

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 Том 62 ЛАБОРАТОРНАЯ 10 • 2017 ДИАГНОСТИКА

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

ОКТАБРЬ

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 16.10.2017.
Формат 60 × 88¹/₈.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Усл. печ. л. 8,33.
Уч.-изд. л. 9,67.
Заказ 894.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Отпечатано в ООО "Подольская
Периодика", 142110, г. Подольск,
ул. Кирова, 15

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2017. № 10. 577—640.

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
10 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Ариповский А.В., Тибилова О.А., Каба С.И., Кухарчук В.В. Физико-химические и биологические свойства триглицеридов. Поглощение клетками функционально разных пальмитиновых + олеиновых липопротеинов очень низкой и линолевых + линоленовых липопротеинов низкой плотности 580
- Мальшиева Н.М., Колесникова Г.С., Иоутси В.А., Ильин А.В., Головкина Н.А., Тюльпакон А.Н. Сравнительный анализ результатов определения тестостерона в сыворотке крови на анализаторах Architect и Vitros и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии. 592
- Дылева Ю.А., Груздева О.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Барбараш О.Л. Физиологическая и патофизиологическая роль стимулирующего фактора роста ST2 599
- Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А. Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза как маркер системного воспаления при остеоартрозе 606

ИММУНОЛОГИЯ

- Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксенов В.В., Ткаченко П.В., Иванов В.А., Иванов А.В., Субботина Т.И. Дифференциальная диагностика хронического сальпингоофорита и рака яичников на основе иммунологического и дискриминантного методов. 611

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Петрова Ю.А., Березкина Г.В., Околелова Н.А., Коломец А.Н. Экспресс-выявление молекулярно-биологическими методами патогенов в снятых с пациентов иксодовых клещах как основа превентивной терапии клещевых трансмиссивных инфекций. 615
- Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артемченко К.Л., Кауфман А.С. Выбор антибиотика в микробиологическом исследовании мокроты 618
- Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., Кошечев М.Е., Зоркальцева Е.Ю., Савилов Е.Д. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулеза 622
- Зыкова Т.А., Шевякова Е.А., Колпаков С.А. Распространенность и возможности серологической диагностики реовирусной инфекции. 627
- Шепелин А.П., Марчихина И.И., Полосенко О.В., Шолохова Л.П., Ажержмачева Н.И., Доброхотский О.Н., Борзенкова Т.Х. Клинические испытания агара и бульона Моссея. 631
- Сухина М.А., Сафин А.Л. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей; методы детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* (обзор литературы) 635

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Amelyushkina V.A., Aripovsky A.V., Tibilova O.A., Kaba S.I., Kukharchuk V.V. The physical chemical and biological features of triglycerides. The cell absorption of functionally different palmitic+oleic lipoproteins of very low and density and linoleic+linolenic lipoproteins of low density
- Malysheva N.M., Kolesnikova G.S., Ioutsi V.A., Il'in A.V., Golovkina N.A., Tyul'pakov A.N. The comparative analysis of the results of detection of testosterone in blood serum applying analyzers Architect and Vitros and tandem mass-spectrometry, a highly efficient fluid chromatography technique
- Dyleva Yu.A., Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G., Barbarash O.L. The physiologic and pathophysiologic role of stimulating growth factor ST2
- Akhverdyan Yu.R., Zavodovsky B.V., Polyakova Yu.V., Sivorodova L.E., Zborovskaya I.A. The nicotinamide-phosphoribosyltransferase as a marker of systemic inflammation under osteoarthritis

IMMUNOLOGY

- Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksenov V.V., Tkachenko P.V., Ivanov V.A., Ivanov A.V., Subbotina T.I. the differentiated diagnostic of chronic salpingoophoritis and ovary cancer on the basis of immunologic and discriminant technique

MICROBIOLOGY

- Rudakova S.A., Rudakov N.V., Petrova Yu.A., Berezkina G.V., Okolelova N.A., Kolomeetz A.N. The molecular biological methods of express-detection of pathogens in ticks taken way from patients as a basis of preventive therapy of tick transmissible infections
- Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamyan T.A., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Artemchenko K.L., Kaufman A.S. The choice of antibiotic in microbiological analysis of phlegm
- Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseeva E.Ya., Tzyrenova T.A., Koscheev M.E., Zorkaltseva E.Yu., Savilov E.D. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis
- Zykova T.A., Shevyakova E.A., Kolpakov S.A. The prevalence and possibilities of serological diagnostic of reoviral infection
- Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Polosenko O.V., Sholokhova L.P., Azhermacheva N.I., Dobrokhotsky O.N., Borzenkova T.Kh. The clinical trials of agar and Mossel EE broth
- Sukhina M.A., Safin A.L. The actual condition of laboratory diagnostic of *Clostridium difficile*-associated diarrhea; the methods of detection of toxigenic strains (review of publications)

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 612.015.3:547.295

Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Ариповский А.В., Тибилова О.А., Каба С.И., Кухарчук В.В.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИГЛИЦЕРИДОВ. ПОГЛОЩЕНИЕ КЛЕТКАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНЫХ ПАЛЬМИТИНОВЫХ + ОЛЕИНОВЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ И ЛИНОЛЕВЫХ + ЛИНОЛЕНОВЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

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

На ступенях филогенеза более ранние, инсулиннезависимые липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и более поздние, инсулинозависимые липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) исполняют разные функции. Нарушение биологической функции трофологии, изменение жирных кислот (ЖК) в триглицеридах (ТГ), преобладание пальмитиновых над олеиновыми ЛПОНП обеспечивают митохондрии клеток неоптимальным субстратом — пальмитиновой насыщенной жирной кислотой (НЖК) для наработки энергии, синтеза АТФ. Физиологично клетки реализуют олеиновый вариант метаболизма ЖК, окисляя главным образом ω -9 эндогенную олеиновую МЖК. Патология ЛПНП — первичный дефицит в клетках полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), атеросклероз и атероматоз интимы артерий эластического типа с формированием плотных бляшек из ПНЖК в форме полиэфиров холестерина. Патология ЛПОНП включает: а) синдром резистентности к инсулину; б) патологию ранней в филогенезе инсулиннезависимой висцеральной жировой ткани — метаболический синдром; в) патологию поздних в филогенезе инсулинозависимых подкожных адипоцитов — ожирение; г) вторичный атеросклероз, при накоплении в крови пальмитиновых ЛПНП с развитием атеротромбоза интимы артерий, мягких богатых ТГ бляшек. Профилактика же нарушений переноса ЖК в ЛПОНП и ЛПНП во многом едина — минимизация афизиологичного влияния избыточного количества пищи, биологической функции питания. Профилактика на уровне популяции включает: а) максимальное ограничение в пище содержания пальмитиновой НЖК; б) умеренное увеличение ПНЖК, преимущественно ω -3 ПНЖК и в) повышение физической активности. В первичной профилактике метаболических пандемий, при афизиологичном воздействии факторов внешней среды, фармакологические препараты биологией не предусмотрены.

Ключевые слова: жирные кислоты; триглицериды; липопротеины очень низкой плотности; позиционная специфичность триглицеридов.

Для цитирования: Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Ариповский А.В., Тибилова О.А., Каба С.И., Кухарчук В.В. Физико-химические и биологические свойства триглицеридов; поглощение клетками функционально разных пальмитиновых + олеиновых липопротеинов очень низкой и линоленовых + линолеиновых липопротеинов низкой плотности. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(10): 580-592. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-580-592>

Titov V.N., Amelyushkina V.A., Aripovsky A.V., Tibilova O.A., Kaba S.I., Kukharchuk V.V.

THE PHYSICAL CHEMICAL AND BIOLOGICAL FEATURES OF TRIGLYCERIDES. THE CELL ABSORPTION OF FUNCTIONALLY DIFFERENT PALMITIC+OLEIC LIPOPROTEINS OF VERY LOW AND DENSITY AND LINOLEIC+LINOLENIC LIPOPROTEINS OF LOW DENSITY

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

The earlier insulin-independent low-density lipoproteins and more late insulin-dependent very low-density lipoproteins implement different functions at the stages of phylogenesis. The disorder of biological function of trophology, alteration of fatty acids in triglycerides, prevalence of palmitic very low-density lipoproteins over oleic very low-density lipoproteins supply mitochondria of cells with non-optimal substrate - palmitic saturated fatty acid for gaining energy, ATP synthesis. Physiologically, cells implement oleic alternative of fatty acids metabolism, oxidizing mainly ω -9 endogenous oleic mono-unsaturated fatty acid. The pathology of low density lipoproteins is primary deficiency of poly-unsaturated fatty acids in cells, atherosclerosis and atheromatosis of intima of arteries of elastic type with development of dense plaques from poly-unsaturated fatty acids in the form of polyethers of cholesterol. The pathology of very low-density lipoproteins includes: a) syndrome of resistance to insulin; b) pathology of phylogenetically earlier insulin-independent visceral fatty tissue - metabolic syndrome; c) pathology of phylogenetically later insulin-dependent subcutaneous adipocytes - obesity; d) secondary atherosclerosis, under cumulation of palmitic low-density lipoproteins in blood with development of atherothrombosis of intima of arteries, soft plaques rich with triglycerides. As for the prevention of disorders of transfer of fatty acids to very low-density lipoproteins and low-density lipoproteins is common in many ways - minimization of aphysiological effect of surplus amount of food, biological function of diet. The prevention at the level of population includes: a) maximal limitation of content of palmitic saturated fatty acid in food; b) moderate increasing of poly-saturated fatty acids, ω -3 poly-saturated fatty acids predominantly; c) increasing of physical activity. The pharmaceuticals are not provided by biology in primary prevention of metabolic pandemics under aphysiological impact of environment factors.

Key words: fatty acids; triglycerides; very low-density lipoproteins; positional specificity of triglycerides.

For citation: Titov V.N., Amelyushkina V.A., Aripovsky A.V., Tibilova O.A., Kaba S.I., Kukharchuk V.V. The physical chemical and biological features of triglycerides. The cell absorption of functionally different palmitic+oleic lipoproteins of very low and density and linoleic+linolenic lipoproteins of low density. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (10): 580-592. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-580-592>

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.06.2016

Accepted 15.06.2016

Введение. Термин триглицериды (ТГ) при ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, гиперлипидемии (ГЛП), неалкогольной жировой болезни печени, метаболическом синдроме, сахарном диабете, резистентности к инсулину, инсулинорезистентности (ИР) и ожирении мы производим столь же часто, как и холестерин (ХС). Однако если ХС — это циклический, вторичный одноатомный гидрофобный полярный спирт, то ТГ образуются при ковалентном взаимодействии трех жирных кислот (ЖК) и трехатомного спирта глицерина [1]. С позиций биохимии, ТГ — эфиры трехатомного глицерина и трех ЖК с числом атомов углерода в цепи от С4 до С22. В биологических средах *in vivo* ХС присутствует в трех функционально разных формах: а) полярный спирт ХС в монослое из фосфатидилхолинов (ФХ); б) мононенасыщенные эфиры ХС (моно-ЭХС) функционально это неполярная форма ХС (моно-ЭХС) и в) полиненасыщенные эфиры ХС (поли-ЭХС) — функционально это неполярная форма полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) [2].

Продукты реакции этерификации спирт + ЖК принято именовать по имени спирта; поэтому моно-ЭХС и поли-ЭХС — это неполярные формы липидов. Липидами являются все жирные кислоты (ЖК) (рис. 1) и многие соединения, в которые ЖК входят. ХС — спирт; не липид, однако, будучи превращенным в неполярную его форму, в холестерололеат, ХС становится компонентом липидов.

Структурные и функциональные различия ТГ определяют свойства этерифицированных с глицерином ЖК. Функциональная роль моно-ЭХС и поли-ЭХС разная: моно-ЭХС — неполярная форма ХС, а поли-ЭХС — неполярная форма ПНЖК. Только в форме поли-ЭХС клетки поглощают ПНЖК путем активного, рецепторного апоВ-100 эндоцитоза. В плазме крови можно определить: а) общий ХС — это неэтерифицированный ХС + моно-ЭХС + поли-ЭХС; б) только неэтерифицированный ХС; в) моно-ЭХС — неполярная форма спирта ХС и г) поли-ЭХС — неполярная форма ПНЖК; каждый тест имеет свое диагностическое значение. Переход только поли-ЭХС, но не моно-ЭХС из ЛП высокой плотности (ЛПВП) в ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) инициирует белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина (БППЭХ). Разнообразие эфиров глицерина ТГ больше, чем эфиров ХС.

В плазме крови методом газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии можно определить содержание 40—45 индивидуальных ТГ. Содержание в плазме крови ТГ с разным числом атомов углерода в ЖК характерно для липидов отдельных видов животных. Все физико-химические свойства ТГ — субстрата гидролиза эфирной связи при действии липаз и кинетика освобождения НЭЖК определена этерифицированными с глицерином ЖК. Различают ТГ по: а) длине ЖК (С2—С18);

б) числу двойных связей (-С = С-, ДС) в ЖК; в) расположению ДС по длине ЖК; г) образованию эфирной связи ЖК с первичными спиртовыми группами глицерина в позиции sn-1 и sn-3 и со вторичной спиртовой группой в sn-2; д) образованию гомогенных ТГ как (олеил-олеил-олеат, ООО) или гетерогенных ТГ как миристоил-олеил-лауреат (МПЛа), пальмитоил-олеил-стеарат (ПОС) или линолеил-линоленил-олеат (ЛиЛнО).

На рис. 2 видно, что спектр ТГ в биологической реакции эндотрофии (при отсутствии пищи) у разных видов животных имеет различия в ЖК, которые этерифицированы с глицерином [3]. ТГ могут быть: а) среднецепочечными при этерификации С12—С14 ЖК и б) длинноцепочечными при образовании эфиров глицерина с С16—С18 ЖК. Физиологично в ТГ этерифицированы ЖК с четным числом атомов углерода. Индивидуальные ТГ с разной константой скорости реакции обеспечивают субстратами для наработки энергии *in vivo* все клетки при реализации разных биологических функций и биологических реакций, включая наиболее энергоемкую биологическую функцию локомоции. И если в плазме крови морской свинки, у человека и кролика преобладают длинноцепочечные С16—С18 ЖК при низком содержании среднецепочечных ТГ (см. рис. 2), то среди ТГ в плазме крови лошади высоко содержание длинноцепочечных С16:0, С16:1 и С18:0, С18:1 и С18:2 ЖК. Одновременно много и среднецепочечных ТГ, в которых этерифицирована С14:0 миристиновая НЖК, С12:0 лауриновая и короткоцепочечных ЖК — С10:0 каприновая и С8:0 каприловая ЖК.

Несмотря на высокие аналитические качества газовой хроматографии, каждый из пиков на хроматограмме индивидуальным ТГ часто не является; пик — это сумма атомов углерода в трёх цепях ЖК + три атома углерода спирта глицерина. Позиционное различие этерификации двух ЖК с первичной или вторичной спиртовой группой методом газовой хроматографии установить трудно. Меньшее число атомов углерода в среднецепочечных ТГ инициирует более активное взаимодействие глицеридов с ФХ, особенно на границе вода/воздух [4]. При инкубации среднецепочечных ЖК с длинноцепочечным ТГ как стеарил-стеарил-стеарат (ССС) в присутствии липаз происходит изменение ЖК; прослежено это при использовании метода дифференциальной сканирующей калориметрии [5].

ЖК этерифицированы и в иные глицериды — в фосфолипиды; они в полной мере определяют и их физико-химические параметры. Полярные ФХ (тоже эфиры глицерина) формируют моно- и бислойные структуры, если длина ЖК в ФЛ не менее С16 и не более С20. Это в равной мере относится ко всем ЖК: НЖК, МЖК, ННЖК и ПНЖК. В зависимости от состава ЖК изменяются физико-химические параметры как плазматической мембраны клеток, так и бислойных, монослой-

БИОХИМИЯ

ных мембран внутриклеточных органелл. Физико-химические особенности полярных ФЛ и спирта ХС в монослойных структурах во многом определяет активность биохимических превращений липидов в переносе ЖК в ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП. Они же определяют и активное поглощение клетками ЖК в лигандных ЛПВП, ЛПОНП и ЛПНП.

Каждый из ТГ обладает специфичными физико-химическими свойствами, кинетическими параметрами липолиза — гидролиза последовательно одной ЖК, двух и трех ЖК при действии разных липаз на ТГ, ди- и моноглицериды. ТГ отличается стерической, пространственной формой молекулы, расположение в пространстве трех цепей ЖК. В силу этого липазы, которые гидролизуют ТГ, в частности постгепариновая липопротеинлипаза (ЛПЛ), обладает позиционной специфичностью. Даже для ТГ, в которых с глицерином этерифицированы всего-то две ЖК — С16:0 пальмитиновая НЖК и цис- С18:1 олеиновая МЖК, характерны пространственные различия. Рис. 3. отображает стерические формы эфиров глицерина только с пальмитиновой НЖК и олеиновой МЖК, в зависимости от позиции их этерификации.

Разными оказываются кинетические параметры биохимических реакций — как этерификации, так и гидролиза ЖК с первичными (sn-1 и sn-2) и вторичной спиртовой группой (sn-2) глицерина. В силу этого липаза поджелудочной железы в тонком кишечнике гидролизует в ТГ эфирную связь только с первичными спиртовыми группами в sn-1 и sn-3 и не может гидролизовать связь ЖК со вторичной группой в sn-2. Поэтому энтероциты молекулу ТГ из тонкого кишечника всасывают в форме трех частей: а) НЭЖК из позиции sn-1; б) НЭЖК из sn-3 и в) 2-моноацилглицерол — негидролизованная ЖК в sn-2. В энтероците происходит этерификация трёх частей с воссозданием ТГ, какими они были в пище. И если в цитоплазме энтероцитов в sn-1 и sn-3 возможна замена (изомеризация) одних ЖК на иные экзогенные НЭЖК, ЖК в sn-2 остается той же, что была в пище. Проследить это можно как в энтероцитах, гепатоцитах, так и в составе ЛПОНП. В большей мере позиционная специфичность характерна для ЛПЛ в плазме крови; в ТГ в

Тривиальное название	Число С-атомов	Число двойных связей	
		Положение двойных связей	
Муравьиная	1: 0	○	В липидах не встречается
Уксусная	2: 0	○	
Пропионовая	3: 0	○	
Масляная	4: 0	○	
Валериановая	5: 0	○	
Капроновая	6: 0	○	
Каприловая	8: 0	○	
Каприновая	10: 0	○	
Лауриновая	12: 0	○	
Миристиновая	14: 0	○	
Пальмитиновая	16: 0	○	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Стеариновая	18: 0	○	
Олеиновая	18: 2; 9	○	
Линолевая	18: 2; 9,12	○	
Линоленовая	18: 3; 9,12,15	○	
Арахидовая	20: 0	○	
Арахидоновая	20: 4; 5,8,11,14	○	
Бегеновая	22: 0	○	
Эруковая	22: 1; 13	○	
Лигноцериновая	24: 0	○	
Нервоновая	24: 1; 15	○	

Рис. 1. Насыщенные ЖК (НЖК), мононенасыщенные ЖК (МЖК) с одной двойной связью (ДС) ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2—3 ДС, арахидоновая полиненасыщенная ЖК (ПНЖК) с 4 ДС; указано расположение ДС в ЖК.

ЛПОНП липаза освобождает одну ЖК в форме НЭЖК, предпочтительно из sn-1.

Освобожденную НЭЖК связывает альбумин, а полярные диглицериды в рамках тройственного ассоциата ЛПВП + БППЭХ + ЛПОНП переходят в ЛПВП: последние состоят из полярных липидов. В ЛПВП иной фермент — диацилглицеролгидролаза — гидролизует диглицериды с образованием НЭЖК и моноглицерида. Далее моноацилглицеролгидролаза гидролизует моноглицериды до НЭЖК + глицерин. Невысокое содержание глицерина всегда есть в плазме крови; спирт является, в частности, субстратом для этерификации в ТГ *in situ de novo* эндогенно синтезированных ЖК, а также реакций глюконеогенеза. В плазме крови в ЛПВП присутствуют ди- и моноглицериды; в полярных по структуре ЛПВП не бывает ТГ.

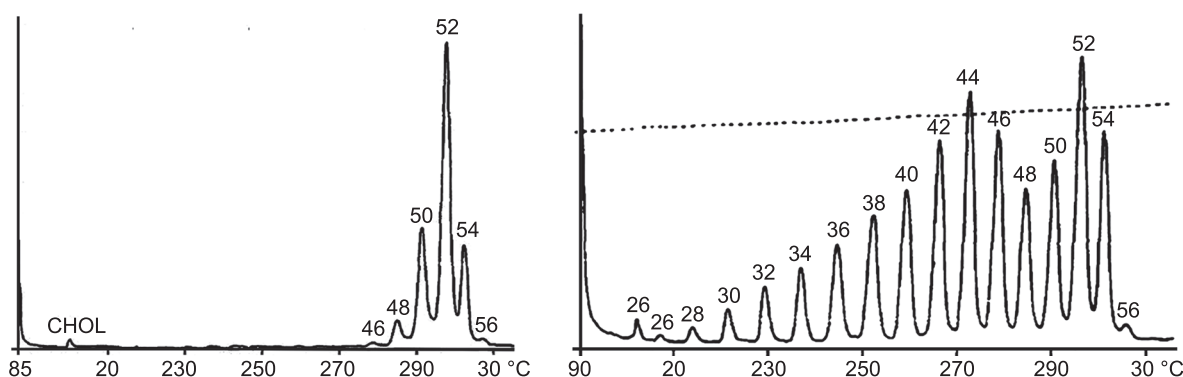


Рис. 2. «Спектр» ТГ в плазме крови морской свинки (слева) и лошади (справа) по числу атомов углерода в молекуле. Chol — холестерин; по оси абсцисс — температура колонки.

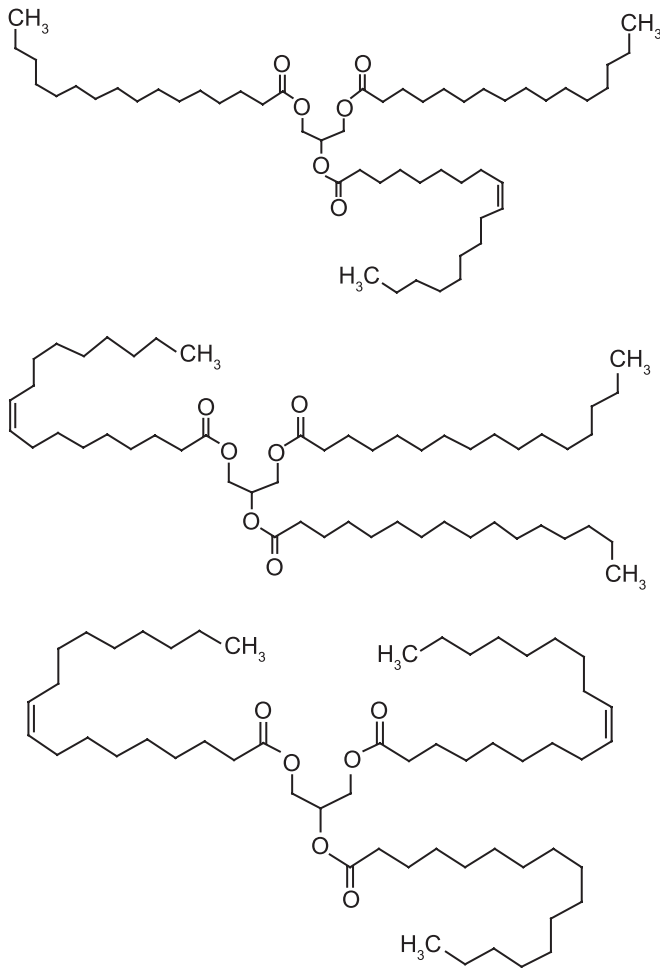


Рис. 3. Стерические различия молекул ТГ: пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП), ниже — олеил-пальмитоил-олеат (ОПП) и еще ниже — олеил-пальмитоил-олеат (ОПО).

Лаборатории клинической биохимии не определяют содержание ТГ; методически это сложно, практически невыполнимо. Вместо ТГ биохимические анализаторы измеряют содержание глицерина. Когда авторы говорят о наличии ТГ в ЛПВП, на самом деле происходит определение полярных ди- и моноглицеридов, а не ТГ. При гидролизе ТГ в составе ЛПОНП с полярными диглицеридами в ЛПВП по градиенту концентрации переходит и полярный спирт ХС. Освобождается он из поверхностного монослоя ФХ + ХС на поверхности массы ТГ в ЛПОНП. Поэтому при активном гидролизе ТГ в ЛПОНП одновременно повышается и ХС-ЛПВП. В обратном направлении из ЛПВП в ЛПОНП переходят ПНЖК в форме поли-ЭХС; неполярные поли-ЭХС синтезируются в ЛПВП *in situ de novo*. Стерические различия характерны не только для гетерогенных ТГ, которые содержат разные ЖК, но и для гомогенных, в которых этерифицированы три одинаковые пальмитиновые НЖК или олеиновые МЖК (рис. 4).

Физико-химические различия гидролиза НЭЖК из sn-1 и sn-3 и отсутствие липолиза в sn-2 в ЖК дали нам основание дифференцировать ТГ на основании ЖК, которая этерифицирована в

sn-2. Эта ЖК не подвергается гидролизу липазами ни в тонком кишечнике, ни в кровотоке, ни в гепатоцитах при оптимизации экзогенных ЖК. Мы разделяем разные по функции пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые ТГ. Образуют их энтероциты; они реализуют ретерификацию в sn-1 и sn-3 глицерина тех ТГ, которые содержала пища. Соотношение в лимфе пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ТГ то же, что и в пище. Энтероциты не изменяют ни спектр принятых с пищей ЖК, ни соотношение ТГ, в которые ЖК этерифицированы. Следовательно, ТГ, которые лежат на тарелке, без изменений оказываются в хиломикронах (ХМ), в эндоплазматической сети гепатоцитов и в секретированных ими ЛПОНП в лимфе и плазме крови.

В силу лимитированного гидролиза ТГ животная пища на тарелке диктует нам, *Homo sapiens*, все параметры превращения ЖК *in vivo*: а) в составе каких ТГ экзогенные ЖК будут *in vivo* перенесены в ХМ и поглощены гепатоцитами; б) как будет происходить оптимизация экзогенных ЖК в гепатоцитах; в) каковы будут параметры депонирования ЖК в ТГ в висцеральных жировых клетках (ВЖК) или адипоцитах; г) каковы будут кинетические параметры освобождения НЭЖК при активации липолиза и д) сколь эффективно и быстро будет происходить окисление ЖК в митохондриях клеток и работа АТФ. В основу всех алиментарных, не генетически обусловленных форм ГЛП, заложено нарушение биологической функции трофологии, функции питания, биологической реакции экзотрофии, внешнего питания. Состав ЖК, этерифицированных в ТГ, вместе с функцией инсулина *in vivo*, определяет и то, сколь длительное время ТГ останутся депонированными в ВЖК или в адипоцитах и сколь просто освободить их из жировых клеток в форме НЭЖК.

И филогенетически ранние ВЖК сальника, и поздние в филогенезе подкожные адипоциты остаются жировыми клетками; характеризует их следующее. Жировые клетки поглощают ЖК путем эндоцитоза неполярных ТГ. Длительно, активно при действии семейства белков перелипидов сохраняют ТГ в форме физиологических, малых капелек в цитозоле, а порой афизиологично в форме одной большой капли, которая занимает почти весь объем цитоплазмы ВЖК или адипоцита. ВЖК и адипоциты

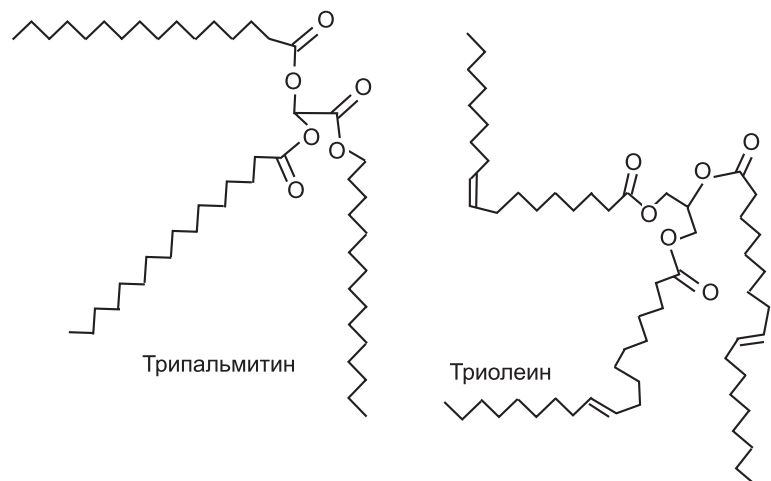


Рис. 4. Стерические различия гомогенных ТГ как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП) и олеил-олеил-олеат (ООО).

Таблица 1

Точка плавления жирных кислот, которые определяют физико-химические параметры триглицеридов

Показатель	ЖК	t плавления, °С
Насыщенные:		
12:0	лауриновая	44
14:0	миристиновая	58
16:0	пальмитиновая	63
18:0	стеариновая	71
20:0	арахиновая	77
Мононенасыщенные:		
16:1	пальмитолеиновая	-0,5
18:1	олеиновая	16
Ненасыщенные:		
18:2	линолевая	-5
18:3	линоленовая	-11
Полиеновые:		
20:4	арахидоновая	-49

освобождают ЖК в форме полярных НЭЖК; из межклеточной среды их поглощают клетки. При перегрузке ВЖК триглицеридами и формировании эндоплазматического стресса они начинают секретировать гуморальный медиатор лептин. Он компенсаторно активирует липолиз в ВЖК, уменьшает содержание ЖК в форме ТГ и повышает концентрацию НЭЖК в межклеточной среде и плазме крови. В адипоцитах эту функцию на уровне организма выполняет филогенетически более поздний гуморальный медиатор паракринных сообществ — адипонектин.

Он также повышает липолиз в подкожных адипоцитах в стремлении освободить клетки от избытка депонированных ТГ. Филогенетически и ВЖК, и адипоциты — производные от клеток РСТ; они потенциально готовы реализовать биологическую функцию эндоекологии, биологическую реакцию воспаления. Физиологические и афизиологические процессы в жировых клетках ВЖК и адипоцитах определены физико-химическими параметрами ЖК, которые этерифицированы в ТГ (табл. 1).

Гипотеза «бережливого генотипа», предложенная Neel в 1962 г., гласит, что на ступенях филогенеза в реализации биологических функций, в том числе и функции локомоции, получили те особи, которые сумели сформировать запасы ТГ в ВЖК; на более поздних ступенях филогенеза и в адипоцитах. Поскольку запастись субстратами для наработки энергии в форме гидрофильного гликогена энергетически не оптимально, да и запастись гидрофильный гликоген *in vivo* негде, оптимальным субстратом для депонирования ЖК оказываются ТГ. *In vivo* клетки большую часть поглощенной ими глюкозы тоже превращают и ЖК. Это оптимально для реализации биологической функции локомоции, движения при сокращении скелетной, поперечнополосатой, инсулинозависимой мускулатуры. Биологическая роль инсулина — обеспечение субстратами для наработки энергии (энергией) функции локомоции.

Инсулинзависимые клетки, которые сформировались на поздних ступенях филогенеза для реализации биологической функции локомоции, это: а) поперечнополоса-

тые, скелетные миоциты; б) синцитий кардиомиоцитов; в) подкожные адипоциты; г) перипортальные гепатоциты и д) оседлые макрофаги Купфера. Только эти клетки имеют на плазматической мембране рецепторы к инсулину и глюкозные транспортеры ГЛЮТ4. Иницируя выставление на мембрану дополнительного количества ГЛЮТ4, инсулин повышает поглощение клетками глюкозы. Далее инсулин иницирует превращение синтезированной из глюкозы пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК, этерификацию её в олеиновые ТГ, формирование и секрецию гепатоцитами олеиновых ЛПОНП.

Инсулин ингибирует липолиз ТГ только в инсулинзависимых адипоцитах, блокируя освобождение в межклеточную среду НЭЖК. Поздний в филогенезе инсулин не может блокировать липолиз в филогенетически ранних ВЖК; рецепторов к инсулину на плазматической мембране ВЖК не имеют. Роль инсулина в биологической функции локомоции — превращение синтезированной из глюкозы *in situ* эндогенной С16:0 пальмитиновой НЖК в ω-9 С18:1 олеиновую МЖК. В то же время инсулин не может активировать превращение экзогенной пальмитиновой НЖК пищи в олеиновую МЖК. Филогенетический ранний предшественник инсулина — инсулиноподобный фактор роста активирует превращение экзогенной пальмитиновой НЖК пищи в ω-7 С16:1 пальмитолеиновую МЖК. Однако для приматов и человека она афизиологична.

Перенос экзогенных ЖК в форме ТГ с лимфой в составе ХМ. Согласно филогенетической теории общей патологии, с ранних ступеней филогенеза единое паракринное сообщество (ПС) энтероцитов, как и каждое ПС клеток, состоит из трёх функционально разных пулов клеток. Это: а) специализированные клетки — энтероциты, которые всасывают экзогенные субстраты, в частности НЭЖК, 2-моноацилглицерид, и ресинтезируют экзогенные ТГ; б) локальный перистальтический насос — артериола мышечного типа, которая перфузирует межклеточную среду в ПС; в) пул функционально гетерогенных клеток рыхлой соединительно ткани (РСТ). Они реализуют биологические функции трофологии, гомеостаза, биологическую функцию эндоекологии и вместе с локальным перистальтическим насосом — биологическую функцию адаптации. Депонирование ТГ энтероциты осуществляли в клетках РСТ, из которых на поздних ступенях филогенеза сформировались ВЖК. Каким же образом гидрофобные ТГ, образованные в энтероцитах, попадают в ПС в ВЖК вне гидрофильной межклеточной среды?

