное, тромбоцитарное, антикоагулянтное, фибринолитическое с маркерами внутрисосудистого свёртывания крови. Исследования системы гемостаза проводились на автоматических коагуло-

логических анализаторах «STA-R Evolution» и агрегометре фирмы «Chrono-log Corporation» (США) до операции и на 1—20-е сутки после операции. На автоматическом анализаторе «STA-R Evolution» определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновую активность по Quick, концентрацию фибриногена по Клауссу, активность антитромбина III, протеина С, плазминогена,  $\alpha_2$ -антиплазмина, концентрацию Д-димера, фактор Виллебранда. Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы «Chrono-log». Статистическую обработку результатов проводили, рассчитывая средние арифметические значения и стандартное отклонение ( $M \pm m$ ). Сравнение количественных данных в двух не связанных группах проводилось с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Достоверными считались результаты с ошибкой менее 5% ( $p < 0,05$ ). Проведённые исследования выполнялись в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

**Результаты.** При изучении исходного состояния у больных с первичными и вторичными злокачественными опухолями печени (табл. 1) установлено достоверное укорочение АЧТВ и увеличение концентрации фибриногена в 1,3 раза, что свидетельствует об активации прокоагулянтного звена свёртывающей системы крови. Отмечаются изменения со стороны тромбоцитарного звена в виде усиления агрегационной способности тромбоцитов.

Активация прокоагулянтного и тромбоцитарного зве-

Таблица 1

**Показатели системы гемостаза у больных первичным и метастатическим раком печени до начала лечения ( $M \pm m$ )**

Исследуемый показатель	Группа	
	контроль ( $n = 40$ )	больные ( $n = 120$ )
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	38,0 ± 0,8	34,0 ± 0,9*
Протромбиновая активность по Quick, %	92,0 ± 2,0	91,0 ± 1,3
Концентрация фибриногена, мг/дл	300,0 ± 8,5	384,0 ± 14,0*
Агрегация тромбоцитов: степень агрегации МА, мм	65,0 ± 1,9	80,0 ± 1,0*
Антитромбин III, %	87,0 ± 1,7	81,0 ± 0,9*
Протеин С, %	130,0 ± 2,5	75,0 ± 2,3*
Плазминоген, %	110,0 ± 1,9	90,0 ± 1,8*
$\alpha_2$ -антиплазмин, %	93,0 ± 3,8	99,0 ± 2,0
Д-димер, нг/мл	0,4 ± 0,2	1,6 ± 0,4*
Фактор Виллебранда, %	110,0 ± 10,0	234,0 ± 10,0*

Примечание. \* — различия достоверны (по сравнению с группой контроля).

Таблица 2

Показатели системы гемостаза у 9 больных со злокачественными опухолями печени и тяжёлой печёночной недостаточностью ( $M \pm m$ )

Исследуемый показатель	До операции	Послеоперационный период, сут		
		1	3—4	5—6
Концентрация фибриногена, мг/дл	422,0 ± 8,0	177 ± 12,0*#	140,1 ± 15,1*	144,0 ± 10,2*
Протромбиновая активность по Quick, %	82,0 ± 4,0	49 ± 1*#	45,0 ± 2,1*#	47,0 ± 2,9*
Антитромбин III, %	78,0 ± 2,3	49,0 ± 2,3*#	44,0 ± 1,8*#	48,0 ± 2,6*
Плазминоген, %	85,0 ± 3,0	39,0 ± 2,7*#	46,0 ± 2,6*#	52,0 ± 3,1*
Д-димер, нг/мл	2,1 ± 0,9	20 ± 1,8*#	20,0 ± 2,8*#	20,0 ± 3,0*#
Фактор Виллебранда, %	240,0 ± 6,9	425,0 ± 8,1*#	442,0 ± 18,2*	540 ± 14,2*#

Примечание. \* — различия достоверны по сравнению с дооперационным периодом; # — различия достоверны по сравнению с показателями без тяжёлой печёночной недостаточности.

ннев системы гемостаза ведёт к появлению тромбина, повышенному отложению фибрина с последующим его лизисом, о чём свидетельствует увеличение маркеров внутрисосудистого свёртывания крови. У больных метастатическим колоректальным раком печени концентрация Д-димера, одного из надёжных и чувствительных маркеров тромбообразования, увеличилась в 4 раза. При изучении фактора Виллебранда, который является показателем повреждения стенки сосуда и активации системы гемостаза, выявлено повышение его содержания в 2,1 раза. В ответ на усиленное внутрисосудистое свёртывание крови происходит расхождение естественных ингибиторов тромбина и других активных сериновых протеаз: у больных выявлено снижение уровня антитромбина III и протеина С (в 1,7 раза). Таким образом, указанные изменения свидетельствуют о развитии у больных первичными и метастатическими опухолями печени гиперкоагуляции с признаками хронического внутрисосудистого свёртывания крови.

Установлено, что хирургические вмешательства на печени вызывали глубокие изменения системы гемостаза, которые развивались преимущественно в виде подострых и хронических форм синдрома ДВС. Подострый синдром ДВС выявлен у 34 больных; наиболее часто (65%) подострый ДВС-синдром развивался после правосторонней гемигепатэктомии и характеризовался значительным достоверным повышением уровня Д-димера (до 12 мкг/мл

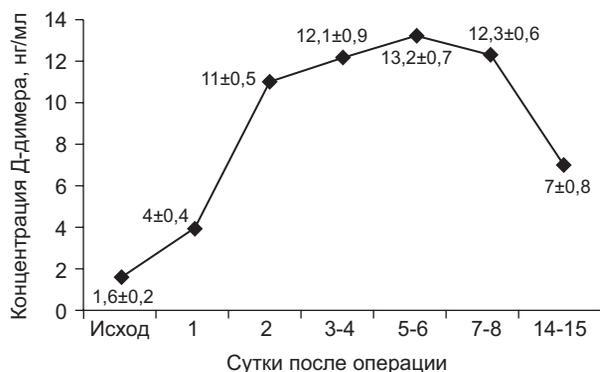


Рис. 1. Изменение концентрации Д-димера у больных с подострым ДВС-синдромом после операции ( $n = 34$ ).

на 3—4-е сутки после операции и до 14 мкг/мл на 9—10-е сутки) (рис. 1) и фактора Виллебранда (до 415% на 3—4-е сутки) (рис. 2), что свидетельствовало о выраженной активации внутрисосудистого свёртывания крови.

Наблюдалось умеренное укорочение АЧТВ с 1-х суток послеоперационного периода, максимально на 3—6-е сутки ( $p < 0,05$ ). Одновременно выявлено существенное снижение ( $p < 0,05$ ) активности факторов протромбинового комплекса: протромбиновая активность по Quick снижалась до 53% на 2-е сутки после операции, в 2 раза на 7—8-е сутки и оставалась резко сниженной до 9—10-х суток послеоперационного периода (рис. 3).

Концентрация фибриногена также существенно снижалась после резекции печени — до 121 мг/дл на 7—8-е сутки после операции ( $p < 0,001$ ).

Обращало на себя внимание значительное снижение уровня естественных антикоагулянтов (антитромбина III — до 48%, протеина С — до 50%), а также компонентов фибринолитической системы (плазминогена — до 52%), защищающих организм от тромбообразования.

У 12 больных с подострой формой ДВС-синдрома развились тромбозы вен верхних и нижних конечностей уже с 1-х суток послеоперационного периода. По

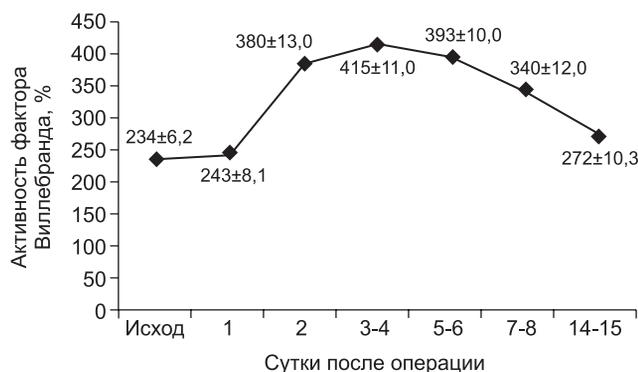


Рис. 2. Изменение активности фактора Виллебранда у больных с подострым ДВС-синдромом после операции ( $n = 34$ ).

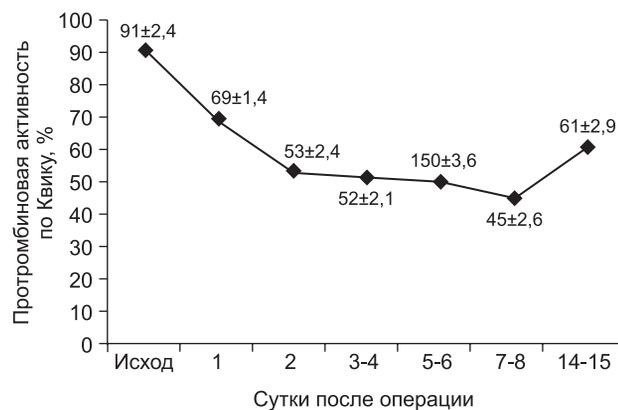


Рис. 3. Изменение активности факторов протромбинового комплекса по Quick у больных с подострым ДВС-синдромом после операции ( $n = 34$ ).

Показатели системы гемостаза у 3 больных с острым ДВС-синдромом печени после операции ( $M \pm m$ )

Исследуемый показатель	До операции	Послеоперационный период, сут					
		1	2	3—4	5—6	7—8	9—10
Протромбиновая активность по Quick, %	94,0 ± 2,4	54,0 ± 1,6**	23,0 ± 2,1**	20,0 ± 2,9**	19,0 ± 3,6**	19,0 ± 2,8**	23,0 ± 3,5**
Концентрация фибриногена, мг/дл	430,0 ± 12,0	60,0 ± 4,5* #	80,0 ± 5,3* #	84,0 ± 6,3**	80,0 ± 3,7**	80,0 ± 4,9**	110,0 ± 7,8*
Антитромбин III, %	80,0 ± 1,9	26,0 ± 2,3**	30,0 ± 1,8**	31,0 ± 2,6* #	29,0 ± 2,9**	41,0 ± 2,8* #	49,0 ± 2,9*
Д-димер, нг/мл	1,7 ± 0,2	3,0 ± 0,8*	20,0 ± 0,6**	20,0 ± 1,3**	17,0 ± 0,9*	13,3 ± 0,8*	18,5 ± 0,7**
Фактор Виллебранда, %	218,0 ± 10,0	343,0 ± 8,1**	418,0 ± 18,2*	420,0 ± 14,2*	420,0 ± 17,5*	420,0 ± 19,8**	420,0 ± 16,3**

Примечание. \* — различия достоверны по сравнению с дооперационным периодом; # — различия достоверны по сравнению с показателями больных с подострым ДВС-синдромом.

локализации они распределились следующим образом: тромбоз поверхностных и глубоких вен нижних конечностей зарегистрирован у 10 пациентов, тромбозы воротной вены печени и левой печёночной вены — по 1 случаю, ТЭЛА — у 1 больного. У 48% больных тромботические осложнения были выявлены в первые 5 сут послеоперационного периода, у 17% больных — в пределах 5—10 дней после операции и у 35% больных — после 10 сут послеоперационного периода. Несмотря на снижение концентрации факторов свёртывания крови, применение низкомолекулярных гепаринов в сочетании с концентратом антитромбина III и свежемороженой плазмой у больных с подострой формой синдрома ДВС восстанавливало факторы свёртывания крови. На 14—15-е сутки послеоперационного периода уровень Д-димера снижался до 7 нг/мл ( $p < 0,05$ ), протромбиновая активность по Quick повышалась до 61% ( $p < 0,05$ ). Пациенты получали фраксипарин 0,3 мл/сутки с постепенным увеличением дозы до 0,3 мл/2 раза в сут и 0,9 мл/сут; свежемороженную плазму — 1—2 дозы и концентрат антитромбина III в среднем 1000—2000 МЕ. По данным ультразвукового доплерографического сканирования, венозные тромбозы не определялись, либо наблюдалась реканализация просвета сосуда.

У больных с подострым диссеминированным внутрисосудистым свёртыванием крови, оперированных на печени, в раннем послеоперационном периоде отмечались клинические признаки печёночной недостаточности — слабость, сонливость, легкие формы желтухи и энцефалопатии, возникшие вследствие недостаточного объёма оставшейся части печени.

Выделена группа больных (9 человек) с развитием тяжёлой печёночной недостаточности в послеоперационном периоде.

При изучении системы гемостаза в этой группе больных (табл. 2) установлено, что уровень Д-димера и фактора Виллебранда повышался в большей степени, достоверно отличаясь от показателей группы больных без тяжёлой печёночной недостаточности. Одновременно в этой группе больных отмечалось резкое снижение активности факторов протромбинового комплекса, уровня антитромбина III и пламиногена по сравнению с аналогичными показателями больных без тяжёлой печёночной недостаточности ( $p < 0,05$ ).

Следовательно, у пациентов с тяжёлой печёночной недостаточностью наблюдалось снижение протромбиновой активности до 45%, антитромбина III до 44%, пламиногена ниже 50% при высоком уровне Д-димера

(>20 мкл/мл) и фактора Виллебранда. Эти показатели можно отнести к гемостазиологическим факторам риска развития тяжёлой печёночной недостаточности.

У 3 больных (у 2 больных после правосторонней и у 1 больного — после левосторонней гемигепатэктомии) развился острый ДВС-синдром (табл. 3). У больных с острым ДВС-синдромом (в отличие от подострого ДВС-синдрома) наблюдалось, наоборот, достоверное удлинение АЧТВ в 1,5 раза и резкое уменьшение активности факторов протромбинового комплекса — в 4,7 раза (протромбиновая активность по Quick падала до 20% на 3—10-е сутки после операции). Концентрация фибриногена снижалась менее 100 мг/дл (до 60—80 мг/дл) с одновременным падением агрегационной активности тромбоцитов до 0. Кроме того, у этих больных установлено резкое снижение уровня антитромбина III (до 26%), протеина С (до 18%), пламиногена (до 18%) с 1-х суток послеоперационного периода, что связано с нарушением синтетической функции печени, но в большей степени с потреблением их в процессе интенсивного внутрисосудистого свёртывания крови.

Об этом свидетельствует резкое повышение маркеров внутрисосудистого свёртывания крови: уровень Д-димера возрастал до 20 мкг/мл, фактора Виллебранда — до 420% уже со 2—4-х суток после операции; у больных развилась полиорганная недостаточность, которая сопровождалась кровотечением из операционной раны и тромбозами вен различной локализации.

У остальных больных (преимущественно с резекцией нескольких сегментов печени) отмечались менее выраженные изменения системы гемостаза, характерные для хронической формы синдрома ДВС.

**Заключение.** Хирургические вмешательства у больных со злокачественными опухолями печени вызывают развитие различных форм синдрома ДВС со значительным повышением содержания маркеров внутрисосудистого свёртывания крови на фоне резкого снижения активности факторов протромбинового комплекса, уровня естественных антикоагулянтов и компонентов фибринолитической системы, защищающих организм от тромбообразования, что согласуется с данными литературы [8]. У 12 больных с подострой формой ДВС-синдрома развились тромбозы вен различной локализации. Применение низкомолекулярных гепаринов в сочетании с концентратом антитромбина III и свежемороженой плазмой снижает интенсивность внутрисосудистого свёртывания крови, приводит к восстановлению факторов свёртывания и является эффективным и адекватным

методом лечения тромбозов и ТЭЛА у онкологических больных. Значительное повышение уровня Д-димера и фактора Виллебранда, а также резкое снижение протромбиновой активности, содержания антитромбина III и уровня плазминогена являются гемостазиологическими факторами развития тяжелой печеночной недостаточности, своевременная диагностика и коррекция которых позволяет улучшить результаты хирургического лечения больных со злокачественными опухолями печени.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 7—8 см. REFERENCES)

1. Патютко Ю.И., Котельников А.Г., Мамонтов К.Г., Пономаренко А.А., Лазарев А.Ф. Непосредственные результаты резекций печени по поводу метастазов колоректального рака. *Онкологическая колопроктология*. 2014; (1): 14—20. (in Russian)
2. Патютко Ю.И., Сагайдак И.Г., Котельников А.Г., Поляков А.Н. Резекция печени: современные технологии при опухолевом поражении. *Анналы хирургической гепатологии*. 2010; 15(2): 9—17. (in Russian)
4. Патютко Ю.И., Пылев А.Л., Сагайдак И.В. Десятилетняя выживаемость больных злокачественными опухолями печени после хирургического лечения. *Анналы хирургической гепатологии*. 2010; 15(3): 39—47.
6. Герок В., Блюм Х. *Заболевания печени и желчевыводящей системы* (пер. с нем.). М.: МЕДпресс-информ; 2009.

#### REFERENCES

1. Patyutko Yu.I., Kotelnikov A.G., Mamontov K.G., Ponomarenko A.A., Lazarev A.F. Immediate results of liver resections for metastases of colorectal cancer. *Oncologicheskaya coloproctologiya*. 2014; (1): 14—20. (in Russian)
2. Patyutko Yu.I., Sagaidak I.G., Kotelnikov A.G., Polyakov A.N. Liver resection: modern technologies in case of tumor lesion. *Annaly khirurgicheskoy hepatologii*. 2010; 15(2): 9—17. (in Russian)
3. Kanas P.K., Taylor A., Primrose J.N. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin. Epid.* 2012; (4): 283—301.
4. Patyutko Yu.I., Pylev A.L., Sagaidak I.V. Ten-year survival of patients with malignant liver tumors after surgical treatment. *Annaly khirurgicheskoy hepatologii*. 2010; 15(3): 39—47. (in Russian)
5. Huang Z., Xu L., Yang T. Hepatic resection: an analysis of the impact of operative and perioperative factors on morbidity and mortality rates in 2008 consecutive hepatectomy cases. *Chin. Med. J.* 2009; 22(19): 2268—77.
6. Gerok V., Blum H. *Diseases of the liver and bile excretory system*. Moscow: MEDpress-inform; 2009. (in Russian)
7. Broek M.A., Olde Damink S.W., Dejong C.H. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int.* 2008; 28(6): 767—80.
8. Umemura Y., Yamakawa K., Kiguchi T., Yoshikawa Y., Ogura H. et al. Design and Evaluation of New Unified Criteria for Disseminated Intravascular Coagulation Based on the Japanese Association for Acute Medicine Criteria. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2016; 22(2): 153—60.

Поступила 15.04.17

Принята к печати 25.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.132.2-089.86-07:616.151.5

Груздева О.В.<sup>1</sup>, Фанаскова Е.В.<sup>1</sup>, Акбашева О.Е.<sup>2</sup>, Учасова Е.Г.<sup>1</sup>, Пенская Т.Ю.<sup>1</sup>, Дылева Ю.А.<sup>1</sup>, Кузьмина А.А.<sup>1</sup>, Барбараш О.Л.<sup>1,3</sup>

## ПРЕИМУЩЕСТВО ТЕСТА ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 634050, Томск;

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 650029, Кемерово, Россия

*Цель исследования — оценка периоперационных параметров теста генерации тромбина и его взаимосвязь с показателями коагуляционного гемостаза, фибринолитической системой и антикоагулянтами у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) при коронарном шунтировании в условиях искусственного кровообращения. Обследовано 200 человек с ИБС, которым была выполнена плановая первичная операция коронарного шунтирования (КШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК). Тест генерации тромбина проводили с помощью универсального автоматического анализатора SEVERON-ALPHA (Technoclone, Vienna, Австрия). Показатели теста генерации тромбина сравнивали с общепринятыми методами оценки гемостаза (МНО, АЧТВ, фибриноген, протромбин по Квику, тромбиновое время, АТ-III, протейн С, фактор VIII,) фактора Виллебранда, ингибитора активации плазминогена 1-го типа (PAI-1), тканевого (t-PA) и урокиназного (u-PA) активаторов плазминогена. Продемонстрировано, что использование теста генерации тромбина дублирует перечисленные показатели и позволяет одномоментно определить как прокоагуляционные, так и антитромботические сдвиги. Преимущество теста генерации тромбина состоит в оценке тромбинового потенциала, что наиболее актуально в кардиологической практике.*

**Ключевые слова:** тест генерации тромбина; коронарное шунтирование; гемостаз.

**Для корреспонденции:** Груздева Ольга Викторовна, д-р мед. наук, зав. лаб. исследований гомеостаза отд. диагностики сердечно-сосудистых заболеваний НИИ КПССЗ, г. Кемерово, e-mail: o\_gruzdeva@mail.ru

**Для цитирования:** Груздева О.В., Фанаскова Е.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Пенская Т.Ю., Дылева Ю.А., Кузьмина А.А., Барбараш О.Л. Преимущество теста генерации тромбина для оценки гемостазиологического потенциала при проведении коронарного шунтирования у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 545-552. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-545-552>

Gruzdeva O.V.<sup>1</sup>, Fanaskova E.V.<sup>1</sup>, Akbasheva O.E.<sup>2</sup>, Uchasova E.G.<sup>1</sup>, Penskaya T.Yu.<sup>1</sup>, Dyleva Yu.A.<sup>1</sup>, Kuzmina A.A.<sup>1</sup>, Barbarash O.L.<sup>1,3</sup>

THE ADVANTAGE OF TEST ON THROMBIN GENERATION FOR EVALUATION OF HEMOSTASIS POTENTIAL UNDER IMPLEMENTATION OF CORONARY BYPASS SURGERY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

<sup>1</sup>The research institute of complex problems of cardiovascular diseases, 650002 Kemerovo, Russia

<sup>2</sup>The Sibirskii state medical university of Minzdrav of Russia, 634050 Tomsk, Russia

<sup>3</sup>The Kemerovskaya state medical academy of Minzdrav of Russia, 650029 Kemerovo, Russia

*The purpose of study is to evaluate peri-operational parameters of testing of generation of thrombin and its relationship with indices of coagulation hemostasis, fibrinolytic system and anti-coagulants in patients with ischemic heart disease under coronary bypass surgery in conditions of artificial blood circulation. The examined sampling included 200 patients with ischemic heart disease. The planned primary operation of coronary bypass surgery in conditions of artificial blood circulation was applied to all of them. The testing of generation of thrombin was implemented using automated analyzer CEVERON-ALPHA (Technoclone, Vienna, Austria). The indices of testing of generation of thrombin were compared with common techniques of evaluation of hemostasis (INR, PTT, fibrinogen, Qick's prothrombin testing, thrombin time, AT-III, protein C, factor VIII), von Willebrand factor, inhibitor of activation of plasminogen type I (PAI-I), tissue and urokinase plasminogen activator.*

*It is demonstrated that application of testing of thrombin generation duplicates enumerated indices and permits at the same time instant to detect both pro-coagulation and anti-thrombotic shifts. The advantage of testing of thrombin generation is in evaluation of thrombin potential that is most actual in cardiologic practice.*

**Key words:** testing of thrombin generation; coronary bypass surgery; hemostasis

**For citation:** Gruzdeva O.V., Fanaskova E.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G., Penskaya T.Yu., Dyleva Yu.A., Kuzmina A.A., Barbarash O.L. The advantage of test on thrombin generation for evaluation of hemostasis potential under implementation of coronary bypass surgery in patients with ischemic heart disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9): 545-552. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-545-552>

**For correspondence:** Gruzdeva O.V., doctor of medical sciences, head of the laboratory of studies of hemostasis of the department of diagnostic of cardiovascular diseases. e-mail: [o\\_gruzdeva@mail.ru](mailto:o_gruzdeva@mail.ru)

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

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

Received 14.04.2017  
Accepted 20.04.2017

Коронарное шунтирование (КШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК) довольно часто сопровождается комплексными нарушениями системы гемостаза, которые могут проявляться в виде серьезных тромбогеморрагических осложнений [1]. Мультифакторный характер этих нарушений при кардиоваскулярных заболеваниях существенно затрудняет возможность прогнозирования состояния системы гемостаза в периоперационном периоде КШ и требует динамического лабораторного контроля [1, 2].