Для переноса ТГ из энтероцитов в ВЖК и депонирования, мы полагаем, на самых ранних ступенях филогенеза в ПС произошло анатомическое единение канальцев эндоплазматической сети двух клеток — энтероцитов и ВЖК; так, вероятно, произошло образование наиболее раннего прообраза лимфатической системы. Мы полагаем, прообразом системы лимфотока стали сформированные из эндоплазматической сети сосуды для переноса гидрофобных ТГ между клетками в ПС. Происходило это при реализации биологических функций трофологии, гомеостаза, несколько позже биологической функции эндоекологии и адаптации [6]. Далее ВЖК гидролизуют ТГ и освобождали ЖК в форме НЭЖК в единый пул межклеточной среды, из которого их поглощали все клетки. Естественно, на ступенях филогенеза произошло существенное усложнение системы лимфотока. Однако с самых ранних ступеней филогенеза и в настоящее вре-

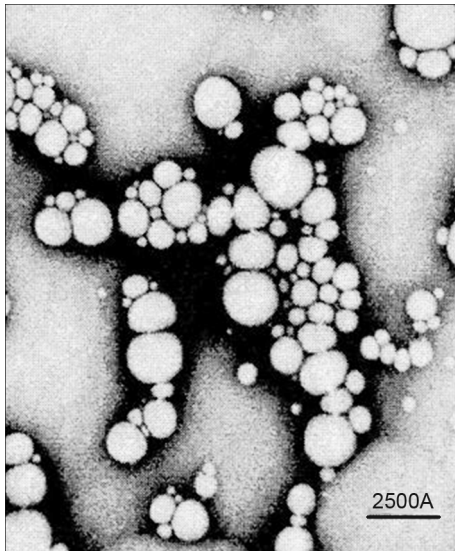


Рис. 5. Структура ХМ в лимфе.

Капли ТГ сформированы при действии МБПТ в эндоплазматической сети энтероцитов и ассоциированы в макрокомплексы при действии апоВ-48.

мя перенос гидрофобных ТГ в форме ХМ происходит на всем протяжении лимфотока. Из *ductus thoracicus* лимфа со всеми ХМ изливается в вену.

Именно микросомальный белок, переносящий триглицериды (МБПТ), в канальцах эндоплазматической сети формирует из экзогенных, неполярных ТГ малые «липидные капли» [7]. Большие конгломераты «липидных капель» (рис. 5) образует апоВ-48; это изоформа апоВ, которая содержит 48% аминокислотных остатков полипептида апоВ-100. По сравнению с апоВ-100, апоВ-48 содержит меньше доменов из гидрофобных остатков аминокислот для связывания поли-ЭХС и не имеет домена-лиганда [8].

После перехода лимфы в кровотока апоВ-48, не имея домена-лиганда, связывается с циркулирующим в крови апоЕ (физиологичный фенотип Е3/Е3), формируя в ХМ кооперативный апоЕ/В-48 лиганд. Одновременно гепатоциты выставляют на плазматическую мембрану апоЕ/В-48 рецепторы. После гидролиза части ТГ в ХМ при действии ЛПЛ и ее кофактора апоС-II формируется активное положение апоЕ/В-48 лиганда и физико-химическое взаимодействие апоЕ/В-48 лиганд + рецептор. Все ХМ, сформированные энтероцитами, активно поглощают гепатоциты. Липаза в канальцах эндоплазматической сети гепатоцитов, как и панкреатическая липаза в содержимом тонкого кишечника, гидролизует экзогенные ТГ: она освобождает две НЭЖК из sn-1 и sn-3; sn-2 — в форме моноглицерола [9]. Далее следует физиологичная оптимизация экзогенных ЖК; в цитоплазме гепатоцитов в органеллах-пероксисомах; совместное действие β -, α - и ω -оксидаз окисляет все афизиологичные ЖК.

Афизиологичные ЖК: 1) ЖК с нечетным числом атомов углерода; 2) дикарбоновые ЖК; 3) ЖК с разветвленными цепями углерода; 4) очень длинноцепочечные ЖК (С24—С26); 5) ЖК с ароматическими (пяти- и шестичленными) радикалами в цепи; 6) ЖК с короткой цепью (С4—С10). В пероксисомах, при окислении афизиологичных экзогенных ЖК АТФ не образуется; происходит наработка только килокалорий. Искусственными ЖК с ароматическими кольцами в цепи в неполярной форме эфиров со спиртами (этиловый, изопропиловый спирт)

оказываются гиполлипдемические препараты — фибраты. У крыс окисление их в пероксисомах происходит столь активно, что может привести к гипертрофии органелл и гепатомегалии. Если при окислении очень длинноцепочечных ЖК формируются фрагменты ЖК, которые можно окислить в митохондриях и превратить в ацетил-КоА, липидсвязывающие белки цитозоля переносят их к митохондриям. Полагают, что при метаболизме очень длинноцепочечных ЖК (С26) с большим числом ДС возможно образование и С20:4 арахидоновой ПНЖК.

Ресинтез эндогенных триглицеридов в гепатоцитах, формирование и секреция ЛПОИП. После оптимизации в гепатоцитах экзогенных ЖК, когда в канальцах эндоплазматической сети происходит ресинтез экзогенных ТГ, отношение пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ТГ остаётся тем же, каким оно было в пище. Содержание пальмитиновой НЖК в гепатоцитах при оптимизации ЖК не меньше. Одновременно в эндоплазматической сети клеток, в первую очередь в гепатоцитах, происходит синтез только пальмитиновой НЖК *in situ de novo* из глюкозы пищи. Инсулин всю синтезированную из глюкозы пальмитиновую НЖК превращает в олеиновую МЖК. Таким образом, повышение пальмитиновой НЖК и пальмитиновых ТГ в гепатоцитах определяют два фактора: содержание пальмитиновой НЖК в пище и отсутствие физиологичного действия инсулина *in vivo* — инициации превращения эндогенной пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК [10].

В инсулинзависимых гепатоцитах инсулин экспрессирует синтез двух ферментов — пальмитоил-КоА-элонгазы и стеарил-КоА-десатуразы. Первый активирует удлинение цепи атомов углерода в С16:0 пальмитиновой НЖК, образуя С18:0 стеариновую НЖК. Второй фермент активирует образование ДС в цепи и ω -9 С18:1 олеиновой МЖК [11]. При активном действии инсулина в гепатоцитах доминирует олеиновая МЖК; при ИР — пальмитиновая НЖК. Вместе же пальмитиновая НЖК + олеиновая МЖК составляют более 80% всего количества ЖК в клетках. При этом содержание *in vivo* пальмитиновой НЖК физиологично не превышает 15% всего количества ЖК при выраженном доминировании олеиновой МЖК. В эндоплазматической сети гепатоцитов происходит этерификация всех ЖК с глицерином и формирование пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ТГ [12].

На основании различия формы ТГ (см. рис. 3 и 4) апоВ-100, мы полагаем, отдельно связывает пальмитиновые, олеиновые, а также линолевые или линоленовые ТГ, секретирова в межклеточную среду одновременно пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые ЛПОИП [13]. В течение миллионов лет четыре ЛПОИП, содержание которых различалось в малой мере, поглощали клетки путем апоВ-100 эндоцитоза. Это снижало в плазме крови содержание ПНЖК и эквивалентно ХС-ЛПНП. Клетки после поглощения ЛПНП гидролизуют все поли-ЭХС; ПНЖК они депонируют в мембранах органелл в фосфолипидах; ХС же «за ненадобностью» выводят в межклеточную среду. ЛПВП в ней связывают выведенный ХС, повышая при этом величину ХС-ЛПВП и перенос спирта ХС к гепатоцитам.

На последующих ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции (движение за счёт сокращения скелетных миоцитов) поступление с пищей пальмитиновой НЖК + олеиновой МЖК стало

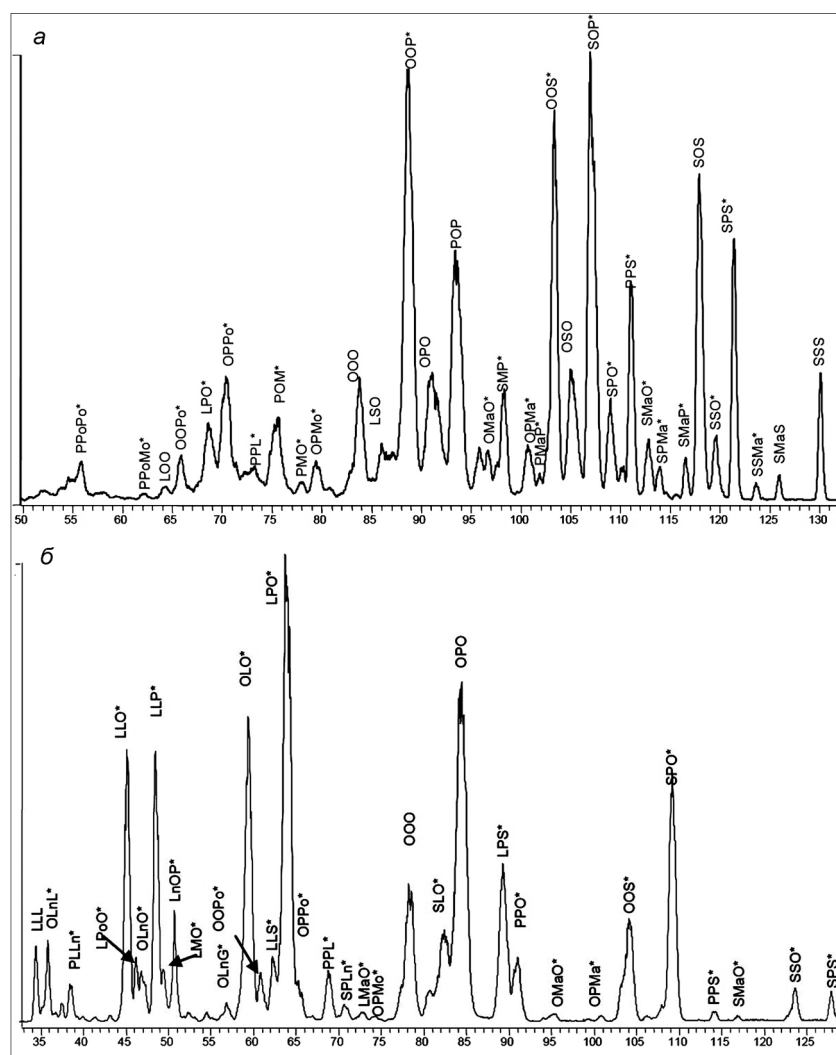


Рис. 6. Спектр ТГ в скелетных мышцах коровы (а) и свиньи (б). По оси абсцисс — время удерживания ТГ; по оси ординат — величина пика на хроматограмме.

много больше, чем линолевой + линоленовой ННЖК. В ЛПОНП при реализации биологической функции локомоции содержание НЖК + МЖК, ННЖК и ПНЖК стало соотноситься как 100:10:1. На ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции произошло обособление пальмитиновых + олеиновых ЛПОНП. Клетки, зависимые от инсулина, стали поглощать пальмитиновые и олеиновые ТГ путём нового, апоЕ/В-100 эндоцитоза. Поглощение же клетками линолевых + линоленовых ТГ, как и ранее, происходит путем апоВ-100 эндоцитоза ЛПНП. Среди последовательных этапов переноса ЖК в составе ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП инсулин регулирует перенос только НЖК + МЖК в ЛПОНП и поглощение их клетками. Нарушение функционального действия инсулина служит причиной столь частого афизиологического сочетания гипергликемии и гипертриглицеридемии. Инсулин в первую очередь нормализует ГЛП и только во вторую — гипергликемию.

Физиологично секретированные гепатоцитами пальмитиновые + олеиновые ЛПОНП клетки поглощают в форме лигандных ЛПОНП; в ЛПНП они не превращаются. Гепатоциты секретируют ЛПОНП, которые не имеют

активного положения апоВ-100 лиганда; вызвано это физиологичной перегрузкой их ТГ. В крови ЛПЛ + апоС-II в пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП гидролизуют избыток ТГ. Когда в связи с апоВ-100 остаётся оптимальное количество ТГ, апоВ-100 меняет конформацию (пространственную форму) и выставляет на поверхность ЛПОНП лиганд. Только инсулинзависимые клетки поглощают пальмитиновые и олеиновые лигандные ЛПОНП путём апоЕ/В-100 эндоцитоза. Чем выше отношение пальмитиновых/олеиновых ЛПОНП, тем более длительна после еды постпрандиальная ГЛП, и наоборот.

Если в пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП высоко содержание ТГ как пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО), олеил-пальмитоил-пальмитат (ОПП) и пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП), гидролиз ТГ происходит медленно [14]. Безлигандные ЛПОНП долго циркулируют в крови, поскольку клетки не могут их поглотить. При длительной циркуляции в крови они медленно превращаются в безлигандные пальмитиновые ЛПНП и подвержены разным модификациям. В крови афизиологичных, пальмитиновых ЛПНП бывает больше, чем физиологичных линолевых + линоленовых ЛПНП. И когда ПНЖК как поли-ЭХС переходят из ЛПВП, они попадают в большой пул пальмитиновых ЛПНП.

Диагностическое значение ХС-ЛПНП состоит в том, что величина равна содержанию в плазме крови ПНЖК в форме поли-ЭХС. Чем выше ХС-ЛПНП, тем больше ПНЖК (поли-ЭХС) циркулируют в плазме крови, и их не могут поглотить клетки. Физиологично ПНЖК в форме поли-ЭХС из ЛПВП переходят в физиологичный малый пул линолевых + линоленовых ЛПОНП → ЛПНП. Будучи меньшими по размеру и бо-

лее гидрофобными, поли-ЭХС вытесняют ТГ из связи с апоВ-100, активируя, таким образом, печеночную глицеролгидролазу и гидролиз ТГ. Когда апоВ-100 связал оптимальное количество поли-ЭХС, он меняет конформацию и выставляет на поверхность ЛПНП апоВ-100 лиганд. Связывая лиганд своими рецепторами, все клетки активно поглощают ЛПНП с переносимыми ими ЖК.

Когда же в афизиологичных условиях поли-ЭХС из ЛПВП физиологично переходят в большой пул афизиологичных пальмитиновых ЛПНП, они не могут инициировать активную конформацию апоВ-100 и поглощение их клетками. Все поли-ЭХС как бы смешиваются с массой пальмитиновых ЛПНП, понижая биодоступность для клеток ПНЖК. Хронический дефицит в клетках ПНЖК — патогенетическая основа атеросклероза. Утилизация же массы безлигандных пальмитиновых ЛПНП со всеми ПНЖК, которая физиологично происходит в инсулинозависимых клетках Купфера и частично в интиме артерий эластического типа, в пуле сбора и утилизации биологического мусора из внутрисосудистого пула межклеточной среды, завершается формированием афизиологичного атероматоза и коронаросклероза.

Алиментарная профилактика атеросклероза; уменьшение содержания пальмитиновой НЖК и одноименных ТГ в пище. Мы полагаем, что высокая частота распространения атеросклероза в популяции *Homo sapiens*, с позиций этиологии, есть результат афизиологичного влияния факторов внешней среды. Основной из них — нарушение биологической функции питания, функции трофологии, непомерно высокое содержание в пище НЖК, главным образом пальмитиновой НЖК, пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПОИП. И не стоит говорить пациенту «не ешьте мясо», желателно рекомендовать мясо с меньшим содержанием пальмитиновой НЖК, ТГ как ППО, ОПП и ПОП и с большей долей среднецепочечных ЖК. Еще лучшая рекомендация — заменить мясо рыбой, состав ЖК и ТГ в которой наиболее благоприятен, поскольку живут рыбы при низкой температуре мирового океана (4—8°C) и число ДС в их ЖК намного выше. Даже у теплокровных морских животных, не говоря уже о рыбах, содержание в тканях пальмитиновой НЖК не превышает 13% [1]. В учреждениях типа *fast food* содержание НЖК + транс-ЖК в пище может достигать 40—60% всей массы ЖК при нулевой концентрации ПНЖК и большом количестве NaCl.

На рис. 6 приведен состав ТГ в скелетных, поперечнополосатых мышцах в говядине (а) и свинине (б). В говядине (по сравнению со свининой) отсутствуют среднецепочечные лауриновые, миристиновые ТГ; самые короткие ТГ — пальмитиновые. В говядине велико содержание пальмитолеиновых ТГ; образованы они афизиологичной ω -7 пальмитолеиновой МЖК; синтезируют ее бактерии в четырех желудках коровы: при физиологичной гибели и деструкции бактерий, эритроциты всасывают синтезированные бактериями ЖК, формируя афизиологичные ТГ как пальмитолеил-пальмитоил-пальмитолеат (ПоППо). В говядине высоко содержание пальмитиновых ТГ и олеиновых ТГ как ПОП, а также ТГ как стеарил-пальмитолеил-стеарат (СПС), афизиологичных С17:0 маргариновых ТГ как стеарил-маргарил-стеарат (СМаС) и стеарил-стеарил-стеарат (ССС) [15]. Пища коров во все сезоны года содержит мало ЖК (3—4% энергетической ценности пищи). Поэтому на ступенях филогенеза жвачные животные приспособились утилизировать бактериальные, афизиологичные ЖК, в частности короткоцепочечные ЖК, которые придают запах сливочному маслу, и длинноцепочечную С17:0, маргариновую НЖК.

В отличие от говядины свинина содержит: а) много линолевых и линоленовых ТГ как линолеил-линолеил-линолеат (ЛЛЛ), олеил-линоленил-линолеат (ОЛнЛ) и олеил-линоленил-гексадеканат (ОЛнГ); б) много среднецепочечных ТГ как линолеил-миристоил-олеат (ЛМО), в ней достоверно более низко содержание стеариновых ТГ как стеарил-стеарил-олеат (ССО); в) малые количества афизиологичной С17:0 маргариновой НЖК и ТГ как линолеил-маргарил-олеат (ЛМаО).

Казалось бы, физико-химические превращения С16:0 пальмитиновой и С18:0 стеариновой НЖК у человека могут быть функционально сходными, как пальмитиновые и стеариновые ТГ. Напомним, что наиболее высоко содержание пальмитиновых ТГ в говядине, а стеариновых ТГ — в баранине. В то же время на ступенях филогенеза у человека в эритроцитах сформировались биохимические реакции, при которых филогенетически ранняя стеарил-КоА-десатураза-1 при всасывании стеариновой НЖК в эритроцитах сразу превращает ее

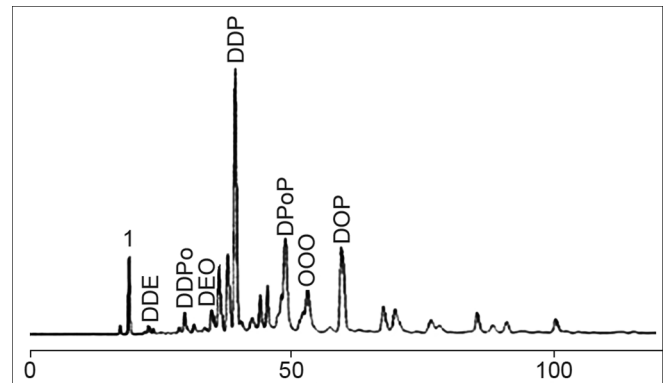


Рис. 7. Спектр триглицеридов рыбьего жира. IS — внутренний стандартный образец; по оси абсцисс — время удерживания; по оси ординат — относительная высота пика.

в ω -9 С18:1, физиологично желаемую олеиновую МЖК. В эритроцитах человека стеарил-КоА-десатураза-1 не экспрессирована, но активирована пальмитиол-КоА-десатураза. В эритроцитах и гепатоцитах она превращает экзогенную пальмитиновую НЖК в афизиологичную для человека ω -7 С16:1 пальмитолеиновую МЖК, формируя пальмитолеиновые ТГ. Содержание афизиологичной пальмитолеиновой МЖК в говядине достигает 8% всех ЖК. Баранина содержит много стеариновой НЖК; эритроциты и гепатоциты человека активно превращают ее в олеиновую МЖК; можно сказать, что баранина богата олеиновой МЖК. Если вычислить среднее содержание атомов углерода в молекуле ТГ, в курятине они самые короткие; ТГ несколько длиннее в свинине, однако менее длинные, чем в говядине. Несколько длиннее ТГ в баранине и достоверно более длинные и ненасыщенные они в рыбьем жире [17].

Если количество атомов углерода в наиболее длинных у человека линолевых и линоленовых ТГ составляет ≈ 57 , то в рыбьем жире некоторые длинноцепочечные ТГ имеют и много больше атомов углерода. Однако чаще это докозаил-докозаил-эйкозаноат (ДДЭ), докозаил-пальмитолеил-пальмитат (ДРоР) и докозаил-докозаил-пальмитат (ДДР) [18]. В рыбьем жире в небольшом количестве присутствуют и более длинные, сложно идентифицируемые ТГ из ПНЖК (рис. 7). Положение ТГ на хроматограмме определено двумя факторами: числом атомов углерода в цепи и количеством ДС в цепи. Если на хроматограмме расположены несколько ТГ с одинаковым числом атомов углерода, на 1-м месте стоит ТГ с большим числом ДС. Количество пальмитиновых ТГ в пище определяет степень и длительность постпрандиальной ГЛП, величину гипертриглицеридемии и ХС-ЛПНП [19].

Если мы выстроим пальмитиновые и олеиновые ТГ в порядке возрастания константы скорости гидролиза (липоза) при действии позиционноспецифичной ЛПЛ, получится функциональная последовательность: ППП → ОПП → ППО → ПОП → ООП → ООО. При реализации физиологичной функции питания, при сдвиге спектра ТГ вправо *in vivo* формируется высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК. При этом постоянно оптимальное количество АТФ синтезировано в реакции окислительного фосфорилирования в матриксе митохондрий при образовании ацетил-КоА преимущественно из олеиновой МЖК [20].

Триглицериды молока, сливочное масло по составу ТГ — неоптимальный продукт для взрослого человека. В той же мере, в которой говядина содержит самое высокое количество пальмитиновой НЖК и пальмитиновых ТГ среди домашних животных (козы, овцы), коровье молоко тоже имеет наиболее высокое содержание пальмитиновой НЖК и одноименных ТГ. Физиологическое содержание ТГ в молоке коровы составляет 2—4 объёмных процентов. И если в гидрофильной плазме крови в межклеточной среде ЖК этерифицированы в ТГ, которые переносят разные классы ЛП, в молоке всех видов животных, приматов и человека ЖК и ТГ содержатся в форме конечных липидов. Это агрегаты, сформированные из ТГ, покрытые монослоем из полярных ФХ и ХС. Именно молоко служит источником поступления эссенциальной для человека аминокислоты метионина; содержит ее каждая молекула ФХ.

Молоко у всех млекопитающих предназначено для питания новорожденных в раннем постнатальном периоде; у приматов и человека максимальная длительность кормления — около года. В конечных липидах молока аполипопротеинов нет; стабилизирует конечные липиды молока лактальбумин. Особые физико-химические свойства ТГ молока определяют единую биологическую цель — максимальное всасывание ЖК энтероцитами в тонком кишечнике новорождённых.

Как следует из табл. 2, в женском молоке количественно доминируют олеиновая МЖК, пальмитиновая НЖК (>60% всего количества НЖК), линолевая ННЖК, стеариновая и миристиновая НЖК. Содержание олеиновой МЖК доминирует и в молоке иных домашних животных; вместе с пальмитиновой НЖК они составляют более половины всех ЖК конечных липидов. Различие женского молока и молока домашних животных состоит в отсутствии в первом короткоцепочечных ЖК; у травоядных животных их, вероятно, синтезирует микрофлора желудочно-кишечного тракта. Вторая особенность — отсутствие в молоке домашних животных ЖК с длиной более чем С18; у человека такие ПНЖК составляют ≈3%. В коровьем молоке более 60% всех ЖК — это НЖК, чаще — это пальмитиновая НЖК при нулевом содержании ПНЖК.

Для взрослого человека при отсутствии оптимальной физической активности продукты из необезжиренного молока, как и пища в учреждениях типа *fast food*, афизиологичны [22]. Это «идеальные условия» для нарушения биологической функции питания, функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. Это условия для становления синдрома атеросклероза (дефицита в клетках ПНЖК) и его основного клинического симптома — атероматоза интимы коронарных, сонных артерий и артерий виллизиевого круга головного мозга. У всех млекопитающих молоко матери предназначено для питания новорождённых в течение определённого биологической периода. И биология не «давала согласия» на спонтанное превращение вида *Homo sapiens* из млекопитающего в млекопитающее.

Среди всех биологических жидкостей и тканей, ТГ молока уникальны; это относится к позиционной специфичности ТГ, этерификации в них ЖК [23]. Согласно физической химии, длинноцепочечные ЖК с большим числом ДС, как правило, глицерин этерифицирует в ТГ в sn-2; НЖК глицерин обычно этерифицирует в sn-1 и sn-3. В отличие от этого в ТГ молока млекопитающих большая часть пальмитиновой НЖК этерифицирована в

sn-2, а олеиновая МЖК и линолевая ННЖК с первичными спиртовыми группами — в sn-1 и sn-3. Столь выраженное нарушение физико-химических свойств в ТГ молока определено «крайней биологической необходимостью» [24]. В тонком кишечнике при действии панкреатической липазы пальмитиновая НЖК освобождается в форме НЭЖК, если она этерифицирована в sn-1 и sn-3.

И в форме НЭЖК пальмитиновая НЖК остается выражено гидрофобной, тугоплавкой; в кишечнике она необратимо связывает ионы Ca^{++} и Mg^{++} и блокирует всасывание их энтероцитами. В результате образования солей пальмитиновой НЖК с кальцием и магнием двухвалентные катионы экскретируются с калом; витамин D при этом оказывает лишь слабое физиологическое действие. В ТГ молока липолиз при действии панкреатической липазы освобождает из связи с первичными спиртовыми группами в основном олеиновую МЖК. Физико-химические свойства олеата кальция и олеата магния таковы, что энтероциты всасывают их полностью [25].

Если смоделировать реакцию между разными ТГ *in vitro*, включая реакцию переэтерификации ЖК между ТГ и реакцию изомеризации между первичными (sn-1 и sn-3) и вторичной спиртовой группой в sn-2 в ТГ, становится ясно, что столь специфичная структура ТГ в материнском молоке вызвана только биологическими, физиологическими условиями [26]. Это определено спецификой экспрессии ферментов синтеза ТГ в секреторных клетках эпителия молочной железы. Если *in vitro* проинкубировать женское молоко с рыбьим жиром при действии липазы из *Candida antarica*, в реакции ферментативной переэтерификации, согласно физической химии, sn-2 в ТГ займут ω-3 22:6 докоза и ω-3 С20:5 эйкоза. Пальмитиновая же НЖК и олеиновая МЖК оказываются этерифицированы в sn-1 и sn-3 спирта глицерина [27].

Из всех продуктов, которые содержат много пальмитиновой НЖК, только из жирных молочных продуктов вся ЖК будет этерифицирована в пальмитиновые ТГ в пальмитиновых ЛПОНП и афизиологичные пальмитиновые ЛПНП. При равном количестве пальмитиновой НЖК, которое всасывают энтероциты из разных продуктов, образование малых, плотных, атерогенных, пальмитиновых ЛПНП [28] при поедании жирных продуктов из коровьего молока будет наибольшим. Это относится и к ТГ сливочного масла (рис. 8). На хроматограмме пики с числом атомов углерода 32—48 отражают содержание среднецепочечных лауриновых и пальмитиновых ТГ, в sn-1, sn-3 этерифицированы также С10:0 каприловая и олеиновая ЖК. В сливочном масле преобладает пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО), среди стеариновых ТГ — пальмитоил-стеарил-олеат (ПСО), в олеиновых ТГ — пальмитоил-олеил-олеат (ПОО). Меньше сливочное масло содержит стеариновые ТГ как стеарил-стеарил-олеат (ССО) и наиболее гидрофобные ТГ — стеарил-стеарил-стеарат (ССС).

Среди животных жиров наибольшее количество пальмитиновых и афизиологичных пальмитолеиновых ТГ содержит говяжий жир; гидролиз ТГ как пальмитоил-пальмитоил-пальмитолеат (ПППо) липазы крови осуществляют с низкой константой скорости реакции [29]. Стеариновых ТГ много в бараньем жире, включая стеарил-стеарил-стеарат (ССС). Среди ТГ в мясе конины много лауриновых и миристиновых ТГ, а также линолевых ТГ вплоть до линолеил-линолеил-линолената

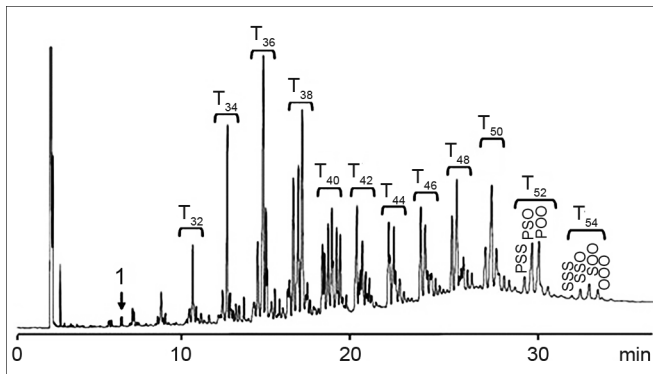


Рис. 8. Триглицериды сливочного масла с высоким содержанием лауриновых, миристиновых, пальмитиновых и стеариновых ТГ.

T-32 — количество атомов углерода в молекуле ТГ; по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — высота пиков ТГ.

(ЛЛЛн). У свиней содержание ТГ в органах различается в большей мере: внутреннее свиное сало состоит из лауриновых и миристиновых ТГ, включая лаурил-лаурил-лауреат (ЛаЛаЛа) и миристоил-миристоил-миристал (МММ). В то же время подкожные адипоциты в свином сале накапливают линолевые, меньше линоленовых ТГ, в которых этерифицировано и некоторое количество ω -6 С20:4 арахидоновой ПНЖК; вероятно арахис содержат ТГ как линолеил-линоленил-арахидонат (ЛЛнА). Если пациенты не потребляют с пищей рыбу, морепродукты и не имеют возможности получить ω -3 ПНЖК, менее желаемым, но физиологично оптимальным, необходимым является потребление ω -6 арахис при поедании свиного сала или куриных яиц. Иных источников ω -6 С20:4 арахис среди пищевых продуктов человека нет. Растительные масла же арахис не содержат; в малых количествах в масле присутствует только С20:0 арахидоновая НЖК.

Содержание ТГ в спредах (spread) определяют производители; все спреды изготовлены способом ферментативной изомеризации ЖК, который исключает воздействие высокого давления H_2 и температуры. Наиболее часто ТГ в спреде (мягком маргарине, который намазывают на хлеб) включают миристоил-олеил-олеат (МОО) $\geq 25\%$; миристоил-линолеил-миристал (МЛМ) $\approx 20\%$ и миристоил-олеил-олеат (МОО) $> 30\%$. При этом отношение миристоил-олеил-миристал (МОМ)/ миристоил-линолеил-миристал (МЛМ) может изменяться от 30:70 до 85:15. Спреды не содержат пальмитиновую НЖК.

В растительных маслах качественные различия ТГ и их количество схожи со спредами. В соевом масле преобладают ТГ как линолеил-линолеил-линолеат (ЛЛЛ) $\approx 20\%$, олеил-линолеил-линоленат (ОЛЛн) $\approx 15\%$, линолеил-олеил-пальмитат (ЛОП) $\approx 10\%$ и олеил-линолеил-олеат (ОЛО) $\approx 6\%$. В отличие от соевого масла ТГ пальмового масла (жира) состоят из линоил-олеил-пальмитат (ЛОП) на $\approx 25\%$, олеил-олеил-пальмитат (ООП) $\approx 20\%$, линолеил-линолеин-пальмитат $\approx 10\%$. В отличие от спредов в пальмовом масле в каждом ТГ этерифицирована пальмитиновая НЖК. И только в рапсовом масле (canola oil) присутствуют длинноцепочечные ω -9 С20:1 эйкозеновая и ω -9 С22:1 эруковая МЖК. Возможное нежелательное действие этих НЖК стало предметом оценки в эпидемиологических и клинических протоколах в течение

многих лет; афизиологичного действия ЖК рапсового масла не выявлено [30].

В масле подсолнечника (*Helianthus annuus*) преобладают ТГ как линолеил-линолеил-линолеат (ЛЛЛ) — более 30%, олеил-линолеил-линолеат (ОЛЛ) — 25%, линолеил-олеил-пальмитат (ЛОП) — 10%. В зависимости от климата содержание линоленовых ТГ в масле подсолнечника может достигать 70%, а концентрация олеиновых ТГ — превышать 17%. У подсолнуха, который культивируют в Северной Америке, содержание в масле олеиновых ТГ наиболее высоко [31]. Льняное масло отжимают из семян льна; оно наполовину состоит из ω -3 α -С18:3 линоленовой ННЖК и содержит ТГ как линоленил-линоленил-линоленан (ЛнЛнЛн). Содержит оно одновременно ω -6 γ -линоленовую и 20% ω -6 С18:2 линолевую ННЖК и ТГ как линолеил-линоленил-линолеат (ЛЛнЛ) в которых в sn-1 и sn-3 этерифицированы стеариновая, миристиновая и пальмитиновая НЖК.

В то же время для человека ω -3 α -линоленовая ННЖК льняное масло не может быть заменой рыбьему жиру. Ни приматы, ни человек не могут из ω -3 С 18:3 α -линоленовой ННЖК синтезировать С 20:5 эйкозапентаеновую ПНЖК, как и из ω -6 γ -линоленовой ННЖК синтезировать С 20:4 арахис ПНЖК. В то же время такой синтез осуществляют крысы и мыши: для них эссенциальна только ω -6 С18:2 линолевая ННЖК; из неё эти животные синтезируют линоленовую и арахис ПНЖК. Ни одна из животных клеток не может ввести в цепь С18:1

Таблица 2

Содержание индивидуальных ЖК в женском молоке и в молоке домашних животных (усредненные данные, моль, %)

ЖК	Женское	Коровье	Козье	Овечье	Лошадиное
4:0	—	8,5	8,2	10,3	—
6:0	—	2,9	6,9	3,4	0,7
8:0	—	1,4	5,8	2,3	5,4
10:0	0,6	2,3	7,9	3,4	12,3
12:0	3,0	2,1	1,9	1,8	8,5
14:0	5,3	7,5	2,6	5,0	6,9
15:0	0,6	1,2	0,7	0,9	0,2
16:0	26,5	28,0	16,0	20,9	21,3
16:1	4,0	1,6	1,2	1,2	4,5
16:2	—	—	—	—	—
17:0	1,1	0,7	2,4	2,9	0,5
18:0	7,8	14,6	14,3	15,5	2,1
18:1	37,6	26,5	30,4	27,2	17,4
18:2	10,0	1,5	1,7	2,9	14,7
18:3	0,6	1,0	—	2,4	5,6
20:0	—	—	—	—	—
20:1	0,6	—	—	—	—
20:2	0,5	—	—	—	—
20:3	0,4	—	—	—	—
20:4	0,8	—	—	—	—
22:2	0,3	—	—	—	—
22:5	0,1	—	—	—	—
22:6	0,3	—	—	—	—

ЖК вторую ДС и синтезировать линолевую ННЖК; провести эту реакцию способны только клетки растений.

В оливковом масле, в зависимости от мест произрастания оливковых деревьев, содержание ω -6 олеиновой НЖК составляет 75—85% всех ЖК. В оливковом масле преобладают ТГ как олеил-олеил-олеат (ООО) при небольшом количестве олеил-олеил-линолеата (ООЛ) [32]. И если клетки растений синтезируют ω -6 олеиновую МЖК, то все клетки животных синтезируют ω -9 олеиновую МЖК. Параметры окисления в митохондриях эндогенной ω -9 олеиновой МЖК оказываются более высокими по сравнению с экзогенной ω -6 олеиновой МЖК. В митохондриях константа скорости окисления ω -9 и ω -6 олеиновой МЖК во много раз выше, чем при окислении пальмитиновой НЖК. В значительной мере это определено различием физико-химических свойств, в частности температуры плавления ЖК: для олеиновой МЖК она составляет 16°C, для пальмитиновой НЖК — 63°C [33]. Имеется отрицательная корреляционная зависимость между числом ДС в ЖК и температурой плавления ТГ, в которых они этерифицированы. Высоконенасыщенные растительные масла имеют низкую температуру плавления, тогда как животные жиры при обычной температуре — твердые вещества. Температура плавления афизиологичного ТГ как ППП составляет 49°C, в то время как для ТГ как ООО температура плавления равна -15°C; различие превышает 50°C [34].

Избыток в пище пальмитиновой НЖК — основа нарушения биологической функции трофологии и патологии сердечно-сосудистой системы. В 1988 г. G. Reaven [35] высказал мнение, что сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, метаболический синдром) имеют в патогенезе много общего с синдромом ИР и ожирением. Предложенная нами филогенетическая теория общей патологии (рассмотрение патологических процессов с позиций биологических функций и биологических реакций) сформировала для этого биологическое основание [36]. «Метаболические пандемии», болезни «цивилизации», мы полагаем, — не нозологические формы заболевания с определённым этиологическим фактором, а нарушение биологических функций. Происходит это при действии неблагоприятных факторов внешней среды. При метаболических пандемиях основу патогенеза составляет нарушение биологической функции трофологии, функции питания, биологической реакции экзотрофии.

В патогенезе всех «метаболических пандемий» задействовано воздействие внешней среды: афизиологичное содержание в пище НЖК, в первую очередь пальмитиновой НЖК и трансформ ЖК [37—39]. Оно изменяет состав и структуру пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ТГ, нарушает перенос их в одноимённых ЛПОИП, линолевых, линоленовых и афизиологичных пальмитиновых ЛПНП. Воздействие внешней среды определяет и раздельное, рецепторное поглощение клетками ЛПОИП путем апоЕ/В-100 и ЛПНП при апоВ-100-рецепторном эндоцитозе. Согласно филогенетической теории общей патологии, формирование на разных ступенях филогенеза биологической функции более ранних ЛПНП и более поздних ЛПОИП даёт основание говорить и о раздельном участии их в становлении патологических процессов.

Нарушение поглощения клетками ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза может быть в форме как: первичная, структурная, врождённая патология апоВ-100-рецептора

и вторичная ГЛП при накоплении в крови афизиологичных пальмитиновых, малых, плотных ЛПНП и формировании для клеток низкой биодоступности линолевых и линоленовых ЛПНП. В этих ситуациях развивается дефицит в клетках ПНЖК; в первом случае преобладает поражение интимы артерий по типу атероматоза, во втором — по типу атеротромбоза [40]. Можно сказать, что следствием нарушения функции ЛПНП служит в первую очередь развитие атеросклероза по причине дефицита в клетках ПНЖК и атероматоза как следствие утилизации высокого содержания в крови афизиологичных, малых, плотных, пальмитиновых ЛПНП.

Преобладание пальмитиновых ЛПОИП над олеиновыми, которые клетки поглощают путем апоЕ/В-100 эндоцитоза, обеспечивают митохондрии всех клеток неоптимальным субстратом (пальмитиновой НЖК) для наработки энергии, синтеза АТФ. Следствием нарушения метаболизма *in vivo* пальмитиновых, олеиновых ТГ и одноимённых ЛПОИП служит метаболический синдром, формирование ИР и развитие ожирения. Физиологично *in vivo* клетки реализуют олеиновый вариант метаболизма НЖК + МЖК; при этом митохондрии для наработки АТФ окисляют ω -9 С18:1 эндогенную олеиновую МЖК.

При резистентности к инсулину клетки *in vivo* вынуждены реализовать пальмитиновый вариант метаболизма НЖК + МЖК, при котором митохондрии формируют АТФ, окисляя в митохондриях пальмитиновую НЖК. При этом в организме формируется постоянный потенциальный дефицит энергии — недостаточное количество АТФ; дефицит энергии испытывают одновременно все клетки *in vivo* при физиологичном насыщении тканей O_2 . Основное следствие патологии ЛПНП — дефицит в клетках ПНЖК; основное следствие патологии ЛПОИП — дефицит энергии в каждой из клеток по причине окисления митохондриями пальмитиновой НЖК — физиологичного, но неоптимального по кинетическим параметрам субстрата.

Функция филогенетически ранних ЛПНП и поздних в филогенезе ЛПОИП разная; столь же различается и патология, которая при этом формируется. Патология ЛПНП — это главным образом первичный дефицит в клетках ПНЖК (атеросклероз) и атероматоз интимы артерий эластического и смешанного типов с формированием плотных бляшек из ПНЖК, из поли-ЭХС. Патология ЛПОИП более обширна; она включает: а) синдром ИР; б) патологию филогенетически ранних, независимых от инсулина клеток висцеральной жировой ткани — метаболический синдром; в) патологию поздних в филогенезе инсулинозависимых подкожных адипоцитов — ожирение; г) вторичный атеросклероз — накопление в крови пальмитиновых ЛПНП. Низкая биодоступность их для клеток, отсутствие лиганда — и есть основа развития атеротромбоза интимы артерий, формирования мягких, богатых ТГ бляшек.

Профилактика же нарушений переноса ЖК в ЛПНП и ЛПОИП во многом едина — минимизация афизиологичного влияния такого фактора внешней среды, как переизбыток, нарушение биологической функции питания, биологической функции трофологии. Профилактические мероприятия на уровне популяции включают: а) максимальное ограничение в пище содержания пальмитиновой НЖК; б) умеренное увеличение в пище ПНЖК, преимущественно ω -3 ПНЖК; в) повышение физической активности [41]. В первичной профилактике всех

«метаболических пандемий» для фармакологических препаратов биология места не предусмотрела. Все лекарственные препараты, в том числе и гипополипидемические — удел не профилактики, а лечения первичных и вторичных ГЛП, предупреждения инфаркта миокарда и нарушений мозгового кровообращения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3—5, 7—19, 21—35, 37—39 см. REFERENCES)

1. Верещагин А.Г. *Биохимия триглицеридов*. М.: Наука; 1972.
2. Титов В.Н., Лисицын Д.М. *Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина*. Москва—Тверь: ООО «Издательство Триада»; 2006.
6. Стюрева Г.М. *Роль лимфы в патологических процессах и ее физико-химические свойства*: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2001.
20. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014.
36. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз*. М.: ИНФРА-М; 2014.
40. Титов В.Н. *Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз*. Москва—Тверь: ООО «Издательство Триада»; 2008.
41. Титов В.Н. *Лабораторная диагностика и диетотерапия гиперлипотеинемий (биологические основы)*. М.: Медпрактика; 2006.

REFERENCES

1. Vereshchagin A.G. *Biochemistry Triglycerides [Biokhimiya triglitseridov]*. Moscow: Nauka; 1972. (in Russian)
2. Titov V.N., Lisitsyn D.M. *Fatty Acid. Physical Chemistry, Biology and Medicine [Zhirnyye kisloty. Fizicheskaya khimiya, biologiya i meditsina]*. Moscow—Tver': ООО «Izdatel'stvo Triada»; 2006. (in Russian)
3. Breckenridge W.C., Marai L., Kuksis A. Triglyceride structure of human milk fat. *Can. J. Biochem.* 1969; 47(8): 761—9.
4. Nayugen H., McNamee C.E. Determination and comparison of how the chain number and chain length of a lipid affects its interactions with a phospholipid at an air/water interface. *J. Phys. Chem. B.* 2014; 118(22): 5901—12.
5. Pattarino F., Bettini R., Foglio Bonda A., Della Bella A., Giovannelli L. Polymorphism and kinetic behavior of binary mixtures of triglycerides. *Int. J. Pharm.* 2014; 473(1-2): 87—94.
6. Styureva G.M. *Lymph Role in Pathological Processes and its Physicochemical Properties*: Diss. Moscow; 2001. (in Russian)
7. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52(12): 1695—727.
8. Nakajima K., Nagamine T., Fujita M.Q., Ai M., Tanaka A., Schaefer E. Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 2014; 64: 117—77.
9. Tremblay A.J., Lamarche B., Labonte M.E., Lépine M.C., Lemelin V., Couture P. Dietary medium-chain triglyceride supplementation has no effect on apolipoprotein B-48 and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014; 99(1): 54—61.
10. Teng K.T., Nagapan G., Cheng H.M., Nesaretnam K. Palm olein and olive oil cause a higher increase in postprandial lipemia compared with lard but had no effect on plasma glucose, insulin and adipocytokines. *Lipids.* 2011; 46(4): 381—8.
11. Chong M., Hodson L., Bickerton A.S., Roberts R., Neville M., Karpe F. et al. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(4): 817—25.
12. Hall W.L., Brito M.F., Huang J., Wood L.V., Filippou A., Sanders

- T.A. et al. An interesterified palm olein test meal decreases early-phase postprandial lipemia compared to palm olein: a randomized controlled trial. *Lipids.* 2014; 49(9): 895—904.
13. Robinson D.M., Martin N.C., Robinson L.E., Ahmadi L., Marangoni A.G., Wright A.J. Influence of interesterification of a stearic acid-rich spreadable fat on acute metabolic risk factors. *Lipids.* 2009; 44(1): 17—26.
14. Lee T.W., Hastilow C.I. Quantitative determination of triacylglycerol profile of structured lipid by capillary supercritical fluid chromatography and high-temperature gas chromatography. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 1999; 76(12): 1405—15.
15. St-Onge M.P., Mayrhoon B., O'keeffe M., Kissileff H.R., Choudhury A.R., Laferrère B. Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014; 68(10): 1134—40.
16. Hasan H. Development of an LC-MS/MS method for the analysis of triacylglycerols from meat and application in the discrimination of cooked meat products. United Kingdom: Department of Chemistry University of York; 2010.
17. Solaesa A.G., Bucio S.L., Sanz M.T., Beltrán S., Rebolledo S. Characterization of triacylglycerol composition of fish oils by using chromatographic techniques. *J. Oleo. Sci.* 2014; 63(5): 449—60.
18. Qi K., Seo T., Jiang Z., Carpentier Y.A., Deckelbaum R.J. Triglycerides in fish oil affect the blood clearance of lipid emulsions containing long- and medium-chain triglycerides in mice. *J. Nutr.* 2006; 136(11): 2766—72.
19. Slivkoff-Clark K.M., James A.P., Mamo C.L. The chronic effects of fish oil with exercise on postprandial lipaemia and chylomicron homeostasis in insulin resistant viscerally obese men. *Nutr. Metab.* 2012; 9: 9—18.
20. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. The Pathogenesis of Metabolic Pandemics. Diabetes [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Sakharный диабет]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
21. Goton N., Aoki T., Nakayasu K., Tokairin S., Nogu-chi N., Wada S. Quantification method for triglyceride molecular species in fish oil with high performance liquid chromatography ultraviolet detector — evaporative light scattering detector. *J. Oleo. Sci.* 2006; 55(9): 457—3.
22. Sanders T., Filippou A., Berry S., Baumgartner S., Mensink R.P. Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94(6): 1433—41.
23. Mochammad M.A., Sunehag A.L., Haymond M.W. De novo synthesis of milk triglycerides in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014; 306(7): E838—46.
24. Lopez-Lopez A., Castellote-Bargallo A.I., Campoy-Folgoso C., Rivero-Urgel M., Tormo-Carnicé R., Infante-Pina D. et al. The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. *Early Hum. Dev.* 2001; 65 Suppl: S83—94.
25. Bar-Yoseph F., Lifshitz Y., Cohen T. Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2013; 89(4): 139—43.
26. Breckenridge W.C., Kuksis A. Molecular weight distributions of milk fat triglycerides from seven species. *J. Lipid. Res.* 1967; 8: 473—8.
27. Subroto E., Tensiska T., Indarto R., Hidayar C. The effect of substrate ratio fish oil and milk fat on synthesis of structured lipid by enzymatic transesterification. *Int. J. Adv. Sci. Engineering.* 2013; 3(2): 19—23.
28. Diffenderfer M.R., Schaefer E.J. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr. Opin. Lipidol.* 2014; 25(3): 221—6.
29. Berry S., Sanders T. Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia. *Proc. Nutr. Soc.* 2005; 64: 205—12.
30. Mungure T.E., Birch E.J. Analysis of intact triacylglycerols in cold pressed canola, flax and hemp seed oils by HPLC and ESI-MS. *Sop. Trans. Analyt. Chem.* 2014; 1(1): 48—61.
31. Abia R., Pacheco Y.M., Perona J.S., Montero E., Muriana F.J., Ruiz-Gutiérrez V. The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. *J. Nutr.* 2001; 131(1): 59—65.
32. Urpi-Sarda M., Casas R., Chiva-Blanch G., Romero-Mamani E.S.,

- Valderas-Martínez P., Arranz S. et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 2012; 65(6): 577—83.
33. Beppu F., Nagai T., Yoshinaga K., Mizobe H., Kojima K., Gotoh N. Quantification of triacylglycerol molecular species in cocoa butter using high-performance liquid chromatography equipped with nano quantity analyte detector. *J. Oleo. Sci.* 2013; 62(10): 789—94.
34. Berry S. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* 2009; 22: 3—17.
35. Reaven G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988; 37(12): 1595—607.
36. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. The Pathogenesis of the Diseases of Civilization. Atherosclerosis [Филогенетическая теория обшей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
37. Sun L., Zhang Y., Wang Q., Zhang H., Xu W., Zhang J. et al. Serum palmitic acid-oleic acid ratio and the risk of coronary artery disease: a case-control study. *J. Nutr. Biochem.* 2011; 22(4): 311—7.
38. Lopez S., Bermudez B., Pacheco Y.M., López-Lluch G., Moreda W., Villar J. et al. Dietary oleic and palmitic acids modulate the ratio of triacylglycerols to cholesterol in postprandial triacylglycerol-rich lipoproteins in men and cell viability and cycling in human monocytes. *J. Nutr.* 2007; 137(9): 1999—2005.
39. Pacheco Y.M., Bermúdez B., López S., Abia R., Villar J., Muriana F.J. Ratio of oleic to palmitic acid is a dietary determinant of thrombogenic and fibrinolytic factors during the postprandial state in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84: 342—9.
40. Titov V.N. *Primary and Secondary Atherosclerosis, Atheromatosis and Atherothrombosis [Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз]*. Moscow—Tver': OOO «Izdatel'stvo Triada»; 2008. (in Russian)
41. Titov V.N. *Laboratory Diagnosis and Diet Therapy Hyperlipoproteinemia (biological bases) [Лабораторная диагностика и диетотерапия гиперлипотеинемии (биологические основы)]*. Moscow: Medpraktika; 2006. (in Russian)

Поступила 01.06.16

Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.154:577.175.624]-074:543.544

Малышева Н.М., Колесникова Г.С., Иоутси В.А., Ильин А.В., Головкина Н.А., Тюльпаков А.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НА АНАЛИЗАТОРАХ ARCHITECT И VITROS И МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ — ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ, 117036, Москва, Россия

Тестостерон является ключевым элементом гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Его физиологическая роль у мужчин хорошо известна и заключается прежде всего в формировании мужского фенотипа и обеспечении сперматогенеза. Оценка андрогенного статуса необходима при широком спектре клинических симптомов и патологических состояний, таких как гипогонадизм, отсроченное или преждевременное половое созревание, синдром поликистозных яичников, некоторые виды рака и др. Точные измерения концентрации тестостерона имеют решающее значение при получении биохимических данных для поддержки клинических решений при диагностике, лечении и профилактике андрогенных заболеваний. Цель работы — проведение сравнительного анализа результатов определения содержания тестостерона в сыворотке крови на анализаторах Architect 2000 и Vitros 3600 и полученных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Для исследования использованы образцы сыворотки крови 230 пациентов, направленных для обследования в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ. Сравнительное изучение результатов определения концентраций тестостерона показало закономерную разницу в абсолютных значениях, однако выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) корреляционная связь между значениями тестостерона, полученными разными методами. Коэффициент корреляции в различных группах пациентов при сравнении результатов Architect и Vitros с ВЭЖХ-МС/МС составлял 0,894—0,920 и 0,955—0,965 соответственно. Рассчитанное процентное распределение результатов определения содержания тестостерона по диапазонам ожидаемых значений показало допустимую, с точки зрения практической диагностики, сопоставимость полученных результатов. Выбор метода определения биохимических параметров при первичной диагностике является очень важным, однако ещё более важным является использование одного и того же метода при лечении и долгосрочном наблюдении пациента.

Ключевые слова: тестостерон; высокоэффективная жидкостная хроматография — тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС); автоматизированные системы.

Для цитирования: Малышева Н.М., Колесникова Г.С., Иоутси В.А., Ильин А.В., Головкина Н.А., Тюльпаков А.Н. Сравнительный анализ результатов определения тестостерона в сыворотке крови на анализаторах Architect и Vitros и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(10): 592-599. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-592-599>

Malyshva N.M., Kolesnikova G.S., Ioutsy V.A., Il'in A.V., Golovkina N.A., Tyul'pakov A.N.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS OF DETECTION OF TESTOSTERONE IN BLOOD SERUM APPLYING ANALYZERS ARCHITECT AND VITROS AND TANDEM MASS-SPECTROMETRY, A HIGHLY EFFICIENT FLUID CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

The endocrinological research center of Minzdrav of Russia, 117036 Moscow, Russia

Для корреспонденции: Малышева Наталья Михайловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. клинко-диагностической лаборатории; e-mail: natalya.m@list.ru

The testosterone is a key element of hypothalamus hypophysis gonad system. Its physiological role in males is well known and consists primarily in formation of male phenotype and support of spermatogenesis. The evaluation of androgenic status is necessary in case of such wide specter of clinical symptoms and pathological states as hypogonadism, delayed of premature puberty, polycystic ovary syndrome, particular types of cancer, etc. The precise measurements of testosterone concentrations have a decisive value in case of receiving biochemical data for supporting clinical decisions at diagnostic, treatment and prevention of androgenic diseases. The purpose of the study is to carry out a comparative analysis of the results of detection of testosterone in blood serum using analyzers Architect 2000 and Vitros 3600 and applying technique of highly-effective fluid chromatography - a tandem mass-spectrometry. The analysis was applied to samples of blood serum from 230 patients send to the endocrinological research center of Minzdrav of Russia. The comparative analysis of the results of detection of concentrations of testosterone demonstrated consistent difference in absolute values. However, a statistically significant correlation ($p < 0,05$) between values of testosterone obtained by different techniques was established. The correlation coefficient in different groups of patients made up to 0,894-0,920 and 0,955-0,965 correspondingly to comparing the results of Architect and Vitros and highly-effective fluid chromatography - a tandem mass-spectrometry. The calculated percentage of distribution of the results of detection of content of testosterone by the ranges of expected values demonstrated an admissible comparativeness of obtained results from point of view of practical diagnostic. The choice of technique of detection of biochemical parameters in case of primary diagnostic is very important. However, even more important is the application of the very same technique in treatment and long-term observation of patient.

Key words: testosterone; highly-effective fluid chromatography - a tandem mass-spectrometry; automated systems

For citation: Malysheva N.M., Kolesnikova G.S., Ioutsi V.A., Il'in A.V., Golovkina N.A., Tyul'pakov A.N. The comparative analysis of the results of detection of testosterone in blood serum applying analyzers Architect and Vitros and tandem mass-spectrometry, a highly efficient fluid chromatography technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 592-599. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-592-599>*

For correspondence: Malysheva N.M., candidate of biological sciences, senior researcher of the clinical diagnostic laboratory. e-mail: natalya.m@list.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.05.2017
Accepted 24.05.2017

Тестостерон (Т) занимает ключевое положение в системе гипоталамус — гипофиз — половые железы. У мужчин он синтезируется преимущественно в семенниках клетками Лейдига, у женщин — корой надпочечников, а также клетками яичников. Кроме того, Т образуется в периферических тканях из надпочечниковых андрогенов. Физиологическая роль его у мужчин хорошо известна и заключается прежде всего в формировании мужского фенотипа и обеспечении сперматогенеза. Кроме специфических задач, тестостерон обеспечивает рост тела, метаболизм костной ткани, её ремоделирование и поддержание анаболических процессов, особенно в мышечной ткани. Он принимает активное участие в обеспечении процесса эритропоэза и регуляции ряда других функций. Вместе со своим активным метаболитом эстрадиолом и 5 α -дигидротестостероном он выполняет в организме более 15 функций и имеет свои рецепторы в 40 различных органах и тканях [1]. Оценка андрогенного статуса у мужчин необходима при широком спектре клинических симптомов и патологических состояний, например таких, как тестикулярная недостаточность, бесплодие, сексуальная дисфункция, гипогонадизм различного генеза и др. Мониторинг уровня Т необходим при проведении антиандрогенной терапии определённых форм дисгормонального рака, а также при проведении заместительной терапии гормональными препаратами. Точное количественное определение концентрации Т необходимо для диагностики широко распространённого возрастного андрогенного дефицита. У женщин определение уровня тестостерона необходимо для оценки функции гонад при гирсутизме, алопеции, акне, бесплодии, при подозрении на андрогенсекретирующие опухоли яичников и надпочечников, синдроме поликистозных яичников, андрогенной недостаточности и др. У детей содержание Т определяют при замедленном или ускоренном половом созревании, на-

рушении деятельности надпочечников, тестикулярных и овариальных нарушениях.

В распоряжении российских клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) имеются различные диагностические системы для определения всевозможных биохимических показателей и маркеров, в частности тестостерона. Точность и правильность определения зависит от наличия адекватного и доступного метода. Любой из существующих методов иммуноанализа требует при его конструкции технологических разработок для каждого индивидуального гормона, включая выработку моноклональных антител с высокой специфичностью для повышения его чувствительности. Особую сложность при создании диагностических тест-систем представляет класс стероидных гормонов и их активных метаболитов, близких по химической структуре. Каждая компания-производитель конструирует свой вариант тест-системы, что затрудняет их стандартизацию. Это одна из причин расхождения в результатах определения гормонов. Появление и развитие современной технологии высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, обеспечивающей высокую производительность, практически 100% селективность, необходимую чувствительность и воспроизводимость, позволяет использовать ВЭЖХ-МС/МС в качестве метода сравнения при тестировании коммерческих анализаторов и тест-систем. В настоящей работе проведён сравнительный анализ результатов определения содержания тестостерона в сыворотке крови на иммунохимических анализаторах Architect 2000 и Vitros 3600 и полученных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии.

Материал и методы. Пациенты. Для исследования использовали образцы сыворотки крови 230 пациентов (в случайной выборке), направленных для обследования

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрических измерений

Параметр	Масса Q1	Масса Q3	СЕ, В	DP, В	СХР, В
ММР-1 (тестостерон)	289,2	97,1	30	106	16
ММР-2 (тестостерон)	289,2	109,1	34	106	18
ММР-вн. ст. (тестостерон-d5)	294,2	113,1	39	106	16

в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ. В число обследованных вошли мужчины в возрасте 18—75 лет, которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных форм гипогонадизма, возрастного андрогенного дефицита, сексуальной дисфункции и других нарушений гормональной функции яичек, женщины в возрасте 18—65 лет и дети в возрасте 1—17 лет, которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных нарушений функции эндокринных желез.

Процедура сбора крови. Образцы крови брали из локтевой вены между 8.00 и 10.00 утра. Отделение сыворотки от форменных элементов проводили центрифугированием при температуре 4°C и 3000 об/мин. Образцы сыворотки хранили при -40°C в аликвотах до измерения в них содержания общего тестостерона.

Высокоэффективная жидкостная хроматография — тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС).

Пробоподготовка. Подготовку образцов сыворотки крови для анализа способом ВЭЖХ-МС/МС проводили с использованием жидкостно-жидкостной экстракции. В 500 мкл сыворотки добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (тестостерон-d₅, CIL) и перемешивали на вортексе (Combi-Spin FVL-2400N). Далее к смеси добавляли 600 мкл этилацетата (Aldrich, for LC-MS) и проводили экстракцию при перемешивании на вортексе в течение 1 мин. После этого смесь центрифугировали при 13 200 об/мин и 4°C в течение 10 мин. Далее органическую фазу отделяли и высушивали досуха в вакуумной центрифуге (Christ RVC 2-25 CDplus) при 40°C. Твёрдый остаток перерастворяли в 150 мкл смеси метанола с деионизованной водой (1:1), центрифугировали (13 200 об/мин, 4°C, 10 мин), и полученный раствор затем помещали в автодозатор системы ВЭЖХ-МС/МС.

Инструменты и проведение измерения. Для проведения анализов методом ВЭЖХ-МС/МС использовали хроматографическую систему Agilent 1200 (США), оснащённую дегазатором G1322A, четырёхканальным насосом со смесителем низкого давления G1311A, автодозатором G1367B и термостатом для колонок G1316A. Детектирование осуществляли при помощи тандемного трёхквадрупольного масс-спектрометра AB SCIEX QTRAP 5500 (Канада), оснащённого источником TurboV с установленным зондом для химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). Условия ионизации оптимизировали с учётом хроматографического потока 1 мл/мин: ток на игле коронного разряда 5 мкА, давление газа-распылителя на источнике 50 psi (фунт/дюйм²), давление газа-завесы 28 psi, температура испарителя 500°C. ММР-переходы и параметры ионной оптики — энергия соударений (СЕ), потенциал декластеризации (DP), входной потенциал в Q₁ (EP) и выходной потенциал камеры соударений (СХР) подбирали для внешнего и внутреннего стандартов индивидуально, значения параметров приведены в табл. 1.

Хроматографическое разделение тестостерона с другими стероидами сыворотки крови для предотвращения наложений перекрывающихся ММР-переходов проводили в смешанном режиме на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6•150 мм, диаметр частиц сорбента 5 мкм, поток элюента 1 мл/мин, температура термостата колонок 50°C. Элюирование проводили смесью метанола (LiChrosolv, для LC-MS) с деионизованной водой (MilliQ) в соотношении 70:30 0—4 мин с последующим

плавным повышением содержания метанола от 70 до 90% в элюенте с 4-й по 5-ю минуту с возвратом к первоначальному составу элюента на 7,5 мин. Время удерживания тестостерона в приведённых условиях составило 3,9 мин.

Автоматизированные системы. Для проведения измерений использовали автоматический хемилюминесцентный анализатор Architect 2000 («Abbott», Великобритания) и автоматический хемилюминесцентный анализатор Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostics, Великобритания). Измерение проводилось по стандартным методикам разработчиков тест-систем, для анализатора Architect использовали тест для количественного определения тестостерона в сыворотке и плазме крови человека 2nd Generation Testosterone REF 2P13, для анализатора Vitros использовали тест для количественного определения тестостерона в сыворотке и плазме крови человека VITROS Immunodiagnostic Products Testosterone REF 1074053 [2, 3].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерной программы STATISTICA 7.0 («StatSoft Inc.», США). Данные представлены в виде медианы интерпроцентильного размаха между 5 и 95% процентилями. Для оценки сопоставимости выборок использовали коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми принимали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Ниже приведены результаты сравнительного исследования уровней тестостерона в группах (табл. 2). Исследование корреляционных связей представлено в табл. 3 и на рис. 1—3.

В зависимости от диапазонов ожидаемых значений уровня тестостерона у здоровых людей, предложенных

Таблица 2

Сравнение результатов определения тестостерона в сыворотке крови (нмоль/л), полученных разными методами (данные представлены в виде: медиана (5—95% интервалы))

Группа	Метод		
	ВЭЖХ-МС/МС	Architect	Vitros
Мужчины, 18—75 лет (n = 124)	17,4 (9,4—44,9)	10,8 (4,7—30,3)	14,0 (6,2—38,4)
Женщины, 18—65 лет (n = 49)	1,5 (0,82—5,8)	0,99 (0,50—3,5)	1,9 (0,7—5,4)
Мальчики, 1—15 лет (n = 28)	5,8 (0,25—18,0)	3,3 (0,15—16,9)	3,8 (0,20—16,3)
Девочки, 2—17 лет (n = 29)	1,3(0,1—6,0)	0,93 (0,1—5,0)	1,9 (0,2—7,7)

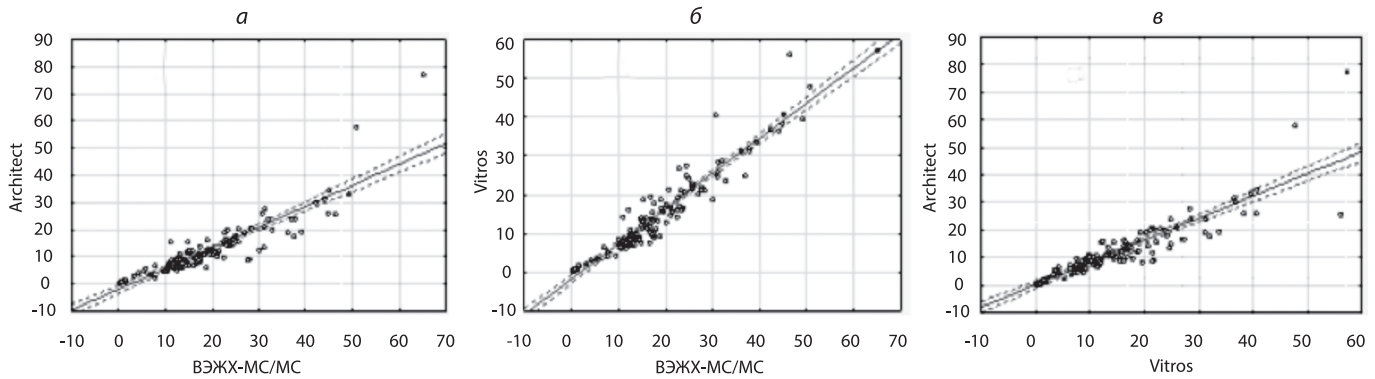


Рис. 1. Сравнение результатов определения содержания тестостерона в сыворотке крови в группе мужчин (18—75 лет), полученных различными методами (сплошная линия — линия регрессии, пунктирная линия — доверительный интервал 5—95%).
а — ВЭЖХ-МС/МС и Architect; б — ВЭЖХ-МС/МС и Vitros; в — Vitros и Architect.