В клиничко-лабораторной практике используются как «локальные», так и интегральные тесты оценки гемостаза. Результаты «локальных» тестов позволяют охарактеризовать состояние отдельных факторов или звеньев каскадной реакции. В их число входят рутинные, ежедневно используемые тесты, такие как: активированное парциальное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбин по Квику, международное нормализованное отношение (МНО), тромбиновое время (ТВ), фибриноген, Д-димер, антитромбин III, протеин С, фактор VIII и др. Но в условиях ИК и тотальной гепаринизации полученные результаты могут выявить лишь отклонения от референтного интервала, а сделать в целом заключение о коагуляционных сдвигах в организме невозможно, так как эти изменения могут быть нивелированы включением компенсаторных механизмов [3]. Это обуславливает актуальность оптимизации алгоритмов лабораторного контроля гемостаза в периоперационном периоде у кардиохирургических пациентов с помощью интегральных методов оценки гемостатического потенциала.

К таким методам относится тест генерации тромбина, который количественно оценивает суммарный эффект взаимодействия всех факторов системы свертывания по динамике образования и инактивации *in vitro* ключевого фермента гемостаза тромбина, витамин-К-зависимого белка, вызывающего специфический протеолиз фибриногена [3, 4]. В то же время в современной литературе мало исследований, посвященных данной проблеме.

В связи с этим целью исследования стала оценка периоперационных параметров теста генерации тромбина и его взаимосвязь с показателями коагуляционного гемостаза, фибринолитической системы и антикоагулянтами у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) при КШ в условиях ИК.

**Материал и методы.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в нём.

Из регистра коронарного шунтирования, включающего более 1317 человек, методом «случай—контроль» были последовательно отобраны 200 человек с ИБС, которым была выполнена плановая первичная операция КШ в условиях ИК. Верификацию диагноза проводили на основании клинических, электрокардиографических, эхокардиографических характеристик заболевания.

Основные клиничко-анамнестические данные пациентов, включённых в исследование, представлены в табл. 1.

Среди пациентов преобладали мужчины ( $n = 157$ ;

Таблица 1

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов

Признак	абс.	%
Пол, женский/мужской	43/157	21,5/78,5
Возраст, $M \pm m$ , годы	59,1 $\pm$ 4,68	
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	29,5 $\pm$ 4,1	
Особенности коронарного русла		
Поражение ствола левой коронарной артерии 50% и более, %	56	28
Количество поражённых коронарных артерий (КА), $n$ , %:		
1 КА	3	1,5
2 КА	52	26
3 и более КА	145	72,5
Факторы риска ИБС		
Отягощённая наследственность по сердечно-сосудистой патологии	152	76
Артериальная гипертензия в анамнезе	183	91,5
Курение	106	53
Ожирение	54	27
Гиперхолестеролемиа	72	36
Сахарный диабет 2-го типа в анамнезе	58	29
Особенности анамнеза		
Фракция выброса левого желудочка, %	56,6 $\pm$ 9,1	
Клиника стенокардии	200	100
Инфаркт миокарда (1 и более) в анамнезе	70	35
Постинфарктный кардиосклероз	38	19
Острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе	12	6
Хроническая ишемия головного мозга в анамнезе	18	18
Сопутствующая патология		
Заболевания желудочно-кишечного тракта	42	21
Заболевания почек в анамнезе	8	4
Заболевания органов дыхания	12	6
Стратегия лечения		
$\beta$ -адреноблокаторы	190	95
иАПФ	158	79
Блокаторы Ca <sup>2+</sup> -каналов	198	99
Инотропные препараты	29	14,5
Диуретики	183	91,5
Нитраты	200	100
Аспирин (прием не менее 1 года)	200	100
Статины	118	59

78,5%), в анамнезе чаще фиксировали АГ, стенокардию, отягощённую наследственность по сердечно-сосудистой патологии, курение и ожирение, 70 пациентов ранее уже перенесли инфаркт миокарда, а 12 человек — острое нарушение мозгового кровообращения. Пациентам в предоперационном периоде была назначена коронароактивная терапия, в 100% случаев они получали аспирин, статины.

Все пациенты подверглись плановому первичному КШ без отмены антитромбоцитарной терапии (аспирин 75—100 мг/сут). Операции КШ с использованием ИК проводились согласно стандартным протоколам, принятым в учреждении. Средняя длительность ИК составила 86,5 мин, длительность пережатия аорты — 53 мин, температура во время искусственного кровообращения — 35,3°C, среднее количество шунтов — 3 шт. Забор внутренних грудных артерий и венозных шунтов осуществлялся по стандартным методикам.

ИК проводили аппаратами фирмы Maguet с использованием оксигенаторов Medos HLM Set Adult с перфузионным индексом 2,5—2,7 л/мин·м<sup>2</sup> стандартным (сбалансированные кристаллоиды, коллоиды) первичным объёмом заполнения, равным 1300 мл. Для защиты миокарда использовали кровяную холодовую кардиоплегию (соотношение крови и кристаллоидного компонента 4:1). Введение гепарина и его нейтрализацию протамина сульфатом проводили по методике, принятой в клинике. Пациентам вводили расчётные дозы гепарина (гепарин—натрий Браун (НФГ) 350 ЕД/кг. Нейтрализацию гепарина проводили раствором протамина сульфата из расчёта гепарин:протамин = 1:1. Состояние коагуляционного гемостаза в периоперационном периоде оценивали с помощью определения активированного времени свертывания (АВС) в цельной крови на автоматическом таймере коагуляции АСТ Plus фирмы Medtronic (США) на тест-системах HR-АСТ. АВС до операции составило 122 с, после введения протамина — 139 с, в раннем послеоперационном периоде — 144 с, что соответствовало протоколу проведения КШ с ИК, принятому в учреждении. В контрольную группу вошли 50 (12 женщин и 38 мужчин) практически здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами, участвующими в исследовании. Средний возраст людей из контрольной группы составил 53,23  $\pm$  3,44 года. Материалом исследования стала бедная тромбоцитами плазма (БТП), полученная из цельной венозной крови, забранной самотеком из катетера центральной вены. Исследование проводили в дооперационный (за 1 ч до вводного наркоза), интраоперационный (через 15 мин после проведения протаминизации) и ранний послеоперационный (в среднем через 1 ч после поступления пациента в отделение реанимации) периоды. Исследования показателей коагулограммы (протромбин по Квику, МНО, АЧТВ, фибриноген, тромбиновое время, АТ-III, протеин С, фактор VIII) и теста генерации тромбина (ТГТ) проводили на универсальном автоматическом анализаторе CEVERON-ALPHA (Technoclonе, Vienna, Австрия) с использованием стандартизированных тест-систем этой же фирмы.

Для оценки результатов, отражающих количественные и динамические характеристики генерации тромбина, измеряли следующие показатели.

*Lag time* (время запаздывания, мин) — время, измеренное от момента внесения смеси флуорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и активатором до момента отклонения флуоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения.

*Peak thrombin* (пиковая концентрация тромбина, нмоль/л) — максимальная концентрация тромбина, достигаемая в процессе его генерации в образце.

*Time to peak* (время достижения пика, мин) — время, за которое в образце достигается максимальная концентрация тромбина.



Параметры теста генерации тромбина у пациентов с КШ

Параметр	Контроль	До операции	После протамина	Ранний послеоперационный период
	1	2	3	4
Lag Time, мин	2,8 (3,0;3,4)	5,65 (4,2; 9,05) $p_{1,2} = 0,011$	6,7 (5,4;8,9) $p_{1,3} = 0,002$ $p_{2,3} = 0,0196$	7,6 (6,5;10,4) $p_{1,4} = 0,0001$ $p_{2,4} = 0,001$ $p_{3,4} = 0,23$
Time to peak, мин	9,5 (8,9; 10,2)	11,6 (9,4; 16,1) $p_{1,2} = 0,0014$	14,15 (10,2; 17,65) $p_{1,3} = 0,012$	14,8 (11,7; 17,6) $p_{1,4} = 0,025$
Peak thrombin, нМ/л	122,8 (115; 130,1)	168,9 (68,0; 277,9) $p_{1,2} = 0,03$	149,7 (92,050; 235,650) $p_{1,3} = 0,025$	105,4 (56,8; 144,8) $p_{1,4} = 0,049$ $p_{2,4} = 0,007$ $p_{3,4} = 0,0002$
V1, нМ/мин	20,4 (17,2; 22,1)	32,3 (7,5; 61,8) $p_{1,2} = 0,028$	28,15 (12,35; 39,5) $p_{1,3} = 0,014$	14,85 (6,6; 25,35) $p_{1,4} = 0,027$ $p_{2,4} = 0,006$ $p_{3,4} = 0,002$
ETP, нМ	1604,2 (1517; 1690)	2556,5 (1524,4; 2738,8) $p_{1,2} = 0,0021$	2062,9 (1381,8; 2690,1) $p_{1,3} = 0,045$ $p_{2,3} = 0,056$	1593,95 (955; 1893,9) $p_{2,4} = 0,002$ $p_{3,4} = 0,0001$

Таблица 4

Коэффициенты корреляции между параметрами ТГТ и базовой коагулограммы у пациентов с КШ

Параметр ТГТ	Параметры коагулограммы											
	ПТ	МНО	АЧТВ	Фибриноген	ТВ	АТ-III	Протеин С	Ф VIII	Ф ВБ	t-PA	t-PA/PAI-1	Фибриногектин
Lag Time, мин	0,38 $p = 0,11$	0,11 $p = 0,12$	0,13 $p = 0,12$	0,21 $p = 0,12$	0,01 $p = 0,12$	-0,44 $p = 0,042$	-0,37 $p = 0,013$	-0,36 $p = 0,037$	-0,49 $p = 0,001$	0,38 $p = 0,11$	-0,38 $p = 0,04$	0,12 $p = 0,14$
Time to peak, мин	0,38 $p = 0,11$	0,38 $p = 0,11$	0,39 $p = 0,04$	0,4 $p = 0,04$	0,51 $p = 0,023$	0,38 $p = 0,11$	0,38 $p = 0,11$	0,38 $p = 0,11$	0,06 $p = 0,12$	0,23 $p = 0,12$	0,31 $p = 0,12$	0,01 $p = 0,12$
Peak thrombin, нМоль	0,38 $p = 0,027$	-0,4 $p = 0,04$		-0,51 $p = 0,01$	-0,45 $p = 0,037$	0,38 $p = 0,043$	0,38 $p = 0,011$	0,7 $p = 0,0002$	0,68 $p = 0,0001$	0,52 $p = 0,01$	0,39 $p = 0,004$	0,39 $p = 0,002$
V1, нМоль/мин	$p = 0,047$	$p = 0,04$	-0,4 $p = 0,03$	-0,58 $p = 0,00$	-0,47 $p = 0,047$	0,38 $p = 0,028$	0,46 $p = 0,001$	0,63 $p = 0,001$	0,59 $p = 0,005$	0,61 $p = 0,00$	0,44 $p = 0,03$	0,56 $p = 0,012$
ETP, нМоль	0,11 $p = 0,12$	0,01 $p = 0,12$	-0,46 $p = 0,03$	-0,49 $p = 0,02$	-0,42 $p = 0,046$	0,47 $p = 0,023$	0,33 $p = 0,003$	0,72 $p = 0,00009$	0,49 $p = 0,01$	0,54 $p = 0,00$	0,41 $p = 0,04$	0,11 $p = 0,12$

корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался менее 0,05.

**Результаты.** При анализе показателей коагулограммы выявлено, что на дооперационном этапе увеличивается содержание фибриногена на 55,9% и фактора Виллебранда на 19%, по сравнению с контролем (табл. 2). Изменения таких показателей, как АЧТВ, протромбин по Квику, МНО, ТВ, VIII фактор, оказались статистически незначимыми. Со стороны системы физиологических антикоагулянтов наблюдалось снижение по сравнению с группой контроля активности АТ-III и протеина С, что

указывает на прокоагуляционный сдвиг. При этом отмечалась существенная активация системы фибринолиза: тканевой активатор плазминогена и Д-димер увеличены относительно контроля на 93 и 65,8% соответственно.

После протаминизации ряд показателей коагулограммы свидетельствовал о развитии гипокоагуляции. Содержание протромбина снижалось и оставалось сниженным на 27,5% в раннем послеоперационном периоде. Показатель МНО повышался на 23,6% по отношению к дооперационному уровню и сохранялся повышенным на 16% в ранний послеоперационный период. Уменьшалось содержание фибриногена: на 41,5% после введения

протамина и на 32% в ранний послеоперационный период по сравнению с показателем до операции. Снижалась активность фактора VIII на 27,3 и 35,2% фактора Виллебранда относительно дооперационных значений, оставаясь ниже на 35,2 и 4,6% соответственно в раннем послеоперационном периоде. На фоне гипокоагуляционного сдвига отмечалось уменьшение АТ-III после протаминизации и в ранний послеоперационный период. Традиционно снижение содержания АТ-III рассматривается как показатель гиперкоагуляции, что не согласуется с полученными данными протромбина по Квику и МНО. Активность протеина С также была снижена относительно контроля до операции после введения протамина на 51,7% и в раннем послеоперационном периоде на 30,5%. Вероятно, снижение естественных антикоагулянтов можно рассматривать как фактор, способствующий повышенной генерации тромбина. Фибринолитическая активность при этом возрастала: тканевой активатор плазминогена увеличивался после протаминизации на 42,7% относительно дооперационных значений, оставаясь увеличенным и в раннем послеоперационном периоде. Содержание комплекса t-PA/PAI после протаминизации существенно выросло относительно исходных данных, однако после операции снижалось практически в 2 раза. Об активации фибринолиза говорит и увеличение концентрации Д-димера после введения протамина и в раннем послеоперационном периоде на 90 и на 85% соответственно. Содержание фибронектина в интра- и раннем послеоперационном периодах увеличивалось относительно исходных данных в 2 и 6 раз соответственно.

В отличие от параметров коагулограммы, ТГТ показал увеличение генерации тромбина на до- и интраоперационном периодах (табл. 3). Пиковая концентрация тромбина и скорость его образования до операции увеличены на 37,5 и 58,3% соответственно; после проведения протаминизации — на 21,9 и 38% по сравнению с контролем. Эндогенный тромбиновый потенциал ЕТР был повышен на 59% до КШ и на 28,5% во время операции, что свидетельствовало о состоянии гиперкоагуляции, а в ранний послеоперационный период снижался, достигая уровня контроля. В то же время некоторые показатели ТГТ имели отношение к гипокоагуляции: на дооперационном периоде увеличивалось время запаздывания и достижения пика концентрации тромбина соответственно на 101 и 22%, а на интраоперационном этапе — на 139 и 49% по сравнению с контролем.

При проведении корреляционного анализа была выявлена тесная взаимосвязь показателей ТГТ с данными коагулограммы. При этом показатели коагулограммы, отражающие гипокоагуляцию, были взаимосвязаны с данными ТГТ, имеющими отношение к снижению активности коагуляционного гемостаза. Так, увеличение АЧТВ сопровождалось увеличением времени достижения пиковой концентрации тромбина, уменьшением скорости его образования и площади под кривой (табл. 4). Установлены статистически значимые отрицательные зависимости концентрации фибриногена от пиковой концентрации тромбина, скорости его образования и площади под кривой генерации тромбина. Аналогичная корреляционная зависимость выявлена для тромбинового времени (см. табл. 4).

В то же время, пиковая концентрация тромбина находилась в положительной статистически значимой зависимости от протромбина, факторов VIII и Виллебранда

и отрицательной с МН. Аналогичная зависимость выявлена для скорости образования тромбина (см. табл. 4). Площадь под кривой генерации тромбина находилась в прямой статистически значимой зависимости от фактора VIII и фактора Виллебранда.

Также выявлена статистически значимая прямая зависимость показателей генерации тромбина от активности физиологических антикоагулянтов и состояния системы фибринолиза. Дефицит АТ-III и протеина С, увеличение концентрации t-PA и комплекса t-PA/PAI сопровождалось снижением скорости образования тромбина, концентрации тромбина и площади под кривой генерации тромбина. Кроме того, установлена положительная корреляционная зависимость скорости образования и пиковой концентрации тромбина от концентрации фибриноектина (см. табл. 4).

*Обсуждение.* Как известно, баланс коагуляции обеспечивается про- и антикоагулянтами, работающими в плазме, что в нормальных условиях предотвращает как чрезмерное образование тромбина, так и, напротив, ингибирование его синтеза. До сих пор ведутся активные дискуссии по выбору лабораторного метода, который бы отражал естественный плазменный баланс про- и антикоагулянтов [3, 5]. В современной лабораторной практике широко распространена оценка отдельных про- или антикоагулянтов с помощью выполнения таких методик, как протромбиновое и активированное частичное тромбопластиновое время (ПТ, АЧТВ), а также с помощью анализа одиночных антикоагулянтов. [3, 6]. Однако ни один из подходов действительно не имитирует того, что происходит в естественных условиях. Например, ПТ и АЧТВ удлинены у больных с врожденными нарушениями системы прокоагулянтов с усиленным синтезом тромбина [7]. С другой стороны, ПВ и АЧТВ укладываются в пределы референсных значений у пациентов с врожденными или приобретенными недостатками антикоагулянтов антитромбина III и протеина С. Открытое оперативное вмешательство на коронарных артериях в условиях ИК можно также рассматривать как временную коагулопатию с дисфункцией всех звеньев системы гемостаза — тромбоцитарно-сосудистого, коагуляционного, системы фибринолиза. Причины, их вызывающие, хорошо известны — дилуция, длительный контакт крови с поверхностью контура аппарата ИК, использование кристаллоидов, трансфузионных компонентов и т. д. [1, 3, 4, 8].

В данном исследовании нами изучена динамика параметров коагулограммы и ТГТ у пациентов с КШ в условиях ИК в периоперационном периоде. На дооперационном этапе, согласно результатам ТГТ, наблюдалось увеличение генерации тромбина: количественные показатели (ЕТР и Peak) и скорость (V) генерации тромбина были статистически значимо выше в сравнении с группой контроля. В то же время результаты дооперационной оценки скрининговых тестов внутреннего (протромбин по Квику, МНО) и внешнего путей (АЧТВ) активации протромбиназы, а также тромбиновое время находились в пределах референсных значений. При этом выявлено достоверное повышение содержания фибриногена и снижение АТ-III, протеина С относительно аналогичных показателей контрольной группы. Полученные данные подтверждают точку зрения о том, что базовые тесты ни в наборе, ни тем более в изолированном виде не позволяют полноценно оценить процесс тромбообразования. Они отражают только начальный

этап образования тромбина, что составляет не более 5% общего потенциала генерированного тромбина и только его лаг-фазу, и измерение заканчивается в тот момент, когда в реакционной кювете появляются первые нити фибрина [9, 10].

Выявленное до операции повышение уровня тканевого активатора плазминогена указывало на активацию системы фибринолиза. В литературе имеются данные о связи повышенной концентрации t-PA в плазме с увеличением риска сердечно-сосудистых осложнений [11]. Возможным объяснением парадоксальной связи t-PA, активирующего фибринолиз, с тромботическими осложнениями может быть повышение концентрации t-PA вследствие увеличения доли неактивного комплекса t-PA/PAI-1, имеющего большую продолжительность циркуляции в кровотоке, чем свободный t-PA [11]. Кроме того, в экспериментах показано, что тромбин стимулирует секрецию t-PA и PAI-1 клетками эндотелия [11], и поэтому повышение этих компонентов в плазме больных может быть следствием увеличения образования тромбина. Активация t-PA может способствовать дестабилизации атеросклеротических бляшек, попадание последних в кровоток — вызывать окклюзию коронарных артерий. Повышенная генерация тромбина могла быть обусловлена также высокой экспрессией фактора Виллебранда в исследуемой группе [9, 12].

После проведения протаминизации количественные показатели теста генерации тромбина и скорость его образования оставались выше уровня контрольной группы, что свидетельствовало о состоянии гиперкоагуляции. При этом хронометрические показатели теста достоверно увеличивались, что говорит об удлинении периода, необходимого для инициации процесса генерации тромбина. Из параметров традиционной коагулограммы наиболее значимо снижалось содержание протромбина и антикоагулянтов (AT-III и протеина С), уменьшалась активность фактора VIII и фактора Виллебранда. Одним из основных факторов, влияющих на длительность времени запаздывания синтеза тромбина, согласно данным А. Dielis (2008), является ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), который в избытке экспрессирует атеросклеротически изменённый эндотелий сосудов (С.Т. Mitchell, 2009) [13, 14]. Снижение естественных антикоагулянтов, видимо, связано, с одной стороны, с их интенсивным потреблением в результате массивного поступления в сосудистое русло тромбопластических веществ, образующихся при травматизации тканей во время ИК, с другой стороны, с дисфункцией сосудистого эндотелия, на поверхности которого происходит активация протеина С посредством тромбомодулина. Кроме того, нельзя исключить и факт дилуции во время операции.

Полученные результаты также свидетельствуют об активации фибринолиза на интраоперационном этапе: после протаминизации увеличивались уровни тканевого активатора плазминогена, комплекса t-PA/PAI и Д-димера. В настоящее время имеются разные мнения относительно воздействия ИК на систему фибринолиза. Ряд авторов в своих исследованиях не выявили активации системы фибринолиза после ИК, другие же, наоборот, находят выраженную её активацию [8, 15]. Учитывая физиологическую роль естественных антикоагулянтов и системы фибринолиза, их изменение можно рассматривать как фактор, сопровождающий повышенную генерацию тромбина.

В работе проводилось определение концентрации фибронектина, одного из ключевых белков межклеточного матрикса, играющего важную роль в регуляции тромбоцитарно-сосудистого гемостаза. Содержание фибронектина после протаминизации было достоверно повышено в 2 раза по сравнению с контролем. Предполагается, что повышенный уровень фибронектина связан не только с эндотелиальной дисфункцией, но и с оперативным вмешательством. Уникальная структура фибронектина позволяет функционировать ему, как молекулярный клей, соединяющий различные молекулы вместе, благодаря его доменам для фибрина, гепарина, коллагена и клеточной поверхности [16].

В раннем послеоперационном периоде параметры ТГТ продолжали статистически значимо изменяться (отображая ведущую роль тромбина в регуляции гемостатического процесса) [8, 17]: площадь под кривой снижалась, достигая уровня контроля, другие показатели теста, такие как концентрация тромбина и скорость его образования, стали статистически значимо ниже по сравнению с контролем. При этом, согласно результатам базовой коагулограммы, был снижен только протромбин, содержание антикоагулянтов хоть и подрастало относительно интраоперационных значений, но оставалось ниже контрольного уровня. Со стороны показателей, характеризующих систему фибринолиза, наблюдалось повышение тканевого активатора плазминогена, комплекс t-PA/PAI уменьшался.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют разнонаправленные изменения в системе гемостаза при проведении открытых кардиохирургических операций в условиях искусственного кровообращения. Очевидно, что лабораторные исследования отдельных факторов свертывания и факторов их регуляции (естественных антикоагулянтов, компонентов системы фибринолиза) не отражают повышенного риска послеоперационной гиперкоагуляции, не распознавание и не управление которой может существенно ухудшить послеоперационный прогноз пациентов. Оценка генерации тромбина, ключевого регулятора активации про- и антикоагулянтов, а также компонентов системы фибринолиза позволит правильно судить о глобальном балансе свертывания и составит верное представление о тех патологиях, которые приводят к геморрагическим или тромботическим состояниям. В отличие от коагулограммы, ТГТ позволяет оценить тромбиновый потенциал как одну из важнейших составляющих гемостатического потенциала в целом, дать его интегральную оценку и оптимизировать лечебно-профилактическую тактику тромбгеморрагических осложнений, что позволит разработать экономически выгодную стратегию диагностики.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дементьева И.И., Чарная М.А., Морозов Ю.А. *Диагностика, профилактика и коррекция нарушений системы гемостаза в кардиохирургии*. В книге: Руководство по кардиоанестезиологии и интенсивной терапии. Москва; 2015.
2. Лазанюк В.Н., Тарабрин О.А., Босенко В.И. *Диагностика и комплексная коррекция геморрагических расстройств у детей, оперированных по поводу цианотических врождённых пороков*

- сердца *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2016; (1): 60—70.
3. Чарная М.А., Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Гладышева В.Г., Исаева А.М. Искусственная» гипокоагуляция у пациентов с гепарининдуцированной тромбоцитопенией (Обзор литературы). Часть I. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2013; 6(2): 87—91.
  4. Чарная М.А., Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Гладышева В.Г., Исаева А.М. «Искусственная» гипокоагуляция у пациентов с гепарининдуцированной тромбоцитопенией (Обзор литературы). ЧАСТЬ II. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2013; 6: 390—3.
  5. Наместников Ю.А., Головина О.Г., Папаян Л.П. Значение теста генерации тромбина в клинической практике. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2011; 4(48): 47—9.
  6. Bosch Y., Al Dieri R., ten Cate H., Nelemans P., Bloemen S., Hemker C. et al. Preoperative thrombin generation is predictive for the risk of blood loss after cardiac surgery: a research article. *J. Cardiothorac Surg*. 2013; 8: 154.
  7. Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoort R. et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb*. 2003; 33(1): 4—15.
  8. Paparella D., Brister S.J., Bushaman M.R. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004; 30(10): 1873—81.
  9. Chantarangkul V., Clerici M., Bressi C. Giesen P.L., Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003; 88: 547—54.
  10. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory *Clin. Chem*. 2016; 62: 699—707.
  11. Said R., Regnault V., Hacquard M., Carteaux J.P., Lecompte T. Platelet-dependent thrombography gives a distinct pattern of in vitro thrombin generation after surgery with cardiopulmonary bypass: potential implications. *Thromb. J*. 2012; 10(1): 15—9.
  12. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb. Res*. 2012; 129(3): 250—6.
  13. Dielis A.W., Balliël W.M., van Oerle R., Hermens W.T., Spronk H.M., Ten Cate H. et al. Thrombomodulin-modified thrombin generation after in vivo recombinant factor VIII treatment in severe hemophilia A. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1351—7.
  14. Mitchell C.T., Kamineni A., Palmas W., Cushman M. Tissue factor pathway inhibitor, vascular risk factors and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009; 207(1): 277—83.
  15. Ray M.J., O'Brein M.F. Comparison of epsilon aminocaproic acid and low-dose aprotinin in cardiopulmonary bypass: efficiency, safety and cost. *Ann. Thorac. Surg*. 2001; 3: 838—43.
  16. Khudhairi D.M., Nadeem F., Zuleika A.M., Hussain A., Ahmed A., el Sharkawy M. Effect of aprotinin on plasma fibronectin levels during cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg*. 1997; 63(1): 64—7.
  17. Tappenden K.A., Gallimore M.J., Evans G., Mackie I.J., Jones D.W. Thrombin generation: a comparison of assays using platelet-poor and -rich plasma and whole blood samples from healthy controls and patients with a history of venous thromboembolism. *Br. J. Haematol*. 2007; 139: 106—12.
  - v kardiohirurgii*. In the book: Manual on cardioanesthesiology and intensive care. Moscow; 2015. (in Russian)
  2. Lazanyuk V.N., Tarabrin O.A., Bosenko V.I. Diagnosis and comprehensive correction of hemorrhagic disorders in children operated on for cyanotic congenital heart defects. *Complex problems of cardiovascular diseases*. 2016; (1): 60—70. (in Russian)
  3. Charnaya M.A., Dementieva I.I., Morozov Yu.A., Gladysheva V.G., Isaeva A.M. «Artificial» hypocoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia (Review of the literature). Part I. *Cardiology and Cardiovascular Surgery*, 2013; T. 6(2): 87—91. (in Russian)
  4. Charnaya M.A., Dementieva I.I., Morozov Yu.A., Gladysheva V.G., Isaeva A.M. «Artificial» hypocoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia (Review of the literature). Part II. *Cardiology and cardiovascular surgery*. 2013; T. 6(3): 390—93. (in Russian)
  5. Namestnikov Yu.A., Golovina O.G., Papayan L.P. The value of the thrombin generation test in clinical practice. *Thrombosis, hemostasis and rheology*. 2011; 4(48): 47—9.
  6. Bosch Y., Al Dieri R., ten Cate H., Nelemans P., Bloemen S., Hemker C. et al. Preoperative thrombin generation is predictive for the risk of blood loss after cardiac surgery: a research article. *J. Cardiothorac. Surg*. 2013; 8: 154.
  7. Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoort R. et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb*. 2003; 33(1): 4—15.
  8. Paparella D., Brister S.J., Bushaman M.R. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004; 30(10): 1873—81.
  9. Chantarangkul V., Clerici M., Bressi C. Giesen P.L., Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003; 88: 547—54.
  10. Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. *Clin. Chem*. 2016; 62: 699—707.
  11. Said R., Regnault V., Hacquard M., Carteaux J.P., Lecompte T. Platelet-dependent thrombography gives a distinct pattern of in vitro thrombin generation after surgery with cardiopulmonary bypass: potential implications. *Thromb. J*. 2012; 10(1): 15—9.
  12. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb. Res*. 2012; 129(3): 250—6.
  13. Dielis A.W., Balliël W.M., van Oerle R., Hermens W.T., Spronk H.M., Ten Cate H. et al. Thrombomodulin-modified thrombin generation after in vivo recombinant factor VIII treatment in severe hemophilia A. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1351—7.
  14. Mitchell C.T., Kamineni A., Palmas W., Cushman M. Tissue factor pathway inhibitor, vascular risk factors and subclinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009; 207(1): 277—83.
  15. Ray M.J., O'Brein M.F. Comparison of epsilon aminocaproic acid and low-dose aprotinin in cardiopulmonary bypass: efficiency, safety and cost. *Ann. Thorac. Surg*. 2001; 3: 838—43.
  16. Khudhairi D.M., Nadeem F., Zuleika A.M., Hussain A., Ahmed A., el Sharkawy M. Effect of aprotinin on plasma fibronectin levels during cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg*. 1997; 63(1): 64—7.
  17. Tappenden K.A., Gallimore M.J., Evans G., Mackie I.J., Jones D.W. Thrombin generation: a comparison of assays using platelet-poor and -rich plasma and whole blood samples from healthy controls and patients with a history of venous thromboembolism. *Br. J. Haematol*. 2007; 139: 106—12.

## REFERENCES

1. Dementieva I.I., Charnaya M.A., Morozov Yu.A. *Diagnosis, prevention and correction of hemostasis system disorders in cardiosurgery [Diagnostika, profilaktika i korrekciya narushenij sistemy gemostaza*

Поступила 14.04.17  
Принята к печати 20.04.17

## ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.3-076.5:575.08

Волков А.Н.<sup>1,2</sup>, Рытенкова О.И.<sup>3</sup>, Бабарыкина Т.А.<sup>3</sup>, Лысенко Д.И.<sup>3</sup>

### ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 650029, Кемерово, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, Кемерово, Россия;

<sup>3</sup>ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», 650000, Кемерово, Россия

*Цель исследования — изучение качественных и количественных характеристик хромосомных аномалий у абортусов при неразвивающейся беременности. Проведен цитогенетический анализ эмбрионального материала, полученного после искусственного прерывания неразвивающейся беременности у 57 женщин. Доля аномальных кариотипов составила 67,3%. Среди хромосомных нарушений преобладали числовые аномалии, структурные изменения хромосом встречались значительно реже. Цитогенетическое исследование абортного материала может стать ценным диагностическим инструментом, позволяющим установить роль генетических факторов в прекращении развития беременности как в случаях естественного зачатия, так и при использовании ВРТ.*

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность; цитогенетический анализ; хромосомные аномалии.

**Для цитирования:** Волков А.Н., Рытенкова О.И., Бабарыкина Т.А., Лысенко Д.И. Цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий при неразвивающейся беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 553-556. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-553-556>

*Volkov A.N.<sup>1,2</sup>, Rytenkova O.I.<sup>3</sup>, Babarykina T.A.<sup>3</sup>, Lysenko D.I.<sup>3</sup>*

#### THE CYTOGENETIC DIAGNOSTIC OF CHROMOSOME ANOMALIES UNDER NON-DEVELOPING PREGNANCY

<sup>1</sup>The Kemerovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 650029 Kemerovo, Russia

<sup>2</sup>The Kemerovskii state university, 650043 Kemerovo, Russia

<sup>3</sup>The Kemerovskaia oblast clinical hospital, 650000 Kemerovo, Russia

*The purpose of the study is to analyze qualitative and quantitative characteristics of chromosome anomalies in abortus under undeveloped pregnancy. The cytogenetic analysis was implemented concerning embryonic material obtained after artificial abortion of undeveloped pregnancy in 57 women. The percentage of abnormal karyotypes made up to 67.3%. The number abnormalities prevailed among chromosome disorders. The structural alterations of chromosomes occurred significantly rarely. The cytogenetic analysis of abortion material can become a valuable diagnostic tool permitting to establish the role of genetic factors in termination of pregnancy both in cases of natural conception and application of ART.*

**Key words:** undeveloped pregnancy; cytogenetic analysis; chromosome anomalies.

**For citation:** Volkov A.N., Rytenkova O.I., Babarykina T.A., Lysenko D.I. The cytogenetic diagnostic of chromosome anomalies under non-developing pregnancy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 553-556. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-553-556>

**For correspondence:** Volkov A.N., candidate of biological sciences, senior researcher, associate professor of the chair of genetics. e-mail: [volkov\\_alex@rambler.ru](mailto:volkov_alex@rambler.ru)

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

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

Received 13.04.2017

Accepted 15.04.2017

Неразвивающаяся, или замершая беременность (НБ) — одна из распространённых причин потери плода; она составляет существенную долю в общем спектре патологий беременности. Частота НБ в различных популяционных группах обычно рассчитывается на

основании анализа клинических признаков наступления и прекращения беременности. В таком случае эта величина приблизительно оценивается в 15—25% [1]. В действительности этот показатель существенно выше за счёт нераспознанных ранних потерь беременности. Так, в исследовании N. Elish и соавт. (1996) установлено, что 17,4% случаев успешного зачатия самопроизвольно разрешаются потерей беременности в течение 2 нед. [2]. В дальнейшем еще 13,7% клинически подтверждённых беременностей заканчиваются спонтан-

**Для корреспонденции:** Волков Алексей Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КемГМУ, доц. каф. генетики ФГБОУ ВО КемГУ; e-mail: [volkov\\_alex@rambler.ru](mailto:volkov_alex@rambler.ru)

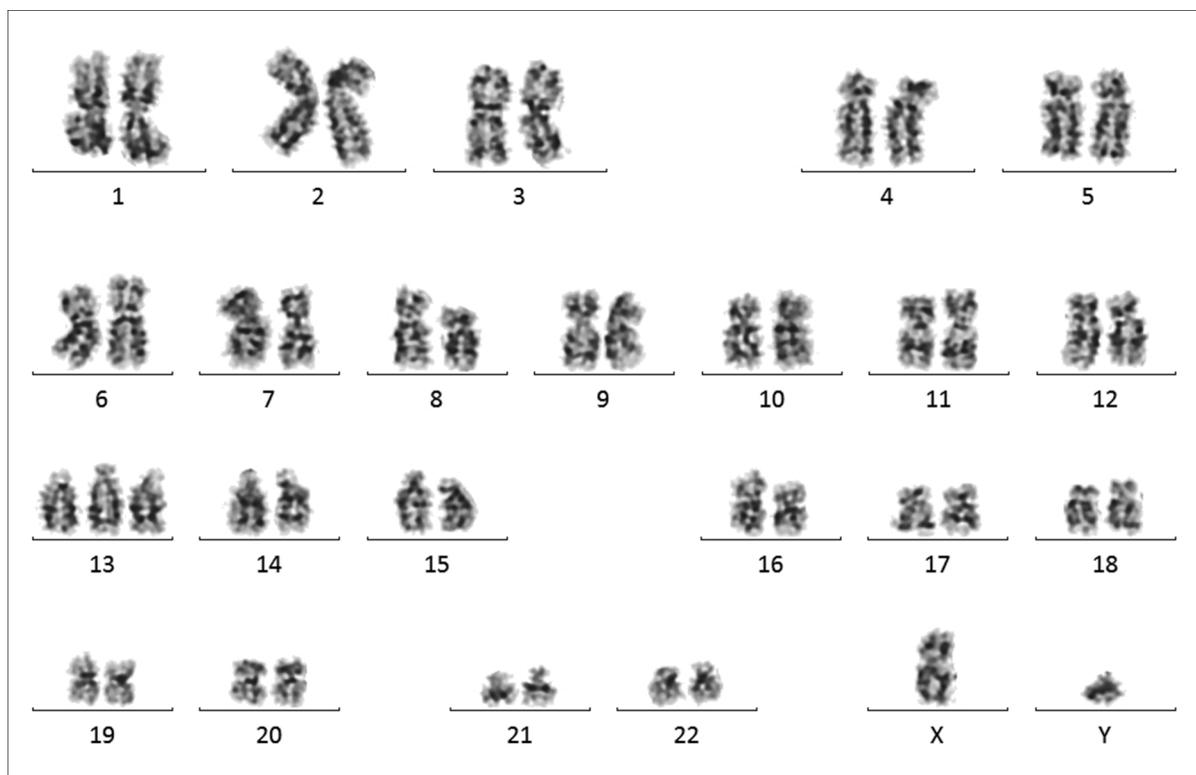


Рис. 1. Мужской кариотип эмбриона с трисомией по хромосоме 13 (47,XY,+13).

ным абортom до 16-й недели беременности [2]. Таким образом, на ранних стадиях беременности происходит жёсткий естественный отбор эмбрионов, в том числе и с позиции их генетических качеств.

Вклад генетических аномалий в нарушение развития эмбриона считается высоким. По разным данным, до 70% беременностей, прекративших развитие на 6—8-й неделе, несли эмбрион с различными хромосомными аномалиями [3, 4]. Изучение кариотипа эмбрионов при НБ имеет важное практическое значение, так как позволяет определить причины патологии беременности в каждом клиническом случае. Кроме того, такие исследования позволяют оценить уровень хромосомного мутагенеза у ранних эмбрионов и его вклад в общую картину репродуктивных потерь у населения.

Цель исследования — изучение качественных и количественных характеристик хромосомных аномалий у абортусов при неразвивающейся беременности.

**Материал и методы.** Для исследования были использованы образцы хориона и тканей эмбрионов, полученные при искусственном прерывании неразвивающейся беременности у 57 женщин, проживающих в Кемерово. Средний возраст женщин составил  $32,6 \pm 0,71$  года, а возрастной диапазон 24—43 года.

Биоматериал, помещённый в физиологический раствор с гепарином, доставлялся в цитогенетическую лабораторию медико-генетической консультации КОКБ (Кемерово). Все дальнейшие манипуляции вплоть до приготовления препаратов метафазных хромосом осуществлялись согласно имеющимся рекомендациям. Готовились «прямые» препараты без предварительного культивирования тканей [5]. Цитогенетический анализ дифференциально GTG-окрашенных хромосом выполнялся в соответствии с действующими требованиями [6] (рис. 1).

Статистический анализ осуществляли с использованием программы Statistica, v.5.5. Рассчитывались основные выборочные характеристики переменных (средние значения, пределы варьирования, доли) и стандартные ошибки средних значений.

**Результаты и обсуждение.** Прежде всего следует отметить, что общая результативность процедуры цитогенетического анализа клинического материала составила 91,2%, что сопоставимо с показателями, достигнутыми другими лабораториями [3, 4]. В 2 случаях качество доставленных образцов оказалось неудовлетворительным, дальнейшая работа с ними была нецелесообразна. В 3 случаях приготовленные цитогенетические препараты не содержали делящихся клеток. Это было связано с запоздалым выполнением медицинского аборта в сроке более 2 нед после замирания беременности. Таким образом, для эффективного цитогенетического анализа эмбрионального материала критическим является качество биоптата и своевременность выполнения соответствующих акушерских процедур.

Цитогенетический анализ абортного материала при замершей беременности показал, что 67,3% образцов содержат хромосомные аномалии. Сверхчисленные хромосомы или отсутствие хромосомы в какой-либо паре (анеуплоидии) отмечались в 51,9% случаев. В 11,5% образцов наблюдалось кратное увеличение числа гаплоидных хромосомных наборов (полиплоидии). Значительно реже (3,8% препаратов) образцы содержали хромосомные aberrации (рис. 2). Высокая доля аномальных кариотипов у спонтанных абортусов неоднократно выявлялась ранее и находилась в пределах 64—74,7% [3, 4, 7]. Учитывая это, можно говорить о значительном уровне хромосомного мутагенеза при формировании гамет и оплодотворении у человека как биологического вида.



Рис. 2. Доля хромосомных аномалий различного типа в биологических образцах при неразвивающейся беременности.

Очевидно, именно эти хромосомные аномалии становятся ведущей причиной прекращения развития беременности в ранние сроки.

Анализ спектра хромосомных нарушений в эмбриональном материале показал, что среди анеуплоидий наиболее часто встречается трисомия по 16 хромосоме (17,1% общего числа хромосомных нарушений) (см. таблицу). Кроме того, данная хромосома участвовала

#### Частота различных хромосомных аномалий при замершей беременности

Тип аномалии	Частота среди всех аномалий, n (%)
Простые анеуплоидии, в том числе:	24 (68,6)
47,XX,+16 и 47,XY,+16	6 (17,1)
45,X	3 (8,6)
47,XXY	2 (5,7)
47,XX,+2 и 47,XY,+2	2 (5,7)
47,XX,+8	2 (5,7)
47,XX,+13	2 (5,7)
47,XX,+3	1 (2,9)
47,XX,+6	1 (2,9)
47,XX,+7	1 (2,9)
47,XX,+15	1 (2,9)
47,XY,+18	1 (2,9)
47,XY,+21	1 (2,9)
47,XY,+22	1 (2,9)
Двойные анеуплоидии, в том числе:	3 (8,6)
48,XX,+16,+18	1 (2,9)
48,XY,+16,+20	1 (2,9)
48,XY,+16,+21	1 (2,9)
Полиплоидии, в том числе:	6 (17,1)
69,XXX и 69,XXY	5 (14,3)
92,XXYY	1 (2,9)
Хромосомные aberrации, в том числе:	2 (5,7)
mos47,XY,+mar[9]/46,XY[11]	1 (2,9)
46,XY,der(14)t(14;15)(p11;q22),mat	1 (2,9)

во всех выявленных нами двойных анеуплоидиях. Высокую распространённость трисомии 16 у спонтанных абортусов отмечали и в предыдущих исследованиях. Так, Р. Jacobs и Т. Hassold [8] обнаружили эту мутацию в 16,1% аномальных кариотипов, а О. Чиряева и соавт. [3] — в 14% таких образцов.

Часто у эмбриона выявлялся кариотип 45,X, который совместим с жизнью и ассоциирован с формированием синдрома Шерешевского—Тернера в постнатальном периоде. При этом характер и степень выраженности пороков развития существенно варьируют. Вероятно, внутриутробная гибель эмбрионов с этой аномалией связана с воздействием дополнительных летальных факторов. По-видимому, то же можно сказать об эмбрионах с кариотипом 47,XXY. В целом доля анеуплоидий по половым хромосомам в рассматриваемой выборке составила 14,3% общего числа аномальных кариотипов.

Помимо уже отмеченных хромосом, в формировании анеуплоидий участвовали еще 10 различных аутосом. Во всех случаях наблюдались трисомии, а моносомии не выявлялись. Невысокая частота каждой из этих аномалий позволяет предположить случайный характер мутационных событий, происходящих при формировании соответствующих анеуплоидий. При этом в составе кариотипов избыточными могли быть как крупные хромосомы (2-я, 3-я), так и самые маленькие (21-я и 22-я).

Отсутствие в выборке образцов с анеуплоидиями прочих хромосом, вероятно, объясняется статистическими причинами. Увеличение объёма проанализированного материала позволило бы обнаружить и иные хромосомные аномалии. Так, в одной из ранее цитированных работ при кариотипировании 200 спонтанных абортусов были выявлены трисомии с участием всех хромосом, за исключением 1, 4, 10, 19 [3]. Увеличение выборки до 233 образцов даёт возможность обнаружить дополнительные трисомии по хромосомам 4 и 10 [4]. Отсутствие (или крайне редкая встречаемость) трисомий 1 и 19 у абортусов до сих пор не объяснено.