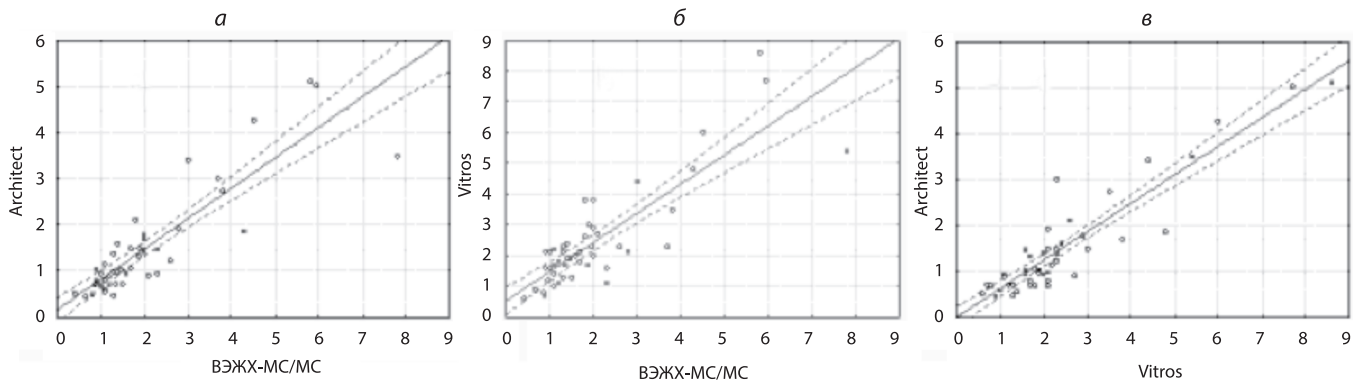


Рис. 2. Сравнение результатов определения содержания тестостерона в сыворотке крови в группе женщин (18—65 лет), полученных различными методами (сплошная линия — линия регрессии, пунктирная линия — доверительный интервал 5—95%).
а — ВЭЖХ-МС/МС и Architect; б — ВЭЖХ-МС/МС и Vitros; в — Vitros и Architect.

разработчиками каждого метода (табл. 4), рассчитано процентное распределение результатов определения тестостерона для мужчин 18—49 лет, мужчин старше 50 лет с возрастным андрогенным дефицитом и женщин 18—65 лет (рис. 4, 5).

У мужчин в возрасте 18—49 лет (см. рис. 4, а) нормальный уровень тестостерона определяется в 61% случаев методом ВЭЖХ-МС/МС, в 63,4% случаев на анализаторе Architect и в 56,5% случаев на анализаторе Vitros, уровень ниже референсных значений — в 26,8; 31,7 и 36,1% случаев, выше референсных значений — в 12,7; 4,9 и 7,4% случаев соответственно. В нормальном диапазоне значений разница в процентах распределения

между методами составила 2,4; 4,5 и 6,9%; в диапазоне ниже референсных значений разница составила 4,9; 4,4 и 9,3%; в диапазоне высоких концентраций распределения отличались на 7,8; 5,3 и 2,5%.

В группе мужчин старше 50 лет (см. рис. 4, б) андрогенный дефицит фиксировался в 50% случаев методом ВЭЖХ-МС/МС, в 44,8% случаев на анализаторе Architect и в 56,7% случаев на анализаторе Vitros. Разница в процентах распределения составила 5,2; 11,9 и 6,7%. Нормальный уровень тестостерона в данной группе фиксировался в 46,4% случаев методом ВЭЖХ-МС/МС, в 48,3% случаев на анализаторе Architect и в 40% случаев на анализаторе Vitros, разница в процентах распределения составила 1,9; 6,4 и 8,3%. Уровень выше

Таблица 3

Корреляционные связи результатов определения тестостерона, полученных различными методами ($p < 0,05$)

Методы	Мужчины, 18—75 лет	Женщины, 18—65 лет	Дети, 1—17 лет	Вся выборка
ВЭЖХ-МС/МС и Architect	0,894	0,879	0,947	0,920
ВЭЖХ-МС/МС и Vitros	0,955	0,847	0,960	0,965
Architect и Vitros	0,889	0,920	0,944	0,919

Таблица 4

Диапазон ожидаемых значений уровня тестостерона у здоровых людей для используемых методов (нмоль/л)

Группа	Метод		
	ВЭЖХ-МС/МС	Architect	Vitros
Мужчины, 18—49 лет	13,0—33,0	8,3—30,2	11,0—33,5
Мужчины, ≥ 50 лет	13,0—33,0	7,7—24,8	11,0—33,5
Женщины, 18—65 лет	0,8—2,7	0,48—1,85	0,1—2,7

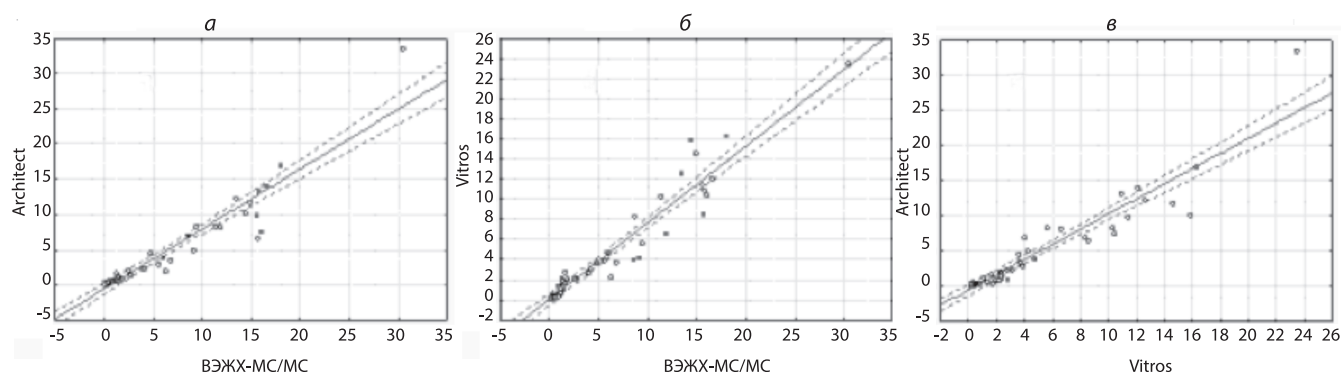


Рис. 3. Сравнение результатов определения тестостерона в сыворотке крови в группе детей (1—17 лет), полученных различными методами (сплошная линия — линия регрессии, пунктирная линия — доверительный интервал 5—95%).
а — ВЭЖХ-МС/МС и Architect; б — ВЭЖХ-МС/МС и Vitros; в — Vitros и Architect.

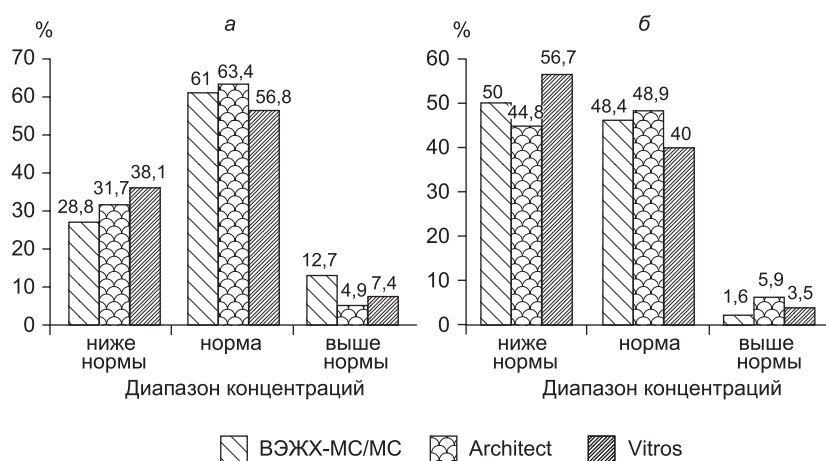


Рис. 4. Процентное распределение уровней тестостерона в сыворотке крови у мужчин.
а — мужчины 18—49 лет; б — мужчины старше 50 лет (андрогенный дефицит).

референсных значений в 3,6% случаев фиксировался методом ВЭЖХ-МС/МС, в 6,9% случаев на анализаторе Architect и в 3,3% случаев на анализаторе Vitros, разница в процентах распределения составила 3,3; 0,3 и 3,6%.

У женщин в возрасте 18—65 лет (см. рис. 5) нормальный уровень тестостерона определялся в 79,6% случаев методом ВЭЖХ-МС/МС, в 81,4% случаев на анализаторе Architect и в 81,6% случаев на анализаторе Vitros, уровень ниже референсных значений — в 4,5; 2,3 и 0% случаев, выше референсных значений — в 15,9; 16,3 и 18,4% случаев соответственно. В нормальном диапазоне значений разница в процентах распределения между методами составила 1,8; 2,0 и 0,2%; в диапазоне ниже референсных значений разница составила 2,2; 4,5 и 2,3%; в диапазоне высоких концентраций распределения отличались на 0,2; 1,6 и 1,8%.

Мы провели анализ распределения количества случаев в выборке по концентрациям тестостерона по каждому исследуемому методу и обнаружили заметные расхождения в диаграммах распределения методов иммуноанализа и метода ВЭЖХ-МС/МС в диапазоне 6—12 нмоль/л (рис. 6).

Сравнительное изучение результатов определения тестостерона в контрольных образцах Bio-Rad,

полученных на автоматизированных системах Architect и Vitros ЕС1 и методом ВЭЖХ-МС/МС, показало хорошую сопоставимость значений между собой (табл. 5).

Обсуждение. Сравнительное изучение результатов определения содержания тестостерона в сыворотке крови, полученных на анализаторах Architect и Vitros и методом ВЭЖХ-МС/МС, показало закономерную разницу значений между собой (см. табл. 2). Существует несколько возможных причин для объяснения несовпадения между результатами, полученными прямыми методами иммуноанализа и методом с предварительной экстракцией. На первом месте так называемый эффект матрикса. Целый ряд соединений, присутствующих в сыворотке крови, могут вмешиваться в реакцию антигена и определяемого лиганда. При экстракции многие из этих соединений элиминируются на преаналитическом этапе. Процедура экстракции сводит эффект фоновой матрицы к минимуму. Важными источниками несовпадений являются также приготовление калибровочной кривой и степень чистоты используемого кристаллического стандарта тестостерона. Ещё одна важная причина варибельности полученных результатов связана со специфичностью используемых для конструирования тест-систем антител, имеющих разную степень аффин-

Таблица 5

Сравнение контролей Bio-Rad (нмоль/л), полученных разными методами (данные представлены в виде: Mediana (5—95% интервалы))

Уровень	Метод	Bio-Rad	КДЛ ЭНЦ
Уровень 1 40 311	Vitros	4,3 (2,7—5,9)	4,6 (4,3—5,1)
	Architect	7,5 (5,4—9,6)	6,4 (6,0—6,7)
	ВЭЖХ-МС/МС	—	6,2 (5,6—6,5)
Уровень 2 40 312	Vitros	24,0 (17,2—30,8)	24,0 (23,6—26,2)
	Architect	23,8 (19,1—28,6)	21,0 (20,1—22,4)
	ВЭЖХ-МС/МС	—	22,1 (19,7—23,6)
Уровень 3 40 313	Vitros	39,9 (28,5—51,3)	40,2 (39,1—43,4)
	Architect	33,6 (27,4—39,9)	30,5 (28,6—32,2)
	ВЭЖХ-МС/МС	—	31,2 (27,6—32,80)

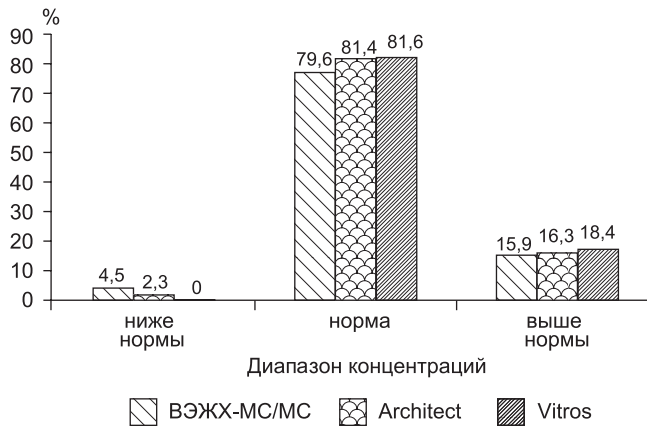


Рис. 5. Процентное распределение уровней тестостерона в сыворотке крови у женщин 18—65 лет.

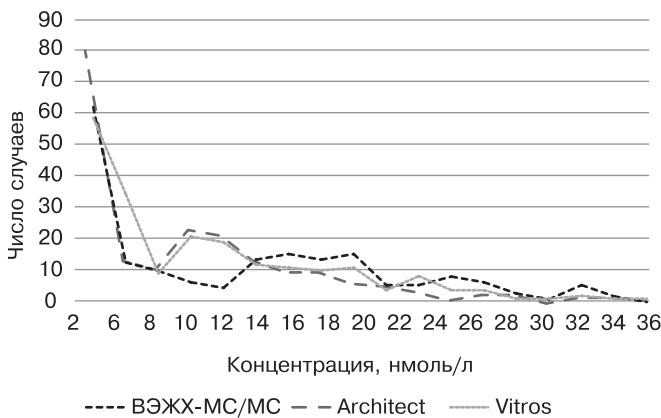


Рис. 6. Диаграмма распределения количества случаев по концентрациям.

ности к тестостерону и другим сопутствующим стероидам. Все эти факторы могут существенно влиять на показатели определяемой концентрации тестостерона [1]. Несмотря на разницу в абсолютных значениях показателей уровня тестостерона, в нашем исследовании выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) корреляционная связь между значениями тестостерона, полученными сравнимыми методами, $r = 0,85—0,97$ (см. табл. 3, рис. 1—3).

Рассчитанное процентное распределение результатов определения содержания тестостерона для мужчин 18—49 лет, мужчин старше 50 лет с возрастным андрогенным дефицитом и женщин 18—65 лет по диапазонам ожидаемых значений показало допустимую, с точки зрения практической диагностики, сопоставимость полученных результатов. Разница в процентах распределения определяется установленными диапазонами нормальных концентраций. Разработчики методов рекомендуют каждой лаборатории устанавливать свой референсный диапазон, соответствующий популяции пациентов лаборатории (т. е. диапазон нормальных значений, отражающий в зависимости от обстоятельств типы образцов и демографические переменные, такие как пол и возраст). Руководство эндокринологического сообщества по андрогенной недостаточности у мужчин (2010 г.) предлагает считать 10,4 нмоль/л нижним пределом диапазона нормальных значений [4].

Анализ распределения количества случаев в выборке по концентрациям тестостерона по каждому исследуемому методу (см. рис. 6) показал заметные расхождения в диаграммах распределения иммуноферментных методов и метода ВЭЖХ-МС/МС в диапазоне 6—12 нмоль/л. Данный интервал является важным при диагностике андрогенного дефицита у мужчин и, возможно, требует дополнительных тестов для подтверждения диагноза. В качестве альтернативной технологии может быть использовано определение свободного тестостерона в слюне и сыворотке крови [5, 6].

Для определения уровня тестостерона в сыворотке крови все чаще используются анализы на основе хромато-масс-спектрометрии [7], о чём свидетельствует почти пятикратное увеличение количества этих методов исследования в программах тестирования (PT) Коллегии американских патологов (CAP) в 2012—2015 гг. [8]. Однако и вариабельность измерений этими методами по сравнению с эталонным методом также существует [9, 10]. Изменчивость и неточность всех анализов тестостерона, так же как их клиническое значение, были подчеркнуты в редакционных статьях, комментариях, заявлениях эндокринологического сообщества и других материалах, опубликованных профессиональными организациями и экспертами [4, 11—18]. Международным центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC) установлена программа стандартизации гормонов (HoSt) для повышения точности и достоверности анализа тестостерона [19]. Доступность эталонных измерительных процедур (RMP) [20—23], эталонных материалов и программы стандартизации CDC позволила изготовителям и лабораториям иммуноанализа повысить точность и надёжность результатов определения тестостерона, а также получить более точные и сопоставимые результаты.

Внешняя оценка качества исследований, выполняемых в КДЛ, является одним из важнейших элементов системы обеспечения качества клинической лабораторной диагностики. Она направлена прежде всего на обеспечение правильности результатов исследований биологических материалов в КДЛ и соответственно сопоставимости результатов, получаемых в разных лабораториях. Кроме того, внешняя оценка служит объективным инструментом оценки соответствия лабораторных результатов установленным нормативам качества. С

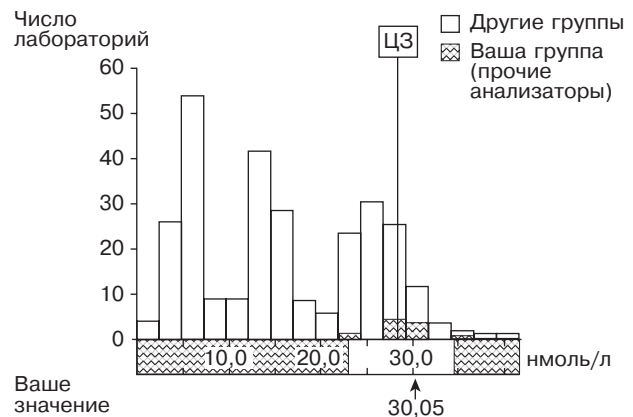


Рис. 7. Распределение средних значений определения тестостерона, полученных лабораториями, участвующими в системе ФСВОК.

1995 г. в нашей стране эта работа выполняется в рамках Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК). По данным ФСВОК-2016 (рис. 7), результаты определения общего тестостерона в КДЛ ЭНЦ отвечают необходимым требованиям. Среднее значение контрольного образца составляет 30,05 нмоль/л при целевом значении (ЦЗ) показателя 28,21 нмоль/л. Смещение составляет +6,5%, диапазон допустимых значений 23,10—34,46 нмоль/л.

Исходя из полученных данных, необходимо подчеркнуть важность правильного выбора метода и грамотной интерпретации результатов определения концентрации тестостерона при первичной диагностике, однако ещё более важным является использование одного и того же метода при лечении и долгосрочном наблюдении пациента. Окончательный диагноз определяется совокупностью клинических симптомов болезни и биохимических параметров пациента, опытом и знаниями лечащего врача.

Заключение. Опыт работы КДЛ ЭНЦ позволяет рекомендовать к использованию в клинических лабораториях диагностические тест-системы для исследования уровня общего тестостерона в сыворотке крови на анализаторах Architect 2000 и Vitros 3600 при условии персонализированного подхода к интерпретации результатов анализа каждого пациента. Высокоэффективная жидкостная хроматография — тандемная масс-спектрометрия используется для тестирования диагностических тест-систем в качестве метода сравнения. В настоящее время метод ВЭЖХ-МС/МС не может быть рекомендован для применения в рутинной диагностике, учитывая высокую стоимость оборудования и обслуживания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Н.П., Кацья Г.В., Колесникова Г.С. *Ключевые гормоны в эндокринологии и методы их определения*. М: АдамантЪ; 2014.
2. Инструкция к набору реагентов для количественного определения тестостерона в сыворотке и плазме крови человека Architect 2nd Generation Testosterone REF 2P13.
3. Инструкция к набору реагентов для количественного определения тестостерона в сыворотке и плазме крови человека VITROS Immunodiagnostic Products Testosterone REF 143 5205.
4. Rosner W., Vesper H.W. Endocrine Society and endorsing organizations, Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 4542—8.
5. Малышева Н.М., Кацья Г.В., Гончаров Н.П. Диагностические возможности определения биологически активного свободного тестостерона в крови с использованием современной технологии ультрафильтрации. *Проблемы эндокринологии*. 2009; 55(3): 34—7.
6. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A., et al. Diagnostic significance of free salivary testosterone measurement using a direct luminescence immunoassay in healthy men and in patients with disorders of androgenic status. *Aging Male*. 2006; Jun; 9(2): 111—22.
7. Jannetto P.J., Fitzgerald R.L. Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 2016; 62: 92—8.
8. College of American Pathologists. Ligand (Special) Participant Summary, Y-B. Surveys; 2015.
9. Thienpont L.M., Van Uytvanhe K., Blincko S., Ramsay C.S., Xie H., Doss R.C. et al. State-of-the-art of serum testosterone measurements by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2008; 54: 1290—7.
10. Vesper H.W., Bhasin S., Wang C., Tai S.S., Dodge L.A., Singh R.J. et al. Interlaboratory comparison study of serum total testosterone

measurements performed by mass spectrometry methods. *Steroids*. 2009; 74: 498—503.

11. Herold D.A., Fitzgerald R.L. Immunoassays for testosterone in women: better than a guess? *Clin. Chem.* 2003; 49: 1250—1.
12. Rosner W., Auchus R.J., Azziz R., Sluss P.M., Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 405—13.
13. Matsumoto A.M., Bremner W.J. Editorial: Serum testosterone assays — accuracy matters. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 520—4.
14. Sacks S.S. Are routine testosterone assays good enough? *Clin. Biochem.* 2005; Rev 26: 43—5.
15. Stanczyk F.Z., Lee J.S., Santen R.J. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 1713—9.
16. Wierman M.E., Basson R., Davis S.R., Khosla S., Miller K.K., Rosner W. et al. Androgen therapy in women: an Endocrine Society Clinical Practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 3697—710.
17. Legro R.S., Arslanian S.A., Ehrmann D.A., Hoeger K.M., Murad M.H., Pasquali R. et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98: 4565—92.
18. Rosner W., Vesper H.W. CDC workshop report improving steroid hormone measurements in patient care and research translation. *Steroids*. 2008; 73: 1285.
19. CDC, CDC Hormone Standardization Project. Standardization of serum total testosterone measurements (2016). Available at: http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/HoSt_Protocol.pdf (accessed 01.10.16).
20. Siekmann L. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. *J. Steroid Biochem.* 1979; 11: 117—23.
21. Thienpont L.M., Van Nieuwenhove B., Stöckl D., Reinauer H., De Leenheer A.P. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: five years experience of two European reference laboratories. *Eur J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996; 34: 853—60.
22. Tai S.S., Xu B., Welch M.J., Phinney K.W. Development and evaluation of a candidate reference measurement procedure for the determination of testosterone in human serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 388: 1087—94.
23. Botelho J.C., Shacklady C., Cooper H.C., Tai S.S., Uytvanhe K.V., Thienpont L.M. et al. Isotope-Dilution Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry Candidate Reference Method for Total Testosterone in Human Serum. *Clin. Chem.* 2013; 59: 372—80.

REFERENCES

1. Goncharov N.P., Katsiya G.V., Kolesnikova G.S. *Key hormones in endocrinology and methods of their determination [Kluchevye hormony v endocrinologii i metody ikh opredeleniya]*. Moscow: «Adamant»; 2014. (in Russian)
2. Kit for the quantitative measurement of testosterone in human serum and plasma Architect 2nd Generation Testosterone (instruction) REF 2P13.
3. Kit for the quantitative measurement of testosterone in human serum and plasma VITROS Immunodiagnostic Products Testosterone (instruction) REF 143 5205.
4. Rosner W., Vesper H.W. Endocrine Society and endorsing organizations, Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 4542—8.
5. Malysheva N.M., Katsiya G.V., Goncharov N.P. Diagnostic possibilities of determination of biologically active free testosterone in blood using modern ultrafiltration technology. *Problemy endocrinologii*. 2009; 55(3): 34—7. (in Russian)
6. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. Diagnostic significance of free salivary testosterone measurement using a direct luminescence immunoassay in healthy men and in patients with disorders of androgenic status. *Aging Male*. 2006 Jun; 9(2): 111—22.

7. Jannetto P.J., Fitzgerald R.L. Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 2016; 62: 92—8.
8. College of American Pathologists. Ligand (Special) Participant Summary, Y-B. Surveys; 2015.
9. Theinpont L.M., Van Uytvanhe K., Blincko S., Ramsay C.S., Xie H., Doss R.C. et al. State-of-the-art of serum testosterone measurements by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2008; 54: 1290—7.
10. Vesper H.W., Bhasin S., Wang C., Tai S.S., Dodge L.A., Singh R.J. et al. Interlaboratory comparison study of serum total testosterone measurements performed by mass spectrometry methods. *Steroids.* 2009; 74: 498—503.
11. Herold D.A., Fitzgerald R.L. Immunoassays for testosterone in women: better than a guess? *Clin. Chem.* 2003; 49: 1250—1.
12. Rosner W., Auchus R.J., Azziz R., Sluss P.M., Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 405—13.
13. Matsumoto A.M., Bremner W.J. Editorial: Serum testosterone assays — accuracy matters. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 520—4.
14. Sacks S.S. Are routine testosterone assays good enough? *Clin. Biochem.* 2005; Rev 26: 43—5.
15. Stanczyk F.Z., Lee J.S., Santen R.J. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 1713—9.
16. Wierman M.E., Basson R., Davis S.R., Khosla S., Miller K.K., Rosner W. et al. Androgen therapy in women: an Endocrine Society Clinical Practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 3697—710.
17. Legro R.S., Arslanian S.A., Ehrmann D.A., Hoeger K.M., Murad M.H., Pasquali R. et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98: 4565—92.
18. Rosner W., Vesper H.W. CDC workshop report improving steroid hormone measurements in patient care and research translation. *Steroids.* 2008; 73: 1285.
19. CDC, CDC Hormone Standardization Project. Standardization of serum total testosterone measurements (2016). Available at: http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/HoSt_Protocol.pdf (accessed 01.10.16).
20. Siekmann L. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. *J. Steroid Biochem.* 1979; 11: 117—23.
21. Thienpont L.M., Van Nieuwenhove B., Stöckl D., Reinauer H., De Leenheer A.P. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: five years experience of two European reference laboratories. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996; 34: 853—60.
22. Tai S.S., Xu B., Welch M.J., Phinney K.W. Development and evaluation of a candidate reference measurement procedure for the determination of testosterone in human serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 388: 1087—94.
23. Botelho J.C., Shacklady C., Cooper H.C., Tai S.S., Uytvanhe K.V., Thienpont L.M. et al. Isotope-Dilution Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry Candidate Reference Method for Total Testosterone in Human Serum. *Clin. Chem.* 2013; 59: 372—80.

Поступила 20.05.17

Принята к печати 24.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.1-092:612.017.1

Дылева Ю.А.¹, Груздева О.В.^{1,2}, Акбашева О.Е.³, Учасова Е.Г.¹, Барбараш О.Л.^{1,2}

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА ST2

¹ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 650029, Кемерово;

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 634050, Томск

ST2 является членом семейства рецепторов интерлейкина 1 (IL-1) и состоит из двух изоформ: трансмембранной, или клеточной (ST2L), и растворимой, или циркулирующей (sST2). ST2 является рецептором IL-33, который представляет собой IL-1-подобный цитокин. IL-33 проявляет свои клеточные функции, связывая рецепторный комплекс, состоящий из вспомогательного белка ST2L и IL-1R. Система IL-33/ST2 активируется в кардиомиоцитах и фибробластах в ответ на механическое раздражение или повреждение. Было показано, что взаимодействие между IL-33 и ST2L является кардиопротективным. На экспериментальных моделях продемонстрировано уменьшение фиброза миокарда, предотвращение развития гипертрофии кардиомиоцитов, снижение апоптоза и улучшение функциональной способности миокарда при взаимодействии IL-33 и ST2L. Положительные эффекты IL-33, в частности, связаны с рецептором ST2L. В свою очередь sST2, связываясь с IL-33, приводит к блокированию взаимодействия между IL-33/ST2L, устраняя тем самым кардиопротективные эффекты. В последние годы знания о роли ST2 в патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний расширились, и роль ST2 связывают с дисфункцией миокарда, фиброзом и ремоделированием. Помимо своей миокардиальной роли, система IL-33/ST2 может играть дополнительную роль в развитии и прогрессировании атеросклероза. Система IL-33/ST2L может обладать терапевтическим потенциалом при миокардиальной перегрузке или травме. sST2, напротив, действует как ложный рецептор IL-33, блокируя кардиопротективные эффекты взаимодействия IL-33/ST2L.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста ST2; интерлейкин 33; сердечно-сосудистые заболевания; фактор риска.

Для цитирования: Дылева Ю.А., Груздева О.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Барбараш О.Л. Физиологическая и патофизиологическая роль стимулирующего фактора роста ST2. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(10): 599-605. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-599-605>

Для корреспонденции: Дылева Юлия Александровна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний НИИ КПССЗ; e-mail: dyleva87@yandex.ru

Dyleva Yu.A.¹, Gruzdeva O.V.^{1,2}, Akbasheva O.E.³, Uchasova E.G.¹, Barbarash O.L.^{1,2}

THE PHYSIOLOGIC AND PATHOPHYSIOLOGIC ROLE OF STIMULATING GROWTH FACTOR ST2

¹The research institute of complex problems of cardio-vascular diseases, 650002 Kemerovo, Russia

²The Kemerovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 650029 Kemerovo, Russia

³The Sibirskii state medical university of Minzdrav of Russia, 634050 Tomsk, Russia

The ST2 is a member of family of receptors of interleukin 1 (IL-1) and consists of two isoforms: a trans-membrane of cellular one (ST2L) and soluble or circulating one (sST2). The ST2 is a receptor of IL-33 that represents IL-1 like cytokine. The IL-33 manifests its cellular functions binding receptor complex consisted of accessory protein ST2L and IL-1R. The system IL-33/ST2 is activated in cardiomyocytes and fibroblasts in response to mechanical irritation or damage. It was demonstrated that interaction between IL-33 and ST2L is a cardioprotective one. The experimental models were used to demonstrate decreasing of myocardium fibrosis, prevention of development of hypertrophy of cardiomyocytes, decreasing of apoptosis and amelioration of functional capacity of myocardium at interaction of IL-33 and ST2L. In particular, the positive effects of IL-33 are related to receptor of ST2L. In turn, sST2 by binding with IL-33 sets blocking of interaction between IL-33/ST2L hence eliminating cardioprotective effects. During last years, the knowledge about the role of ST2 in pathophysiology of cardio-vascular diseases broadened and now the role of ST2 is related to myocardium dysfunction, fibrosis and remodeling. The system IL-33/ST2L, besides its myocardial role, can play an additional role in development and progressing of atherosclerosis. The system IL-33/ST2L can have a therapeutic potential in case of myocardial overload or trauma. On the contrary, sST2 acts as a false receptor of IL-33 blocking cardioprotective effects of interaction of IL-33/ST2L.

Key words: transforming growth factor ST2; interleukin 33; cardio-vascular diseases; risk factor.

For citation: Dyleva Yu.A., Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G., Barbarash O.L. The physiologic and pathophysiologic role of stimulating growth factor ST2. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (10): 599-605. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-599-605>

For correspondence: Dyleva Yu.A., candidate of medical sciences, researcher of of laboratory of studies of homeostasis of the department of cardio-vascular diseases. e-mail: dyleva87@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.05.2017
Accepted 25.05.2017

Более 50 лет назад д-р Уильям Каннель ввел термин «факторы риска» ишемической болезни сердца (ИБС) в ходе Фрэммингемского исследования [1]. С того времени оценка сердечно-сосудистых факторов риска (ФР) стала рутинной в клинической практике. Относительно недавно в 2013 г. Американская коллегия кардиологов совместно с Американской ассоциацией сердца выпустили руководство по лечению нарушений липидного обмена, включая оценку кардиоваскулярных рисков на основе отдельных факторов, с расчётом прямых последствий для менеджмента здравоохранения и первичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [2, 3].

Хотя доказана значимость наличия традиционных ФР, таких как сахарный диабет (СД), артериальная гипертензия (АГ), курение и гиперхолестеринемия в развитии кардиоваскулярной патологии, сердечно-сосудистые нарушения могут протекать и в отсутствие традиционных ФР. Так, в исследовании U.Khot и соавт. [4] 18% пациентов с ИБС не имели традиционных сердечно-сосудистых ФР и более чем половина имели 1 ФР. Эти несоответствия между распространённостью ФР и развитием ССЗ иногда называют «парадоксом профилактики» [5]. Таким образом, использование биомаркёров для улучшения стратификации риска на основе традиционных ФР может вызывать большой как патофизиологический, так и клинический интерес.

Действительно, в настоящее время потенциал сердечно-сосудистых исследований в эпоху прецизионной медицины практически не имеет границ. Биомаркёры играют важнейшую роль в диагностике и прогнозировании ряда ССЗ. Тем не менее их значение для мониторинга пациента и персонализированной оценки его состояния пока недостаточно хорошо определено. В ходе многочисленных исследований, призванных за-

полнить этот пробел, оценивали большое количество потенциальных биомаркёров, из которых немногие «пережили» тщательный анализ и зарекомендовали себя как потенциальные маркёры для использования в клинической сфере. Одним из таких биомаркёров является sST2, который недавно был определен как сильный предиктор заболеваний сердечно-сосудистой системы [6–10].

Основы биологии ST2. ST2 является членом суперсемейства Toll-like-рецепторов интерлейкина 1 (IL-1) и известен также как IL1RL1, DER4, T1 и FIT-1 [9, 11, 12]. ST2 был впервые описан в 1989 г. [13, 14], но в течение многих лет его рассматривали как рецептор, связанный с иммунными и воспалительными заболеваниями. E. Weinberg и соавт. [15] обнаружили экспрессию ST2 в клетках сердца в ответ на реакцию стресса в миокарде, что свидетельствовало об определенной роли ST2 в сердечно-сосудистой системе. J. Schmitz и соавт. идентифицировали IL-33 в качестве лиганда ST2, что позволило улучшить понимание его функций [16]. В последние годы знания о биологической функции ST2 и его роли в патофизиологии ССЗ были намного расширены. В следующих разделах мы рассмотрим ключевые вопросы, касающиеся роли ST2, чтобы облегчить понимание его функциональной значимости в развитии ССЗ.