Весьма характерной генетической чертой эмбрионов при неразвивающейся беременности является высокая распространённость полиплоидий (17,1% всех аномальных кариотипов) со значительным преобладанием триплоидии. Это соответствует результатам более ранних исследований [3, 7, 8], в которых максимальная частота триплоидных кариотипов среди генетически аномальных абортусов достигала 21% [8].

Доля всех типов хромосомных aberrаций общего числа хромосомных аномалий, напротив, невысока и составила 5,7%. Нами выявлены только 2 таких случая. В одном из них кариотип был мозаичным, с дополнительной маркерной хромосомой в части клеток (mos47,XY,+mar[9]/46,XY[11]). В другом образце выявлена несбалансированная транслокация материнского происхождения 46,XY,der(14)t(14;15)(p11;q22),mat.

Для того чтобы объяснить столь значительный вклад хромосомных нарушений в прекращение развития эмбриона, необходимо принять во внимание срок замирания беременности. В рассмотренной нами выборке эта величина, по результатам УЗИ, составила  $6,6 \pm 0,31$  нед при варьировании показателя в пределах 4—13 нед. Анализ распределения образцов по сроку беременности показал, что в 83,7% случаев остановка развития эмбрионов произошла до 8-й недели беременности (рис. 3). Этот период совпадает со временем раннего (активного) органогенеза. Происходит закладка осевого комплекса (хорда, нервная трубка,

ЦИТОЛОГИЯ

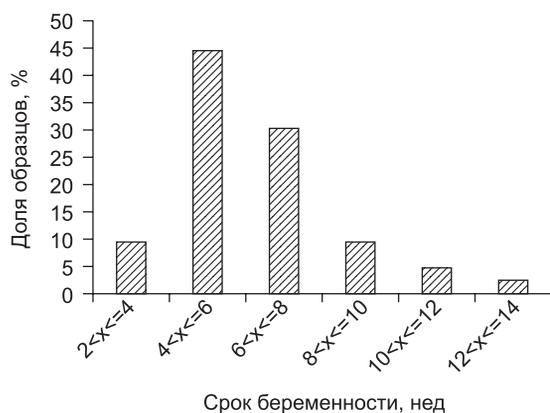


Рис. 3. Распределение образцов в зависимости от срока замирирования беременности, установленного по УЗИ.

сомиты), выделение и формирование зачатков практически всех органов и систем, формирование дефинитивной плаценты. Очевидно, нарушение чёткой работы наследственного аппарата из-за хромосомных аномалий в этот период может послужить достаточной причиной для прекращения дальнейшего развития эмбриона [5].

Вместе с тем полное отсутствие в изученном материале моносомий по аутосомам может свидетельствовать о наличии внутриутробной гибели эмбрионов на ещё более ранних стадиях развития, что с трудом поддаётся учёту и цитогенетическому исследованию. Наоборот, среди эмбрионов, преодолевших эти этапы отбора, остаётся минимальное количество носителей хромосомных аномалий, несовместимых с жизнью. В дальнейшем большая их часть будет самопроизвольно элиминирована, а частота хромосомных нарушений у новорождённых не превысит 1% [8].

С практической позиции цитогенетическое исследование абортного материала важно в двух аспектах. Хромосомные аномалии, выявляемые у эмбрионов, считаются спорадическим событием, их появление непредсказуемо, а причины до конца не ясны. С этой точки зрения выявление аномалии даёт повод надеяться на отсутствие у женщины иных патологий, повлекших замирание беременности. Последующие беременности могут реализоваться вполне успешно. Напротив, отсутствие в эмбриональных клетках хромосомных нарушений побуждает продолжить поиск причин репродуктивной неудачи, что будет сопряжено с дополнительными обследованиями женщины и, возможно, терапевтическими процедурами.

С другой стороны, всё более широкое использование вспомогательных репродуктивных технологий требует внедрения сопутствующих методов оценки генетического здоровья эмбриона. Цитогенетические исследования эмбрионального материала при неразвивающейся беременности после ЭКО и ИКСИ показали, что частота хромосомной патологии и спектр аномалий в этом случае сопоставимы с популяционными показателями [9].

Выявление хромосомных нарушений в абортном материале после ЭКО и ИКСИ может свидетельствовать об использовании генетически дефектных гамет или мутационном событии, произошедшем после оплодотворения. Отсутствие хромосомных нарушений свидетельствует об иных причинах неудачной беременности. В обоих случаях цитогенетический анализ даёт ценную информацию

для врача-репродуктолога и позволяет наметить пути дальнейшего анализа и решения возникших проблем.

**Заключение.** Согласно результатам исследования, биологический материал, полученный от замерших беременностей, в 67,3% случаев содержит хромосомные аномалии. Преобладают численные нарушения (анеуплоидии и полиплоидии). Структурные изменения хромосом встречаются значительно реже. Таким образом, хромосомные нарушения можно считать ведущей причиной гибели эмбрионов вплоть до 6—8-й недели беременности. Цитогенетическое исследование абортного материала — ценный диагностический инструмент, позволяющий установить роль генетических факторов в прекращении развития беременности как в случаях естественного зачатия, так и при использовании ВРТ.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4, 6, 8 см. REFERENCES)

3. Чиряева О.Г., Петрова Л.И., Садик Н.А., Дудкина В.С., Пендина А.А., Фёдорова И.Д., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Цитогенетический анализ хориона при неразвивающейся беременности. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2007; LVI (1): 35—45.
5. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. *Цитогенетика эмбрионального развития человека.* СПб.: Издательство Н-Л; 2007.
7. Тихомирова С.В., Диунов А.Г., Гурьев Д.Л., Нестулей С.Ю. Анализ аномалий кариотипа хориона при неразвивающейся беременности. *Медицинская генетика.* 2016; 15(5): 45—7.
9. Боярский К.Ю., Гайдук С.Н., Леонченко В.В. Причины прерывания беременности после ЭКО и ИКСИ в первом триместре: анализ клинических и цитогенетических данных. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2008. LVII (4): 73—5.

REFERENCES

1. Pfeifer S., Fritz M., Goldberg J. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012; 98(5): 1103—11.
2. Elish N., Saboda K., O'Connor J., Nasca R., Stanek E.J., Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. *Human Reproduction.* 1996; 11(2): 406—12.
3. Chiryayeva O.G., Petrova L.I., Sadik N.A., Dudkina V.S., Pendina A.A., Fedorova I.D., Kuznetsova T.V., Baranov V.S. Direct cytogenetic study of chorionic samples from the arrested pregnancy tissues. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2007; LVI (1): 35—45. (in Russian)
4. Philipp T., Philipp K., Reiner A., Beer F., Kalousek D.K. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Human Reproduction.* 2003; 18(8): 1724—32.
5. Baranov V.S., Kuznetsova T.V. *Cytogenetics of human embryo development [Citogenetika embrional'nogo razvitiya cheloveka].* St. Petersburg: Izdatel'stvo N-L; 2007. (in Russian)
6. Shaffer L.J., McGowan-Jordan J., Schmid M. *ISCN 2013. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).* Basel: Karger; 2013.
7. Tikhomirova S.V., Diunov A.G., Guriev D.L., Nestuley S.Yu. Analysis of abnormalities of chorion karyotype in cases of non-developing pregnancy. *Meditinskaya genetika.* 2016; 15(5): 45—7. (in Russian)
8. Jacobs P., Hassold T. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv. Genet.* 1995; 33: 101—33.
9. Boyarsky C.Y., Gaidukov S.N., Leonchenko V.V. The causes of arrested IVF and ICSI pregnancies in the first trimester: analysis of clinical and cytogenetic data. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2008; LVII (4): 73—5. (in Russian)

Поступила 13.04.17

Принята к печати 15.04.17

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.19-006.04-078.33

Подлесных С.В.<sup>1</sup>, Колосова Е.А.<sup>1</sup>, Анисимов Д.С.<sup>1</sup>, Щербаков Д.Н.<sup>1</sup>, Рязанов М.А.<sup>1</sup>, Петрова В.Д.<sup>3</sup>, Шойхет Я.Н.<sup>4</sup>, Johnston S.A.<sup>2</sup>, Лазарев А.Ф.<sup>3</sup>, Шаповал А.И.<sup>1,2</sup>

### ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>Российско-американский противораковый центр ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», 656049, Барнаул, Россия;

<sup>2</sup>Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, 85287, Темпе, Аризона, США;

<sup>3</sup>Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 656049, Барнаул, Россия

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 656038, Барнаул, Россия;

*В настоящее время для ранней диагностики актуален поиск новых биомаркеров рака. В качестве альтернативы существующим биомаркерам большой интерес приобретают антитела (АТ) против антигенов, ассоциированных с опухолями. Изменение количества и специфичности АТ в сыворотке крови указывает на происходящие процессы в организме, в том числе на развитие онкологических заболеваний. В работе приведены результаты анализа репертуара антител (иммуносигнатуры) с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рака молочной железы (РМЖ). Мы выявили 119 информативных пептидов из 330 034 пептидов, представленных на микрочипе, связывание антител с которыми демонстрирует статистически значимые межгрупповые различия ( $p < 0,001$ ). Эта панель пептидов помогает с высокой чувствительностью и специфичностью различать сыворотки больных и здоровых доноров. Оценка репертуара антител, взаимодействующих с панелью синтетических пептидов, может быть использована для разработки диагностических тестов при обнаружении РМЖ на ранних стадиях.*

**Ключевые слова:** пептидные микрочипы; биомаркеры; опухольассоциированные антитела; рак молочной железы; репертуар антител; иммуносигнатура.

**Для цитирования:** Подлесных С.В., Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербаков Д.Н., Рязанов М.А., Петрова В.Д., Шойхет Я.Н., Johnston S.A., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Высокоспецифичный и чувствительный анализ репертуара сывороточных антител с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рак молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 557-563. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-557-563>

Podlesnykh S.V.<sup>1</sup>, Kolosova E.A.<sup>1</sup>, Anisimov D.S.<sup>1</sup>, Scherbakov D.N.<sup>1</sup>, Ryazanov M.A.<sup>1</sup>, Petrova V.D.<sup>3</sup>, Shoikhet Ya.N.<sup>4</sup>, Johnston S.A.<sup>2</sup>, Lazarev A.F.<sup>3</sup>, Shapoval A.I.<sup>1,2</sup>

#### THE HIGHLY SPECIFIC AND SENSITIVE ANALYSIS OF REPERTOIRE OF SERUM ANTIBODIES USING PEPTIDE MICROCHIPS IN PATIENTS WITH DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

<sup>1</sup>The Russian-American anti-cancer center of the Altaiiiskii state university, 656049 Barnaul, Russia

<sup>2</sup>Center for Innovations in Medicine, The Biodesign Institute, Arizona State University, 85287, Tempe, AZ, USA;

<sup>3</sup>The Altaiiiskii branch of the N.N. Blokhin Rossiiskii oncologic center of Minzdrav of Russia, 656049 Barnaul, Russia

<sup>4</sup>The Altaiiiskii state medical university of Minzdrav of Russia, 656038 Barnaul, Russia

*Nowadays, the search for new biomarkers of cancer is actual for early diagnostic. The antibodies against antigens associated with tumors arouse an interest as an alternative to the present biomarkers. The alteration of quantity and specificity of antibodies in blood serum indicates processes occurring in the organism, including development of oncologic diseases. The article presents the results of analysis of repertoire of antibodies (immunotypes) using peptide micro-chips in patients with diagnosis of breast cancer. The study established 119 informative peptides out of 330 034 peptides, presented on the microchip. The binding of antibodies with them demonstrates statistically significant intergroup values ( $p < 0.001$ ). This panel of peptides is effective in discerning sera of patients and healthy donors with high sensitivity and specificity. The evaluation of repertoire of antibodies interacting with panel of synthetic peptides can be used in development of diagnostic tests in case of detection of breast cancer at early stages.*

**Keywords:** peptide microchips; biomarkers; tumor-associated antibodies; breast cancer; repertoire of antibodies; immunotype/0869-2084-2017-62-10-

**For citation:** Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Anisimov D.S., Scherbakov D.N., Ryazanov M.A., Petrova V.D., Shoikhet Ya.N., Johnston S.A., Lazarev A.F., Shapoval A.I. The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 557-563. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-557-563>

**For correspondence:** Podlesnykh S.V., post-graduate student, junior researcher. e-mail: step-uch@mail.ru

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

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

Received 30.04.2017  
Accepted 16.05.2017

**Для корреспонденции:** Подлесных Степан Васильевич, аспирант, мл. науч. сотр. Российско-американского противоракового центра ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; e-mail: step-uch@mail.ru

В структуре причин заболеваемости и смертности населения стран мира, по данным ВОЗ за 2015 г., онкологические заболевания за последние годы вышли на лидирующие позиции [1]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России ведущей онкологической патологией является рак молочной железы (РМЖ), составляющий 20,9% [2]. Около 60% РМЖ диагностируется на ранних стадиях, но приблизительно 20% диагнозов являются ложноотрицательными [3]. Пятилетняя выживаемость у пациентов с I стадией РМЖ составляет 93% и только 7% у пациентов с IV стадией [4]. Таким образом, в настоящее время наиболее актуальной является диагностика онкологических заболеваний на ранних стадиях, до манифестации клинических симптомов болезни [5—8], что может стать перспективным решением для снижения инвалидности и смертности.

Сегодня общепризнанными биомаркерами в диагностике РМЖ являются белки, такие как CA 27.29, CA 15.3, p53, CEA, PEA, ER, PR, HER2 [6, 9—13]. Однако эти белки можно обнаружить только при уже сформировавшихся опухолях (более 2,5 см), доступных для биопсии или способных к продукции высоких концентраций белков [6, 9]. К тому же эти биомаркеры не обеспечивают достаточной чувствительности и специфичности диагностических методов, что приводит к ложноположительным и ложноотрицательным диагнозам [5, 11, 14].

Бессимптомное развитие онкологических заболеваний может происходить в течение нескольких лет, и в это время белковые биомаркеры в сыворотке крови практически невозможно выявить. В качестве альтернативы существующим биомаркерам в настоящее время большой интерес вызывают антитела (АТ) против антигенов, ассоциированных с опухолями (ТАА — tumor associated antigens) [7, 15—17]. Изменение количества и специфичности АТ в сыворотке в ответ на патофизиологические изменения при развитии онкологических заболеваний может быть использовано для диагностических целей [18, 19]. Антитела в отличие от существующих биомаркеров рака более стабильны, специфичны и характеризуются ранней продукцией в ответ на антиген. Для эффективной диагностики необходима технология, которая позволит расшифровать изменения в составе циркулирующих антител.

Нашей исследовательской группой разрабатывается метод, в основе которого лежит оценка сывороточных антител как маркеров онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы. Метод основан на применении пептидных микрочипов со случайными аминокислотными последовательностями, которые используются для оценки взаимодействия антител с частичным или полным подобием эпитопов антигенов [7, 20]. Этот метод использован для анализа связывающей активности моноклональных антител, оценки эффективности вакцин и сравнения репертуаров сывороточных антител здоровых добровольцев и пациентов с различными диагнозами, включая болезнь Альцгеймера, инфекционные, онкологические и аутоиммунные заболевания [15, 20—25].

*Цель работы* — с помощью пептидных микрочипов сравнить репертуар антител в сыворотках здоровых доноров и больных с диагнозом РМЖ.

*Материал и методы.* Для выполнения настоящей работы сформировали 2 группы. В первую группу во-

шла 41 пациентка (средний возраст  $56,4 \pm 12,2$  года) с диагнозом РМЖ, во вторую группу (контроль) — 40 здоровых женщин (средний возраст  $47,1 \pm 8,5$  года). Исследование одобрено этическим комитетом Алтайского филиала РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Барнаул). Все пациенты и здоровые доноры подписали письменное информированное согласие.

Взятие капиллярной крови из пальца производили в конические пробирки типа Микровет («Фирма Синтакон»), содержащих  $K_3$ ЭДТА. Пробирки с образцами центрифугировали с частотой вращения 1500 об/мин при  $4^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Образцы полученной плазмы замораживали для хранения при  $-20^\circ\text{C}$  и использовали для исследования. Оценку репертуара антител в сыворотках больных и здоровых доноров проводили с помощью микрочипов, содержащих 24 идентичных микроэреэра из 330 034 пептидов со случайными аминокислотными последовательностями. Пептиды синтезированы на подложке микрочипа методом фотолитографии, как описано ранее [20]. Аминокислотная последовательность и месторасположение каждого пептида на микроэреэре известно. Каждый микроэреэрей имеет площадь  $0,5 \text{ см}^2$ , размер точки каждого пептида около 8 мкм в диаметре, расстояние между соседними пептидами приблизительно 1 нм.

Для экспериментальной работы проводили предварительную подготовку микрочипов. Каждый микрочип на 60 мин отдельно помещали в чашку Петри с дистиллированной водой, затем в фосфатно-солевой буфер (ФСБ, «Биолот») на 30 мин, инкубировали при малой скорости орбитального шейкера Biosan OS 20 («Biosan»). После этого микрочипы фиксировали в штативе кюветы EasyDip и промывали полосканием в трёх свежих растворах ФСБТ (ФСБ + 0,25% Твин 20, «Helicon») и дистиллированной воде. После предварительной подготовки высушенные центрифугированием в течение 5 мин при 800 об/мин микрочипы помещали в гибридизационную кассету («Arrait Corporation») с силиконовыми прокладками, обеспечивающими разделение всех 24 микроэреэрей на микрочипе. В каждую лунку кассеты, соответствующей микроэреэрею микрочипа, добавляли по 150 мкл инкубационного раствора, содержащего ФСБТ и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Amresco»). Поверхность кассеты покрывали плёнкой, инкубировали микрочипы в течение 18 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Предварительно удалив содержимое лунок кассеты, вносили 75 мкл инкубационного раствора. Образцы исследуемой плазмы крови разводили (1:250) в инкубационном растворе и добавляли в лунки гибридизационной кассеты в объёме 75 мкл, поверхность кассеты покрывали плёнкой и накрывали крышкой, инкубировали в течение 60 мин ( $22\text{—}24^\circ\text{C}$ ) на орбитальном шейкере при 250 об/мин. После инкубации с помощью промывателя микропланшетов BioTek ELx50 («BioTek Instruments») микрочипы промывали тремя повторами свежего ФСБТ и промывочным раствором (ФСБТ + 1% БСА). Разборку кассет и извлечение микрочипов проводили в контейнере с дистиллированной водой, не допуская высушивания. Микрочипы помещали в четырёхлуночные планшеты, наполненные раствором «вторичных» антител против IgG человека (5 мл/лунку) с флуоресцентной меткой Alexa Flour 647 («Life Technologies») 75 пг/мл в инкубационном растворе. Планшеты с микрочипами в растворе «вторичных» антител накрывали не пропускающей свет крышкой,

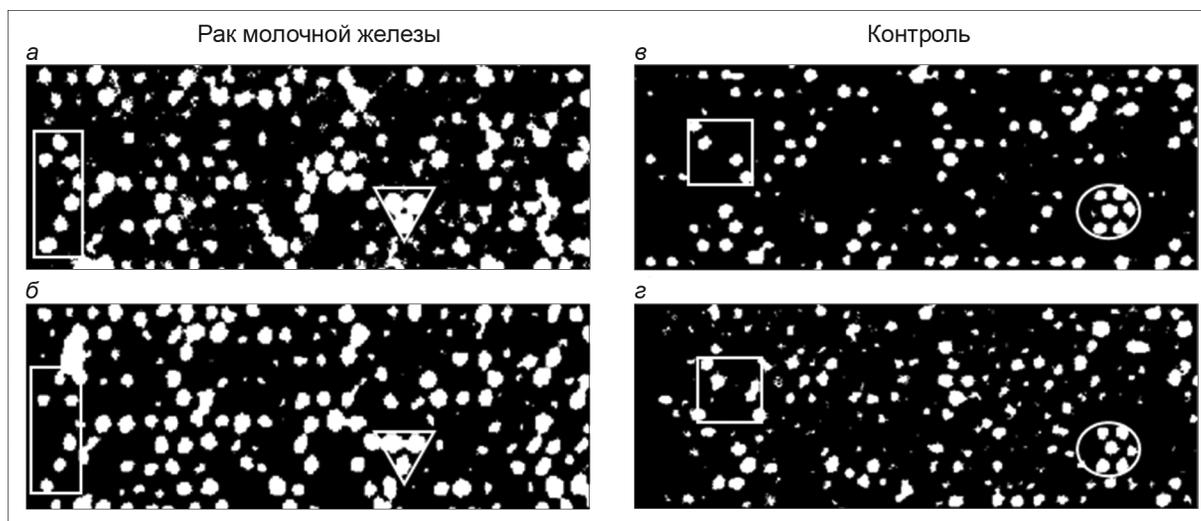


Рис. 1. Взаимодействие антител с пептидами на микрочипе. Образец сканированного изображения пептидного микрочипа высокой плотности, инкубированного с сыворотками больной РМЖ и здорового донора (два повтора для каждой сыворотки).

а, б — рак молочной железы; в, з — контроль; светлые точки представляют пептиды, с которыми взаимодействуют сывороточные антитела, линиями выделены скопления пептидов, отражающие воспроизводимость тестирования сыворотки на разных микрочипах.

инкубировали при температуре 22—24°C в течение 60 мин на малой скорости орбитального шейкера. После этого микрочипы, фиксированные в кюветах Easy-Dip, промывали полосканием в трёх свежих растворах ФСБТ, дистиллированной воде и в течение 5 мин высушивали центрифугированием (800 об/мин).

Высушенные микрочипы сканировали с использованием двухлазерного сканера высокого разрешения «InnoScan 900 AL» («Innorsys») при длине волн 632 и 535 нм. Положение, размер и интенсивность флуоресценции для каждого пептида оценивались с помощью программного обеспечения Marix (v. 7.3.1). Оцифрованные результаты использовали в математической и статистической обработке.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью алгоритмов анализа программного обеспечения BRB-Array Tools (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>). Каждый оцифрованный микроэрейд анализировали с использованием фильтров интенсивности флуоресценции. Нормализацию полученных данных интенсивности флуоресценции проводили с помощью алгоритма квантильной нормализации [24, 26, 27]. Дополнительно применяли алгоритм качества. Уровни интенсивности по каждому образцу логарифмировали с последующим усреднением для сравнения классов. Пептиды, разница взаимодействия с которыми в двух группах сывороток статистически значима, были выбраны с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок с последующим иерархическим кластерным анализом [15, 21, 26, 27]. Для построения дендрограмм применен метод Уорда (Ward's method) с использованием квадрата евклидова расстояния в качестве меры сходства объектов. Для анализа пептидов применяли классификатор *k*-Nearest Neighbors с евклидовой метрикой и алгоритм перекрёстной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Различия считали статистически значимыми если  $p < 0,001$ .

**Результаты и обсуждение.** Образцы сыворотки крови здоровых доноров и пациентов с диагнозом РМЖ были проанализированы с помощью пептид-

ных микрочипов для оценки репертуара циркулирующих антител. Ранее мы показали, используя микрочипы с пептидами, нанесёнными на их поверхности (10 286 пептидов), что циркулирующие антитела в сыворотке здоровых добровольцев и больных с РМЖ взаимодействуют с разными группами пептидов [28]. В настоящей работе использовались микрочипы нового поколения, где пептиды (300 034 пептида) синтезировались на поверхности микрочипа с помощью метода фотолитографии [20].

На первом этапе проведён визуальный анализ микроэрейд с разными образцами сыворотки. На рис. 1 представлены идентичные участки микроэрейд после инкубации с сыворотками и вторичными антителами. Видно, что сыворотки двух групп (РМЖ и контроль) взаимодействуют с разными группами синтетических пептидов. Анализ одних участков двух разных микроэрейд, представленных на рис. 1, свидетельствует о взаимодействии сыворотки одного донора с аналогичным набором пептидов, что говорит о хорошей воспроизводимости эксперимента при использовании технических повторов. Следует отметить некоторое количество неизбежных погрешностей, которые возникают при производстве или обработке пептидного микрочипа, однако эти артефакты не снижают информативность теста.

Следующим этапом работы стал выбор пептидов, взаимодействие с которыми контрольных и РМЖ-сывороток показывает статистически значимые отличия. Для этого сканированные изображения микрочипов оцифровывались, и оценивалась интенсивность флуоресценции каждого пептида. Интенсивность флуоресценции соответствует количеству сывороточных антител, взаимодействующих с отдельным пептидом. Медианные уровни интенсивности флуоресценции каждого из анализируемых микрочипов имели некоторые отличия. Для выравнивания медианы всех микрочипов нами применён алгоритм квантильной нормализации, позволяющий сглаживать различия между микроэрейд. Как было установлено ранее, нормализация данных

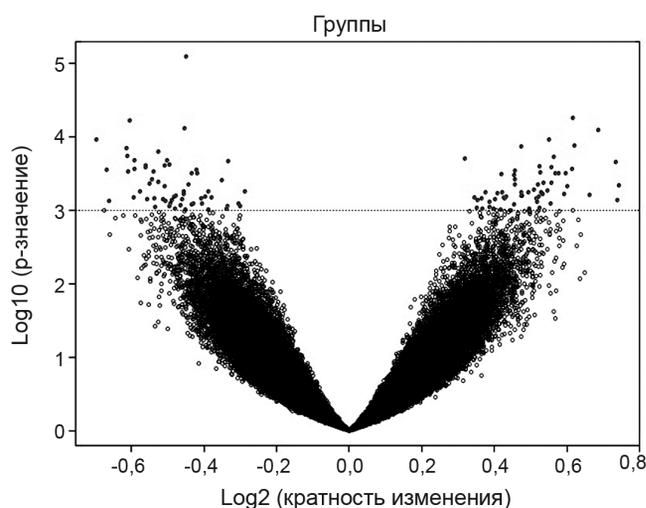


Рис. 2. Диаграмма распределения интенсивности свечения пептидов (Volcano plot). Левый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми выше с сыворотками больных РМЖ. Правый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми выше с сыворотками здоровых доноров. Точки выше пунктирной линии представляют пептиды, разница в интенсивности свечения которых в группах больных РМЖ и здоровых доноров статистически значима ( $p < 0,001$ )

несколько снижает уровень, но не искажает разницу во флуоресценции, вызванную биологическими эффектами связывания сывороточных антител с пептидами [28]. Дальнейший анализ результатов проводили с использованием нормализованных данных.

Распределение нормализованных интенсивностей флуоресценции пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ и здоровых доноров, показано на рис. 2. С помощью статистического анализа данных выявлены пептиды, которые по-разному взаимодействуют с контрольными и РМЖ-сыворотками. На рис. 2 отмечены синтетические пептиды, с которыми взаимодействуют только сыворотки больных РМЖ, а также другой набор пептидов, взаимодействующих только с сыворотками здоровых доноров. В результате оценки циркулирующих антител у здоровых доноров и больных РМЖ с помощью пептидных микрочипов (общее количество 330 034 пептидов) нами выявлено 119 пептидов, связывание с которыми сывороточных антител (IgG) показало статистически значимые межгрупповые различия ( $p < 0,001$ ).

Иерархический кластерный анализ образцов сыворотки, с использованием выявленных 119 пептидов представлен на рис. 3. График демонстрирует четкое разделение двух групп на кластеры в зависимости от наличия или отсутствия диагноза РМЖ. При внимательном рассмотрении тепловой карты (heatmap) можно

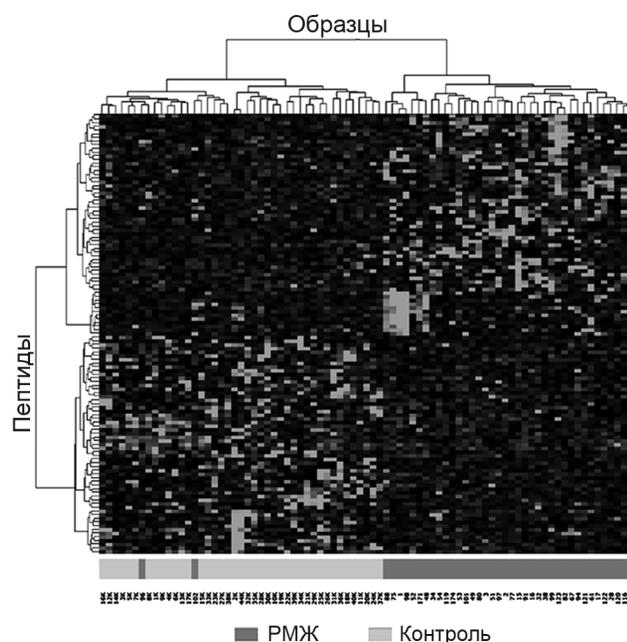


Рис. 3. Кластерный анализ и тепловая карта (heatmap) сывороток больных РМЖ и здоровых доноров.

Индивидуальные пептиды (119) представлены в горизонтальных рядах, образцы сывороток от больных (41) и здоровых (40) представлены в вертикальных колонках. Светлые точки показывают высокое взаимодействие сыворотки с определённым пептидом, тёмные показывают низкое взаимодействие. Кластеризация пептидов представлена на левой стороне рисунка. Кластеризация сывороток представлена в верхней части рисунка.

заметить внутригрупповые кластеры среди больных с диагнозом РМЖ. Такая специфическая реакция взаимодействия циркулирующих антител с пептидами внутри одной группы, возможно, характеризует молекулярные подтипы этого заболевания, однако это требует дополнительного изучения. Интересно отметить, что 2 из 40 больных с диагнозом РМЖ были отнесены к группе контроля. Это может свидетельствовать о том, что набор из 119 пептидов недостаточен для выявления всех молекулярных подтипов РМЖ.

Для анализа точности классификации групп контроля и РМЖ-больных использовали классификатор ближайших соседей (k-Nearest Neighbors) с евклидовой метрикой и алгоритм перекрёстной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Данные в приведенной ниже таблице показывают, что с помощью 119 пептидов можно отделить контрольные образцы от образцов больных с диагнозом РМЖ с высокой чувствительностью (0,951) и специфичностью (0,854).

На рис. 4 представлены примеры 8 пептидов, которые взаимодействуют либо с сыворотками больных РМЖ

**Оценка чувствительности и специфичности классификации контрольных и РМЖ-образцов сыворотки с помощью пептидного микрочипа при использовании классификатора «k-Nearest Neighbors»**

Группа	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
РМЖ	0,951	0,854	0,867	0,946
Здоровые	0,854	0,951	0,946	0,867

Примечание. PPV — positive predictive values (предсказательная ценность положительных результатов); NPV — negative predictive values (предсказательная ценность отрицательных результатов).

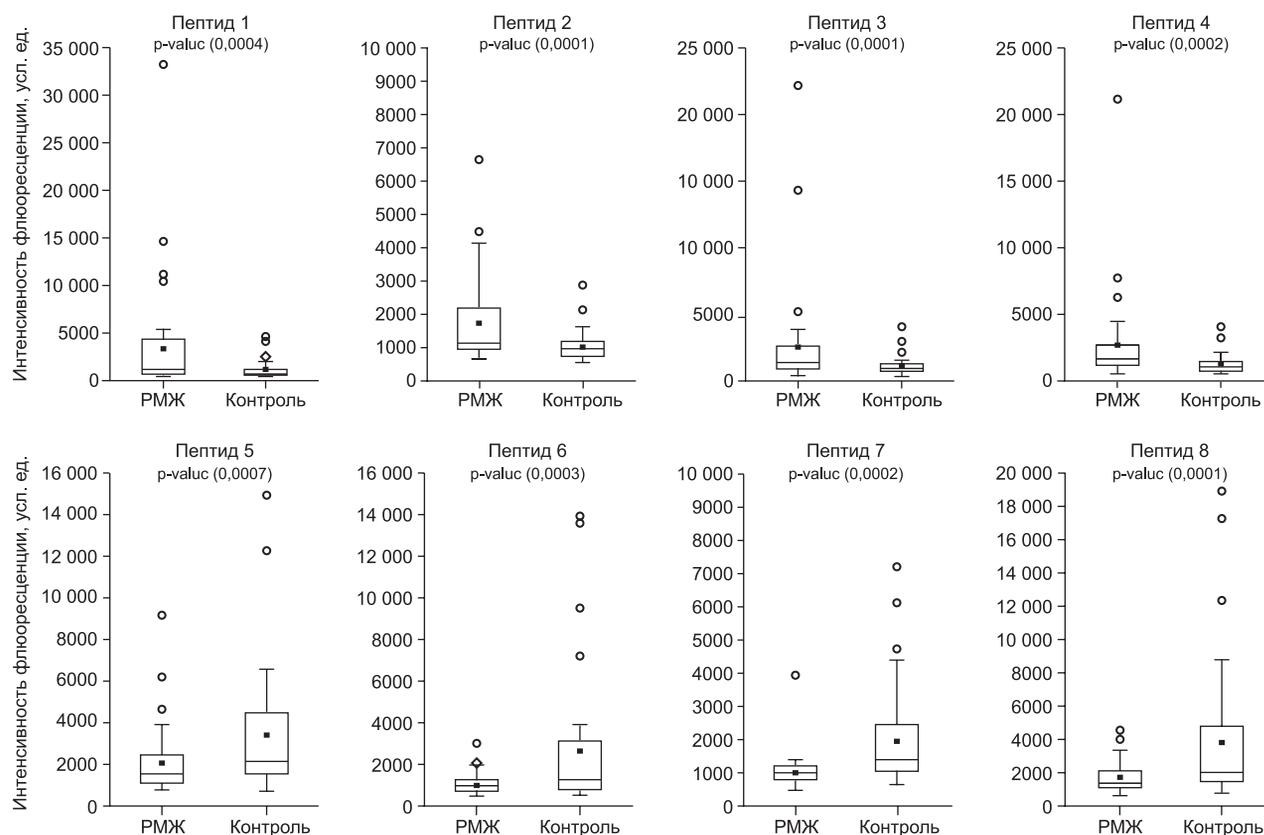


Рис. 4. Уровень флюоресценции пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ и здоровых доноров. На диаграммах (boxplot) представлены примеры взаимодействия сывороточных антител с различными пептидами на микрочипе. В верхнем ряду диаграмм показаны пептиды, значительно характеризующие больных (РМЖ), в нижнем ряду диаграмм — пептиды, отличающие здоровых доноров (контроль). Значком  $x$  обозначены средние значения уровня флюоресценции. Нижние границы ящиков обозначают первый кватиль (25-й перцентиль) флюоресценции, верхняя граница — третий кватиль (75-й перцентиль), внутренняя линия — медиана. Линии — «усы» на диаграмме обозначают минимально и максимально наблюдаемые значения интенсивности флюоресценции. Выбросы отмечены пустыми кругами. В верхнем углу графика приведён уровень значимости (значения  $p$ ) для каждого пептида.

(верхние диаграммы), либо с сыворотками здоровых доноров (нижние диаграммы). Различия между группами статистически значимы. Однако следует отметить низкий уровень интенсивности флюоресценции, что может говорить об относительно небольшом количестве антител в сыворотках больных РМЖ и здоровых доноров, взаимодействующих с выбранными пептидами, представленными на микрочипе. Это также может быть следствием того, что существующие методы статистической обработки данных основываются на анализе средних значений с минимальной дисперсией. В результате этого пептиды, показавшие высокие уровни взаимодействия с несколькими (5—6) сыворотками, не показывают статистически значимых различий и не выбираются алгоритмом как информативные. Это может приводить к тому, что пептиды, имеющие важное физиологическое или диагностическое значение, не используются для классификации образцов.

Пептиды на микрочипе представляют случайную комбинацию всех аминокислот и являются мимотопами (подобие эпитопов) антигенов. Длина пептидов варьирует в пределах 5—15 аминокислот [20]. С помощью таких вероятных аминокислотных последовательностей можно определять связывающую молекулу для многих антител, даже при несовпадении с природными

эпитопами. Это даёт возможность наиболее адекватно оценить репертуар циркулирующих антител и установить информативные пептиды даже в тех случаях, когда антиген неизвестен.

**Заключение.** Проведённый анализ демонстрирует отличия репертуара сывороточных антител у больных с диагнозом РМЖ и здоровых доноров. Микрочипы с пептидами со случайными аминокислотными последовательностями могут быть использованы для анализа репертуара антител при классификации здоровых и больных с диагнозом РМЖ. Для определения диагностической ценности пептидных микрочипов при клиническом определении РМЖ требуются дополнительные эксперименты с большим количеством образцов и тестированием независимой выборки «слепых» образцов. Также необходим анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ, для определения потенциальных антигенов, характеризующих рак молочной железы. Высокая чувствительность и специфичность пептидных микрочипов при классификации образцов, полученных от больных с ранними стадиями РМЖ (T1N0M0) показывает, что эта технология может быть использована для обнаружения РМЖ на ранних стадиях. Обнаружение заболевания на раннем этапе раз-

вития, до манифестации клинических симптомов, позволит раньше начать эффективное лечение и снизить уровень смертности населения.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках конкурсной части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», задание № 6.3892.2017/4.6, грант Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-00321 А.

## ЛИТЕРАТУРА

1. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990—2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053): 1659—724.
2. Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2017; 4—5.
3. Assi V., Warwick J., Cuzick J., Duffy S.W. Clinical and epidemiological issues in mammographic density. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011; 9(1): 33—40.
4. Ries LAG., Melbert D., Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975—2005; *National Cancer Institute* [Internet]. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/)
5. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Скрининг рака молочной железы. *Практическая онкология*. 2010; 11(2): 60—5.
6. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Опухолевые маркеры при раке молочной железы. *Врач*. 2011; 12: 2—7.
7. Шаповал А.И., Легutki Д.Б., Стаффорд Ф., Требухов А.В., Джонстон С., Шойхет Я.Н. и др. Иммуносигнатура (immunosignature) — пептидные микроэреы для диагностики рака и других заболеваний. *Российский онкологический журнал*. 2014; 4: 6—11.
8. Shi R., Taylor H., McLarty J., Liu L., Mills G., Burton G. Effects of payer status on breast cancer survival: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2015; 15(211): 2—8.
9. Тамкович С.Н., Войцickий В.Е., Лактионов П.П., Современные методы диагностики рака молочной железы. *Биомедицинская химия*. 2014; 60(2): 141—60.
10. Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21: 1973—9.
11. Cheang M.C., Martin M., Nielsen T.O., Prat A., Voduc D., Rodriguez-Lescure A. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015; 20: 474—82.
12. Chlebowski R.T., Manson J.E., Anderson G.L., Cauley J.A., Aragaki A.K., Stefanick M.L. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013; 105: 526—35.
13. Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical Proteomics*. 2013; 10(1): 13—5.
14. Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452(7187): 548—52.
15. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Stephen W.C., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1—7.
16. Liping D., Ningjing L., Mei L., Zhang J.Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Experimental Hematology & Oncology*. 2013; 2(15): 3—7.

17. Zhang J.Y., Casiano C.A., Peng X.X., Koziol J.A., Chan E.K., Tan E.M. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2003; 12(2): 136—43.
18. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends in Biotechnology*. 2013; 31(1): 45—51.
19. Zaenker P., Ziman M.R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers — a review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2013; 22(12): 2161—81.
20. Legutki J.B., Zhao Z.G., Greving M., Woodbury N., Johnston S.A., Stafford P. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring. *Nature Communications*. 2014; 5: 4785.
21. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(139): 2—15.
22. Legutki J.B., Magee D.M., Stafford P., Johnston S.A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine*. 2010; 28(28): 4529—37.
23. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 2011; 70(2): 286—95.
24. Steinhoff C., Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Briefings in Bioinformatics*. 2006; 7(2):166—77.
25. Lacombe J., Mangé A., Solassol J. Use of autoantibodies to detect the onset of breast cancer. *Journal of Immunology Research*. 2014; 8.
26. Brown J.R., Stafford P., Johnston S.A., Dinu V. Statistical methods for analyzing immunosignatures. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12(349): 2—15.
27. Simon R., Lam A.P., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-Array Tools. *Cancer Informatics*. 2007; 2: 11—7.
28. Подлесных С.В., Колосова Е.А., Щербакoв Д.Н., Шайдуpов А.А., Анисимов Д.С., Рязанов М.А. и др. Взаимодействие антител сыворотки крови пациентов при раке молочной железы с синтетическими пептидами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(6): 775—9.

## REFERENCES

1. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990—2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053): 1659—724.
2. Kaprina A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality) [Zlokachestvennyye novooobrazovaniya v Rossii v 2015 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2017; 4—5. (in Russian)
3. Assi V., Warwick J., Cuzick J., Duffy S.W. Clinical and epidemiological issues in mammographic density. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011; 9(1): 33—40.
4. Ries LAG., Melbert D., Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975—2005; *National Cancer Institute* [Internet]. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/)
5. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. Screening of breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya*. 2010; 11(2): 60—5. (in Russian)
6. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. Tumor markers in breast cancer. *Vrach*. 2011; 12: 2—7. (in Russian)
7. Chapoval A.I., Legutki D.B., Stafford F., Trebukhov A.V., Johnston S.A., Shoihet Y.N. et al. Immunosignature — peptide microarray for diagnostic of cancer and other diseases. *Rossiiskij onkologicheskij zhurnal*. 2014; 4: 6—11. (in Russian)
8. Shi R., Taylor H., McLarty J., Liu L., Mills G., Burton G. Effects of payer status on breast cancer survival: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2015; 15(211): 2—8.
9. Tamkovich S.N., Voickij V.E., Laktionov P.P. Modern methods

- of breast cancer diagnostics. *Biomedicinskaya himiya*. 2014; 60(2): 141—60. (in Russian)
10. Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21: 1973—9.
  11. Cheang M.C., Martin M., Nielsen T.O., Prat A., Voduc D., Rodriguez-Lescure A. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015; 20: 474—82.
  12. Chlebowski R.T., Manson J.E., Anderson G.L., Cauley J.A., Aragaki A.K., Stefanick M.L. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013; 105: 526—35.
  13. Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical Proteomics*. 2013; 10(1): 13—5.
  14. Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008. 452(7187): 548—52.
  15. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Stephen W.C., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1—7.
  16. Liping D., Ningjing L., Mei L., Zhang J.Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Experimental Hematology & Oncology*. 2013; 2(15): 3—7.
  17. Zhang J.Y., Casiano C.A., Peng X.X., Koziol J.A., Chan E.K., Tan E.M. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2003; 12(2): 136—43.
  18. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends in Biotechnology*. 2013; 31(1): 45—51.
  19. Zaenker P., Ziman M.R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers — a review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2013; 22(12): 2161—81.
  20. Legutki J.B., Zhao Z.G., Greving M., Woodbury N., Johnston S.A., Stafford P. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring. *Nature Communications*. 2014; 5: 4785.
  21. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(139): 2—15.
  22. Legutki J.B., Magee D.M., Stafford P., Johnston S.A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine*. 2010; 28(28): 4529—37.
  23. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 2011; 70(2): 286—95.
  24. Steinhoff C., Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Briefings in Bioinformatics*. 2006; 7(2): 166—77.
  25. Lacombe J., Mangé A., Solassol J. Use of autoantibodies to detect the onset of breast cancer. *Journal of Immunology Research*. 2014; 8.
  26. Brown J.R., Stafford P., Johnston S.A., Dinu V. Statistical methods for analyzing immunosignatures. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12(349): 2—15.
  27. Simon R., Lam A.P., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-Array Tools. *Cancer Informatics*. 2007; 2: 11—7.
  28. Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Shcherbakov D.N., Shajdurov A.A., Anisimov D.S., Ryazanov M.A. et al. Interaction of serum antibodies from breast cancer patients with synthetic peptides. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(6): 775—9. (in Russian)

Поступила 30.04.17

Принята к печати 16.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.145-002.1-076.5-078.33

Агарков Н.М.<sup>1</sup>, Макконен К.Ф.<sup>2</sup>, Аксёнов В.В.<sup>1</sup>, Яковлев А.П.<sup>1</sup>, Луценко В.Д.<sup>2</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЭНДОМЕТРИТА

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», 305040, Курск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, Российская Федерация

*Острый эндометрит (ОЭ) — наиболее распространённая патология среди женщин репродуктивного возраста. В его развитии ведущая роль принадлежит иммунной системе, однако сведения о наиболее информативных параметрах клеточного иммунитета отсутствуют. Цель исследования — совершенствование диагностики ОЭ посредством иммунологического метода с объективной оценкой диагностической ценности показателей системного клеточного иммунитета. Показатели клеточного иммунитета изучены у 78 больных послеродовым ОЭ и 54 практически здоровых женщин методом проточной цитометрии с последующим расчетом для каждого показателя информативности и дезинтеграции, объективизирующих отбор диагностически значимых параметров. Показано, что для полноценной диагностики ОЭ достаточно определять абсолютное и относительное содержание Т-хелперов и натуральных киллеров, обладающих высокой величиной информативности и дезинтеграции. Это позволяет сократить количество исследуемых параметров системного клеточного иммунитета и финансовые расходы на диагностику ОЭ.*

Ключевые слова: острый эндометрит; клеточный иммунитет; метод проточной цитометрии.