Изоформы ST2 и их роль. Ген, названный ST2, находится на хромосоме человека 2q12 и является частью более крупного кластера генов IL-1 (GenBank, № AC007248). Четыре изоформы являются транскрипционными продуктами гена (sST2, ST2L, ST2V, ST2LV), 2 из которых наиболее важны: трансмембранный рецептор ST2L (или IL1RL1-b) и растворимый рецептор sST2 (или IL1RL1-a), который может быть обнаружен в сыворотке крови [11, 17].

sST2 и ST2L образуются из двойной промоутерной системы, отвечающей за дифференциальную экспрес-

сию мРНК. Ген *ST2* состоит из 2 промоторов: проксимального и дистального, которые способны влиять на механизм регуляции транскрипции гена. Каждый промотор влияет на экспрессию sST2 и ST2L мРНК: альтернативный сплайсинг с участием 3'-конца гена отвечает за разницу в экспрессии [18]. Данные о внутреннем контроле дифференциальной транскрипции sST2 и ST2L до конца не изучены и ограничиваются гемопозитическими клетками (GATA2, нейротрофиновый рецептор p75) [19, 20]. Важно отметить, что генетические факторы определяют до 40% межиндивидуальной вариабельности в содержании sST2 [21].

Общая структура ST2L аналогична структуре рецептора типа I IL-1: это мембраносвязанная форма, содержащая внеклеточный домен трёх связанных иммуноглобулинподобных мотивов, трансмембранного сегмента и внутриклеточного домена Toll/IL-1 цитоплазматического рецептора. Как уже отмечалось, sST2 является циркулирующей формой, в которой отсутствуют трансмембранный и цитоплазматический домены, и включает уникальную 9-аминокислотную C-концевую последовательность. Трансмембранная форма ST2L экспрессируется прежде всего на гемопозитических клетках (Т-хелперы (Th2) и тучные клетки). Экспрессия циркулирующей формы sST2 в значительной степени индуцибельна и почти повсеместна в живых клетках [11, 18].

Взаимодействие ST2 и IL-33. IL-33 (также известный как IL-1F11) был идентифицирован как лиганд ST2 [16]. IL-33 представляет собой IL-1-подобный цитокин, который секретируется большинством клеток в ответ на повреждение [11]. Функции IL-33 заключаются в связывании рецепторного комплекса, состоящего из ST2L и IL-1R вспомогательного белка (IL-1RAcP). IL-1RAcP имеет важное значение для IL-33 в передаче сигнала через ST2L путем усиления сродства IL-33 к ST2L [22]. Взаимодействие IL-33 и ST2L индуцирует митогенактивированную протеинкиназу и несколько биохимических путей. Общая сумма этих событий приводит к активации ингибитора ядерного фактора κВ-киназного комплекса, запуская NF-κВ-активность [11]. Предполагается, что IL-33 выполняет и внутриклеточные функции без связывания с рецептором ST2L.

Растворимая форма sST2, связываясь с IL-33, блокирует взаимодействие между IL-33 и ST2L путем ограничения активации инициируемого каскада реакций, запускаемых при взаимодействии IL-33 и ST2L, блокируя тем самым их клеточные функции. Так, sST2 считается приманкой для рецептора (см. рисунок) [18, 23].

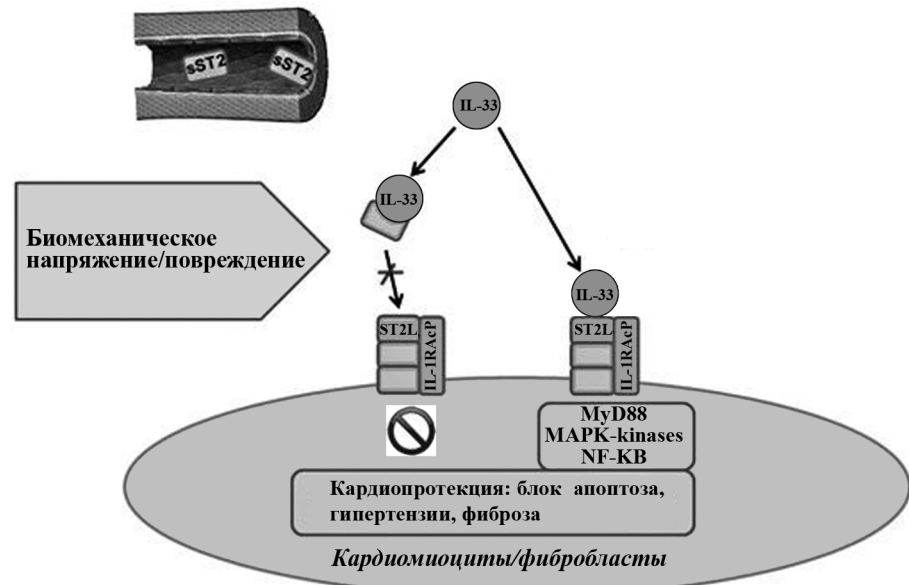
Таким образом, ST2 функционирует не только в качестве медиатора IL-33 с трансмембранной изоформой ST2L, но и в качестве ингибитора IL-33 через растворимую изоформу ST2. Кроме того, IL-33, как предполагается, регулирует транскрипцию мРНК как ST2L, так и sST2, увеличивая экспрессию первого при одно-

временном снижении второго [24]. Так осуществляется обратное влияние между цитокинами и ST2.

ST2 при воспалительных заболеваниях. Говоря о роли ST2, наиболее известны его эффекты как маркера воспалительных и иммунных процессов, в частности в отношении регуляции тучных клеток и Th 2-го типа CD4+ (Th2), а также продукции Th2-ассоциированных цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) [11, 18, 25]. IL-33/ST2 участвует в иммунной реакции путём активации Th2-эффекторных клеток и высвобождения Th2-связанных цитокинов.

Было показано, что у мышей с отсутствием гена *IL-4* на поверхности зрелых клеток Th2 экспрессируется ST2L [11], хотя способность активировать Th2-цитокин в ответ на антиген снижена по сравнению с аналогами дикого типа с наличием гена *IL-4* [11, 18, 26]. Мыши с базальным уровнем ST2 нормально развиваются и демонстрируют созревание Th2-клеток, но у них наблюдаются изменённые Th2-опосредованные ответы при специфическом взаимодействии антиген—антитело. Они способны индуцировать ответ IL-4 и IgE на инфекцию, что эквивалентно их аналогам дикого типа [11, 27], но не образовывать гранулёмы в ответ на внутривенную инъекцию яиц паразита — возбудителя инфекции [11, 28]. Эти данные позволяют предположить, что продуцирование ST2L и IL-4 может служить маркером для различных субпопуляций клеток Th2 [26] или параллельных комплементарных систем. Каждый из них является достаточным, но не необходимым для инициации иммунных ответов Th2 на антиген [11].

Так, роль IL-33/ST2 была продемонстрирована при различных заболеваниях, связанных с иммунным ответом по типу Th2, таких как астма, лёгочный фиброз, ревматоидный артрит, коллагеновые сосудистые заболевания, сепсис, травмы, злокачественные опухоли, фибропролиферативные заболевания, глистные инфекции



Схематическое изображение сигналинга IL-33 и его взаимодействия с трансмембранным рецептором ST2L и растворимым рецептором sST2.

IL-33 проявляет свои функции посредством связывания комплекса рецептора ST2L и белка IL-1R (IL-1RAcP). При миокардиальном стрессе сигналинг IL33/ST2 связан с кардиопротективным действием через ST2L. Растворимая или циркулирующая изоформа (sST2), связываясь с IL-33, блокирует IL-33/ST2L-сигналинг.

и язвенный колит. Таким образом, можно заключить, что ST2L опосредует эффект IL-33 в Th2-зависимых воспалительных процессах, в то время как sST2 выступает в качестве антагониста и ингибирует воспалительные реакции Th2-типа [11, 18].

Роль ST2 в миокардиальном стрессе. Показано, что система IL-33/ST2 активируется в ответ на миокардиальный стресс. При этом в ответ на механическое напряжение кардиомиоцитами и фибробластами вырабатывается как ST2L, так и sST2 [18, 23]. Доказательства, подтверждающие этот факт, получены в экспериментальных и клинических исследованиях. В ранней работе E. Weinberg и соавт. [15] неонатальные кардиомиоциты крыс подвергались циклической деформации. Были проанализированы тысячи генов транскрипторов, из которых ST2 был самым высокоиндуцированным в ответ на биомеханический стресс, причём как растворимая его форма, так и мембраносвязанная.

Анализ кардиомиоцитов и сердечных фибробластов новорождённых крыс показал, что экспрессия генов IL-33 и sST2 была более чем в 5 раз больше в сердечных фибробластах, чем в кардиомиоцитах. Кроме того, экспрессию IL-33 и sST2 индуцирует либо циклическое биомеханическое напряжение, либо ангиотензин II в клетках обоих типов [12]. На экспериментальной модели инфаркта миокарда (ИМ) у крыс было показано, что экспрессия ST2 в миокарде и экспрессия сывороточного ST2 была резко повышена [15, 29]. На другой модели высокого давления в полости левого желудочка IL-33 синтезировался сердечными фибробластами в ответ на биомеханическое напряжение [12].

Таким образом, и сердечные фибробласты, и кардиомиоциты экспрессируют IL-33 и sST2, и уровень экспрессии увеличивается в ответ на стресс и биомеханическое напряжение. Эта теория подтверждается и клиническими исследованиями, в которых высокое содержание sST2 было неоднократно обнаружено у пациентов с острым ИМ и острой сердечной недостаточностью (ОСН) и коррелировало с размером зоны ИМ, сердечной дисфункцией, нарушением гемодинамики и нейрогормональными расстройствами [15, 30—34].

IL-33/ST2L-кардиопротективный эффект. Кардиопротективный эффект при связывании IL-33 и ST2L был продемонстрирован на экспериментальных моделях. Кардиопротективные эффекты этого взаимодействия заключаются в снижении степени фиброза миокарда, предотвращении гипертрофии кардиомиоцитов, снижении апоптоза и улучшении функциональной способности миокарда [18]. На экспериментальной модели также показано, что IL-33 является антагонистом ангиотензин II-индуцированной и фенилэфрининдуцированной гипертрофии кардиомиоцитов [12], в то время как на модели мышей, подвергшихся перегрузке давлением желудочков, лечение с помощью IL-33 снижало гипертрофию миокарда, фиброз, экспрессию натрийуретических пептидов, желудочковую дисфункцию и преждевременную смертность [12]. Важно отметить, что в условиях гипоксии IL-33 дает антиапоптотический эффект, защищая культуральные кардиомиоциты [35]. На модели ишемии/реперфузии миокарда у крыс лечение IL-33 снижало размер зоны инфаркта и фиброза и улучшало желудочковую дилатацию, сократительную функцию и выживаемость мышей дикого типа вследствие подавления активности каспазы-3 и повышения экспрессии «ингибитора апоптоза» семейства белков со сдвигом в сто-

рону Th2-ответа. Однако кардиопротективные эффекты IL-33 проявлялись в зависимости от дозы лечения [35].

Благоприятные эффекты IL-33 опосредуются специфическим взаимодействием с рецептором ST2L. Блокирование рецептора ST2L анти-ST2L-моноклональными антителами блокировало антигипертрофические и антиапоптотические эффекты IL-33 в кардиомиоцитах [12, 35]. Кроме того, у ST2L-животных польза IL-33 утрачена: в отличие от животных дикого типа у ST2L-мышей наблюдалась более выраженная гипертрофия левого желудочка, более выраженная дилатация, снижение фракционного выброса, более выраженный фиброз, высокий уровень натрийуретических пептидов и низкая выживаемость [12, 35]. Таким образом, кардиопротективные эффекты возможны только при взаимодействии IL-33 с ST2L-рецептором, что подтверждает роль IL-33/ST2L в фибробласт-кардиомиоцитарных перекрестных реакциях при биомеханической перегрузке и миокардиальном повреждении [12, 35].

sST2 как патофизиологический медиатор. В отличие от кардиопротекторного эффекта IL-33/ST2L высокий уровень sST2 блокирует защитные эффекты IL-33. Так, белок sST2 экспрессируется в зависимости от степени антигипертрофического эффекта IL-33 в кардиомиоцитах, стимулированных ангиотензином II или фенилэфрином [12]. Уменьшение уровня свободного IL-33 было отмечено после предварительной инкубации с sST2-Fc. В условиях гипоксии IL-33 снижал апоптоз кардиомиоцитов, но добавление sST2 ингибировало этот кардиопротективный эффект [35]. Защитные эффекты IL-33 могут быть также нейтрализованы нейрогормональным фактором эндотелином-1, который повышает экспрессию sST2 и ингибирует IL-33 путем передачи сигнала через p38 MAP-киназу [36]. Эти данные свидетельствуют о том, что растворимая форма ST2 способна изолировать IL-33 и, таким образом, нарушать сигналы IL-33/ST2L. Тем не менее данных, полученных в ходе исследований в естественных условиях, недостаточно. На модели острого ИМ у крыс экспрессия sST2 в миокарде была резко выражена в течение первых 4 нед и коррелировала с процессами фиброза и воспаления [29]. На других моделях лечение антагонистами рецепторов минералокортикоидов усиливало IL-33/ST2-сигнализацию со снижением экспрессии sST2 в инфарктзависимой области, что коррелировало с более низким уровнем экспрессии маркеров фиброза и воспаления [37].

sST2 синтезируется не только сердечными фибробластами и кардиомиоцитами в ответ на повреждение или стресс, но и возможна внемиокардиальная продукция sST2, которая осуществляется эндотелиальными клетками макро- (аорта и коронарные артерии) и микрососудов сердца [38, 39]. Вклад экстракардиальной экспрессии ST2 в общий циркулирующий объем стимулирующего фактора и патофизиологию сердечной недостаточности в целом до конца не установлен и требует дальнейшего изучения.

ST2 и атеросклероз. Экспрессия IL-33 и ST2 установлена в нормальных и поражённых атеросклерозом мышечных и человеческих клетках и тканях. Известно, что атеросклероз развивается по типу иммунного ответа Th1, IL-33/ST2L, проявляя протективные эффекты, переключает Th1-путь на Th2. На модели атеросклероза у apoE^{-/-} мышей на высокожировой диете было показано, что лечение IL-33 редуцировало размер атеросклеротических бляшек и макрофагов, снижало аккумуляцию

T-клеток в синусе аорты, индуцировало Th2-зависимые цитокины и специфические антитела к окислительно-модифицированным липопротеинам низкой плотности в сыворотке крови и лимфатических узлах [40]. Также было показано, что сопутствующее лечение sST2 вызывало значительное увеличение атеросклеротической бляшки и повышение Th1-ответа [40]. Эти данные указывают на потенциальную роль ST2 в развитии сердечно-сосудистого риска за пределами сердца. Учитывая связь между концентрацией sST2 и риском систолической гипертензии (сама по себе связана с увеличением сосудистой жесткости), можно считать актуальным дальнейшее исследование патофизиологической роли IL-33/ST2 за пределами сердца.

Концентрации растворимого ST2 и факторы сердечно-сосудистого риска. На данный момент проведено несколько исследований, в которых изучалась взаимосвязь концентрации растворимого ST2 и сердечно-сосудистых ФР в общей популяции. Это связано с тем, что концентрации ST2 у больных без ССЗ, как правило, ниже, чем при наличии ССЗ [1, 9]. До того как появились высокочувствительные методы определения концентрации sST2, с помощью существующих методов исследования было невозможно обнаружить аналит у значительного процента пациентов. Благодаря разработке более чувствительных и высокоточных методов стала возможна оценка биомаркера даже в случаях заболеваний сердечно-сосудистой системы без клинических проявлений [9, 41].

Так, концентрация ST2 была измерена у 3450 участников Фрэммингемского исследования. Возрастные и половые специфические ограничения изучали на здоровых участниках исследования без серьезных сопутствующих заболеваний [42]. Содержание sST2 было прямо связано с более старшим возрастом, принадлежностью к женскому полу, наличием АГ и СД. Другие исследования также подтверждают связь sST2 с СД и перекрестными факторами риска СД [43, 44]. Следует отметить, что хотя при астме ST2 повышается, никакой связи между уровнем растворимого ST2 с астмой или другими нарушениями легочной функции не было обнаружено. Несмотря на то что концентрация sST2 коррелирует с несколькими традиционными сердечно-сосудистыми ФР, уровень sST2 является наследственным, что было продемонстрировано в Фрэммингемском исследовании, в котором клинические факторы составляли лишь 14% межличностных различий по уровню ST2, в то время как на долю генетических факторов приходилось до 45% [21]. То, что клинические факторы не коррелируют с уровнем sST2, свидетельствует о том, что ST2 имеет патофизиологическую ценность независимо от традиционных факторов сердечно-сосудистого риска и может быть исследован как прогностический маркер.

Ассоциация уровня ST2 и ФР ССЗ хорошо исследована у пациентов с АГ, не имеющих диабета. Среди участников Фрэммингемского исследования (1834) с нормальным уровнем АД исходная концентрация ST2 была связана с развитием гипертензии в течение 3 лет [45]. У лиц с концентрацией sST2, соответствующей верхнему квартилю, наблюдалось 1,8-кратное увеличение вероятности развития АГ по сравнению с лицами, у которых уровень sST2 был низким (ОШ = 1,77; 95% ДИ 1,14—2,76; $p = 0,01$). Примечательно, что в данном исследовании уровень sST2 был связан только с прогрессированием систолического АД и пульса, но не диастолического

давления, что подтверждает связь между физиологической ролью ST2 и сосудистыми заболеваниями [40] и повышает вероятность развития систолической гипертензии на фоне прогрессирующего атеросклероза.

Растворимый ST2 как предиктор сердечно-сосудистых исходов. ST2 как предиктор сердечно-сосудистых исходов был изучен в 3 когортах взрослых лиц без ССЗ в крупномасштабных исследованиях, таких как Фрэммингемское [46], Dallas Heart Study [47], Cardiovascular Health Study [48]. Среди 3428 участников Фрэммингемского исследования (53% женщин), средний возраст которых составил 59 лет, в течение в среднем 11,3 года было показано, что растворимый ST2 ассоциировался с развитием сердечной недостаточности (ОШ = 1,45; 95% ДИ 1,23—1,70; $p < 0,001$) и смертностью от всех причин (ОШ = 1,32; 95% ДИ 1,20—1,46; $p < 0,001$) [46]. У лиц с высоким уровнем растворимого ST2 наблюдалось 2,5-кратное увеличение риска сердечной недостаточности по сравнению с лицами, у которых были низкие концентрации ST2. sST2 в сочетании с фактором роста дифференциации 15, высокочувствительным тропонином-I, натрийуретическим пептидом В-типа и С-реактивным белком при мультимаркерном подходе оставался независимым предиктором исходов. Более того, такой мультимаркерный подход улучшал сердечно-сосудистый прогноз и при включении в модель клинических ФР [46].

В Dallas Heart Study в течение 8,3 года под наблюдением находились 3294 человека. Однако уровень sST2 измеряли с использованием менее чувствительного метода, и у большинства лиц не оценивали уровень sST2. Так, в отличие от данных по другим когортам концентрация sST2 не была связана с традиционными ФР ССЗ. Между тем базовый уровень sST2 ассоциировался со смертностью от всех причин (ОШ = 2,1; 95% ДИ 1,4—3,2; $p = 0,0009$), но не от ССЗ [47]. Используемый метод в Dallas Heart Study отличался от применявшегося в Фрэммингемском исследовании, чем, вероятно, и объясняются некоторые расхождения в результатах [47].

В Cardiovascular Health Study, проведенном относительно недавно, уровень ST2 анализировали у 3915 участников без ССЗ [47]. В ходе наблюдения в течение 13,6 года установлено, что исходный уровень ST2 ассоциировался с развитием сердечно-сосудистых нарушений. В частности, уровень sST2 в верхнем квартиле имел большую связь с риском сердечной недостаточности (ОШ = 1,34; 95% ДИ 1,10—1,63; $p < 0,001$) и смертностью от сердечно-сосудистых причин (ОШ = 1,40; 95% ДИ 1,13—1,72; $p < 0,001$) по сравнению с уровнем в низком квартиле.

В проведенном нами ранее исследовании было показано, что высокий уровень ST2 при ИМ был более информативным показателем при оценке риска развития внутрибольничных осложнений заболевания: ранней постинфарктной стенокардии, нарушения ритма, рецидивов ИМ, ОЧН II—IV класса по Killip (ОШ = 1,7; 95% ДИ 1,6—2,8; АУС = 0,78; $p = 0,003$) по сравнению с NT-proBNP (ОШ = 1,2; 95% ДИ 1,1—1,6; АУС = 0,69; $p = 0,034$). Однако определение концентрации ST2 в комбинации с NT-proBNP увеличивало их диагностическую значимость (ОШ = 1,92; 95% ДИ 1,7—3,2; $p = 0,012$) [33]. При ИМ происходит активация гуморального и клеточного звеньев иммунного ответа, являющихся необходимым условием для рубцевания зоны некроза и способствующих увеличению уровня ST2. Кроме того,

повышение концентрации, по-видимому, обусловлено выраженной декомпенсацией гемодинамики и активацией провоспалительного статуса в условиях ишемии/реперфузии [33].

Позже было показано, что высокий уровень стимулирующего фактора ST2 ассоциируется с развитием дезадаптивного типа ремоделирования и позволяет прогнозировать риск его развития (ОШ = 4,5; 95% ДИ 2,0—10,1; $p = 0,011$; АУС составила 0,81, чувствительность — 78,7%, специфичность — 69,4%), причем с большей чувствительностью и специфичностью чем с NT-proBNP (ОШ = 2,3; 95% ДИ 2,0—2,01; $p = 0,032$; АУС составила 0,68, чувствительность — 69,5%, специфичность — 65,9%) [34].

Суммируя результаты этих исследований, можно заключить, что уровень sST2 в общей популяции является прогностическим в оценке риска сердечно-сосудистых исходов вне зависимости от традиционных ФР и, вероятно, также не зависит от других сердечно-сосудистых биомаркеров (это предмет дальнейшего изучения), а также может быть потенциальным маркером в оценке риска развития кардиоваскулярных осложнений.

ST2: вопросы без ответов и взгляд в будущее. Несмотря на то что многое относительно физиологической роли IL-33/ST2 и его роли в развитии сердечно-сосудистой патологии было изучено, необходимо более глубокое понимание патофизиологической значимости ST2. Учитывая, что белки IL-33/ST2L/sST2 выполняют разные функции в различных клетках и биологических системах, требуется более глубокое понимание их значения в регулировании этих процессов. Источник(и) циркулирующего ST2, помимо сердца, требует более четкой идентификации. Учитывая прогностическую роль sST2 в оценке развития заболеваний широкого диапазона, разумно предположить, что в этих процессах важную роль играет сосудистый эндотелий, и это предмет дальнейшего изучения. Помимо понимания патофизиологии ST2, не менее интересным является изучение возможного терапевтического вмешательства на основе стимуляции функции IL-33/ST2L с потенциальной функциональной редукцией sST2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—33, 35—48 см. REFERENCES)

34. Дылева Ю.А., Груздева О.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Федорова Н.В., Чернобай А.Г., Каретникова В.Н., Косарева С.Н., Кашгалап В.В., Федорова Т.С., Барбараш О.Л. Значение стимулирующего фактора роста ST2 и NT-proBNP в оценке постинфарктного ремоделирования сердца. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 12(128): 63—71.

REFERENCES

1. Ho J.E., Sritara P., deFilippi C.R., Wang T.J. Soluble ST2 Testing in the General Population. *Am. J. Cardiol*. 2015; 115.
2. Stone N.J., Robinson J., Lichtenstein A.H., Merz C.N., Blum C.B., Eckel R.H. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014; 129(25 Suppl 2): S1e45.
3. Goff D.C. Jr., Lloyd-Jones D.M., Bennett G., Coady S., D'Agostino

- R.B. Sr., Gibbons R. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014; 129(25 Suppl 2): S49e73.
4. Khot U.N., Khot M.B., Bajzer C.T., Sapp S.K., Ohman E.M., Brener S.J. et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA*. 2003; 290: 898e904.
5. Rose G. Strategy of prevention: lessons from cardiovascular disease. *Br. Med. J.* 1981; 282: 1847e1851.
6. Bayes-Genis A. ST2-Based Precision Medicine in Device Management: the Next Frontier Beyond MADIT-CRT? *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2016; 9(5-6): 419—20.
7. O'Donoghue M.L., Morrow D.A., Cannon C.P., Jarolim P., Desai N.R., Sherwood M.W. et al. Multimarker Risk Stratification in Patients With Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5: e002586.
8. Maisel A.S., Di Somma S. Dowe need another heart failure biomarker: focus on soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2). *European Heart Journal*. 2016; 0: 1—9. doi:10.1093/eurheartj/ehw462.
9. Maisel A.S., Richards A.M., Pascual-Figal D., Mueller C. Serial ST2 Testing in Hospitalized Patients With Acute Heart Failure. *Am. J. Cardiol*. 2015; 115(7): 32B-7B.
10. Kakkar R., Hei H., Dobner S., Lee R.T. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 6941e6948.
11. Kakkar R., Lee R.T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2008; 7(10): 827—40.
12. Sanada S., Hakuno D., Higgins L.J., Schreiter E.R., McKenzie A.N.J., Lee R.T. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(6): 1538—49.
13. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 1989; 258: 301e304.
14. Klemenz R., Hoffmann S., Werenskiold A.K. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 5708e5712.
15. Weinberg E.O., Shimp M., De Keulenaer G.W., MacGillivray C., Tominaga S., Solomon S.D. et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106: 2961e2966.
16. Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23: 479e490.
17. Bergers G., Reikerstorfer A., Braselmann S., Graninger P., Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 1994; 13: 1176e1188.
18. Pascual-Figal D.A., Januzzi J.L. The Biology of ST2: The International ST2 Consensus Panel. *Am. J. Cardiol*. 2015; 115(7 Suppl): 3B-7B.
19. Baba Y., Maeda K., Yashiro T., Inage E., Kasakura K., Suzuki R. et al. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 32689e32696.
20. Caporali A., Meloni M., Miller A.M., Vierlinger K., Cardinali A., Spinetti G. et al. Soluble ST2 is regulated by p75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia. *Arterioscler. Thromb. Biol.* 2012; 32: 149e160.
21. Ho J.E., Chen W.Y., Chen M.H., Larson M.G., McCabe E.L., Cheng S. et al. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(10): 4208—18.
22. Chackerian A.A., Oldham E.R., Murphy E.E., Schmitz J., Pflanz S., Kastelein R.A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J. Immunol.* 2007; 179: 2551e2555.
23. Daniels L.B., Bayes-Genis A. Using ST2 in cardiovascular patients: a review. *Future Cardiology*. 2014; 10: 525—39.
24. Schmieder A., Multhoff G., Radons J. Interleukin-33 acts as a pro-inflam-

- matory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. *Cytokine*. 2012; 60: 514e521.
25. Komai-Koma M., Xu D., Li Y., McKenzie A.N., McInnes I.B., Liew F.Y. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 2779—86.
 26. Kropf P., Herath S., Tewari R., Syed N., Klemenz R., Müller I. Identification of two distinct subpopulations of Leishmania major-specific T helper 2 cells. *Infect. Immun.* 2002; 70: 5512—20.
 27. Hoshino K., Kashiwamura S., Kuribayashi K., Kodama T., Tsujimura T., Nakanishi K. et al. The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1541—8.
 28. Townsend M.J., Fallon P.G., Matthews D.J., Jolin H.E., McKenzie A.N. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 1069—76.
 29. Sanchez-Mas J., Lax A., Asensio-Lopez M., Fernandez-Del Palacio M., Caballero L., Santarelli G. et al. Modulation of IL-33/ST2 system in post-infarction heart failure: correlation with cardiac remodeling markers. *Eur. J. Clin. Invest.* 2014; 44(7): 643—51.
 30. Weir R.A.P., Miller A.M., Murphy G.E.J., Clements S., Steedman T., Connell J.M.C. et al. Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55: 243e250.
 31. Shah R.V., Chen-Tournoux A.A., Picard M.H., vanKimmenade R.R.J., Januzzi J.L. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea. *Circ. Heart. Fail.* 2009; 2: 311e319.
 32. Januzzi J.L., Peacock W.F., Maisel A.S., Chae C.U., Jesse R.L., Bag-gish A.L. et al. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 607e613.
 33. Barbarash O., Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Belik E., Ak-basheva O., Karetnikova V., Shilov A. Prognostic Value of Soluble ST2 During Hospitalization for ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Ann. Lab. Med.* 2016; 36(4): 313—9.
 34. Dyleva Yu.A., Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G., Fedorova N.V., Chernobay A.G., Karetnikova V.N., Kosareva S.N., Kashtalov V.V., Fedorova T.S., Barbarash O.L. The value of the stimulating growth factor ST2 and NT-proBNP in the evaluation of postinfarction cardiac remodeling. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2015; 12(128): 63—71. (in Russian)
 35. Seki K., Sanada S., Kudinova A.Y., Steinhauser M.L., Handa V., Gannon J. et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ. Heart. Fail.* 2009; 2: 684e691.
 36. Yndestad A., Marshall A.K., Hodgkinson J.D., Tham E.L., Sugden P.H., Clerk A. Modulation of interleukin signalling and gene expression in cardiac myocytes by endothelin-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2010; 42: 263e272.
 37. Lax A., Sanchez-Mas J., Asensio-Lopez M., Fernandez-Del Palacio M., Caballero L., Garrido I. et al. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and IL-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *JACC Heart Fail.* 2015; 3: 50e58.
 38. Bartunek J., Delrue L., Van Durme F., Muller O., Casselman F., De Wiest B. et al. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J. Am. Coll. Car-diol.* 2008; 52: 2166e2174.
 39. Demyanets S., Kaun C., Pentz R., Krychtiuk K.A., Rauscher S., Pfaffenberger S. et al. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 60: 16e26.
 40. Miller A.M., Xu D., Asquith D.L., Denby L., Li Y., Sattar N. et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 339e346.
 41. Dieplinger B., Januzzi J.L. Jr., Steinmair M., Gabriel C., Poelz W., Haltmayer M. et al. Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2 in human plasma — the presage ST2 assay. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 409: 33e40.
 42. Coglianese E.E., Larson M.G., Vasan R.S., Ho J.E., Ghorbani A., McCabe E.L. et al. Distribution and clinical correlates of the inter-leukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study. *Clin. Chem.* 2012; 58: 1673e1681.
 43. Fousteris E., Melidonis A., Panoutsopoulos G., Tzirogiannis K., Foussas S., Theodosis-Georgilas A. et al. Toll/interleukin-1 receptor member ST2 exhibits higher soluble levels in type 2 diabetes, especially when accompanied with left ventricular diastolic dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.* 2011; 10: 101e108.
 44. Miller A.M., Purves D., McConnachie A., Asquith D.L., Batty G.D., Burns H. et al. Soluble ST2 associates with diabetes but not established cardiovascular risk factors: a new inflammatory pathway of relevance to diabetes? *PLoS One.* 2012; 7: e47830.
 45. Ho J.E., Larson M.G., Ghorbani A., Cheng S., Vasan R.S., Wang T.J. et al. Soluble ST2 predicts elevated SBP in the community. *J. Hyper-tens.* 2013; 31: 1431e1436.
 46. Wang T.J., Wollert K.C., Larson M.G., Coglianese E., McCabe E.L., Cheng S. et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovas-cular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2012; 126: 1596e1604.
 47. Chen L.Q., de Lemos J.A., Das S.R., Ayers C.R., Rohatgi A. Soluble ST2 is associated with all-cause and cardiovascular mortality in a population-based cohort: the Dallas Heart Study. *Clin. Chem.* 2013; 59: 536e546.
 48. Ginsberg E., Seliger S., Gottdiener J.S., Christenson R., End C., De-Filippi C. Soluble ST2 predicts incident heart failure and cardiovas-cular death in older adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63: A768.

Поступила 15.05.17
Принята к печати 25.05.17

НИКОТИНАМИД-ФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗА КАК МАРКЁР СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», 400138, Волгоград, Россия

Цель исследования — определение уровня висфатина (Namp1, никотинамид-фосфорибозилтрансферазы — НФРТ) в сыворотке крови здоровых добровольцев для установления уровня нормальных значений данного параметра, характерного для здоровых людей. Кроме того, данный параметр также был исследован и у пациентов с остеоартрозами (ОА). Мы обследовали 152 человека, из которых 92 пациента с первичным ОА и 60 практически здоровых лиц, составивших группу сравнения. Уровень НФРТ в сыворотке крови определялся непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем (RaiBiotech, cat. № EIA-VIS-1).

Средний уровень НФРТ в сыворотке крови у здоровых людей составил $2,43 \pm 0,17$ нг/мл ($M \pm m$). Уровень нормальных значений НФРТ у здоровых, определяемый как $M \pm 2\sigma$, составил от 0 до 5,07 нг/мл. Данные исследования подтвердили взаимосвязь между концентрацией НФРТ и выраженностью клинических проявлений ОА. Показано, что более высокий уровень НФРТ в сыворотке крови был характерен для пациентов с более тяжёлым клиническим течением заболевания. Полученные данные свидетельствуют о том, что высокий уровень НФРТ положительно коррелирует с более высокими концентрациями С-реактивного белка и СОЭ, что косвенно говорит в пользу провоспалительного характера действия НФРТ и подтверждает гипотезу о первичной роли системного воспаления в патогенезе ОА.

Ключевые слова: висфатин; никотинамид-фосфорибозилтрансфераза; адипокины; системное воспаление; остеоартроз.

Для цитирования: Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А. Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза как маркёр системного воспаления при остеоартрозе. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(10): 606-610. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-606-610>

Akhverdyan Yu.R., Zavadovsky B.V., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A.

THE NICOTINAMIDE-PHOSPHORIBOSILTRANSFERASE AS A MARKER OF SYSTEMIC INFLAMMATION UNDER OSTEOARTHRITIS

The research institute of clinical and experimental rheumatology, 400138 Volgograd, Russia

The purpose of study is to establish the level of visfatin (Namp1, nicotinamide-phosphoribosiltransferase) in blood serum of healthy volunteers for determination of the level of normal values of of the given parameter specific to healthy people. Besides, the given parameter also was analyzed in patients with osteoarthritis. The sampling consisted of 152 individuals. Out of them, 92 patients with primary osteoarthritis and 60 healthy individuals. The level of Namp1 in blood serum of healthy people was detected by using commercial test-systems (RaiBiotech, cat. № EIA-VIS-1). The average level of Namp1 in blood serum of healthy people made up to $2,43 \pm 0,17$ ng/ml ($M \pm m$). The level of normal values of Namp1 in healthy people detected as $M \pm 2\sigma$, made up to from 0 to 5.07 ng/ml. The study data proved the relationship between concentration of Namp1 and expression of clinical manifestations of osteoarthritis. It is demonstrated that higher level of Namp1 in blood serum was typical for patients with more severe clinical course of disease. The obtained data testify that high level of Namp1 correlates positively with higher concentrations of C-reactive protein and ESR that indirectly testifies in behalf of anti-inflammatory character of action of Namp1 and substantiates hypothesis about primary role of systemic inflammation in pathogenesis of osteoarthritis.

Key words: visfatin; nicotinamide-phosphoribosiltransferase; adipokine; systemic inflammation; osteoarthritis

For citation: Akhverdyan Yu.R., Zavadovsky B.V., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A. The nicotinamide-phosphoribosiltransferase as a marker of systemic inflammation under osteoarthritis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 606-610. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-606-610>

For correspondence: Akhverdyan Yu.R., candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of methods of treatments and prevention of diseases of joints. e-mail: doctor_2001@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.06.2017
Accepted 30.06.2017

Введение. На сегодняшний день остеоартроз (ОА) считается одним из наиболее распространённых заболеваний суставов [1], от которого страдают более 10% населения земного шара [2]. Длительное время считалось,

что основным признаком ОА являются дегенерация суставного хряща, структурные изменения субхондральной кости [3] с явлениями вторичного синовита. С учётом новых данных о патогенезе ОА современная концепция его развития предполагает принципиально новую роль хронического синовиального воспаления [4, 5], без которого невозможно прогрессирование деструкции хряща и которое имеет важное значение в развитии клинических про-

Для корреспонденции: Ахвердян Юрий Рубенович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов, e-mail: doctor_2001@mail.ru

явлений этого заболевания [6, 7]. Эта гипотеза подтверждается гистологическими данными, которые фиксируют наличие воспалительной реакции, приводящей к разрушению хряща при остеоартрозе, выраженной правда, в меньшей мере, чем при артритах [8].

Предполагается что продукты деградации хряща, обладая антигенными свойствами и попадая в синовиальную жидкость, вызывают воспаление в синовии, приводящее к нарушению обменных процессов в синовиоцитах. В процессе развития ОА из хрящевой ткани высвобождаются протеогликаны, продукты распада хондроцитов и коллагена, являющиеся антигенами, индуцирующими воспаление [9]. Медиаторы воспаления способствуют повышению проницаемости сосудов и усиленной трансфузии плазмы в синовиальную жидкость, что приводит к уменьшению концентрации гиалуроновой кислоты и снижению вязкоэластических свойств синовиальной жидкости [10].

Однако локальные воспалительные изменения в суставе при ОА нельзя рассматривать вне рамок системной воспалительной реакции. В настоящее время существует понятие системного воспаления (СВ или SIRS — systemic inflammatory response syndrome) [11, 12] как хронического вялотекущего воспалительного процесса. Активирующими факторами для СВ могут служить самые разнообразные агенты, например микробные, или продукты распада коллагена. По сути при СВ происходит генерализация повреждающих факторов и воспалительная реакция из местной становится системной [13]. При этом развиваются во многом шаблонные процессы, включая активацию системы гемостаза, эндотелиоцитов, лейкоцитов, тучных клеток и комплемента. Все данные процессы и механизмы, взаимосвязано развиваясь в параваскулярной и интраваскулярной среде, в конечном итоге приводят к одному глобальному результату — расстройству микроциркуляции [14].

Регулируют все эти сложнейшие механизмы взаимодействия биогенные амины, конечные продукты активации систем комплемента и гемостаза, свободные радикалы и множество прочих медиаторов.

В силу своей универсальности и конечной точки повреждения (микроциркуляторное русло) данный патологический процесс крайне актуален для целого ряда областей медицины. Например, синдром воспалительной реакции (SIRS — systemic inflammatory response syndrome) рассматривается как ключевое звено септических осложнений и приводит к полиорганной недостаточности пациентов реанимационных отделений [12].

В настоящее время существуют две противоположные точки зрения о последовательности развития реакций при СВ. Сторонники первой теории считают, что системная реакция запускается местным процессом, происходящим интраартериально. Пристеночные макрофаги в ответ на локальные стимулы продуцируют провоспалительные цитокины, которые в итоге и приводят к распространению повреждения из очага и системной реакции. Вторая теория причиной СВ считает экстраваскулярные стимулы (инфекция, ожирение, курение, гиподинамия и целый ряд других), которые и запускают системное вялотекущее хроническое воспаление. Однако сторонники обеих точек зрения признают ведущую роль цитокиновой системы в генерализации процесса [11].

В качестве маркеров воспаления традиционно рассматривают белки острой фазы, которые выполняют

функции медиаторов иммунной системы. К ним относят хорошо известные фибриноген, протромбин, церулоплазмин, С-реактивный белок (СРБ) и ряд других [13].

Продолжаются исследования сотен новых молекулярных факторов, ответственных за развитие системного воспаления, в первую очередь связанных с гормоноподобными веществами, выделяемыми белой жировой тканью. Большинство из них имеют провоспалительную природу. К ним относят классические цитокины, такие как IL-6, IL-1 и TNF α , а также адипокины (которые тоже являются разновидностью цитокинов): лептин, адипонектин, резистин, висфатин и др. [15].

Последние исследования связывают повышенные уровни висфатина (никотинамид-фосфорибозилтрансферазы, Nampt) со степенью тяжести ОА [16, 17]. У больных ОА выявлен повышенный уровень никотинамид-фосфорибозилтрансферазы (НФРТ) в синовиальной жидкости. Показано, что циркулирующие в сыворотке крови уровни висфатина выше у пациентов с ОА, чем в контрольной группе [18—20].

Таким образом, на сегодняшний день доказана важная роль адипокинов в целом (и никотинамид-фосфорибозилтрансферазы в частности) в патогенезе развития ОА, что требует дальнейшего изучения.

Целью данной работы было изучение среднего уровня НФРТ в сыворотке крови у здоровых людей, а также выявление возможной корреляции уровня НФРТ с тяжестью клинической симптоматики и классическими маркерами воспаления у пациентов с ОА.

Материал и методы. С целью уточнения отдельных вопросов патогенеза ОА мы определяли уровень НФРТ в сыворотке крови пациентов с ОА. Обследовали 152 человека: 92 пациента с первичным ОА и 60 практически здоровых людей, составивших группу сравнения.

Все пациенты проходили предварительный скрининг на соответствие критериям включения:

1. Возраст от 38 до 80 лет.
2. Наличие у пациента первичного ОА в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (1991 г.).
3. Индекс массы тела (ИМТ) от 25 до 29,9 кг/м².
4. Добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Любая крупная хирургическая операция или инфекция в течение последних 8 нед.
2. Тяжелая сопутствующая патология (почечная, печёночная, сердечная недостаточность, неконтролируемая артериальная гипертония, сахарный диабет, нарушения мозгового кровообращения), злокачественные новообразования и доброкачественные новообразования, склонные к прогрессированию, в том числе в анамнезе за 5 лет.
3. Злоупотребление алкоголем, психические заболевания, беременность и кормление грудью.
4. Лихорадочные состояния неясной этиологии, данные об активной форме туберкулёза, обнаружение поверхностного антигена вируса гепатита В, гепатита С или вируса иммунодефицита человека.

В исследование вошли пациенты, проходящие амбулаторное лечение в клинко-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ КиЭР» (Волгоград), а также больные, получавшие стационарное лечение в ревматологическом отделении ГУЗ «ГКБСМП № 25» Волгограда. Исследование продолжалось с 2011 по 2014 г. Все пациенты,

находившиеся под нашим наблюдением, обследовались как минимум дважды — при первичном обращении, а также по окончании курса лечения.

Всем больным проводилось полное клинико-лабораторное обследование, включающее сбор анамнеза, осмотр, лабораторные и инструментальные исследования. Комплекс лабораторных тестов включал общеклинический анализ крови и мочи, определение содержания СРБ, общего билирубина и трансаминаз, мочевой кислоты, мочевины и креатинина в сыворотке крови, а также липидного спектра крови.

Уровень НФРТ в сыворотке крови определяли непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем (RayBiotech, cat № EIA-VIS-1) до и после лечения.

Пациенты с различными формами ОА были в возрасте от 38 до 78 лет, из них 59 (64,1%) женщин (средний возраст $54,62 \pm 1,37$ года) и 33 (35,9%) мужчины (средний возраст $53,97 \pm 2,3$ года). Пациенты с ОА были сопоставимы по возрасту с группой здоровых (женщины — $p > 0,1$ и мужчины — $p > 0,1$). Большая часть обследованных была моложе 60 лет, т.е. была представлена лицами трудоспособного возраста.

Контрольную группу составили 60 практически здоровых лиц: 40 (66,67%) женщин и 20 (33,33%) мужчин в возрасте от 22 до 55 лет без жалоб на боли в суставах в

Таблица 1

ИМТ и уровень НФРТ в сыворотке крови у здоровых людей

Количество здоровых, абс (%)	ИМТ, кг/м ²	Средний уровень висфатина ($M \pm m$), нг/мл
30 (50)	<25	2,02 ± 0,17
30 (50)	25—29,9	2,84 ± 0,28

течение жизни. Средний возраст женщин составил $48,8 \pm 2,3$ года, мужчин — $46,35 \pm 2,30$ года. У 30 человек ИМТ был в пределах 18,5—24,9 кг/м², у 30 других — от 25 до 29,9 кг/м². Никто из данной группы не предъявлял жалоб, характерных для патологии суставов, и не имел заболеваний суставов в анамнезе.

Этическая экспертиза. Заключение № 2 Комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР» РАМН (протокол № 2 от 11.12.2014 г.).

Статистическая обработка данных клинического обследования проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA 10.0 для Windows». Количественные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия достоверности Стьюдента, категориальные данные — с использованием непараметрического критерия достоверности хи-квадрат. Достоверность различий между группами определяли с

Таблица 2

Зависимость концентрации НФРТ от клинических проявлений ОА

Клинические проявления	n = 92	Уровень НФР, нг/мл ($M \pm m$)	Достоверность различий с донорами, p	Достоверность различий между группами, p
Количество пораженных суставов				
Моно- и олигоартроз	44	3,68 ± 0,35	<0,001	0,003
Полиостеоартроз	48	4,73 ± 0,46	<0,001	
Форма заболевания:				
Узелковая	47	5,25 ± 0,62	<0,001	<0,001
Безузелковая	45	3,69 ± 0,38	<0,001	
Наличие синовита:				
С синовитом	39	5,23 ± 0,56	<0,001	<0,001
Без синовита	53	3,80 ± 0,48	<0,001	
Продолжительность заболевания:				
До 5 лет	20	3,74 ± 0,43	>0,05	0,319
6—10 лет	39	4,29 ± 0,51	<0,05	
11—15 лет	19	4,30 ± 0,45	<0,05	
Более 15 лет	14	5,05 ± 0,63	<0,05	
Рентгенологическая стадия:				
St I	19	3,8 ± 0,49	>0,05	0,001
St II	38	4,47 ± 0,78	>0,05	
St III	28	4,17 ± 0,43	<0,05	
St IV	7	5,69 ± 0,51	<0,001	
Степень функциональной недостаточности суставной системы:				
I	31	3,63 ± 0,31	>0,05	<0,001
II	29	4,17 ± 0,53	<0,05	
III	26	5,17 ± 0,48	<0,001	
IV	6	5,88 ± 0,58	<0,001	

Зависимость лабораторных показателей у пациентов с ОА от концентрации НФРТ в сыворотке крови

Лабораторные показатели ($M \pm m$)	1-я группа ($n = 28$) — с высоким уровнем НФРТ	2-я группа ($n = 64$) — с нормальным уровнем НФРТ	Достоверность (t, p)
СОЭ	$20,8 \pm 1,84$	$12,3 \pm 0,97$	$p < 0,001$
СРБ (норма — менее 5,0 мг/л)	$15,52 \pm 1,03$	$7,2 \pm 1,04$	$p < 0,001$

помощью дисперсионного анализа. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Нами была произведена оценка уровня НФРТ в сыворотке крови у здоровых обследуемых с целью установления уровня нормальных значений данного параметра, характерного для здоровых людей.

Средний уровень НФРТ в сыворотке крови у здоровых составил $2,43 \pm 0,17$ нг/мл ($M \pm m$). Уровень нормальных значений НФРТ у здоровых людей, определяемый как $M \pm 2\sigma$, составил от 0 до 5,07 нг/мл.

Была проанализирована зависимость уровня НФРТ от ИМТ. Данные представлены в табл. 1. Подтверждена достоверная разница уровней циркулирующего НФРТ в зависимости от ИМТ ($p < 0,05$).

Учитывая достоверную разницу уровня НФРТ в зависимости от ИМТ, мы рассчитали нормальные значения НФРТ для групп с ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м² и от 25 до 29,9 кг/м², они составили соответственно 0,14 — 3,9 и 0 — 5,9 нг/мл.

Лица с ИМТ более 29,9 кг/м² в исследование не включались.

Учитывая, что в исследовании участвовали пациенты с ОА с ИМТ 25—29,9 кг/м² в качестве нормальных значений в данном исследовании были приняты цифры 0—5,07 нг/мл.

Мы изучили также уровень НФРТ в сыворотке крови у больных ОА в зависимости от клинической картины заболевания. Данные представлены в табл. 2. Видно, что пациенты с высоким уровнем НФРТ в сыворотке крови достоверно чаще имели следующий симптомокомплекс: полиостеоартроз, наличие вторичного синовита, продолжительность заболевания более 5 лет, рентгенологическая стадия III и IV, функциональная недостаточность суставной системы II—IV степени. Вероятнее всего, повышение уровня НФРТ у больных с ОА связано с прогрессированием заболевания.

Нами были изучены лабораторные показатели, отражающие тяжесть ОА. Для выяснения клинико-патогенетического значения определения уровня НФРТ у пациентов с ОА, мы разделили больных на две группы. В 1-ю группу ($n = 28$) включены пациенты с повышенным уровнем НФРТ (более 5,9 нг/мл), во 2-ю ($n = 64$) — с показателями, соответствующими границе нормы (менее 5,9 нг/мл). В табл. 3 представлены данные об уровне СРБ, СОЭ в группах с высоким и нормальным уровнем НФРТ в сыворотке крови. Видно, что существует достоверная связь между уровнем НФРТ в сыворотке крови и лабораторными показателями при ОА. У пациентов, имеющих высокий уровень НФРТ, были выявлены более высокие концентрации СРБ и СОЭ, что косвенно подтверждает данные о наличии у НФРТ провоспалительных свойств.

Пациенты с повышенным уровнем НФРТ чаще имели вторичный синовит. У этих же больных в сыворотке крови отмечались более высокие показатели СОЭ и СРБ (табл. 3).

Таким образом, в результате нашего исследования выявлен целый ряд факторов, свидетельствующих о негативном влиянии НФРТ на течение ОА. На наш взгляд, положительная корреляция между уровнем НФРТ и классическими маркерами воспаления, такими как СРБ и СОЭ, подтверждает роль НФРТ как медиатора воспаления. Об этом же говорит и корреляция высокого

уровня НФРТ в сыворотке крови с более тяжёлой клинической картиной ОА.

Известно, что НФРТ активизирует лейкоциты человека и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов. Возможно, это является одним из механизмов действия НФРТ при ОА. Повышенные концентрации НФРТ могут поддерживать и стимулировать системное воспаление.

В процессе исследования каких-либо нежелательных явлений отмечено не было.

Заключение. Из результатов нашего исследования следует, что средний уровень НФРТ у больных с ОА достоверно выше, чем у здоровых людей. Более высокий уровень НФРТ в сыворотке крови был характерен для пациентов с более тяжёлым клиническим течением заболевания (полиостеоартроз, узелковая форма, вторичный синовит, рентгенологическая стадия II—IV). Можно предположить, что у больных с ОА по мере прогрессирования заболевания повышается и уровень НФРТ.

Высокий уровень НФРТ положительно коррелировал с более высокими концентрациями СРБ и СОЭ, что косвенно говорит в пользу провоспалительного характера действия НФРТ.

Сфера возможного применения результатов исследования. В ходе исследования удалось уточнить отдельные звенья патогенеза ОА. Результаты исследования можно применить для повышения качества диагностики ОА, в частности, для прогнозирования тяжести течения заболевания, что требует дальнейшего изучения проблемы.

Кроме того, понимание роли НФРТ в патогенезе ОА дает стимул для создания специфических ингибиторов НФРТ, что открывает новые возможности терапии ОА. Учитывая что, НФРТ играет важную роль в развитии ревматологической патологии в целом и ОА в частности, дальнейшее изучение молекулярных механизмов активации НФРТ может привести к разработке новых терапевтических средств для лечения широкого спектра заболеваний.

Финансирование. Бюджетные средства ФГБНУ «НИИ КиЭР».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6—9, 14—20
см. REFERENCES)

- Зборовский А.Б., Мозговая Е.Э. Опыт лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов (Обзор литературы). *Доктор.Ру*. 2011; (7): 49—52.
- Насонова В.А., Мендель О.И., Денисов Л.Н. и др. Остеоартроз и ожирение: клинико-патогенетические взаимосвязи. *Профилактическая медицина*. 2011; (1): 29—37.
- Ревматические болезни (Руководство по внутренним болезням)*. Насонова В.А., Бунчук Н.В., ред. М.: Медицина; 1997.

4. Заводовский Б.В., Симакова Е.С., Сивордова Л.Е. *Адипокин-лептин в патогенезе остеоартроза*. LAPLAMBERT Academic Publishing, GmbH; 2013.
5. Полякова Ю.В., Симакова Е.С., Заводовский Б.В. и др. Клинико-патогенетическая роль висфатина в развитии воспалительных процессов при остеоартрозе. *Врач-аспирант*. 2012; 55 (6): 14—20.
10. Четина Е.В., Братыгина Е.А., Зайцева Е.М. и др. Прогнозирование течения остеоартроза по экспрессии гена *MTOR* (Mammalian Target of Rapamycin). *Научно-практическая ревматология*. 2012; (1): 27—32.
11. Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калюжин В.В., Афанасьева Д.С., Мурашев Б.Ю., Осихов И.А. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний. *Сибирский медицинский журнал*. 2013; (2): 5—9.
12. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6(4): 9—21.
13. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н. Системное воспаление — миф или реальность? *Вестник Российской Академии наук*. 2004; 74(3): 219—27.
8. Garnero P., Delmas P.D. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003; (15): 641—6.
9. Creamer P., Hochberg M.C. Osteoarthritis. *Lancet*. 1997; 350: 503—8.
10. Chetina E.V., Bratygina E.A., Zajceva E.M. i dr. Predicting the course of osteoarthritis by *MTOR* (Mammalian Target of Rapamycin) gene expression. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2012; (1): 27—32. (in Russian)
11. Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калюжин В.В., Афанасьева Д.С., Мурашев В.Ю., Осихов И.А. Systemic inflammation in the pathogenesis of the metabolic syndrome and its associated diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; (2): 5—9. (in Russian)
12. Gusev E.Yu., Chereshev V.A., Yurchenko L.N. Systemic inflammation from the position of a typical pathological process theory. *Citokiny i vospalenie*. 2007; 6(4): 9—21. (in Russian)
13. Chereshev V.A., Gusev E.Yu., Yurchenko L.N. Systemic inflammation — Myth or Reality? *Vestnik Rossiiskoy Akademii nauk*. 2004; 74(3): 219—27. (in Russian)
14. Kahaleh M.B., Fan P.S. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1997; (15): 163—7.
15. Conde J., Gomez R., Bianco G. et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011; 70(3): 551—9.
16. Duan Y., Hao D., Li M. et al. Increased synovial fluid visfatin is positively linked to cartilage degradation biomarkers in osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2012; 32(4): 985—90.
17. Gómez R., Conde J., Scotece M. et al. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011; 7(9): 528—36.
18. Ozgen M., Koca S.S., Aksoy K. Visfatin levels and intima-media thicknesses in rheumatic diseases. *Clin Rheumatol*. 2011; 30(6): 757—63.
19. Tilg H., Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; (6): 772—83.
20. Toussiroot, E., Streit G., Wendling D. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14(10): 1095—1100.

REFERENCES

1. Zborovsky A.B., Mozgovaya Ye.E. Experience of treatment of degenerative joint diseases (literature review). *Doktor.Ru*. 2011; (7): 49—52. (in Russian)
2. Nasonova V.A., Mendel O.I., Denisov L.N. i dr. Osteoarthritis and obesity: clinical and pathogenetic relationships. *Profilakticheskaya meditsina*. 2011; (1): 29—37. (in Russian)
3. *Rheumatic diseases (Guide to Internal Diseases) [Revmaticheskiye bolezni (Rukovodstvo po vnutrennim boleznyam)]*. Nasonova V.A., Bunchuk N.V., eds. Moscow: Meditsina, 1997. (in Russian)
4. Zavadovsky B.V., Simakova Ye.S., Sivordova L.Ye. The Adipokine-leptin and pathogenesis of osteoarthritis. LAPLAMBERT Academic Publishing, GmbH; 2013. (in Russian)
5. Polyakova Yu.V., Simakova Ye.S., Zavadovsky B.V. i dr. Clinico-pathogenetic role of visfatin in the development of inflammation in osteoarthritis. *Vrach-aspirant*. 2012; 55(6): 14—20. (in Russian)
6. Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Abramson S.B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthr. Rheum.* 2001; 44: 1237—47.
7. Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. Osteoarthritis: from molecule to man. *Arthritis Res*. 2002; (4): 13—9.

Поступила 19.06.17

Принята к печати 30.06.17

Уважаемые авторы и читатели журнала!

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

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.

ИММУНОЛОГИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.12-002.2:618.11-006.041-079.4

Агарков Н.М.¹, Макконен К.Ф.², Аксёнов В.В.¹, Ткаченко П.В.³, Иванов В.А.⁴, Иванов А.В.³, Субботина Т.И.⁵

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО САЛЬПИНГООФОРИТА И РАКА ЯИЧНИКОВ НА ОСНОВЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО И ДИСКРИМИНАНТНОГО МЕТОДОВ

¹ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», 305040, Курск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, Россия;

³ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Курск, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Курский государственный университет», 305000, Курск, Россия;

⁵ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», 300012, Тула, Россия

Рак яичников и хронический сальпингоофорит — лидирующие патологии женской половой сферы и основные причины заболеваемости и смертности женского населения. Цель исследования — отбор ведущих дифференциально-диагностических показателей системного клеточного иммунитета и проведение дифференциации больных раком яичников и хроническим сальпингоофоритом посредством дискриминантного метода. Дифференциальная диагностика рака яичников и хронического сальпингоофорита проведена у 92 и 87 пациенток соответственно по показателям системного клеточного иммунитета, изученным методом проточной цитометрии. Показано, что основными дифференциально-диагностическими показателями системного клеточного иммунитета при раке яичников и хроническом сальпингоофорите служат снижение относительного содержания натуральных киллеров, абсолютного числа В-лимфоцитов и Т-хелперов. Разработанные дискриминантные модели позволяют проводить безошибочную дифференциальную диагностику рака яичников и хронического сальпингоофорита в 91,8—92,1% случаев. Такой подход повышает качество дифференциальной диагностики рака яичников и хронического сальпингоофорита.

Ключевые слова: дифференциальная диагностика; рак яичников; хронический сальпингоофорит; системный клеточный иммунитет; метод проточной цитометрии; дискриминантный метод.

Для цитирования: Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксёнов В.В., Ткаченко П.В., Иванов В.А., Иванов А.В., Субботина Т.И. Дифференциальная диагностика хронического сальпингоофорита и рака яичников на основе иммунологического и дискриминантного методов. Клиническая лабораторная диагностика 2017; 62(10): 611-615. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-611-615>

Agarkov N.M.¹, Makkonen K.F.², Aksenov V.V.¹, Tkachenko P.V.³, Ivanov V.A.⁴, Ivanov A.V.³, Subbotina T.I.⁵

THE DIFFERENTIATED DIAGNOSTIC OF CHRONIC SALPINGOOPHORITIS AND OVARY CANCER ON THE BASIS OF IMMUNOLOGIC AND DISCRIMINANT TECHNIQUE

¹The South-Western state university, 305040 Kursk, Russia

²The Belgorodskii state national research institute, 308015 Belgorod, Russia

³The Kurskii state medical university, 305041 Kursk, Russia

⁴The Kurskii state university, 305000 Kursk, Russia

⁵The Tulskaia state university, 300012 Tula, Russia

The ovary cancer and chronic salpingoophoritis are among leading pathologies of female's sexual sphere and a main cause of morbidity and mortality of female population. The purpose of study was to select leading differential diagnostic indices of systemic cellular immunity and to carry out a differentiation of patients with ovary cancer and chronic salpingoophoritis using discriminant technique. The differentiated diagnostic of ovary cancer and chronic salpingoophoritis was applied to 92 and 87 patients correspondingly to indices of systemic cellular immunity and analyzed by flow cytometry technique. It is demonstrated that the main differential diagnostic indices of systemic cellular immunity in case of ovary cancer and chronic salpingoophoritis are decreasing of relative content of natural killers, absolute number of B-lymphocytes and T-helpers. The developed discriminant models permit to carry out in 91.8%-92.1% cases a faultless differentiated diagnostic of ovary cancer and chronic salpingoophoritis. The approach like that increases quality of differentiated diagnostic of ovary cancer and chronic salpingoophoritis.

Key words: differentiated diagnostic; ovary cancer; chronic salpingoophoritis; systemic cellular immunity; flow cytometry technique; discriminant technique

For citation: Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksenov V.V., Tkachenko P.V., Ivanov V.A., Ivanov A.V., Subbotina T.I. The differentiated diagnostic of chronic salpingoophoritis and ovary cancer on the basis of immunologic and discriminant techniques. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 611-615. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-611-615>

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

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

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 24.05.2017
Accepted 11.05.2017

Введение. В современных условиях состояние здоровья женщин, в том числе и репродуктивное, во многом определяет заболеваемость раком яичников (РЯ) и хроническим сальпингоофоритом (ХС), занимающих лидирующие позиции в структуре патологии женских половых органов. РЯ — одна из наиболее частых форм злокачественных новообразований женских половых органов [1—4]. Заболеваемость РЯ в последнее десятилетие в России составляет 17—20 случаев, а смертность — 10—12 случаев на 100 000 женского населения [5]. Смертность от РЯ в настоящее время остается стабильно высокой и занимает одно из первых мест в структуре смертности от заболеваний репродуктивной системы. Это обусловлено как бессимптомным течением заболевания на ранних стадиях и недостаточной специфичностью методов современной диагностики неопластических процессов яичников, так и отсутствием четко выделенных и патогномоничных дифференциально-диагностических симптомов РЯ, который следует дифференцировать с ХС.

ХС имеет неуклонное доминирование и высокую распространенность среди воспалительных заболеваний репродуктивной системы женщин [6—9]. ХС рассматривают как приоритетную медицинскую, социальную и экономическую проблему, приводящую к снижению трудоспособности и нарушению фертильности с формированием бесплодия [10]. В США ежегодно регистрируют более 1 млн случаев острого и хронического сальпингоофорита, что сопровождается прямыми и косвенными затратами в размере 4,2 млрд долларов в год [11]. ХС занимает первое место в структуре воспалительных заболеваний внутренних половых органов [12].

ХС и РЯ характеризуются активным вовлечением в патологический процесс иммунной системы, изменения которой следует в приоритетном плане учитывать при дифференциальной диагностике данных двух нозологий. Однако сравнительные исследования клеточного системного иммунитета при РЯ и ХС практически отсутствуют. Дифференциально-диагностических признаков системного клеточного иммунитета РЯ и ХС, в том числе выделенных посредством дискриминантного метода, в настоящее время отобрано недостаточное количество.

Цель исследования — отбор ведущих дифференциально-диагностических показателей системного клеточного иммунитета и проведение дифференциации больных РЯ и ХС посредством дискриминантного метода.

Материал и методы. В стационарных условиях обследованы 92 пациентки с РЯ II—III стадии и 87 пациентов с ХС. Исследуемые группы больных близки по возрастному составу, основным социально-демографическим и репродуктивным характеристикам. Диагноз РЯ и ХС устанавливали на основе клинического, иммунологического, гистологического и ультразвукового методов исследования. Содержание иммунокомпетентных клеток в периферической крови определяли методом проточной

цитометрии на цитофлюорометре «Cytomics FC 500» («Becton Dickinson», США) с помощью наборов моноклональных антител «Invitrogen Corporation Mouse anti-human»: СД3 (FITC), (МНСД 0301-4); СД4 (PE-CY5.5), (МНСД 0418); СД8 (PE-CY7), (МНСД 0812); СД16 (PE-TR), (МНСД 1612).

При статистическом анализе полученных данных производили расчёт среднеарифметических величин, их ошибок, показателей дезинтеграции по методике А.В. Завьялова [13]. При дифференциальной диагностике использовали также дискриминантный метод, посредством которого строили дискриминантные модели по показателям системного клеточного иммунитета с наибольшими величинами дезинтеграции. Для обработки данных применяли программу «Statistica 6.0», критерии Стьюдента и Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. Оценка результатов иммунного статуса у больных злокачественными новообразованиями яичников и ХС указывает на угнетение параметров иммунной системы как в первой, так и во второй клинической группах (табл. 1). Так, у больных РЯ особенно снижено абсолютное количество Т-хелперов, В-лимфоцитов, абсолютное и относительное число натуральных киллеров. Следует также отметить существенное уменьшение в периферической крови процентного содержания Т-супрессоров. Другие показатели иммунной системы при развитии РЯ снизились, но в меньшей степени. При ХС наблюдают достоверное уменьшение числа иммунокомпетентных клеток, однако их снижение носит менее выраженный характер. Репрезентативное, но менее выраженное снижение отмечено для относительного количества Т-лимфоцитов, абсолютного числа Т-лимфоцитов и относительного числа В-лимфоцитов в периферической крови больных ХС.

Одновременно у пациенток с раком шейки матки выявлено снижение уровня иммунорегуляторных Т-лимфоцитов [14]. Как процентное, так и абсолютное содержание клеток СД4+ и СД8+ было существенно ниже нормы в 1,6 и 2,1 раза. У пациенток с дисплазиями тяжелой степени и злокачественными опухолями шейки матки отмечены значительные сдвиги в субпопуляции лимфоцитов, проявляющиеся в том, что по мере прогрессирования злокачественного процесса выявляли снижение содержания общих Т-клеток (СД3+), Т-хелперов/индукторов (СД4+). При раке шейки матки II и III стадий иммунодепрессия более выражена: происходило минимальное уменьшение численности клеток с маркерами СД3+, СД4+ и снижалось количество СД8+, СД16+ и СД22+ лимфоцитов. Изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов отразились на соотношении СД4+/СД8+, что указывает на наличие хелперного дефекта. У больных РЯ также имеется иммунодепрессия, затрагивающая в основном Т-, НК-клеточное и фагоцитарное звено иммунитета [14]. При РЯ изменяется также содержание ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , и ФНО- α [15].

При поступлении в клинику в крови больных ХС выявлена супрессия Т-клеточного звена иммунитета, что

Таблица 1

Изменения иммунного статуса у пациенток с РЯ и ХС в периферической крови ($M \pm m$)

Иммунологический показатель, единица измерения	Рак яичников	Хронический сальпингоофорит	Различие
Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$0,7 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,08$	$p < 0,001$
Т-лимфоциты, %	$42,7 \pm 1,6$	$53,2 \pm 1,4$	$p < 0,001$
Т-супрессоры, $\times 10^9/\text{л}$	$0,2 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,02$	$p < 0,001$
Т-супрессоры, %	$13,5 \pm 0,9$	$24,1 \pm 1,4$	$p < 0,001$
Т-хелперы, $\times 10^9/\text{л}$	$0,2 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,07$	$p < 0,001$
Т-хелперы, %	$26,4 \pm 0,7$	$38,9 \pm 0,8$	$p < 0,001$
В-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$0,04 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,02$	$p < 0,001$
В-лимфоциты, %	$4,3 \pm 0,17$	$6,2 \pm 0,21$	$p < 0,001$
Натуральные киллеры, $\times 10^9/\text{л}$	$0,1 \pm 0,005$	$0,2 \pm 0,01$	$p < 0,001$
Натуральные киллеры, %	$2,4 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,8$	$p < 0,001$

проявлялось снижением количества Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток, НК-клеток и клеток-маркеров ранней активации и повышением количества клеток-маркёров фактора апоптоза [16].

Исследование показателей клеточного иммунитета позволило обнаружить при ХС снижение общего числа Т-лимфоцитов (CD3+) в сыворотке до $40,2 \pm 1,1\%$ [17]. Процентное содержание Т-хелперов/индукторов (CD4+) было также снижено до $30,6 \pm 1,4\%$. В то же время количество Т-супрессоров (CD8+) уменьшилось незначительно и достоверно не отличалось от контрольных значений. Помимо снижения Т-хелперов, незначительно снизился также уровень натуральных киллеров (CD16+).