Для корреспонденции: Агарков Николай Михайлович, д-р мед. наук, проф. каф. биомедицинской инженерии Юго-Западного государственного университета; e-mail: vitalaxen@mail.ru

**Для цитирования:** Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксёнов В.В., Яковлев А.П., Луценко В.Д. Использование метода проточной цитометрии и диагностически значимых показателей системного клеточного иммунитета для диагностики острого эндометрита. Клиническая лабораторная диагностика 2017; 62(9): 563-567. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-563-567>

Agarkov N.M.<sup>1</sup>, Makkonen K.F.<sup>2</sup>, Aksenov V.V.<sup>1</sup>, Yakovlev A.P.<sup>1</sup>, Lutsenko V.D.<sup>2</sup>

THE APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE AND DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT INDICES OF SYSTEMIC CELLULAR IMMUNITY FOR DIAGNOSTIC OF ACUTE ENDOMETRITIS

<sup>1</sup>The Southern-Western state university, 305040 Kursk, Russia

<sup>2</sup>The Belgorodskii state national research university, 308015 Belgorod, Russia

*The acute endometritis is a the most widespread pathology among women of reproductive age. The immune system plays a leading role in its development. However, there is no data concerning the most informative parameters of cell immunity. The purpose of study is to enhance diagnostic of acute endometritis using immunologic technique with objective evaluation of diagnostic value of indices of systemic cell immunity. The indices of cell immunity are analyzed on sampling of 78 patients with postnatal acute endometritis and 54 healthy women. The technique of flow cytometry was applied with subsequent calculation of index of informativeness and disintegration objectifying selection of diagnostically significant parameters. It is demonstrated that full-fledged diagnostic of acute endometritis requires detection of absolute and relative content of T-helpers and natural killers having high value of informativeness and disintegration. Hence an opportunity to reduce number of analyzed parameters of systemic cell immunity and financial costs of diagnostic of acute endometritis.*

**Key words:** acute endometritis; cell immunity; technique of flow cytometry

**For citation:** Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksenov V.V., Yakovlev A.P., Lutsenko V.D. The application of flow cytometry technique and diagnostically significant indices of systemic cellular immunity for diagnostic of acute endometritis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 563-567. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-563-567>

**For correspondence:** Agarkov N.M., doctor of medical sciences, professor of the chair of biomedical engineering. e-mail: vitaxen@mail.ru

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

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

Received 28.04.2017  
Accepted 11.05.2017

В общей популяции женщин репродуктивного возраста отмечен повсеместный рост частоты острого эндометрита (ОЭ) [3]. Кроме того, не наблюдают уменьшения распространённости ОЭ после родов, аборт и особенно после операций кесарева сечения, несмотря на проводимые в этом направлении многочисленные исследования. Частота послеродового эндометрита в популяции составляет 3—8%, при патологических родах — 10—20%, а у женщин с высоким инфекционным риском — 13,3—54,3% [6]. Тревогу вызывает и то, что наряду с увеличением числа пациенток с острыми воспалительными заболеваниями женских половых органов происходит их рост среди молодого контингента [5, 12]. Одна из причин этого — несовершенство используемых диагностических тестов и методов. Улучшить качество диагностики и повысить уровень раннего выявления ОЭ позволяет, по мнению различных исследователей [1, 10, 13], иммунологический метод, предусматривающий изучение иммунограмм при данной патологии, поскольку ОЭ сопровождается существенными нарушениями в иммунной системе женщин.

В развитии ОЭ ключевая роль принадлежит клеточному звену иммунитета на системном уровне [3, 8, 9]. Однако используемые для диагностики ОЭ показатели системного клеточного иммунитета врачи и исследователи выбирают субъективно, без оценки информативности каждого из компонентов иммунной системы. Кроме того, отсутствуют сведения о степени дезинтеграции параметров клеточного иммунитета при ОЭ. Это обуславливает актуальность оценки диагностической значимости показателей системного клеточного иммунитета для полноценной лабораторной диагностики ОЭ.

*Цель исследования* — совершенствование диагностики ОЭ посредством иммунологического метода с объективной оценкой диагностической ценности показателей системного клеточного иммунитета.

*Материал и методы.* В клинических условиях под наблюдением находились 78 больных послеродовым ОЭ (основная группа) и 54 практически здоровых женщин (контрольная группа) Сравниваемые группы сопоставимы по возрасту, становлению менструальной функции, социальному статусу. Диагноз послеродового эндометрита подтверждали результатами клинического, лабораторного, гистологического и ультразвукового исследований аппаратом «ACUSON Computed Sonography 128/хр» (США). В периферической крови определяли содержание иммунокомпетентных клеток методом проточной цитометрии на цитофлюорометре «Cytomics FC 500» («Becton Dickinson», США) с помощью наборов моноклональных антител «Invitrogen Corporation Mouse anti-human»: CD3 (FITC), (МНСД 0301-4); CD4 (PE-CY5.5), (МНСД 0418); CD8 (PE-CY7), (МНСД 0812); CD16 (PE-TR), (МНСД 1612).

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0, *t*-критерий Стьюдента и критерий Вилкоксона. Информативность параметров рассчитывали методом Кульбака. Иммунорегуляторный индекс определяли как отношение Т-хелперов к Т-супрессорам. Показатель дезинтеграции рассчитывали по формуле [2]:

$$ПД_i^j = \frac{(Gx_i^j + G_x^n)}{|M_{xi}^j - M_{xi}^j|}, \text{ где}$$

$Gx_i^j$  — среднее квадратическое отклонение признака  $x_i$  в  $j$ -м классе (основная группа);

Таблица 1

**Показатели системного клеточного иммунитета при ОЭ ( $M \pm m$ )**

Кластер дифференцировки, единица измерения	Основная группа	Контрольная группа
Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$0,8 \pm 0,11^*$	$1,4 \pm 0,09^*$
Т-лимфоциты, %	$37,2 \pm 2,1^*$	$59,6 \pm 2,5^*$
Т-хелперы, $\times 10^9/\text{л}$	$0,3 \pm 0,05^*$	$0,7 \pm 0,04$
Т-хелперы, %	$21,5 \pm 1,3^*$	$40,9 \pm 2,7^*$
Т-супрессоры, $\times 10^9/\text{л}$	$0,4 \pm 0,02^*$	$1,1 \pm 0,04^*$
Т-супрессоры, %	$18,7 \pm 2,0^*$	$35,2 \pm 1,6^*$
Т-цитотоксические, $\times 10^9/\text{л}$	$0,3 \pm 0,02^*$	$0,6 \pm 0,04^*$
Т-цитотоксические, %	$15,2 \pm 1,7^*$	$29,4 \pm 1,6^*$
Натуральные киллеры, $\times 10^9/\text{л}$	$0,1 \pm 0,03^*$	$0,4 \pm 0,02$
Натуральные киллеры, %	$7,4 \pm 0,6^*$	$16,9 \pm 1,5^*$
Иммунорегуляторный индекс, у.е.	$1,0 \pm 0,02^*$	$1,2 \pm 0,03^*$

\* Статистически значимая разница в группах.

$G_{xi}^*$  — среднее квадратическое отклонение признака  $xi$  в контрольной группе;

$M_{xi}^j$  — среднее значение признака в  $j$ -м классе (основная группа);

$M_{xi}^*$  — среднее значение признака в контрольной группе.

*Результаты и обсуждение.* Диагностика ОЭ по показателям клеточного иммунитета на системном уровне показывает угнетение всех исследуемых параметров вследствие развившегося острого воспалительного процесса (табл. 1).

Отмечено достоверное снижение абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в периферической крови пациенток по сравнению с контрольной группой. Более выраженные изменения установлены как для абсолютного, так и относительного количества Т-хелперов на системном уровне. Среди больных ОЭ установлено статистически значимое уменьшение количества Т-супрессоров и их процентного содержания ( $p < 0,001$ ). Количество цитотоксических лимфоцитов репрезентативно снизилось и в абсолютном, и относительном выражении. Об угнетении системного клеточного иммунитета при ОЭ свидетельствует значительное уменьшение натуральных киллеров в абсолютном и процентном содержании. Одновременно произошло снижение иммунорегуляторного индекса. Все это указывает на важное диагностическое значение показателей системного клеточного иммунитета в диагностике ОЭ.

Для лабораторной диагностики ОЭ, как считают другие исследователи, важно и то, что в иммунограммах больных эндометритом после кесарева сечения отмечают лейкоцитоз, снижение абсолютного числа лимфоцитов и клеток, несущих CD3+, CD4+ и CD22+, что свидетельствует о снижении хелперной активности [3, 15]. Кроме того, при ОЭ происходят изменения интерферонового иммунного статуса [8]. При ОЭ в аспирате эндометрия отмечают высокие уровни провоспалительных цитокинов с преобладанием IL1 $\beta$  и IL6, что свидетельствует о тяжести течения и прогнозирует исход заболевания. Уровни провоспалительных цитокинов в аспирате из полости матки повышены в 5—8 раз по сравнению с сывороткой крови (в 3—5 раз) [8]. Именно поэтому диагностику и тактику лечения ОЭ рекомендовано проводить с оценкой продукции данных цитокинов.

Установлено, что наибольшее угнетение иммунного ответа происходит при гиперпластическом варианте эндометрита за счет снижения всех фракций клеточного иммунитета [11]. Гиперактивность иммунной системы при смешанном варианте патологии определяет активность компонентов лейкоцитарного звена.

Однако информативность и распространённость изученных параметров иммунограммы периферической крови у пациенток с ОЭ различна (табл. 2). Среди показателей системного клеточного иммунитета более в половине случаев встречаются снижение абсолютного числа Т-хелперов менее  $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$  и относительного числа Т-хелперов менее 30%. Высокая распространенность отклонений натуральных киллеров менее  $0,25 \cdot 10^9/\text{л}$  и относительного содержания менее 10% в периферической крови отмечена практически у каждой второй пациентки с ОЭ. Немного реже регистрируют изменения в содержании абсолютного и относительного числа Т-цитотоксических лимфоцитов. Более редко, но с той же частотой, что и рассмотренные выше параметры им-

мунной системы, встречаются изменения Т-супрессоров менее  $0,6 \cdot 10^9/\text{л}$  и Т-супрессоров менее 23%.

Максимальные величины информативности определены для Т-хелперов в абсолютном и относительном содержании. Высокий уровень информативности свойственен абсолютному количеству натуральных киллеров и несколько ниже — процентному содержанию данного кластера дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Т-цитотоксические лимфоциты характеризуются значительной мерой информативности. Незначительно ниже, но в целом существенная информативность выявлена для абсолютного и относительного числа Т-супрессоров.

Диагностическую значимость параметров клеточного иммунитета на системном уровне для ОЭ объективно определяют показатели сдвига и дезинтеграции (табл. 3).

Таблица 2

**Частота отклонений и информативность параметров клеточного иммунитета крови при ОЭ**

Кластер дифференцировки, единица измерения	Распространенность отклонений		Информативность
	основная группа	контроль	
Т-лимфоциты менее $1,1 \cdot 10^9/\text{л}$	$40,2 \pm 3,9$	$1,2 \pm 1,1$	297,4
Т-лимфоциты менее 45%	$42,7 \pm 4,0$	$0,9 \pm 0,9$	350,3
Т-хелперы менее $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$	$54,3 \pm 4,0$	$0,7 \pm 0,8$	506,4
Т-хелперы менее 30%	$56,8 \pm 4,0$	$0,6 \pm 0,8$	555,3
Т-супрессоры менее $0,6 \cdot 10^9/\text{л}$	$28,9 \pm 3,6$	$0,8 \pm 0,9$	218,9
Т-супрессоры менее 23%	$34,5 \pm 3,8$	$1,1 \pm 1,0$	249,9
Т-цитотоксические менее $0,4 \cdot 10^9/\text{л}$	$45,6 \pm 4,0$	$1,2 \pm 1,1$	350,7
Т-цитотоксические менее 20%	$48,2 \pm 4,0$	$1,3 \pm 1,1$	367,9
Натуральные киллеры менее $0,25 \cdot 10^9/\text{л}$	$54,7 \pm 4,0$	$0,6 \pm 0,8$	530,1
Натуральные киллеры менее 10,0%	$49,5 \pm 4,0$	$0,5 \pm 0,7$	488,9
Иммунорегуляторный индекс менее 1,1	$37,2 \pm 3,9$	$1,3 \pm 1,1$	261,5

Таблица 3

**Значения показателей сдвига и дезинтеграции параметров системного клеточного иммунитета при ОЭ**

Кластер дифференцировки, единица измерения	Величина сдвига, %	Величина дезинтеграции
Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	-42,9	10,8
Т-лимфоциты, %	-37,6	7,5
Т-хелперы, $\times 10^9/\text{л}$	-57,1	20,4
Т-хелперы, %	-47,4	19,6
Т-супрессоры, $\times 10^9/\text{л}$	-63,6	12,3
Т-супрессоры, %	-46,9	9,5
Т-цитотоксические, $\times 10^9/\text{л}$	-50,0	16,7
Т-цитотоксические, %	-48,3	13,1
Натуральные киллеры, $\times 10^9/\text{л}$	-75,0	23,8
Натуральные киллеры, %	-56,2	18,7
Иммунорегуляторный индекс, у.е.	-16,7	7,7
Сумма	-541,7	159,8

Общая сумма сдвига исследованных параметров — отрицательная и значительная, что указывает на важное участие данного звена иммунной системы в развитии заболевания. При этом выраженные сдвиги характерны для абсолютного и относительного числа натуральных киллеров в периферической крови. Высокие показатели, выраженные как в абсолютных, так и относительных величинах, определены для Т-супрессоров и Т-хелперов. Значительные показатели сдвига отмечены для Т-цитотоксических лимфоцитов. Обращает на себя внимание то, что показатели сдвига параметров системного клеточного иммунитета не имеют выраженного разброса, за исключением иммунорегуляторного индекса, который существенно ниже всех кластеров дифференцировки.

Значительные сдвиги у женщин с послеродовым ОЭ обнаруживаются в субпопуляционном составе лимфоцитов [4]. У таких пациенток выявляют снижение уровня Т-хелперов/индукторов, несущих на своей поверхности маркеры CD4+. Эти сдвиги клеточного состава отражаются на соотношении CD4+/CD8+, что свидетельствует, как и в выше представленных исследованиях [3, 15], о наличии хелперного дефекта — одной из вероятных причин развития послеродового эндометрита [4]. Для сравнения: при хроническом эндометрите повышается абсолютное число Т-лимфоцитов с супрессорной активностью [7]. При хроническом эндометрите отмечают тенденцию к снижению цитотоксических лимфоцитов (CD8+) в периферической крови [14, 16]. За счет этого несколько увеличивается иммунорегуляторный индекс, достигающий максимальных показателей. Содержание естественных киллеров (CD16+) в периферической крови приближается к нижним границам нормы. Количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации CD95+ и HLA-DR+, свидетельствующие об активности процесса, не отличается от средних показателей в контрольной группе. Количество лимфоцитов, экспрессирующих CD25+ маркер клеток-супрессоров пролиферации аутореактивных клеток, снижается [14, 16].

В отличие от параметров сдвига показатели дезинтеграции клеточного иммунитета при ОЭ (см. табл. 3) отличаются большим разнообразием и варьируют от

7,4—7,5 для иммунорегуляторного индекса и процентного содержания Т-лимфоцитов до 20,4—23,8 для абсолютного количества Т-хелперов и натуральных киллеров. Относительные величины содержания Т-хелперов и натуральных киллеров имеют высокие параметры дезинтеграции. Среди показателей системного клеточного иммунитета у больных ОЭ существенным оказался рассматриваемый численный критерий для абсолютного и относительного числа Т-цитотоксических лимфоцитов.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что объективный отбор показателей системного клеточного иммунитета с учетом информативности и величины дезинтеграции существенно сокращает число необходимых для полноценной диагностики ОЭ определяемых параметров клеточного звена иммунной системы. Это имеет научное и экономическое значение, так как повышает эффективность диагностики и снижает финансовые затраты на обследование больных ОЭ. Именно поэтому для диагностики ОЭ среди показателей системного клеточного иммунитета следует использовать абсолютное и относительное содержание Т-хелперов, натуральных киллеров, которые характеризуются наибольшей степенью информативности и дезинтеграции. Данные показатели иммунной системы, на наш взгляд, имеют не только диагностическое, но и прогностическое значение для ранней диагностики ОЭ.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Агарков Н.М., Будник И.В. Информативность клинических симптомов, иммунологических, гематологических показателей и проявлений эндогенной интоксикации при остром неспецифическом сальпингоофорите. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2012; 4: 11—5.
2. Агарков Н.М., Афанасова Е.П., Шульга Л.В., Яковлев А.П., Иванов А.В. Многокритериальная математическая оценка состояния клеточного иммунитета при остром эндометрите. *Российский медицинский журнал.* 2014; 4: 31—3.
3. Анохова Л.И., Патенюк А.В., Кузник Б.И., Загородная Э.Д. Сравнительное действие тималина, тимогена и ронколейкина на состоянии иммунитета и гемостаза при развитии эндометрита после кесарева сечения. *Сибирский медицинский журнал.* 2012; 108(1): 48—51.
4. Белокриницкая Т.Е., Битковский Ю.А., Анохова Л.И., Фролова Н.И. Цитокины, субпопуляции лимфоцитов и фагоцитарная активность лейкоцитов при послеродовых эндометритах у пациенток молодого возраста. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.* 2012; 3: 71—4.
5. Горин В.С., Матвеева И.В., Попова Ж.Ю. и др. Клинико-микробиологические особенности пуэрперального эндометрита, диагностика и лечение. *Сибирский медицинский журнал.* 2011; 101(2): 9—16.
6. Гуртовой Б.Л., Кулаков В.И., Воропаева С.Д. *Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии.* М.: Трида-Х; 2004.
7. Данусевич И.Н. Состояние эндокринной и иммунной систем у женщин с хроническим эндометритом и репродуктивными нарушениями. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2013; 8(3): 108—11.
8. Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н., Ланцакова П.Е. Новые направления в диагностике и лечении эндометрита. *Иммунопатология, аллергология инфектология.* 2016; 1: 64—77.

9. Колмык В.А., Насыров Р.А., Кутушева Г.Ф., Петров В.В., Григорьев С.Г. Значение иммуногистохимического контроля для лечения пациенток с хроническим эндометритом. *Педиатр*. 2016; 7(3): 17—22.
10. Муратова Г.К., Субанова Г.А., Маткеримов А.Т., Аскеров А.А. Вопросы диагностики эндометрита. *Вестник Омского государственного университета*. 2016; 4: 96—9.
11. Сндоян А.В., Ермаков А.Н. Иммунологическая перестройка при хроническом воспалении слизистой оболочки матки. *Молодой ученый*. 2016; 22-1(126): 39—43.
12. Тарасенко Ю.Н. Оптимизация комплексного лечения послеродового эндометрита на основе использования локальной антимикробной терапии. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2012; 2(11): 840—3.
13. Тузлуков И.И., Коваленко М.С., Наумова Н.В. Особенности течения и методы прогнозирования послеродового эндометрита. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2015; 1: 149—54.
14. Эллиниди В.Н., Давыдова Н.И., Калинин Н.М. и др. Современные возможности диагностики хронического эндометрита. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2003; 52(3): 64—8.
15. Matteo M., Cicinelli E. et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulation in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009; 61: 322—9.
16. Sukhikh G.T., Kasabulov N.M., Van'ko L.V. et al. Ratio between the number of Th1 and Th2 lymphocytes in the peripheral blood and concentration of proinflammatory cytokines in lochia of women with postpartum endometritis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 140(6): 672—4.
17. Колмык В.А., Насыров Р.А., Кутушева Г.Ф., Петров В.В., Григорьев С.Г. Значение иммуногистохимического контроля для лечения пациенток с хроническим эндометритом. *Педиатр*. 2016; 7(3): 17—22. (in Russian)
18. Gorin V.S., Matveev I.V., Popova Z.Y., and others. Clinical and microbiological features of puerperal endometritis, diagnosis and treatment. *Sibirskij meditsinskij zhurnal*. 2011; 101(2): 9—16. (in Russian)
19. Gurtovoy B.L., Kulakov V.I., Voropayeva S.D. *The use of antibiotics in obstetrics and gynecology*: Moscow: Triada-X; 2004. (in Russian)
20. Danusevich I.N. State of the endocrine and immune systems in women with chronic endometritis and reproductive disorders. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 2013; 8(3): 108—11. (in Russian)
21. Kagramanova Zh.A., Malinovskaya V.V., Wyzhlowa E.N., Lanshakova P.E. New directions in the diagnosis and treatment of endometritis. *Immunopatologija, allergologija, infektologija*. 2016. 1: 64—77. (in Russian)
22. Kolmyk V.A., Nasyrov R.A., Kutusheva G.F., Petrov V.V., Grigoriev S.G. The Value of immunohistochemical control for the treatment of patients with chronic endometritis. *Pediatr*. 2016. 7(3): 17—22. (in Russian)
23. Muratova G.K., Subanova G.A., Matkerimov A.T., Askerov A.A. Problems in the diagnosis of endometritis. *Vestnik Oshskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2016; 4: 96—9. (in Russian)
24. Sndoyan A.V., Ermakov A.N. Immunological reorganization in chronic inflammation of the mucous membrane of the uterus. *Molodoy uchenyi*. 2016; 22-1(126): 39—43. (in Russian)
25. Tarasenko Y.N. Optimization of complex treatment of postpartum endometritis based on the use of local antimicrobial therapy. *Bulleten' meditsinskikh internet-konferentsii*. 2012; 2(11): 840—3. (in Russian)
26. Tuzlukov I.I., Kovalenko M.S., Naumova N.V. Features of the course and methods of prediction of postpartum endometritis. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik im. akademika I.P. Pavlova*. 2015; 1: 149—54. (in Russian)
27. Ellinidi V.N., Davydova N.I., Kalinina N.M. Modern diagnostics of chronic endometritis. *Zhurnal akusherstva i zhenskih boleznej*. 2003; 52(3): 64—8. (in Russian)
28. Matteo M., Cicinelli E. et al. Abnormal lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *J. Human Reproduction Immunol.* 2009. 61: 322—9.
29. Sukhikh G.T., Kasabulov N.M., Vanko L.V. et al. The ratio of th1-and th2-lymphocytes in peripheral blood and concentration of proinflammatory cytokines in lochia of women with postpartum endometritis. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 2005; 140(6): 672—4.

## REFERENCES

Поступила 28.04.17  
Принята к печати 11.05.17

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.843.1.086.3

Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В.

### ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЁНОК *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

*Холера продолжает оставаться одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения, что определяет необходимость её постоянного мониторинга, а также дальнейшее изучение этой инфекции в микробиологическом и экологическом аспектах. Значительную роль среди механизмов, позволяющих холерным вибрионам из года в год на протяжении десятилетий сохранять свою экологическую нишу в различных водоёмах, а также распространяться в них, играет феномен биоплёнкообразования. Решающую роль в изучении процесса биоплёнкообразования сыграло применение методов электронной микроскопии. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) имеет ряд существенных преимуществ, однако исследование биоплёнок данным методом имеет определённые ограничения и особенности, сказывающиеся на получаемых результатах. Цель исследования — моделирование биоплёнок холерных вибрионов с использованием новой оригинальной методики и изучение их методом ТЭМ.*

*Для этого разработан оригинальный субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства пробоподготовки к ТЭМ. Использование данного метода многократно упрощает процесс пробоподготовки и позволяет максимально сохранять нативную структуру биоплёнок. Путём комбинирования вариантов контрастирования и сравнения полученных результатов определена роль различных составляющих в процессе биоплёнкообразования, а также показана структура матрикса биоплёнок, морфо-стадийная картина процесса биоплёнкообразования холерных вибрионов, выделены электронно-микроскопические признаки биоплёночных форм холерных вибрионов. Приведённые в работе данные помогут оптимизировать изучение биоплёнок методом ТЭМ и лучше понять феномен биоплёнкообразования.*

**Ключевые слова:** биоплёнки; биоплёнкообразование; *Vibrio cholerae*; культивирование биоплёнок; трансмиссионная электронная микроскопия.