При изучении клеточного и гуморального иммунитета у пациенток с ХС на фоне нормального числа лейкоцитов отмечен умеренный лимфоцитоз с повышением абсолютного содержания Т-лимфоцитов (CD3+),

Таблица 2

Дезинтеграция иммунологических показателей у больных РЯ и ХС

Иммунологический показатель, единица измерения	Рак яичников	Ранговое место	Хронический сальпингоофорит	Ранговое место
Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	3,8	6	3,1	6
Т-лимфоциты, %	4,2	5	4,0	4
Т-супрессоры, $\times 10^9/\text{л}$	2,1	8	0,9	8
Т-супрессоры, %	9,3	4	3,3	5
Т-хелперы, $10^9/\text{л}$	14,2	3	6,4	3
Т-хелперы, %	1,8	9	0,4	10
В-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	16,4	2	17,6	1
В-лимфоциты, %	1,7	10	0,5	9
Натуральные киллеры, $\times 10^9/\text{л}$	2,2	7	2,8	7
Натуральные киллеры, %	18,7	1	11,3	2
Сумма	74,4	—	50,3	—

Т-хелперов (CD4+) и снижением Т-супрессоров (CD8+), что сопровождалось дисбалансом иммунорегуляции за счет снижения Т-супрессии [18]. Функциональная активность Т-лимфоцитов (CD71, CD25) не повышалась, также как и активность гуморального иммунитета. Некоторое повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов характерно для адекватной функции иммунной системы при ХС.

Отбор дифференциально-диагностических показателей иммунной системы для рассматриваемых двух нозологических форм заболеваний путем определения параметров дезинтеграции (табл. 2) показывает, что к числу таких параметров следует отнести относительное содержание в периферической крови натуральных киллеров, абсолютное количество Т-хелперов и В-лимфоцитов. При РЯ наибольшая степень дезинтеграции присуща относительному содержанию натуральных киллеров в периферической крови. Второе и третье ранговые места при математическом ранжировании принадлежат соответственно абсолютному количеству В-лимфоцитов и Т-хелперов.

Показатель дезинтеграции при РЯ остается высоким для процентного содержания Т-супрессоров. Среди иммунологических показателей существенной стабильностью у пациентов с РЯ обладает относительное число Т-хелперов и В-лимфоцитов. У больных с ХС максимальная величина дезинтеграции установлена для абсолютного числа В-лимфоцитов. Значительно ниже по сравнению с другими показателями иммунного статуса в этой группе и в группе больных РЯ величина дезинтеграции для относительного количества натуральных киллеров и абсолютного числа Т-хелперов в периферической крови, которые занимают вторую и третью позиции соответственно. Низкой дезинтеграцией отличается процентное содержание В-лимфоцитов и Т-хелперов. В целом величина дезинтеграции у больных РЯ намного выше, чем при ХС.

Дискриминантные функции построены по показателям иммунологических исследований с наибольшей величиной дезинтеграции и имеющим приоритетное дифференциально-диагностическое значение среди параметров клеточного иммунитета крови. В математические модели вводили показатели Т-хелперов (абсолютное количество), абсолютного числа В-лимфоцитов и относительного числа натуральных киллеров, т.е. те показатели, которые по результатам выполненного анализа отличались наибольшей дифференциально-диагностической значимостью. Дискриминантная модель для больных РЯ с учётом параметров клеточного иммунитета на системном уровне описывает уравнение:

$$y_9 = 285,235x_{14} + 161,124x_{15} + 25,742x_{16} - 691,247, \text{ где}$$

y_9 — больные РЯ;

x_{14} — содержание абсолютного числа Т-хелперов в периферической крови;

x_{15} — абсолютное количество В-лимфоцитов в периферической крови;

x_{16} — процент натуральных киллеров в периферической крови.

Для пациентов с ХС разработанная математическая модель имеет вид:

$$y_{10} = 192,244x_{14} + 111,953x_{15} + 18,436x_{16} - 362,456, \text{ где}$$

y_{10} — больные ХС;

x_{14} — x_{16} — показатели клеточного иммунитета, аналогичные больным РЯ.

Таблица 3

Параметры расстояния Махаланобиса для дифференциальной диагностики больных РЯ и ХС по показателям клеточного иммунитета в периферической крови

Код признака	Observed	G_1:0	G_2:1
1	G_1:0	0,745	4149,634
2	G_1:0	0,821	4235,871
3	G_1:0	1,345	4095,354
4	G_1:0	0,318	4116,637
5	G_1:0	0,908	4058,387
6	G_1:0	2,115	4271,455
7	G_1:0	0,943	4044,106
8	G_1:0	0,806	4020,287
9	G_2:1	3815,781	3,836
10	G_2:1	4126,944	0,971
11	G_2:1	4018,598	0,125
12	G_2:1	4246,221	1,284
13	G_2:1	4315,824	3,287
14	G_2:1	4097,873	1,854
15	G_2:1	4142,631	0,246
16	G_2:1	4167,808	1,117

Качество созданных математических моделей соответствует необходимым требованиям и подтверждена результатами контрольных испытаний (табл. 3). При этом удельный вес больных РЯ, ошибочно отнесённых к ХС, составляет 8,2%. Доля пациентов с ХС, дифференцированных как представители с РЯ, составляет 7,9%.

Заключение. На основе иммунологического обследования больных РЯ и ХС установлено, что основными достоверными дифференциально-диагностическими критериями среди изученных параметров системного клеточного иммунитета при РЯ и ХС служит снижение относительного содержания натуральных киллеров, абсолютного числа В-лимфоцитов и Т-хелперов в периферической крови. По данным показателям с помощью дискриминантного метода разработаны дискриминантные модели, позволяющие проводить безошибочную дифференциальную диагностику РЯ и ХС в 91,8—92,1% случаев.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Генинг С.О., Пирмамедова С.С. Модель уточняющей диагностики стадий рака яичников. *Казанский медицинский журнал*. 2012; 93(5): 739—43.
2. Борисов К.Е. Ведущая роль топотекана в лечении платинорезистентных рецидивов рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2012; (1): 102—13.
3. Вовк А.В., Шаназаров Н.А. Хирургическое и химиотерапевтическое лечение распространенного рака яичников. *Фундаментальные исследования*. 2011; (6): 222—6.
4. Buys S.S., Partridge E., Black A., Johnson C.C., Lamerato L., Isaacs C. et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *JAMA*. 2011; 305(22): 2295—303.

5. Жаров А.В., Кравченко Г.Р., Чернова Л.Ф. Губайдулина Т.Н. Результаты комплексного лечения больных с распространёнными формами рака яичников с включением в схему терапии препарата промисан. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2011; (2): 83—9.
6. Денисова Е.Д., Аполихина И.А., Булгакова Н.Н. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия: возможности применения при заболеваниях нижних отделов половых путей. *Акушерство и гинекология*. 2010; (3): 17—20.
7. Серов В.Н., Царегородцева М.В. Аутоиммунный оофорит воспалительного генеза и репродуктивная функция. *Акушерство и гинекология*. 2009; (1): 32—5.
8. Singh R., Joshi D., Sharma S.M., Singh P., Gangane N. Xanthogranulomatous salpingitis with enterobial appendicitis. *J. Obstet. Gynaecol*. 2011; 31(1): 95—6.
9. Zorzi M.G., Pusioli T., Pisciolli F. Appropriate use of the term «pseudoxanthomatous salpingiosis» in gynecological practice. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol*. 2009; 36(4): 271.
10. Горин В.С., Сагинор М.Е., Мальгинская Н.А., Бирюкова Л.А., Мальгинский М.Л. Принципы диагностики и терапии гнойных воспалительных заболеваний придатков матки. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2008; 8(5): 30—7.
11. Quan M. Pelvic inflammatory disease: diagnosis and management. *J. Am. Board Fam. Pract*. 2004; 7(2): 110—23.
12. Газазян М.Г., Сухих Н.В., Хардинов А.В. Оптимизация диагностики и лечения хронических сальпингоофоритов. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2009; 9(3): 67—71.
13. Завьялов А.В., Газазян М.Г., Афанасьев Ю.П. Перестройка интермодальных взаимоотношений физиологических функций при беременности. *Физиология человека*. 1998; 14(1): 18—21.
14. Антонеева И.И. Кислородозависимая антимикробная система нейтрофилов в динамике развития рака яичников. *Казанский медицинский журнал*. 2008; 89(4): 476—8.
15. Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Бутов А.А., Корчагина И.А. и др. Способ уточняющей диагностики прогрессирующих форм рака яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (10): 32—6.
16. Конопля А.А., Евсегнеева И.В., Гаврилюк В.П., Караулов А.В. Нарушения иммунитета и их коррекция при хроническом сальпингоофорите. *Физиология и патология иммунной системы*. 2015; 19(9): 3—15.
17. Серов В.Н., Царегородцева М.В. Хронические воспалительные заболевания органов малого таза: оценка риска развития аутоиммунной овариальной недостаточности. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2008; 8(5): 4—9.
18. Евсеев А.А., Ганковская Л.В., Кузнецов М.В., Свитич О.А. Эффективность комплексного лечения пациенток с хроническим сальпингоофоритом при применении топической иммунотерапии. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2015; 15(5): 106—11.

REFERENCES

1. Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Gening S.O., Pirmamedova S.S. Model of specific diagnostics of ovarian cancer stages. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2012; 93(5): 739—43. (in Russian)
2. Borisov K.E. the Leading role of topotecan in the treatment of platanares-stetnih recurrence of ovarian cancer. *Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy*. 2012; (1): 102—13. (in Russian)
3. Vovk A.B., Shanazarov N.A. Surgical and chemotherapeutic treatment of advanced ovarian cancer. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; (6): 222—6. (in Russian)
4. Buys S.S., Partridge E., Black A., Johnson C.C., Lamerato L., Isaacs C. et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *JAMA*. 2011; 305(22): 2295—303.
5. Zharov A.V., Kravchenko G.R., Chernova L.F. Gubajdulina T.N. The results of complex treatment of patients with common forms of ovarian cancer with the inclusion in the scheme of treatment of the drug promisan. *Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy*. 2011; (2): 83—9 (in Russian)
6. Denisova E.D., Apolihina I.A., Bulgakova N.N. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy: application in diseases of the lower genital tract. *Akusherstvo i ginekologija*. 2010; (3): 17—20. (in Russian)

7. Serov V.N., Caregorodceva M.V. Autoimmune oophoritis of inflammatory Genesis and reproductive function. *Akusherstvo i ginekologija*. 2009; (1): 32—5. (in Russian)
8. Singh R., Joshi D., Sharma S.M., Singh P., Gangane N. Xanthogranulomatous salpingitis with enterobial appendicitis. *J. Obstet. Gynaecol.* 2011; 31(1): 95—6.
9. Zorzi M.G., Pusiol T., Pisciole F. Appropriate use of the term «pseudoxanthomatous salpingiosis» in gynecological practice. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2009; 36(4): 271.
10. Gorin V.S., Saginor M.E., Mal'tinskaja N.A., Birjukova L.A., Mal'tinskij M.L. Principles of diagnostics and treatment of purulent inflammatory diseases of uterine appendages. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2008; 8(5): 30—7. (in Russian)
11. Quan M. Pelvic inflammatory disease: diagnosis and management. *J. Am. Board Fam. Pract.* 2004; 7(2): 110—23.
12. Gazazjan M.G., Suhij N.V., Hardikov A.V. Optimization of diagnostics and treatment of chronic salpingoophoritis. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2009; 9(3): 67—71. (in Russian)
13. Zav'jalov A.B., Gazazjan M.G., Afanas'ev Ju.P. the restructuring of the intermodal relations of physiological functions during pregnancy. *Fiziologija cheloveka*. 1998; 14(1): 18—21. (in Russian)
14. Antoneeva I.I. Oxygen-dependent antimicrobial system of neutrophils in the development of ovarian cancer. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2008; 89(4): 476—8. (in Russian)
15. Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Butov A.A., Korchagina I.A. i dr. Method of clarifying the diagnosis of progressive forms of ovarian cancer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; (10): 32—6. (in Russian)
16. Konoplya A.A., Evsegneeva I.V., Gavriljuk V.P., Karaulov A.V. Disorders and their correction in chronic oophoritis. *Fiziologija i patologija immunnoj sistemy*. 2015; 19(9): 3—15. (in Russian)
17. Serov V.N., Caregorodceva M.V. Chronic inflammatory diseases of the pelvic organs: assessing the risk of development of autoimmune ovarian failure. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2008; 8(5): 4—9. (in Russian)
18. Evseev A.A., Gankovskaja L.V., Kuznecov M.V., Svitich O.A. the Efficiency of complex treatment of patients with chronic salpingoophoritis in the application of topical immunotherapy. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2015; 15(5): 106—11. (in Russian)

Поступила 24.05.17
Принята к печати 11.05.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.9-022.3-078:577.2.08

Рудакова С.А.¹, Рудаков Н.В.^{1,2}, Петрова Ю.А.¹, Березкина Г.В.^{1,2}, Околелова Н.А.¹, Коломеец А.Н.¹

ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ПАТОГЕНОВ В СНЯТЫХ С ПАЦИЕНТОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ КАК ОСНОВА ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ КЛЕЩЕВЫХ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора», 644080, Омск;

²ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644050, Омск

Комплексное молекулярно-биологическое исследование иксодовых клещей, снятых с людей в Омской области в весенне-летние периоды 2014—2016 гг., выявило их инфицированность возбудителями клещевых трансмиссивных инфекций и свидетельствует о существенном риске заражения населения. При исследовании клещей *I. persulcatus* частота выявления ДНК боррелий составила 59,5%, риккетсий — 30,6%, анаплазм и эрлихий — 5,9%. Инфицированность вирусом клещевого энцефалита, по данным выявления РНК, составила 3,3%. При исследовании клещей *D. reticulatus* в ПЦР ДНК риккетсий выявили в 20,5%, боррелий — в 6,6%, РНК вируса клещевого энцефалита — в 3,6% случаев, ДНК анаплазм и эрлихий не обнаружено. При секвенировании положительных на риккетсии проб наиболее часто идентифицировали *Rickettsia raoultii*. Обсуждены подходы к экспресс-диагностике и превентивной терапии клещевых трансмиссивных инфекций с учётом микст-инфицирования переносчиков и патогенетических особенностей возникающих нозологий. Требуется более широкого внедрения алгоритмы лабораторных исследований, регламентируемых СП 3.1.33-10—15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами».

Ключевые слова: клещевые трансмиссивные инфекции; риккетсии и риккетсиозы; экспресс-диагностика; превентивная терапия.

Для цитирования: Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Петрова Ю.А., Березкина Г.В., Околелова Н.А., Коломеец А.Н.

Экспресс-выявление молекулярно-биологическими методами патогенов в снятых с пациентов иксодовых клещах как основа превентивной терапии клещевых трансмиссивных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 615-618. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-615-618>

Rudakova S.A.¹, Rudakov N.V.^{1,2}, Petrova Yu.A.¹, Berezkina G.V.^{1,2}, Okolelova N.A.¹, Kolomeetz A.N.¹

THE MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS OF EXPRESS-DETECTION OF PATHOGENS IN TICKS TAKEN WAY FROM PATIENTS AS A BASIS OF PREVENTIVE THERAPY OF TICK TRANSMISSIBLE INFECTIONS

¹The Omskii research institute of feral nidal infections of the Rospotrebnadzor, 644080 Omsk, Russia

²The Omskii state medical university of Minzdrav of Russia, 644050 Omsk, Russia

Для корреспонденции: Рудаков Николай Викторович, д-р мед. наук, проф., директор ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», 644080, Омск; e-mail: rickettsia@mail.ru

*The complex molecular biologic study of ticks, took off from people in the Omskii oblast during Spring-Summer periods in 2014-2016 established their infection with agents of tick's transmissible infections and testifies a significant risk of infection of population. The analysis of ticks *I. persulcatus* established that rate of detection of DNA of borrelia made up to 59,5%, rickettsia - 30,6%, anaplasmae and erlichiae - 5,9%. The analysis of ticks *D. reticulatus* by polymerase chain reaction detected DNA of rickettsia in 20,5%, borrelia - in 6,6%, RNA of tick-borne encephalitis virus - in 3,6%. No DNA of anaplasmae and erlichiae was detected. During sequencing of tests positive to rickettsia the most often Rickettsia raoultii was identified. The approaches to express-diagnostic and preventive therapy of tick-born transmissible infections were substantiated with consideration for mixt-infection of agents and pathogenic characteristics of developing nosologies. The algorithms of laboratory analysis regulated by the Sanitary Regulations 3.1.33-10-15 "Prevention of infections transmitted by ticks" require a broader implementation.*

Key words: ticks' transmissible infections; rickettsia and rickettsiosis; express-diagnostic; preventive therapy

For citation: Rudakova S.A., Rudakov N.V., Petrova Yu.A., Berezkina G.V., Okolelova N.A., Kolomeetz A.N. The molecular biological methods of express-detection of pathogens in ticks taken way from patients as a basis of preventive therapy of tick transmissible infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 615-618. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-615-618>*

For correspondence: Rudakov N.V., doctor of medical sciences, professor, the director. e-mail: rickettsia@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.05.2017
Accepted 22.05.2017

Введение. Наличие сочетанных природных очагов клещевых трансмиссивных инфекций (КТИ) определяет риск заражения людей различными патогенами — вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), боррелиями, представителями порядка *Rickettsiales*, франциселлами, бабезиями и другими патогенными микроорганизмами. Это усложняет диагностику, лечение и профилактику инфекций, передающихся иксодовыми клещами, и требует комплексного подхода [1].

В России наиболее широко распространены и имеют наибольшее эпидемиологическое значение очаги клещевого энцефалита (КЭ) и иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), расположенные в лесных и (в меньшей степени) в лесостепных ландшафтах. Наряду с ними в переносчиках выявляют возбудителей клещевых риккетсиозов (КР), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ). Постоянный рост числа людей, контактирующих с природными очагами, ставит проблему клещевых трансмиссивных инфекций в ряд наиболее актуальных для отечественного здравоохранения.

Цель исследования — обоснование необходимости проведения экстренных диагностических и профилактических мероприятий в отношении лиц, обратившихся по поводу присасывания иксодовых клещей.

Материал и методы. Проведено комплексное исследование 506 экземпляров иксодовых клещей, снятых с людей в различных районах Омской области в весенне-летние периоды 2014—2016 гг. Исследованы 385 экземпляров имаго *Dermacentor reticulatus* (Koch, 1844) и 121 экземпляр *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930).

Выделение из клещей нуклеиновых кислот проводили наборами «АмплиПрайм РИБО-преп» («Интерлабсервис»). Исследования на наличие РНК ВКЭ, ДНК боррелий, риккетсий, эрлихий, анаплазм проводили с помощью ПЦР с использованием тест-систем «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва). Для амплификации ДНК риккетсий использовали праймеры: RP877p (GGG GAC CTG CTC ACG GCG G), RP1258n (ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A) и/или CS409d (CCT ATG GCT ATT ATG CTG GC), RP1258n, амплифицирующие фрагменты гена цитратсинтазы (*gltA*), и/или праймеры 190.70 (ATG GCG AAT ATT

TCT CCA AAA), 190.180 (GCA GCG ATA ATG CTG AGT A), 190.701 (GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT), амплифицирующие фрагмент гена *ompA* (ООО «Агентство Химэксперт», Россия). Выявление ДНК риккетсий проводили в ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Для идентификации риккетсий часть положительных ПЦР-продуктов секвенирована с использованием тех же праймеров. Секвеновую реакцию проводили с использованием реагентов BigDye Terminator v. 1.1. Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Секвенирование очищенных фрагментов проводили на генетическом анализаторе 3500xL (Applied Biosystems, США). Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей по степени гомологии с данными, представленными в базе данных GenBank, проводили с помощью поисковой системы «BLAST».

Результаты и обсуждение. При исследовании снятых с людей клещей *I. persulcatus* установлено, что уровень инфицированности клещей вирусом КЭ, по данным выявления РНК, составил 3,3%. Частота выявления ДНК боррелий в этих клещах методом ПЦР составила 59,5%. Частота выявления ДНК риккетсий составила 30,6%, причем в 11,8% исследованных клещей маркеры риккетсий обнаружены в сочетании с положительными результатами ПЦР на другие патогены (с вирусом КЭ — в 5,8%, с боррелиями — в 8,9%, с анаплазмами и эрлихиями — в 5,9%). ДНК анаплазм и эрлихий выявили у 5,9% исследованных переносчиков.

При исследовании клещей *D. reticulatus* в ПЦР РНК вируса КЭ выявили в 3,6% случаев, ДНК риккетсий — в 20,5%, ДНК боррелий — в 6,6% случаев. ДНК анаплазм и эрлихий в исследованных клещах *D. reticulatus* не обнаружено.

Часть образцов ДНК, давших положительный результат в ПЦР на риккетсии, исследована методом секвенирования. Всего идентифицировано 8 образцов ДНК, из них 7 проб риккетсий (*Rickettsia raoultii* — 5, *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* — 1, *Rickettsia slovacica* — 1). В одной пробе наряду с *R. raoultii* идентифицирована *Bartonella henselae*. Генетический материал *Candidatus R. tarasevichiae* выявлен в клеще *I. persulcatus* из Тарского района (зона подтайги), остальные идентифицированные пробы получены из клещей *D. reticulatus*: *R. raoultii*

— в клещах из Тарского (южная тайга), Называевского и Нижнеомского (лесостепь) районов, Павлоградского и Русско-Полянского (степная зона) районов; *R. slovaca* — из Нижнеомского района.

Пациентам с положительными результатами исследования снятых переносчиков в соответствии с СП 3.1.33-10—15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами» рекомендовано введение противоклещевого иммуноглобулина (при выявлении РНК вируса КЭ) или экстренная антибиотикопрофилактика (при выявлении ДНК боррелий, риккетсий, эрлихий, анаплазм). Поскольку антибиотикопрофилактику в соответствии с пунктами 3.4. и 7.3.2. данных СП необходимо проводить в максимально короткий срок (не более 72 ч с момента присасывания клеща), рекомендации по ее назначению конкретизируют по назначению врача с учетом результатов лабораторных исследований в ПЦР.

Применительно к риккетсиям видоспецифические ПЦР тест-системы до настоящего времени не выпускают, а идентификацию на основе определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов генов в короткие сроки провести затруднительно [2]. Результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о том, что на одних и тех же эндемичных территориях циркулирует несколько видов риккетсий разной патогенности для человека [3, 4]. По результатам настоящего исследования в снятых переносчиках в Омской области выявляли преимущественно *R. raoultii*, возможная роль которой в инфекционной патологии в России недавно описана [5].

С учётом общих патогенетических механизмов инфекционных процессов, вызываемых различными видами клещевых риккетсий [6], представляется целесообразным на эндемичных по КР территориях при положительных результатах ПЦР на риккетсии снятых переносчиков проводить экстренную антибиотикопрофилактику доксициклином.

По данным результатов проведенных трёхлетних исследований снятых переносчиков [7], суммарная частота выявления ДНК бактериальных патогенов (возбудителей КР, ГАЧ, МЭЧ, ИКБ, туляремии) составила в среднем 61,0% (от 44,5 до 71,5% в отдельные годы). С учётом этого крайне важной задачей на современном этапе становится расширение сети лабораторий, осуществляющих экспресс-исследование снятых переносчиков на комплекс клещевых патогенов, характерных для соответствующей местности, и последующая экстренная антибиотикопрофилактика у пациентов с присасыванием иксодовых клещей (при выявлении ДНК возбудителей КТИ) в соответствии с СП 3.1.33-10—15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами».

Правильное назначение препарата выбора крайне важно у лихорадящих больных с неясной клинической картиной после присасывания иксодовых клещей при отсутствии лабораторного подтверждения этиологии заболевания [8]. При отрицательных результатах лабораторных исследований на КЭ, учитывая частую микст-инфицированность иксодовых клещей бактериальными патогенами, для эмпирической терапии до лабораторного подтверждения диагноза по назначению врача возможно применение обладающего широким спектром активности в их отношении доксициклина.

Анализ полученных результатов исследований снятых переносчиков позволяет сделать вывод о широком спектре выявляемых клещевых патогенов при наиболь-

шей эпидемиологической значимости выявления в клещах *I. persulcatus* боррелий и вируса КЭ.

Заключение. Комплексное молекулярно-биологическое исследование показало наличие инфицированности снятых с людей иксодовых клещей на территории Омской области возбудителями клещевых трансмиссивных инфекций (КЭ, ИКБ, КР, ГАЧ, МЭЧ), что подтверждает существование и активное функционирование сочетанных природных очагов, а также их потенциальную опасность для человека. Необходимо дальнейшее совершенствование методов и схем лабораторной диагностики и превентивной терапии КТИ с учетом микст-инфицирования переносчиков и патогенетических особенностей вызываемых заболеваний. Необходимо также более широкое внедрение алгоритмов лабораторного исследования снятых переносчиков и превентивной терапии КТИ на основе их результатов, регламентируемых СП 3.1.33-10—15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Лабораторная диагностика трансмиссивных инфекций человека в сочетанных природных очагах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 5: 51—3.
2. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 1: 50—2.
3. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Кумпан Л.В. Новые эколого-эпидемиологические аспекты изучения очагов клещевых риккетсиозов на основе молекулярно-биологических методов. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 11: 5—7.
4. Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Околелова Н.А., Иголкина Я.П., Тикунова А.Ю., Рар В.А., Егембердиева Р.А., Коломеец А.Н., Решетникова Т.А., Рудаков Н.В. Результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований в сочетании очаге клещевых риккетсиозов в Омской области. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 11: 19—21.
5. Рудаков Н.В. Влияние патогенетических закономерностей инфекционного процесса на общность клинических и эпидемиологических проявлений клещевых риккетсиозов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 3: 68—71.
6. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Рудакова С.А., Кумпан Л.В., Белан Ю.Б., Решетникова Т.А., Шпынов С.Н., Абрамова Н.В., Коломеец А.Н. О роли *Rickettsia raoultii* в эпидемиологии клещевых риккетсиозов в России. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015; 3: 17—21.
7. Березкина Г.В., Штрек С.В., Зеликман С.Ю., Боброва О.А., Околелова Н.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е., Рудакова С.А., Петрова Ю.А., Любенко А.Ф., Кумпан Л.В. Комплексное выявление возбудителей природно-очаговых инфекций методом ПЦР в снятых с людей переносчиках в Омской области. *Национальные приоритеты России*. 2016; 4: 78—85.
8. Злобин В.И., Рудаков Н.В., Малов И.В. *Клещевые трансмиссивные инфекции*. Новосибирск: Наука; 2015.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Rudakova S.A. Laboratory diagnostics of tick-borne human infections in mixed natural foci. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 5: 51—3. (in Russian)
2. Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A. Problems of laboratory diagnostics of rickettsioses of spotted fever group. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; (1): 50—2. (in Russian)
3. Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V. New ecological and epidemiological aspects of studying foci of tick-borne rickettsiosis based on molecular biological methods.

- Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2016; (11): 5—7. (in Russian)
- Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Okolelova N.A., Igolkina Ya.P., Tikunova A.Yu., Rar V.A., Egemberdieva R.A., Kolomeets A.N., Reshetnikova T.A., Rudakov N.V. The results of microbiological and molecular-biological studies in the combined focus of tick-borne rickettsiosis in the Omsk region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2016; (11): 19—21. (in Russian)
 - Rudakov N.V. Influence of pathogenetic regularities of the infectious process on the commonness of clinical and epidemiological manifestations of tick-borne rickettsiosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2015; (3): 68—71. (in Russian)
 - Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Rudakova S.A., Kumpan L.V., Belan Yu.B., Reshetnikova T.A., Shpynov S.N., Abramova N.V., Kolomeets A.N. About the role of *Rickettsia raoultii* in epidemiology of tick-borne rickettsioses in Russia. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2015; (3): 17—21. (in Russian)
 - Berezkina G.V., Shtrek S.V., Zelikman S.Y., Bobrova O.A., Okolelova N.A., Kolomeets A.N., Samoylenko I.E., Rudakova S.A., Petrova Yu.A., Lubenko A.F., Kumpan L.V. Complex detection of pathogens of natural focal infections by the PCR method in ticks removed from humans in the Omsk Region. *Natsional'nye priority Rossii*. 2016; (4): 78—85. (in Russian)
 - Zlobin V.I., Rudakov N.V., Malov I.V. Tick-borne transmissible infections. [*Kleshchevye transmissivnye infektsii*]. Novosibirsk: Nauka; 2015. (in Russian)

Получена 15.05.17

Принята к печати 22.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.33.035.1:616.24-002

Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артеменко К.Л., Кауфман А.С.

ВЫБОР АНТИБИОТИКА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ МОКРОТЫ

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург

Изучена эффективность использования тест-системы «Выбор Антибиотика» для выращивания максимально возможного количества бактерий из патологического материала при пневмонии. По результатам метагеномного анализа установлено, что тест-система позволяет поддерживать рост практически всех бактерий, выявленных в мокроте, в том числе тех, которые относятся к пока не культивируемым. Проведено сравнение результатов стандартного определения чувствительности бактерий к антибиотикам и выбора эффективного лекарственного препарата по результатам использования тест-системы «Выбор Антибиотика». Полученные данные показывают, что тест-система позволяет без выделения чистой культуры выбрать антибиотик в течение 6—20 ч.

Ключевые слова: тест-система; выбор антибиотика; экспресс-диагностика; метагеномный анализ; пока не культивируемые бактерии; острая пневмония.

Для цитирования: Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артеменко К.Л., Кауфман А.С. Выбор антибиотика в микробиологическом исследовании мокроты. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 618-622. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-62-10-618-622>

Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamyan T.A., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Artemenko K.L., Kaufman A.S.

THE CHOICE OF ANTIBIOTIC IN MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF PHLEGM

The I.P. Pavlov first Sankt-Pereburgskii state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

The efficiency of application of the test-system “Vy`borAntibiotika” (AntibioticChoice) in incubation of a maximal possible number of bacteria from pathologic material in case of pneumonia was studied. The results of meta-genome analysis permitted to establish that test-system support incubation of practically all bacteria detected in phlegm, including those attributed to so far non-incubated ones. The comparison of the results was carried out concerning a standard detection of sensitivity of bacteria to antibiotics and choice of efficient medicinal according the results of application of test-system “Vy`borAntibiotika”. The obtained data demonstrates that test-system permits to choose antibiotic during 6-20 hours without isolation of pure strain.

Key words: test-system; choice of antibiotic; express-diagnostic; meta-genome analysis; so far non-incubated bacteria; pneumonia

For citation: Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamyan T.A., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Artemenko K.L., Kaufman A.S. The choice of antibiotic in microbiological analysis of phlegm. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (10): 618-622. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-618-622>

For correspondence: Tetz G.V., doctor of medical sciences, professor, the head of the chair of microbiology and virology. e-mail: vtetv@yahoo.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.05.2017
Accepted 21.05.2017

Для корреспонденции: Тец Виктор Вениаминович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», 197022, Санкт-Петербург, e-mail: vtetv@yahoo.com

Введение. В современной медицинской практике постоянно увеличивается использование антибиотиков. Это связано с выявлением новых заболеваний, при которых антибиотики позволяют достичь необходимого клинического результата. Выбор оптимальной антибиотикотерапии — одна из главных целей медицинской лабораторной диагностики. Традиционно он основан на выделении чистой культуры предполагаемого возбудителя, его идентификации и оценки чувствительности к противомикробным препаратам. Разработаны различные схемы проведения таких исследований без и с использованием автоматических и полуавтоматических анализаторов. [1]. Такие методы для медицинской практики имеют два главных недостатка: занимают несколько дней, поскольку требуют выделения чистых культур и не гарантируют, что выявят все или именно те, что надо, микроорганизмы. В результате полученные данные приходят позже, чем надо, и часто не соответствуют реальной эффективности применяемых антибиотиков. Развитие генетических подходов, основанное на выявлении и идентификации генов, кодирующих 16S рибосомальную РНК, позволило изучать материал от больного без выделения чистой культуры. Однако искать при этом можно только ограниченное число известных бактерий и, как выяснилось, идентификация бактерий недостаточно точная, а выявление генов устойчивости к антибиотикам не соответствует чувствительности к ним, поскольку такие гены часто не экспрессируются [2]. Появление более сложного метагеномного анализа открыло, что существующие классические методы выделения различных бактерий в сумме позволяют получить в виде чистых культур лишь небольшую их часть. Такие бактерии, гены которых можно выявить, а бактериологические методы выделения чистых культур пока не найдены, получили название «пока не культивируемых» [3]. Пока не культивируемые бактерии преобладают в микробиоте человека и обнаружены среди патогенных бактерий [3—5]. Поскольку именно человек является экологической нишей для большинства патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих его болезни, очевидно, что и список возбудителей не полон даже при тех заболеваниях, где микробная природа давно известна.

Таким образом, лабораторная диагностика столкнулась с необходимостью получить метод исследования, который позволяет обнаружить как можно больше микробов, находящихся в патологическом материале, определить, чем с ними можно бороться, и сделать это в течение одного дня (6—24 ч).

Цель настоящей работы — изучение возможности использования нового подхода в микробиологическом исследовании, позволяющего одновременно получать рост максимально возможного количества разных бактерий из очага поражения и данные об эффективности действия на них различных антибиотиков.

Материал и методы. Материал для исследования — мокрота больного с внебольничной пневмонией. Время между забором материала и включением его в исследование не превышало 24 ч с хранением при +4°C.

Питательные среды: Уриселект 4 (Биорад, Франция), элективный солевой агар и цетримидный агар (Биомедиа, СПб), *Candida brillians* (Оксойд, Великобритания), Колумбийский агар и среда, входящая в состав тест-системы «Выбор Антибиотика».