**Для цитирования:** Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В. Изучение биоплёнок *Vibrio cholerae* методом трансмиссионной электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 568-576. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2017-62-9-568-576>

*Golovin S.N., Simonova I.R., Titova S.V., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Trishina A.V.*

#### THE ANALYSIS OF BIOFILMS *VIBRIO CHOLERAЕ* USING TECHNIQUE OF TRANSMISSIVE ELECTRONIC MICROSCOPY

The Rostov-on-Don anti-plague institute of the Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

*The cholera continues to be one of the priority problems of world health care that determines necessity of its permanent monitoring and also further investigation of this infection in microbiological and ecological aspects. The phenomenon of biofilm formation plays a significant role among mechanisms permitting comma bacillus year by year to retain its ecological niche and to spread in various basins over a period of decades. The application of techniques of electronic microscopy played a decisive role in studying the process of biofilm formation. The transmission electronic microscopy has a number of significant advantages, but studying of biofilms using the given technique has certain limitations and peculiarities affecting derivable results.*

*The purpose of study is modeling of biofilms of comma bacillus using a new original technique and analyzing them implementing transmission electronic microscopy. An original substrate was developed to cultivate biofilms of comma bacillus adjusted to convenient sampling preparation for transmission electronic microscopy. The application of the given technique manifold simplifies the process sampling preparation and permits to retain at most the native structure of biofilms. By means of combining alternatives of contrasting and comparing of obtained results the role of various components in the process of biofilm formation is determined. Also, the structure of matrix of biofilms and morphologic phasic picture of process of biofilm formation of comma bacillus is demonstrated. The electronic microscopic indications of biofilm forms of comma bacillus are marked out. The presented data supports optimization of studying biofilms using transmission electronic microscopy and better understanding phenomenon of biofilm formation.*

**Key words:** biofilm; biofilm formation; *vibrio cholerae*; cultivation of biofilms; transmission electronic microscopy

**For citation:** Golovin S.N., Simonova I.R., Titova S.V., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Trishina A.V. The analysis of biofilms *Vibrio cholerae* using technique of transmissive electronic microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9): 568-576. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-568-576>

**For correspondence:** Simonova I.R., head of the group of electronic microscopy of the laboratory of biological security and treatment. e-mail: [labbibebez@mail.ru](mailto:labbibebez@mail.ru)

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

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

Received 20.04.2017  
Accepted 25.05.2017

**Введение.** Холера продолжает оставаться одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде масштабных эпидемий и вспышек. Так, по данным на начало 2017 г., в мире зарегистрировано более 17 тыс. больных холерой в 19 странах мира [1]. Это определяет необходимость постоянного мониторинга холеры, являющегося одним из основных компонентов надзора за эпидемическими инфекционными болезнями на глобальном и территориальном уровнях, а также дальнейшего изучения этой инфекции в микробиологическом и экологическом аспектах. Значительную роль среди механизмов, позволяющих холерным вибрионам из года в год на протяжении десятилетий сохранять свою экологическую нишу в различных водоёмах, а также распространяться в них, несомненно, играет феномен биоплёнокообразования [2].

В настоящее время известно, что в естественной среде обитания до 99% всех микроорганизмов существуют в виде биоплёнок — организованных сообществ бактерий, представляющих собой динамически изменяющуюся в пространстве и времени структуру, состоящую из активно функционирующих клеток и покоящихся форм, заключённых в экстрацеллюлярный матрикс, которая формируется на границе раздела твёрдой и жидкой или твёрдой и газообразной фаз [3, 4].

Решающую роль в изучении процесса биоплёнокообразования сыграло применение методов электронной микроскопии, которая в настоящее время даёт единственную возможность для объективной визуализации ультраструктуры биоплёнок [5]. Метод электронной микроскопии представлен несколькими её видами, различающимися по принципу взаимодействия детективной части применяемых приборов с исследуемым объектом и определяемыми параметрами. Наиболее часто для исследования биоплёнок применяют трансмиссионную (просвечивающую) электронную микроскопию (ТЭМ), растровую (сканирующую) электронную микроскопию и атомно-силовую (зондовую) микроскопию [6—9].

ТЭМ имеет ряд существенных преимуществ, позволяющих визуализировать как поверхностные структуры образца, так и внутренние, а применение метода ультратонких срезов, томографии, гистохимических методов и иммунофлуоресценции позволяет получить цельную комплексную картину структуры и состава исследуемого образца [10, 11].

Однако исследование биоплёнок методом ТЭМ имеет определённые ограничения и особенности, сказывающиеся на получаемых результатах. Ограничением является толщина исследуемого образца. Для изучения методом ТЭМ исследуемые объекты должны иметь толщину не более 100 нм, в связи с этим основной проблемой, возникающей при исследовании биоплёнок, является необходимость отделения плёнки от субстрата и перенос на опорные сетки, что неизбежно приводит к нарушению её первоначальной структуры и невозможности изучения характера взаимодействия с субстратом.

Особенности процедуры пробоподготовки по классической схеме, включающей обезвоживание в серии спиртов восходящей концентрации, пропитку смолой и полимеризацию, также влияют на структуру биоплёнки вследствие воздействия на нее сил поверхностного натяжения и вымывания компонентов матрикса при много-

кратном погружении исследуемых образцов в различные агрессивные жидкости.

Цель данного исследования — моделирование биоплёнок холерных вибрионов с использованием новой оригинальной методики и изучение их методом ТЭМ.

Для решения этой задачи нами сконструировано оригинальное приспособление, представляющее собой субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства осуществления пробоподготовки к ТЭМ (приоритетная справка № 2017108346 от 13.03.2017 г.).

**Материал и методы.** В исследовании использованы бактерии *Vibrio cholerae* El Tor штамм 5879 и *Vibrio cholerae* El Tor штамм 19667 из коллекции музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Контроль жизнеспособности микробных клеток определяли двумя методами: с помощью специфической флюоресценции с использованием набора «FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit» (согласно методикам фирмы-изготовителя «Invitrogen») и путём определения колониеобразующих единиц (КОЕ) из исходной концентрации микробной взвеси  $10^2$  микробных кл./мл с высеиванием на плотную питательную среду (агар Мартена с pH 7,6—7,8) и подсчётом числа образовавшихся колоний через 24 ч.

Холерные вибрионы культивировали на агаре Мартена (pH 7,6—7,8). Через 24 ч инкубации при 37°C бактериальную массу суспендировали в стерильной водопроводной воде до показателя мутности 0,5 Ед по шкале McFarland на приборе Densi-La-Meter II («Erba Lachema»). Взвесь содержала  $10^6$  КОЕ/мл холерных вибрионов. Далее путём кратного разведения из неё получали маточную суспензию для моделирования биоплёнок, содержащую  $10^3$  КОЕ/мл холерных вибрионов.

Субстрат для культивирования биоплёнок готовили по оригинальной методике.

Маточную суспензию холерных вибрионов в количестве 50 мл вносили в ёмкость с субстратом и культивировали при комнатной температуре в статических условиях без дополнительной аэрации. Сроки культивирования определялись задачами конкретного эксперимента.

Фиксацию биоплёнок осуществляли 3,6% раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4), постфиксацию — 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование образцов осуществляли по методу J.H. Luft [12, 13] и тетраоксидом осмия (VIII) [14].

После высушивания образцы биоплёнок исследовали методом ТЭМ в электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

**Результаты.** Для подготовки образцов к исследованию методом ТЭМ необходимо было исключить необходимость отделения биоплёнки от субстрата и минимизировать механическое и химическое воздействия на неё во время осуществления различных манипуляций.

Для решения этой задачи нами было сконструировано оригинальное приспособление, представляющее собой субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства осуществления пробоподготовки к ТЭМ.

Первоначально получали формваровую плёнку по

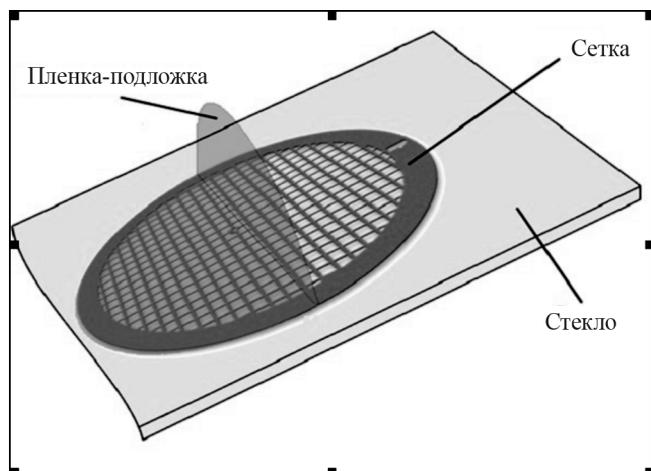


Рис. 1. Субстрат для культивирования биоплёнок.

стандартной методике [15]. Готовили 1% раствор поливинилформалина (формвара) в дихлорэтане, который выдерживали сутки при комнатной температуре для полного растворения. В этот раствор наполовину погружали предметное стекло на 10 с, затем извлекали, сушили в вертикальном положении на фильтровальной бумаге в течение 1 мин, получая на стекле плёнку. Плёнку надрезали по периметру и вместе со стеклом погружали под углом 45° в ёмкость с дистиллированной водой, где происходило отделение плёнки от стекла.

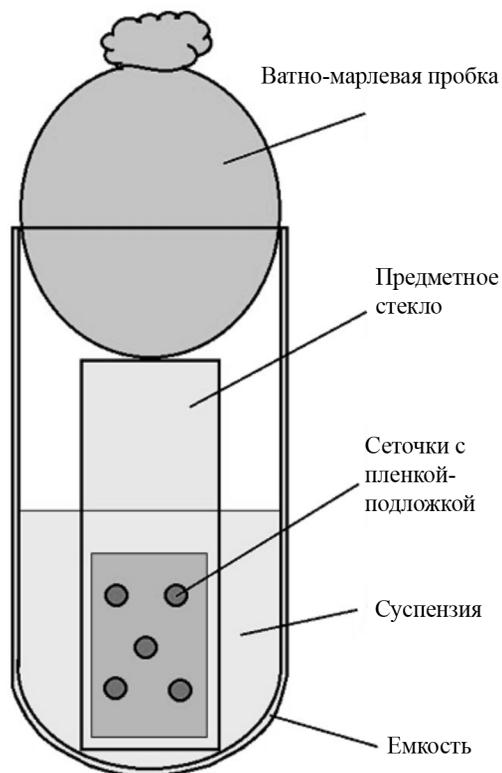


Рис. 2. Культивирование биоплёнок холерных вибрионов.

На плавающую на поверхности воды плёнку помещали 5 медных сеточек для электронной микроскопии с количеством ячеек 200 меш, а сверху накладывали предметное стекло, быстро погружая вместе с плёнкой в воду, затем переворачивали и извлекали, получая субстрат, состоящий из стекла, на котором размещены медные сеточки, покрытые формваровой плёнкой (рис. 1).

Стерилизацию субстрата, в силу неустойчивости формваровой плёнки при высоких температурах, осуществляли методом тиндализации при температуре 70°C в течение 3 сут с ежесуточным часовым инкубированием при 37°C.

После стерилизации субстрата маточную суспензию холерных вибрионов в количестве 50 мл вносили в ёмкость с субстратом и культивировали при комнатной температуре в статичных условиях без дополнительной аэрации (рис. 2). Сроки культивирования определялись задачами конкретного эксперимента.

Полученные биоплёнки извлекали из маточной суспензии, отмывали от планктонных клеток в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) и фиксировали-контрастировали по следующей схеме, предложенной J. Luft [12, 13] для визуализации углеводного компонента матрикса (далее — схема 1):

а) 3,6% раствор глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) с 0,02% водным раствором рутениевого красного 1:1 — 1 ч при 4°C;

б) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре;

в) 2% водный раствор тетраоксида осмия (VIII), 0,2% водный раствор рутениевого красного, фосфатный буфер (рН 7,2—7,4), соотношение 2:1:1 — 1 ч при комнатной температуре;

г) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре.

Для визуализации белкового компонента матрикса биоплёнки использована следующая схема фиксации и контрастирования [14] (далее — схема 2):

а) 3,6% раствор глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 1 ч при 4°C;

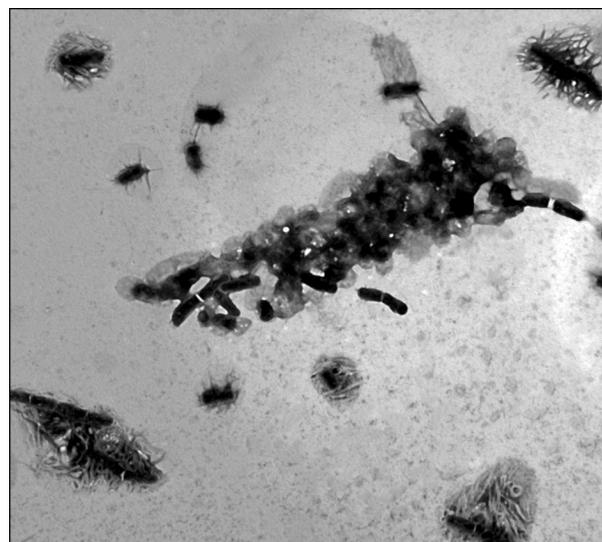


Рис. 3. Биоплёнка *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 8000).

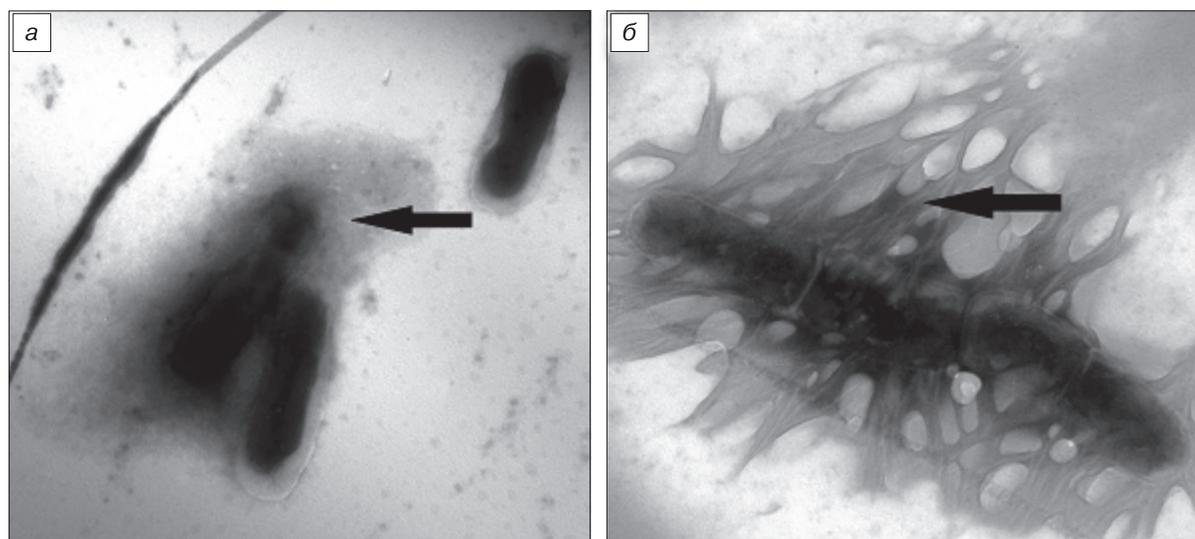


Рис. 4. Визуализация белкового (а) и углеводного (б) компонентов матрикса биоплёнки холерных вибрионов (стрелками указано вещество матрикса).

а — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 19667, 10-е сутки (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 30 000); б — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000).

б) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре;

в) 2% водный раствор тетраоксида осмия (VIII) — 1 ч при комнатной температуре;

г) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре.

После высушивания сетки с образцами биоплёнок отделяли пинцетом от предметного стекла и помещали в держатель для дальнейшего исследования методом ТЭМ.

*Обсуждение.* Предложенный способ культивирования позволил получить полноценную биоплёнку холерных вибрионов, полностью сохранившую связь с субстратом и обладающую характерными морфологическими признаками.

Использованная для пробоподготовки схема 1 позволила одновременно обеззараживать, фиксировать и контрастировать биоплёнку.

Общий вид биоплёнки *Vibrio cholerae* El Tor (штамм 5879) представлен на рис. 3.

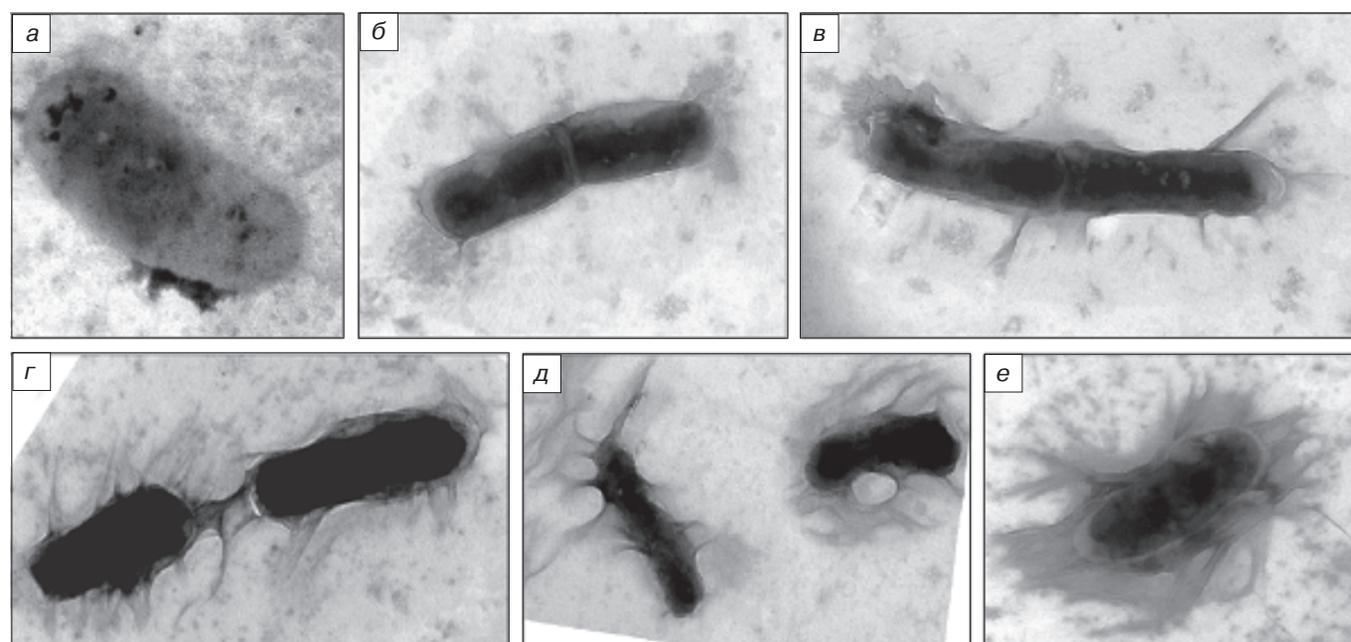


Рис. 5. Клетки *V. cholerae* El Tor 5879 на разных этапах формирования биоплёнки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия).

а — планктонная форма; б, в — адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата; г, д — созревание биоплёнки; е — зрелая биоплёнка.

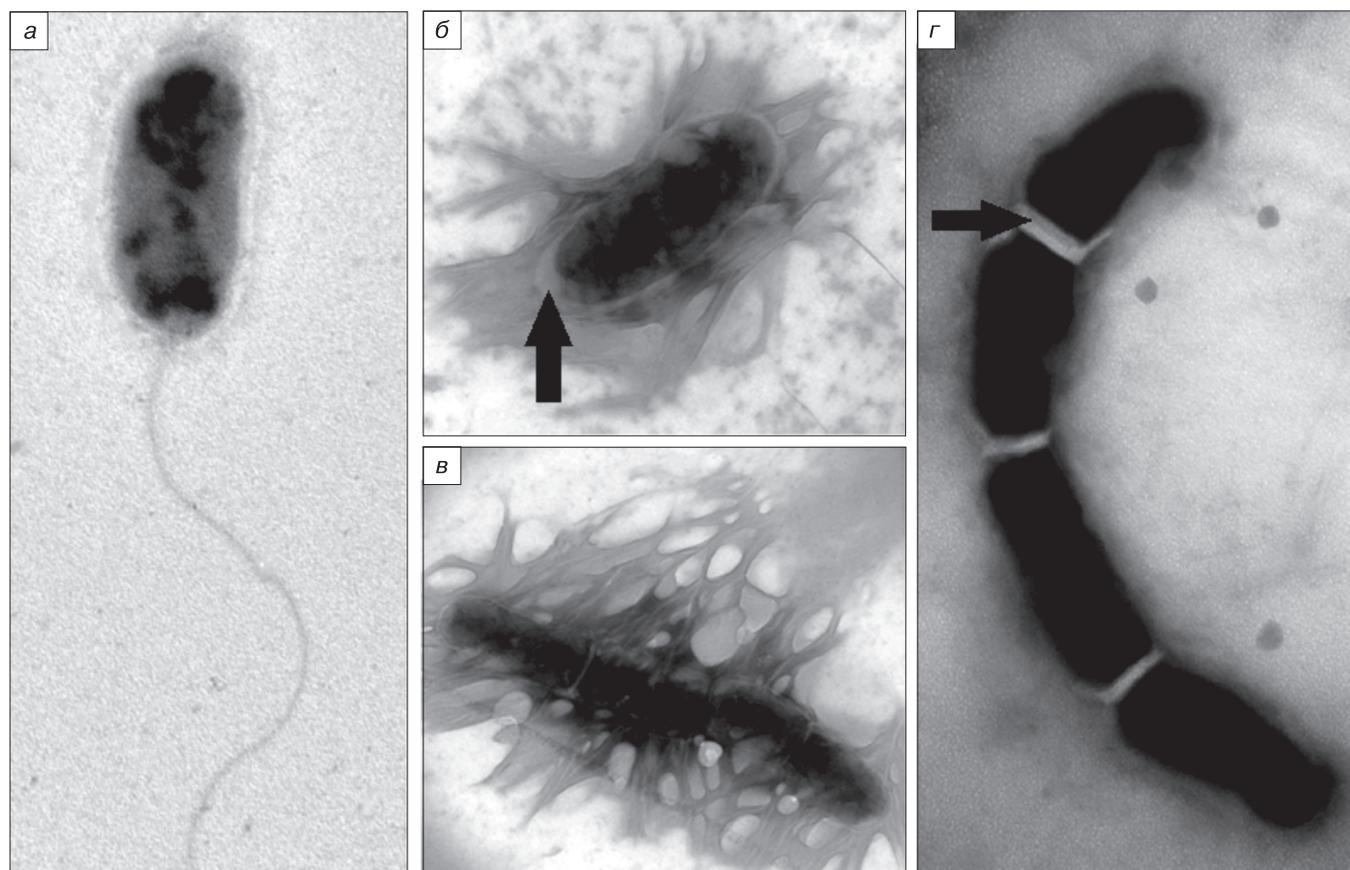


Рис. 6. Клетки планктонной и биоплёночной культур холерных вибрионов.

*a* — планктонная форма *V. cholerae* El Tor 5879, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 20 000); *б* — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000; стрелка указывает на капсулу); *в* — цепочки клеток биоплёночной формы *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000); *г* — цепочки клеток биоплёночной формы *V. cholerae* El Tor 19667, 10-е сутки (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 30 000; стрелка указывает на линию деления).

На первом этапе катионы рутениевого красного связываются с отрицательно заряженными полисахаридами матрикса. Поскольку рутениевый краситель не обладает электронной плотностью при ТЭМ, на втором этапе мы добавляли тетраоксид осмия (VIII), который, являясь сильным окислителем, восстанавливается до низших окислов, а те в свою очередь взаимодействуют с рутениевым красным, который связан с матриксом. Рутениевый краситель не проникает в клетку [13, 16], поэтому в комплексе с оксидами осмия контрастирует только внеклеточный матрикс [12, 13], а оксиды осмия проникают через мембрану и контрастируют бактериальные клетки [14].

Использование для пробоподготовки схемы 1 позволяет визуализировать только белковый компонент матрикса, так как тетраоксид осмия (VIII) не контрастирует углеводы [14].

Для сравнения на рис. 4 представлены два фрагмента биоплёнки с визуализацией белкового (*a*) и углеводного (*б*) компонентов матрикса.

Как видно, основная структура экстрацеллюлярного матрикса представлена углеводным компонентом — экзополисахаридом, что подтверждают различные исследования. Он же формирует и архитектуру матрикса, образуя нитевидные выросты, отходящие от клеток и

прикрепляющиеся вторым концом к субстрату. При этом количество складок и тяжей зависит от степени зрелости биоплёнки, и в пределах одного образца встречаются участки формирующейся биоплёнки с разной степенью зрелости.

При детальном изучении биоплёнки при больших увеличениях можно проследить изменение морфологии клеток на разных этапах биоплёнокообразования от планктонной формы до зрелой биоплёнки (рис. 5).

Согласно последним данным, процесс биоплёнокообразования можно разделить на следующие этапы [17]:

1. Обратимая адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата, связанная с действием неспецифических сил взаимодействия (силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные, электростатические и дисперсионные силы Лондона).

2. Необратимая адгезия бактерий к субстрату посредством жгутиков и пилей IV типа, адгезинов, фимбрий и др.

3. Созревание биоплёнки, во время которого адгезированные бактерии начинают синтезировать внеклеточное полимерное вещество, к которому прикрепляются также вторичные колонизаторы из планктонных форм.

4. В стадии зрелой биоплёнки бактерии практически не делятся, так как этому препятствует окружающий их матрикс, но сохраняют высокую жизнеспособность.

5. Дисперсия, т. е. разрушение зрелой биоплёнки с вторичной планктонизацией, наступает через определённый период под действием собственных бактериальных сурфактантов и др. веществ, в результате чего высвободившиеся клетки получают питательные вещества и способность к делению.

Таким образом, полученные нами результаты соответствуют данной морфо-стадийной характеристике.

У клеток, находящихся в составе биоплёнки, наблюдаются изменения размеров, формы и субмикроскопической организации клеточных компонентов.

На рис. 6 представлены клетки *V. cholerae* El Tor штамм 5879 в планктонной (а) и биоплёночной (б) формах.

Обращает на себя внимание колокализация клеток в биоплёнке — в некоторых участках они расположены цепочками, что нехарактерно для планктонных клеток в жидкой среде. Между клетками четко видна линия деления, а образование цепочек в плоскости деления объясняется, по-видимому, адгезией материнских клеток к субстрату и удерживанием дочерних клеток веществом матрикса. Помимо колокализации биоплёночные формы отличаются от планктонных тем, что окружены электронно-прозрачной капсулой и заключены в экстрацеллюлярный матрикс с филаментоподобными образованиями (при контрастировании по схеме 1). Также необходимо отметить отсутствие у клеток, входящих в состав биоплёнки, жгутиков.

Эти особенности мы предлагаем считать электронно-микроскопическими признаками биоплёночных форм холерных вибрионов.

**Заключение.** В работе показано успешное применение ТЭМ для изучения биоплёнок холерных вибрионов. Использование разработанного нами нового метода культивирования биоплёнок, адаптированного для исследования методом ТЭМ, многократно упрощает процесс пробоподготовки и позволяет максимально сохранять нативную структуру биоплёнок. Комбинируя варианты контрастирования и сравнительные полученные результаты, можно определять роль различных составляющих в процессе биоплёнокообразования, а также изучать структуру матрикса. Данные методики помогут оптимизировать изучение биоплёнок методом ТЭМ и лучше понять феномен биоплёнокообразования.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—3, 6, 10—16 см. REFERENCES)

1. Об эпидемиологической ситуации по холере в мире на 03.03.2017. Информационный бюллетень РостПЧИ № 6 об эпидемиологической ситуации по холере в мире. Ростов-на-Дону; 2017 г. Available at: [http://antiplague.ru/cholera\\_03-03-2017/](http://antiplague.ru/cholera_03-03-2017/)
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76(2): 149—163.
5. Соколова Т.Н. Микробные биоплёнки и способы их обнаружения. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2014; 4(48): 12—5.
7. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л., Ломинадзе Г.Г. Современные технологии исследования бактериальных биоплёнок. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(1): 14—20.

8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. Ультраструктура биоплёнок при внутривидовом и межвидовом взаимодействии условно патогенных бактерий. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2014; 1: 1—11.
9. Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Фролова Я.Н., Лабушкина А.В. Способность к формированию биоплёнки возбудителем дифтерии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 36—8.
17. Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Миронов А.Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346—54.

## REFERENCES

1. About the epidemiological situation of cholera in the world on 03/03/2017. Information bulletin of the ROSHI No. 6 on the epidemiological situation of cholera in the world. Rostov-on-Don, 2017. Available at: [http://antiplague.ru/cholera\\_03-03-2017/](http://antiplague.ru/cholera_03-03-2017/).
2. Yan J., Nadell C.D., Bassler B.L. Environmental fluctuation governs selection for plasticity in biofilm production. *ISME J*. 2017. Available at: <https://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej201733a.html>
3. Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. *Microbial Biofilms*. 2nd Ed ASM Press; Washington, DC: 2015. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880100/>
4. Nikolaev Ju.A., Plakunov V.K. Biofilm — «city of microbes» or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya*. 2007; 76(2): 149—63. (in Russian)
5. Sokolova T.N. Microbial biofilms and ways of their detection. *Zhurnal Grodenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 4(48): 12—5. (in Russian)
6. Mohammed S.A., Vienna M.E., Penny M.R., Hilton S.T., Mordan N., Knowles J.C. Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *Microbiology Open*. 2017. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.455/pdf>
7. Chebotar' I.V., Pogorelov A.G., Jashin V.A., Gur'ev E.L., Lominadze G.G. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2013; 5(1): 14—20. (in Russian)
8. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Orlova O.G. Ultrastructure features in biofilms during opportunistic bacteria intraspecific and interspecific interactions. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2014; 1: 1—11. (in Russian)
9. Harseeva G.G., Mironov A.Ju., Frolova Ja.N., Labushkina A.V. Diphtheria causative agent capacities to form biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 36—8. (in Russian)
10. Wu S., Baum M.M., Kerwin J., Guerrero-Given D., Webster S., Schaudinn C. et al. Biofilm-specific extracellular matrix proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Pathog Dis*. 2014; 72(3): 143—60.
11. Lara H.H., Romero-Urbina D., Pierce G., Lopez-Ribot J.L., Arellano-Jimenez M.J., Jose-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 13: 91.
12. Luft J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. *The Anatomical Record*. 1971; 3(171): 369—415.
13. Luft J.H. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Feder. Proc*. 1967; 25: 1733—83.
14. Bahr G.F. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. *Exp. Cell. Res*. 1954; 7: 457—79.
15. Pease D.C. *In Histological Techniques for Electron Microscopy*. 2nd ed. New York and London: Academic Press; 1964.
16. Tani E., Ametani T. Substructure of microtubules in brain nerve cells as revealed by ruthenium red. *J. Cell. Biol*. 1970; 46(1): 159—65.
17. Harseeva G.G., Frolova Ja.N., Mironov A.Ju. Biofilms of Pathogenic Bacteria: Biological Properties and Their Role in Chronization of Inflammatory Process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346—54. (in Russian)

Поступила 20.04.17  
Принята к печати 25.05.17

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 576.852.23:616.611.63-002.5

Харсеева Г.Г.<sup>1</sup>, Кудря Е.В.<sup>2</sup>, Воронина Н.А.<sup>1</sup>, Доля Ю.А.<sup>2</sup>, Бут О.М.<sup>3</sup>, Гасретова Т.Д.<sup>1</sup>, Алутина Э.Л.<sup>1</sup>.

## **CORYNEBACTERIUM RIEGELII — НЕОБЫЧНЫЙ ВИД, ВЫДЕЛЕННЫЙ ОТ ПАЦИЕНТКИ С ТУБЕРКУЛЁЗОМ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ (СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ)**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ГБУ РО «Противотуберкулёзный клинический диспансер» Минздрава Ростовской области, 344022, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

<sup>3</sup>МБУЗ «Городская больница № 20 г. Ростов-на-Дону», городская лаборатория клинической микробиологии, 344006, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

*Описан клинический случай туберкулёза мочевого выделительной системы пациентки с массивным выделением из урогенитального тракта штамма *Corynebacterium riegelii*. Проанализированы данные клинико-лабораторного обследования больной и описаны свойства выделенного штамма *C. riegelii* (высокая степень высеваемости ( $10^6$  и выше), выраженная уреазная активность (разложение уреазы в течение 5 мин), наличие гемолитической активности) с учётом определения его антибиотикочувствительности. Показана этиологическая значимость выделенного вида *C. riegelii* в развитии инфекционного процесса в урогенитальном тракте.*

**Ключевые слова:** *C. riegelii*; уреазная активность; туберкулёз мочевого выделительной системы; урогенитальный тракт.

**Для цитирования:** Харсеева Г.Г., Кудря Е.В., Воронина Н.А., Доля Ю.А., Бут О.М., Гасретова Т.Д., Алутина Э.Л. *Corynebacterium riegelii* — необычный вид, выделенный от пациентки с туберкулёзом мочевого выделительных путей. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (9): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9->

Kharseeva G.G.<sup>1</sup>, Kudrya E.V.<sup>2</sup>, Voronina N.A.<sup>1</sup>, Dolya Yu.A.<sup>2</sup>, But O.M.<sup>3</sup>, Gasretova T.D.<sup>1</sup>, Alutina E.L.<sup>1</sup>

CORYNEBACTERIUM RIEGELII AS AN UNUSUAL SPECIES SEPARATED FROM FEMALE PATIENT WITH TUBERCULOSIS OF URINARY TRACTS: A PRACTICE CASE

<sup>1</sup>The Rostovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 344022 Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>The anti-tuberculosis clinical dispensary of the Minzdrav of the Rostovskaia oblast, 344022 Rostov-on-Don, Russia

<sup>3</sup>The municipal hospital № 20, the municipal laboratory of clinical microbiology, 344006 Rostov-on-Don, Russia

*The article describes a clinical case of tuberculosis of urinary tracts of a female patient with massive discharge of strain *Corynebacterium riegelii* from urogenital tract. The data of clinical laboratory examination of female patient are analyzed. The characteristics of isolated strain *C. riegelii* (high degree of isolation rate ( $10^6$  and higher) expressed urease activity (decomposition of urease during 5 min), presence of hemolytic activity) with consideration for estimation of its antibiotics sensitivity. The etiologic significance of isolated species *C. riegelii* in development of infection process in urogenital tract is demonstrated.*

**Key words:** *C. riegelii*; urease activity; tuberculosis; urinal system; urogenital tract

**For citation:** Kharseeva G.G., Kudrya E.V., Voronina N.A., Dolya Yu.A., But O.M., Gasretova T.D., Alutina E.L. *Corynebacterium riegelii* as an unusual species separated from female patient with tuberculosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9) : . (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9->

**For correspondence:** Kharseeva G.G., doctor of medical sciences, professor, head of the chair of microbiology and virology. e-mail: [galinagh@bk.ru](mailto:galinagh@bk.ru)

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

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

Received 19.04.2017

Accepted 26.04.2017

**Введение.** *Corynebacterium riegelii* впервые описана и идентифицирована G. Funke в 1998 г. как микроорганизм, связанный с инфекциями мочевого выделительных путей у женщин [1—3]. *C. riegelii* (rie.gel'ii, в дальнейшем *riegelii* от *Riegelii*) назван так в честь современного французского микробиолога Филиппа Ригеля, внесшего большой вклад в систематику рода *Corynebacterium*. В 2012 г. в Японии зафиксиро-

ван редкий случай уросепсиса у 94-летнего мужчины с почечно-каменной болезнью, обусловленный *C. riegelii* [4]. В 2013 г. в Бразилии выявлен фатальный случай уросепсиса у 79-летней женщины, причиной которого являлась *C. riegelii* [1]. У пациентки не обнаружено иных сопутствующих заболеваний, способных вызвать прогрессирующее ухудшение клинического состояния, и других возбудителей инфекций. На основании этого констатирована смерть, наступившая вследствие уросепсиса, вызванного *C. riegelii*.

Тяжело протекающие и летальные случаи заболевания мочевого выделительных путей, обусловленных *C. riegelii*, описаны лишь за рубежом (Япония, Бразилия, Испа-

**Для корреспонденции:** Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, Ростов-на-Дону, e-mail: [galinagh@bk.ru](mailto:galinagh@bk.ru)

ния, Швейцария) [1—4]. Отличительной особенностью *C. riegelii* является высокая уреазная активность, проявляющаяся через 5 мин после инокуляции в среду культуры при комнатной температуре. Повышенная уреазная активность расценивается как фактор патогенности *C. riegelii* [3].

Представлено клиническое наблюдение пациентки с диагнозом туберкулёз мочевыделительной системы, зарегистрированным в 2013 г. в Ростове-на-Дону. Особенностью случая является выделение редко встречающегося вида *C. riegelii* из мочи в диагностически значимом количестве.

**Материал и методы.** Исследован штамм *C. riegelii*, выделенный из мочи пациентки П. в диагностически значимом количестве ( $10^6$ — $10^7$ ). Штамм *C. riegelii* идентифицировали в соответствии с указаниями [5] и методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS). Гемолитическую активность определяли по методу Грейга [6], ДНКазную активность определяли в соответствии с инструкцией на агаре для теста на ДНКазу с толуидиновым синим (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия), антибиотикочувствительность — диско-диффузионным методом [7].

**Результаты и обсуждение.** Больная П., 73 года, поступила в урогенитальное отделение противотуберкулёзного клинического диспансера 20.05.13 г. с жалобами на боли в правом бедре, хромоту, дизурию, свищ правого бедра с гнойно-серозным отделяемым. В анамнезе: болела длительно, лечилась в поликлинике без существенного эффекта по поводу кисты правого бедра. Госпитализирована в урогенитальное отделение противотуберкулёзного диспансера, где проведено комплексное обследование больной.

Общий анализ крови от 21.05.13 г.: Нб 129 г/л, эр.  $4,0 \cdot 10^{12}$ /л, л.  $6,4 \cdot 10^9$ /л, э. 1%, полиморфноядерные лейкоциты —  $4,0 \cdot 10^9$ /л, сегментоядерные лейкоциты —  $58 \cdot 10^9$ /л, лимф. 32%, мон. 5%; СОЭ 7 мм/ч.

Общий анализ мочи от 21.05.13 г.: относительная плотность 1008, белок 0,033 г/л, лейкоциты в большом количестве, эритроциты 5 клеток, эпителий почек — не обнаружено, рН кислая, эпителий мочевыводящих путей — 3—5 клеток; микобактерии туберкулёза не обнаружены.

Биохимический анализ крови от 21.05.13 г.: глюкоза 4,9 ммоль/л, билирубин 6,47 мкмоль/л, общий белок 74,2 г/л, креатин 166,4 ммоль/л, тимоловая проба 1,4 ед., протромбиновый индекс 98%, АлАТ 17,8 мкмоль/л, АсАТ 32,4 мкмоль/л.

При бактериологическом исследовании мочи 22.05.2013 г. *M. tuberculosis* не выявлены, но обнаружены *Staphylococcus cohnii* в количестве  $10^6$  и *Corynebacterium spp.* в количестве  $10^7$ . После назначения антибактериальных препаратов (рифампицин, изониазид, стрептомицин, канамицин, пиперазид) при повторном бактериологическом исследовании мочи 17.10.2013 г. *M. tuberculosis* не выявлены, но обнаружены *C. riegelii* в количестве  $10^6$ .

При флюорографическом исследовании от 15.03.13 г. изменений в лёгких не выявлено.

Результаты рентгенологического исследования от 07.08.13 г. (обзорная рентгенограмма) свидетельствовали об отсутствии деструктивных изменений тазобедренных суставов. На фистулограмме от 16.10.13 г. в верхней трети бедра определяется контрастированный свищевой ход и сформировавшаяся полость,

заполненная контрастом 2,7×5,5 см. По результатам спиральной компьютерной томографии почки расположены обычно, имеют чёткие неровные контуры. Левая почка имеет размер 11,6×6,0 см, правая — 9,8×5,5 см, состоит из разнокалиберных полостных образований и включений извести. Чашечно-лоханочная система почки и мочеточник значительно расширены, мочеточник атоничен, в паренхиме почки обнаружены включения извести. Мочевой пузырь расположен обычно, в его стенке выявлены включения извести, определяется грубая спайка. Печень и селезёнка не увеличены. В селезёнке обнаружены включения извести, в печени — кисты размером 1,0×0,9 см, 3,0×2,7 см.

Больной П. поставлен диагноз: туберкулёз мочевыделительной системы: поликавернозный туберкулёз правой почки, стриктура нижней трети левого мочеточника, гидронефроз слева.

От больной П. при бактериологическом исследовании выделен штамм *C. riegelii* в диагностически значимом количестве ( $10^6$ ). Масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), проведённый на Bruker Daltonik MALDI Biotyper, подтвердил (индекс Score-1,844) результаты идентификации данного вида культуральным методом. При микроскопическом исследовании *C. riegelii* представляли собой грамположительные палочки средних размеров, расположенные в мазках хаотично. Их рост обнаружен на средах МПА (мясопептонный агар), КТА (кровяно-теллуриновый агар), коринебаккагаре с теллуридом калия при 37°C. На коринебаккагаре (производства ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) *C. riegelii* образовывали колонии чёрного цвета, блестящие, гладкие, диаметром 1,0—1,5 мм после инкубации в течение 24 ч. Каталазоположительны, неподвижны. В тесте ферментации/окисления глюкозы *C. riegelii* только ферментировали глюкозу, медленно окисляли мальтозу, обладали высокой уреазной активностью (разложение уреазы в течение 5 мин), это характерные отличительные признаки данного вида. Не редуцировали нитраты в нитриты. *C. riegelii* обладали средней гемолитической (оптическая плотность 0,325) и отрицательной ДНКазной активностью.

Выделенный штамм *C. riegelii* по показателям минимальной подавляющей концентрации (МПК) в соответствии с [8, 9] чувствителен к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, резистентен к бензилпенициллину, линкомицину, рифампицину, гентамицину.

**Заключение.** Анализ клинических и лабораторных данных, характеризующих состояние больной П., указывает на этиологическую значимость выделенной *C. riegelii* в развитии инфекционного процесса в урогенитальном тракте. Особое внимание при выделении данного вида коринебактерий от пациентов следует уделять степени его высеваемости ( $10^6$  и выше), высокой и быстро проявляющейся (в течение нескольких минут) уреазной активности, наличию гемолитической активности.

Представленное исследование свидетельствует о важности выявления коринебактерий и, в частности, нового вида *C. riegelii* из клинических образцов для назначения адекватного лечения.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 8, 9, см. REFERENCES)

5. МР 4.2.00.20—11. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*. Методические рекомендации; утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 11.05.2011. М.; 2011.
6. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М., ред. М.: Медицина; 2012.
7. МУК 4.2.1890—04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. М.; 2004.

REFERENCES

1. Aygun G., Midilli K., Cilingir H., Yilmaz M., Kutuksu A., Eker E. A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii*. *Braz. J. Microbiol.* 2013; 44(2): 475—6.
2. Ferrer I., Marne C., Revillo M.J., López A.I., Velasco J.J., García-Moya J.B. Infección urinaria por *Corynebacterium riegelii*. *Enfermed. Infec. Microbiol. Clín.* 2001; 19(6): 284—5.
3. Funke G., Lawson P.A., Collins M.D. *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(3): 624—7.
4. Matsunami M., Otsuka Y., Ohkusu K., Soqi M., Kitazono H.,

Hosokawa N. Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and *Corynebacterium riegelii* in an adult: case report and literature review. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18(4): 552—4.

5. МР 4.2.00.20—11. Control methods. Biological and microbiological factors. Phenotypic identification of bacteria of the genus *Corynebacterium*. Guidelines. [Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Fenotipicheskaya identifikatsiya bakteriy roda *Corynebacterium*. Metodicheskie rekomendatsii]; utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 11.05.2011. M., 2011. (in Russian)
6. Guide to Medical Microbiology. Private medical microbiology and etiologic diagnosis of infections [Rukovodstvo po meditsinskoy mikrobiologii. Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya i etiologicheskaya diagnostika infektsiy]. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M., eds. Moscow: Meditsina; 2012. (in Russian)
7. МУК 4.2.1890—04. Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Methodical instructions [Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya]. Moscow; 2004. (in Russian)
8. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; (4): 291—6.
9. Performanse standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S25. *NCCLS.* 2015; 35(3).

Поступила 19.04.17

Принята к печати 26.04.17

**Уважаемые авторы и читатели журнала!**

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