Определение биохимической активности микроорганизмов проводили с помощью системы Vitek 2 (bioMérieux, Франция).

Тест-система «Выбор Антибиотика» (ТСВА) для культивирования бактерий и оценки действия на них антибиотиков (амоксциллин/клавуланат, азитромицин, цефтриаксон, левофлоксацин, меропенем, линезолид, амикацин, ванкомицин, клиндамицин, рифампицин) (Новые Антибиотики, Россия).

Выделение ДНК из патологического материала и выросших на среде бактерий проводили при помощи стандартного набора «ДНК сорб-В» (Россия) согласно имеющемуся протоколу. Амплификацию проводили, используя эубактериальные праймеры 27F—534R, фланкирующие гипервариабельный участок гена *16S pPHK*.

27F: '5-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3'

534R: '5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Используемая в работе пара олигонуклеотидных праймеров специфична консервативным участкам гена *16S pPHK* и применяется в метагеномных исследованиях для выявления бактериального разнообразия различных сообществ [6]. Метагеномное секвенирование фрагмента гена *16S pPHK* произведено на пиросеквенаторе Roche/454 Genome Sequencer FLX Titanium. Максимальная длина полученных последовательностей составила 507 нуклеотидов, химерные последовательности и последовательности короче 300 нуклеотидов не были включены в анализ.

Анализ разнообразия и таксономического состава. Каждая полученная в ходе пиросеквенирования последовательность была идентифицирована путём сравнения с последовательностями баз данных GenBank и EzTaxon при использовании алгоритмов BLASTN поиска и попарного сравнения [7]. Для идентификации применяли следующие пороги сходства (x = сходство): виды ($x \geq 97\%$), роды ($97 > x \geq 94\%$), семейства ($94 > x \geq 90\%$), порядки ($90 > x \geq 85\%$), классы ($85 > x \geq 80\%$), отряд ($80 > x \geq 75\%$). Для определения видового разнообразия таксономического состава и сравнения сообществ применяли программу Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu>). Полученные последовательности выравнивали и проводили кластерный анализ с помощью программы Complete Linkage Clustering, входящей в состав Pyrosequencing pipeline. Кластеризацию осуществляли на разных уровнях, характеризующихся различными расстояниями между кластерами (от 0 до 0,25, с шагом 0,01). Выделение фило-типов (OTU) проводили при кластерном расстоянии 0,03; оценку таксономической сложности сообществ — при уровнях различий, соответствующих следующим таксонам: вид — 0,03, род — 0,05, семейство — 0,1, используя программу Rarefaction (Pyrosequencing pipeline). Для характеристики таксономического состава сообществ был проведен кластерный анализ с параметром расстояния 0,25. Далее для каждого кластера с помощью программы Dereplicate Request определяли нуклеотидную последовательность, соответствующую центру кластера, имеющую минимальную сумму квадратов расстояний до других входящих в кластер последовательностей. Репрезентативные последовательности кластеров таксономически классифицировали. Классификация видов на всех этапах работы произведена на основе генотипического подхода в соответствии с международным кодом номенклатуры бактерий (ICNB). В случае если репрезентативная последовательность имела гомологию более 97% с последовательностью валидированного микроорганизма, кластер относили к соответствующему виду.

Результаты. Из мокроты больного в результате стандартной лабораторной диагностики изолирован и иденти-

фицирован штамм *Pseudomonas aeruginosa*. Бактерии данного вида входят в число известных возбудителей заболеваний дыхательной системы и особенно распространены у больных с хронической обструктивной болезнью лёгких и муковисцидозом.

При использовании ТСВА рост максимального количества бактерий, имеющихся в патологическом материале, происходит в контрольных лунках, не содержащих антибиотиков. Остальные 10 лунок ТСВА содержат антибиотики в той концентрации, в какой они встречаются в очаге инфекции. Поскольку среда, использованная в системе, обеспечивает рост разных бактерий в минимальные сроки, учёт результатов проводили первый раз уже через 6 ч после засева и инкубации при 37°C. Бактерии, выросшие на ТСВА в контроле, были собраны и одновременно с исходным патологическим материалом подвергнуты метагеномному изучению. В результате в образце мокроты и среди бактерий, выросших после её посева на ТСВА, обнаружено значительное видовое разнообразие. Выявлены бактерии, относящиеся к 7 разным порядкам и 8 семейств (см. таблицу). По количеству последовательностей в патологическом материале преобладали бактерии 2 порядков: *Pseudomonadales* и *Burkholderiales*, представленность которых составила соответственно 88,3 и 8,5%, а на ТСВА — 76,5 и 1%. В то же время качественный состав микроорганизмов, выявленных в мокроте и выросших на ТСВА, оказался практически идентичным.

Обсуждение. Установлено, что в материале находятся бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Streptococcus* и *Herbaspirillum*. Эти бактерии удалось идентифицировать только до рода, и их вид не определён с достаточной точностью на основании существующей базы данных. В мокроте, кроме того, обнаружены бактерии этих же родов, для которых был идентифицирован вид: *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter denitrificans*, *Granulicatella adiacens*, *Corynebacterium striatum*. Большая часть из идентифицированных генетическим путём бактерий относится к мало изученным микроорганизмам. Некоторые из них, например *Herbaspirillum*, больше известны в качестве представителей микрофлоры почвы или связаны с растениями [8]. Вместе с тем некоторые из этих бактерий обнаружены и при заболеваниях дыхательной системы. Так, *Achromobacter xylosoxidans* и *Achromobacter denitrificans* описаны у больных пневмонией и муковисцидозом [9, 10], бактерии рода *Sphingomonas sp.* — при внебольничной пневмонии [11], при внутрибольничной пневмонии — *Granulicatella adiacens* [12] и *Corynebacterium striatum* [13]. Таким образом, любая из бактерий, обнаруженных при метагеномном анализе, не может быть исключена из списка возможных возбудителей данного патологического процесса. Исходя из этого, очень вероятно, что фактически у данного больного имеет место смешанная инфекция, в число возбудителей которой могут входить неродственные грамотрицательные палочки родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum* и грамположительные кокки, и палочки *Granulicatella*, и *Corynebacterium*.

Чувствительность к антибиотикам, определённая у

Микробы, выявленные при метагеномном анализе мокроты и бактерии, выросшие из неё на ТСВА

Положение в систематике	Название	
	Бактерии в мокроте	Бактерии, выросшие на ТСВА
Порядок	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales</i>
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadales</i>
	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiales</i>
	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetales</i>
	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillales</i>
	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiales</i>
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadales</i>
Семейство	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>
	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>
	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>
Род	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>
	<i>Granulicatella</i>	<i>Granulicatella</i>
	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Herbaspirillum</i>
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
Вид	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Pseudomonas sp*</i>	<i>Pseudomonas sp*</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Achromobacter insolitus</i>	<i>Achromobacter insolitus</i>
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>
	<i>Achromobacter sp*</i>	<i>Achromobacter sp</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Sphingomonas sp*</i>	<i>Sphingomonas sp</i>
	<i>Streptococcus sp*</i>	<i>Streptococcus sp</i>
	<i>Herbaspirillum sp*</i>	<i>Herbaspirillum sp</i>
	<i>Corynebacterium striatum</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>

Примечание. * — вид точно не определён.

изолированного стандартным методом штамма *P. aeruginosa*, показала его множественную устойчивость к лечебным препаратам.

Изолированный штамм был чувствителен к гентамицину и меропенему. Полученные данные характеризовали свойство только одного штамма, изолированного от больного, остальные бактерии, выявленные метагеномным анализом в патологическом материале, при этом остались неизученными.

Частично расширить возможности лабораторного исследования в этой области позволяет ТСВА. Система не показывает уровень чувствительности к антибиотикам отдельных бактерий, но зато дает возможность выбрать препарат, который в концентрации, имеющейся в очаге поражения, способен блокировать рост всех бактерий в патологическом материале данного больного. Для этого патологический материал от больного был засеян на ТСВА, в отдельные лунки, в питательной среде которых содержится по одному антибиотику, что даёт возможность анализа действия 10 различных препаратов. Таким образом, в присутствии каждого антибиотика в разных лунках мы регистрировали наличие совместного роста культивируемых и пока не культивируемых бактерий, находящихся в патологическом материале. Отсутствие роста бактерий через 6 ч (предварительный результат) и 20—24 ч (окончательный результат) позволило выбрать antimicrobial препарат, предотвращающий рост всех возможных бактерий, находящихся в патологическом материале.

При использовании ТСВА рост микробов отсутствовал только на среде с гентамицином. Таким образом, на все бактерии, которые находились в патологическом материале, действовал только один антибиотик — гентамицин, который можно считать препаратом выбора для лечения инфекции данного больного.

Полученные результаты свидетельствуют, что существующие микробиологические технологии пока не позволяют изолировать и изучить все бактерии, находящиеся в очаге инфекции и полученном из него патологическом материале. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных лабораторных методов следует считать широкое распространение пока не культивируемых бактерий. Известно, что чаще всего такие бактерии дают рост при совместном выращивании в составе смешанных сообществ, где бактерии предоставляют друг другу определённые факторы, без которых каждая по отдельности расти не способна. Можно предполагать, что патологический процесс вызван не тем микробом или микробами, которые удалось выделить и идентифицировать общепринятыми, стандартными методами. Результаты такого анализа значительно снижают реальную ценность существующего лабораторного исследования, основанного на представлениях, сложившихся в микробиологии в 30—40-х годах прошлого века. Недостаточно информативны и результаты подбора антибиотиков, основанные на стандартных подходах. Использование ТСВА позволило получить смешанные сообщества, которые, по данным метагеномного анализа, по составу бактерий соответствовали материалу, полученному от больного. Таким образом, ТСВА позволяет в минимальные сроки найти препарат, который в концентрации, создаваемой в очаге поражения, активен против всех бактерий, находящихся в материале из очага инфекции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(11): 1749—55.

2. Вечерковская М.Ф., Тец Г.В., Тец В.В. Неизвестные бактерии в микрофлоре ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями. *Клиническая онкогематология.* 2014; 7(2): 229—32.
3. Grice E.A., Segre J.A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151—70.
4. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415—25.
5. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133—41.
6. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* 2009; 55(5): 856—66.
7. Schloss P., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23): 7537—41.
8. Suwantarant N., Adams L.L., Romagnoli M., Carroll K.C. Fatal case of *Herbaspirillum seropedicae* bacteremia secondary to pneumonia in an end-stage renal disease patient with multiple myeloma. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(4): 331—3. Available online DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.011>
9. De Baets F., Schelstraete P., Van Daele S., Haerynck F., Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 2007; 6: 75—8.
10. Aundhakar S.C., Mane M.B., Bharadiva, Pawar S.K. Watch Out! Pneumonia Secondary to *Achromobacter Denitrificans*. *Ann. Med. Health. Sci. Res.* 2014; 4(1): S22—4.
11. Farr G., Pedram S. Community-Acquired Pneumonia with *Sphingomonas paucimobilis*. *Chest.* 2013; 10: 144. DOI: 10.1378/chest.1703090
12. Liao C.H., Teng L.J., Hsueh P.R., Chen Y.C., Huang L.M., Chang S.C. Nutritionally variant streptococcal infections at a University Hospital in Taiwan: disease emergence and high prevalence of beta-lactam and macrolide resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 2004; 38: 452—55.
13. Tarr P.E., Stock F., Cooke R.H., Fedorko D.P., Lucey D.R. Multi-drug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 2003; 5(1): 53—8.

REFERENCES

1. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(11): 1749—55.
2. Veчерковская М.Ф., Тец Г.В., Тец В.В. Unknown bacteria in oral flora of children with hematological malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014; 7(2): 229—32. (in Russian)
3. Grice E.A., Segre J.A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151—70.
4. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415—25.
5. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133—41.
6. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* 2009; 55(5): 856—66.
7. Schloss P., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23): 7537—41.
8. Suwantarant N., Adams L.L., Romagnoli M., Carroll K.C. Fatal case of *Herbaspirillum seropedicae* bacteremia secondary to pneumonia in an end-stage renal disease patient with multiple myeloma. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(4): 331—3. Available online DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.011>
9. De Baets F., Schelstraete P., Van Daele S., Haerynck F., Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 2007; 6: 75—8.
10. Aundhakar S.C., Mane M.B., Bharadiva, Pawar S.K. Watch Out!

- Pneumonia Secondary to *Achromobacter Denitrificans*. *Ann. Med. Health. Sci. Res.* 2014; 4(1): S22—4.
11. Farr G., Pedram S. Community-Acquired Pneumonia with *Sphingomonas paucimobilis*. *Chest.* 2013; 10: 144. DOI: 10.1378/chest.1703090
12. Liao C.H., Teng L.J., Hsueh P.R., Chen Y.C., Huang L.M., Chang S.C. Nutritionally variant streptococcal infections at a University Hospital in Taiwan: disease emergence and high prevalence of beta-lactam and macrolide resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 452—55.
13. Tarr P.E., Stock F., Cooke R.H., Fedorko D.P., Lucey D.R. Multi-drug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 2003; 5(1): 53—8.

Поступила 12.05.2017

Принята к печати 21.05.2017

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.873.21:579.253.2.083.3

Хромова П.А.¹, Огарков О.Б.^{1,2,3}, Жданова С.Н.¹, Синьков В.В.^{1,4}, Моисеева Е.Я.⁵, Цыренова Т.А.⁵, Кощеев М.Е.⁵, Зоркальцева Е.Ю.³, Савилов Е.Д.^{1,3}

ВЫЯВЛЕНИЕ ВЫСОКОТРАНСМИССИВНЫХ ГЕНОТИПОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЁЗА

¹ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск;

²ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003, Иркутск;

³Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, 664049, Иркутск;

⁴ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», 664047, Иркутск;

⁵ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулезная больница», 664039, Иркутск

Проведён биоинформационный поиск, разработан дизайн праймеров и TaqMan зондов для выявления ДНК возбудителя туберкулеза субтипов CC1 и CC2-W148 генотипа Beijing, а также генотипа Ural в различном клиническом материале (мокрота, спинномозговая жидкость, плевральная жидкость и др.) методом ПЦР в реальном времени. На 180 клинических образцах от 143 больных туберкулёзом (ТБ) лёгких проведена апробация чувствительности и специфичности разработанных тестов относительно исследований на генетическом анализаторе GeneXpert. Чувствительность для тестов на CC1, CC2-W148 и Ural относительно ПЦР анализатора GeneXpert составила 91%, 106% и 81% соответственно. Специфичность во всех случаях составила 100%. Образцы, несущие ДНК CC2-W148 генотипа, в параллельных исследованиях чаще были значимо положительны на мутации устойчивости к рифампицину — Rif(+) по результатам GeneXpert ($\chi^2 = 27,1$; $p < 0,01$) относительно других генотипов. В то же время выявление CC2-W148 штамма у больного чаще сопровождалось расхождением результатов: GeneXpert — Rif(+) и устойчивости к рифампицину в бактериологическом исследовании при окончательной валидации множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) ТБ ($\chi^2 = 5,1$; $p < 0,05$). Исследовано негативное влияние комбинации аллеля -336G гена CD209 пациента с генотипом микобактерии туберкулёза (МБТ) Beijing, обнаруженное ранее (Ogarkov et al., 2012). Наблюдали значимое преобладание широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) ($\chi^2 = 4,3$; $p < 0,05$) у больных с аллелем -336G гена CD209 в комбинации с клоном CC2-W148 по сравнению с остальными сочетаниями у больных. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования генотипирования возбудителя ТБ и пациента для раннего прогноза развития МЛУ/ШЛУ ТБ и других осложнений на этапах первичного обследования впервые выявленных больных ТБ.

Ключевые слова: эпидемические субтипы возбудителя туберкулёза; ПЦР-РВ тест для параллельного выявления генотипа CD209 пациента и субтипа CC2-W148.

Для цитирования: Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., Кощеев М.Е., Зоркальцева Е.Ю., Савилов Е.Д. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулёза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(10): 622-627. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627>

Khromova P.A.¹, Ogarkov O.B.^{1,2,3}, Zhdanova S.N.¹, Sinkov V.V.^{1,4}, Moiseeva E.Ya.⁵, Tzyrenova T.A.⁵, Koscheev M.E.⁵, Zorkaltseva E.Yu.³, Savilov E.D.^{1,3}

THE DETECTION OF HIGHLY-TRANSMISSIBLE GENOTYPES OF AGENT IN CLINICAL SAMPLES FOR PROGNOSIS OF UNFAVORABLE COURSE OF TUBERCULOSIS

¹The research center of problems of family health and human reproduction, 664003 Irkutsk, Russia

²The Irkutskii state university, 664003 Irkutsk, Russia

³The Irkutskiaia medical academy of post-graduate training - the branch of The Russian medical academy of post-graduate education of Minzdrav of Russia, 664049 Irkutsk, Russia

⁴The Irkutskii oblastnoii clinical consultative diagnostic center, 664047 Irkutsk, Russia

⁵The Irkutskiaia oblastnaia clinical tuberculosis hospital, 664039 Irkutsk, Russia

The bio-information search was carried out and the design of primers and TaqMan probes was developed to detect DNA of agent of tuberculosis subtypes CC1 and CC2-W148 of Beijing genotype and also Ural genotype in various clinical material (phlegm, spinal fluid, pleural fluid, etc.) using real-time polymerase chain reaction technique. The 180 clinical samples from 143 patients with tuberculosis of lungs were used to carry out an approval of sensitivity and specificity of the developed tests concerning studies at the genetic analyzer GeneXpert. The sensitivity of tests on CC1, CC2-W148 u Ural relating to polymerase chain reaction of analyzer Gene Expert made up to 91%, 106% and 81% correspondingly. In all cases, the specificity made up to 100%. In parallel studies the samples with DNA of CC2-W148 genotype were more often positive on mutation of resistance to Rifampicin-Rif (+) according the results of GeneXpert ($\chi^2 = 27,1$; $p < 0,01$) related to other genotypes. At the same time, detection of CC2-W148 strain in patient was more often accompanied by discrepancy of results: GeneXpert - Rif (+) and resistance to Rifampicin in bacteriological study under ultimate validation of multiple medicinal resistance of tuberculosis ($\chi^2 = 5,1$; $p < 0,05$). The analysis was applied to negative effect of combination of allele-336G of CD209 gene of patient with genotype of tuberculosis mycobacterium Beijing detected previously (Ogarkov et al., 2012). The significant prevalence was observed related to widespread medicinal resistance ($\chi^2 = 4,3$; $p < 0,05$) in patients with allele-336G of CD209 gene in combination with CC2-W148 clone in comparison with other combinations in patients. The obtained results testify a possibility of application of genetic typing of tuberculosis agent and patient for early diagnosis of development of various complications of tuberculosis at the stages of primary examination of primarily detected patients with tuberculosis.

Key words: epidemic subtypes of tuberculosis agent; real-time polymerase chain reaction test; parallel detection; CD209 genotype; patient; CC2-W148 subtype.

For citation: Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseeva E.Ya., Tzyrenova T.A., Koscheev M.E., Zorkaltseva E.Yu., Savilov E.D. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 622-627. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627>*

For correspondence: Ogarkov O.B., doctor of medical sciences, chief researcher, the head of the department of epidemiology and microbiology. e-mail: bogarkov@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study was implemented with the support of the grant of the Russian Foundation for Basic Research.

Received 23.05.2017
Accepted 30.05.2017

По оценкам ВОЗ, около трети человеческой популяции инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), при этом Российская Федерация входит в число 22 стран с наиболее неблагоприятной ситуацией по туберкулёзу (ТБ) [1]. Ранняя диагностика ТБ представляет только один из аспектов этой проблемы, но, пожалуй, наиболее сложный.

Безусловно, важнейшими в снижении глобального бремени ТБ служат социальные составляющие:

- улучшение условий жизни;
- снижение доли ВИЧ-инфицированных в популяции;
- качество питания;
- эффективность лечения заболевания и др.

Быстрая высокочувствительная диагностика ТБ должна быть неотъемлемой частью эпидемиологического и инфекционного контроля как в специализированных лечебных учреждениях, так и в популяции в целом.

Идеальный тест для экспресс-диагностики ТБ должен отвечать ряду ключевых критериев [2]:

- иметь чувствительность, превышающую 95% по отношению к бактериоскопическому и бактериологическому методам выделения;
- быть нацеленным на несколько уровней медицинского обслуживания от поликлиники до стационара;
- быть недорогим, доступным и быстрым;
- обладать предсказательной силой, в том числе быть пригодным для мониторинга лекарственной чувствительности и др.

В настоящее время наиболее близки к вышеназванным требованиям в лабораторной экспресс-диагностике ТБ «у постели больного», или «Point-of-Care Testing» (РОС), лабораторные исследования, выполняемые на генетическом анализаторе GeneXpert. Согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ТБ с множественной и широкой лекарственной

устойчивостью (МЛУ/ШЛУ ТБ), в случае обнаружения устойчивости возбудителя к рифампицину молекулярно-генетическими методами с помощью GeneXpert (или иным валидированным способом) лечение осуществляют по четвертому режиму химиотерапии [3]. Несмотря на очевидные преимущества метода, такие как быстрота выполнения теста и возможность раннего прогноза МЛУ, исследования на GeneXpert не лишены ряда недостатков, таких как высокая стоимость исследования, ограниченность исследования только одним противотуберкулезным препаратом. Кроме того, современные методы клинической лабораторной диагностики ТБ, в том числе основанные на молекулярно-генетических методах, совершенно не учитывают данные молекулярной эпидемиологии ТБ. Современные исследования свидетельствуют о циркуляции на территории России и других стран ряда эпидемиологических возбудителей, обладающих повышенной трансмиссивностью [4], способных вызывать нозокомиальные вспышки в туберкулезных стационарах [5] и, вероятно, имеющих более высокую патогенность [6].

Цель настоящего исследования — разработка и апробация недорогих ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) тестов для выявления в мокроте и другом клиническом материале высокотрансмиссивных (эпидемиологических) генотипов возбудителя ТБ и аллеля -336G гена *CD209* пациента, комбинацию которых мы рассматриваем как неблагоприятно влияющую на исход ТБ [7].

Материал и методы. Соблюдение этических норм. Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (НЦ ПЗСРЧ).

Штаммы микобактерий. Штаммы были получены с твердой питательной среды Левенштейна—Йенсена. Исследования устойчивости штаммов к противотуберкулезным препаратам (ПТП) 1-го и 2-го рядов прово-

дли согласно стандартным операционным процедурам (СОП) Иркутской областной клинической туберкулёзной больницы (ИОКТБ). Исследования клинических образцов (мокроты, промывных вод бронхов и др.) проводили на 16-модульном анализаторе GeneXpert GXXVI-16-D (Cepheid), согласно СОП ИОКТБ с выявлением мутаций устойчивости к рифампицину — Rif(+). Оставшуюся от аликвотирования мокроту и другие клинические образцы инактивировали 50% изопропиловым спиртом с 1% СТАВ, согласно описанной ранее методике [7].

Выделение геномной ДНК из штаммов и клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость и др.) проводили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия). Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы НПФ «Синтол», реагенты для ПЦР приобретали в компании «Интерлабсервис». Структуры праймеров зондов, температура отжига и размер ампликонов для индикации CC1 и CC2-W148 кластеров генотипа Beijing, генотипа Ural, а также выявления аллеля –336G гена *CD209* [7] приведены в табл. 1. Дизайн и анализ

in silico праймеров и зондов выполнены с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Методологию, разработанную для индикации динуклеотидной делеции в гене *kdpD*, специфичной для клона CC2-W148 генотипа Beijing [8], не приводят до решения Евразийской патентной организации (заявка № 201700085). Разработанные тесты с детекцией ПЦР-РВ испытывали на амплификаторе Light Cycler Nano (Roche), согласно разработанным в процессе работы протоколам. Статистическую обработку результатов проводили в таблицах Excel и программой Statistica v6.0.

Результаты. Приведённые в табл. 1 наборы праймеров и зондов были испытаны на специфичность выявления субтипов CC1, CC2-W148 генотипа Beijing и генотипа Ural с ДНК, выделёнными из 120 культур МБТ и охарактеризованными ранее с помощью 24-локусного MIRU-VNTR генотипирования [11]. Выбор генотипов-мишеней определяли спектром эпидемически и клинически актуальных клонов, циркулирующих на территории

Таблица 1

Список праймеров и зондов, использованных для проведения исследования

Название гена и (позиция SNP в геноме)	Структура олигонуклеотида 5'→3'	Размер ампликона (п.н.)	Tm, °C	Ссылка на источник	Примечание
<i>CD209</i> (rs4804803)	ACTGTGTTACACCCCTCCACTAG	91	60	[7]	Прямой праймер для амплификации фрагмента CD209
	AGGAAAGCCAGGAGGTCACA				Обратный праймер для амплификации фрагмента CD209
	(R6G)CTGC(C-LNA)(C-LNA) (A-LNA)CCCTTGC(BHQ1)				Зонд для индикации –336A аллеля CD209
	(FAM)CTGC(C-LNA)(T-LNA) (ALNA)CCCTTGC(BHQ1)				Зонд для индикации –336G аллеля CD209
<i>pks8</i> (1884305)	(FAM)-TGGCGACATT(G-LNA) (G-LNA)TCACTGCGG-(RTQ1)	100	65	[8]	Зонд для индикации ДНК CC1 кластера
	(R6G)-GTGGCGACATT(G-LNA) (T-LNA)TCACTGCGG-(BHQ2)				Зонд для индикации ДНК иных кластеров(non-CC1)
	GCGATGATGCGTAGAGAGCAC				Прямой праймер для амплификации ДНК CC1/non-CC1 кластеров
	AACACCGCCGCGCAATCCATT				Обратный праймер для амплификации ДНК CC1/non-CC1 кластеров
<i>cinA</i> (2147906)	(FAM)GACGATATG(A-LNA) (T-LNA)(C-LNA)GTCGAG(BHQ1)	143	60	[9]	Зонд для индикации ДНК Ural
	(R6G)ACGATATG(A-LNA)(C-LNA) (C-LNA)GTCGAG(BHQ1)				Зонд для индикации ДНК иных генотипов (non-Ural)
	TCGAGGCACAGCTGCGATT				Прямой праймер для амплификации ДНК Ural/non-Ural
	CCAGCTCGTCGTCCAGCT				Обратный праймер для амплификации ДНК Ural/non-Ural
<i>инсерция IS6110 Rv2664-Rv2665</i>	(R6G)-AGACTCTCTGATCT(G-LNA) AGAC (C-LNA)TCA-(BHQ2)	198	65	[10]	Зонд для индикации ДНК CC2-W148 кластера
	(FAM)-TT(C-LNA) CTCTGACAGCAACA(C-LNA) CAGTT-(RTQ1)				Зонд для индикации ДНК иных кластеров (nonCC2-W148)
	GCGACCCGCGTCTCTCTGA				Прямой праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148
	TCGGCCGTACGGACGACGAT				Обратный праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148
	CGAGGCTGCCTACTACGCTC				Обратный праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148

Определение чувствительности и специфичности тестов на 100 образцах мокроты, 120 штаммах МБТ и 10 МОТ штаммах

Название гена и позиция мутации в геноме	Позитивные результаты относительно GeneXpert как референс-метода (63/100) при исследовании образцов мокроты	Специфичность тестов при исследовании 120 МБТ и 10 МОТ штаммов
CC1 <i>pks8</i> (1884305)	57/63 (91%)	100%
CC2-W148 инсерция IS6110 <i>Rv2664-Rv2665</i>	59/63 (94%)	100%
CC2-W148 <i>kdpD</i> (2545delCT)	66/63 (105%)	100%
Ural <i>cinA</i> (2147906)	51/63 (81%)	100%

Таблица 3

Демографические, генетические данные, ВИЧ-статус больных исследуемой выборки

Признак	Значение признака
Общее количество больных, абс.	143
Мужчины	86
Женщины	57
Возраст, годы, среднее стандартное отклонение	40,9 ± 11,9
<i>CD209</i> , генотип	
AA	100
AG	40
GG	3
ВИЧ-положительные, абс. (%)	35 (24,5%)

исследуемого региона и в России в целом [12]. Во всех случаях получено 100% совпадение результатов. Отсутствие неспецифической реакции разработанных тестов определяли аналогично с использованием 10 образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов и относящихся к видам микобактерий, отличным от *M. tuberculosis* (МОТ). Проведенный тест показал полную видовую специфичность разработанных тестов (табл. 2).

Чувствительность тестов определяли на 100 образцах мокроты, отобранных случайным образом. Как видно из табл. 2, ПЦР набор на основе динуклеотидной делеции в гене *kdpD* показал большую чувствительность, чем используемый в качестве референсного теста GeneXpert. С помощью этого подхода было выявлено три дополнительных образца, позитивных на ДНК МБТ, по сравнению с результатами на GeneXpert.

Для оценки клинического значения разработанных тестов было исследовано 190 клинических образцов (мокрота, спинномозговая жидкость, операционный материал) от 186 больных ТБ, находившихся на стационарном лечении в ИОКТБ в 2016 г. Все исследования проведены в параллельных испытаниях с GeneXpert, как описано выше. Ретроспективный анализ клинических данных выявил 143 пациента из числа обследованных, имевших развернутую бактериограмму выделенных штаммов. Для дальнейшего анализа были отобраны только эти случаи. В табл. 3 приведены общие демографические данные выборки, генетический полиморфизм гена *CD209* – 336A/G, их ВИЧ-статус.

МЛУ ТБ оценивали по наличию устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду, ШЛЮ определяли при наличии МЛУ и устойчивости к канамицину и офлоксацину. В случае выявления МЛУ и

устойчивости к одному из двух антибиотиков (канамицину или офлоксацину), штамм обозначали как преШЛЮ.

Среди 39 больных, мокрота которых была положительна на присутствие ДНК CC2-W148 клона, 34 были позитивны на Rif(+) мутации в GeneXpert исследовании. Среди 104 больных, мокрота которых была позитивна на ДНК других генотипов (или других субтипов генотипа Beijing, например CC3, CC4, CC5, CC6 и BL7 [8]), выявлено только 38 Rif(+) случаев. Таким образом, Rif(+) мутации значимо чаще встречали в образцах с ДНК CC2-W148 субтипа ($\chi^2 = 27,1; p < 0,01$). Следовательно, у больных, поражённых МБТ генотипа Beijing/CC2-W148, значимо чаще развивались случаи с МЛУ и ШЛЮ (табл. 4). Однако углублённый анализ выявил расхождение между прогнозом МЛУ/ШЛЮ по результатам исследования на GeneXpert и фенотипическим развитием МЛУ/ШЛЮ у штаммов. Анализ выявил семь случаев несовпадения Rif(+) результатов по данным GeneXpert с фенотипически проявившимся МЛУ-ТБ по итогам бактериологического анализа. Среди 39 образцов CC2-W148 клона в пяти случаях предварительный результат МЛУ не был подтверждён. В трёх случаях штаммы были чувствительны к рифампицину, в одном — к изониазиду, в одном — к изониазиду и рифампицину. В то же время среди остальных 104 случаях иных генотипов, т.е. не относящихся к клону Beijing/CC2-W148, выявлено только два таких несовпадения. Таким образом, МБТ клона Beijing/CC2-W148 значимо чаще ($\chi^2 = 5,1; p < 0,05$, с коррекцией по Йетсу) давали неправильный прогноз МЛУ при предварительном исследовании на мутации устойчивости к рифампицину на анализаторе GeneXpert.

Из 143 обследованных в девяти случаях выявлены смешанные генотипы W148/nonW148. В одном случае за время периода наблюдения у пациента произошла однозначная смена генотипа возбудителя, сопровождавшаяся развитием ШЛЮ. *Больной Б., 1987 г.р., поступил в ИОКТБ с диагнозом: рецидив ТБ лёгких, диссеминированная форма в фазе инфильтрации, ТБ внутри-*

Таблица 4

Частота встречаемости МЛУ, преШЛЮ/ШЛЮ среди исследованных генотипов, абс. (%)

Генотип/субтип	Всего	МЛУ	преШЛЮ/ШЛЮ	$\chi^2; p^*$
Beijing/CC1	21	9 (42,9%)	3 (14,3%)	нет различий
Beijing/CC2-W148	39	16 (41,0%)	11 (28,2%)	11,1; >0,01
Ural	4	1 (25%)	0	нет различий
«Другие генотипы»	79	18 (22,8%)	11 (13,9%)	—

* Сравнение суммарных данных МЛУ + преШЛЮ/ШЛЮ Beijing/CC1, Beijing/CC2-W148 и Ural со штаммами «другие генотипы».

Таблица 5

Частоты сочетания генотипов *CD209* пациентов и выделенных от них микст W148/nonW148 вариантов возбудителя ТБ

Тип больных/Количество случаев	Общий показатель	Микст генотипы W148/nonW148	χ^2 ; p
Больные с сочетанием -336G аллель + CC2-W148 генотип	16	6	$\chi^2 = 24,1^*$; $p < 0,01$
Больные с иным сочетанием аллелей <i>CD209</i> и генотипами МБТ	127	3	

* Коррекция по Йетсу.

грудных лимфатических узлов в фазе инфильтрации; ВИЧ-инфекция, стадия 4B, фаза прогрессирования, без ВААРТ. При поступлении на стационарное лечение в мокроте определено наличие ДНК МБТ Rif(+), микст-генотип (W148/non-W148). Через месяц лечения мокрота оставалась положительной на ДНК МБТ, Rif(+), однако генотип определяли однозначно как W148.

ДНК из мокроты 143 больных генотипирована на AA\AG\GG генотипы в позиции -336 гена *CD209* [7]. Получено следующее распределение генотипов — 100\40\3 соответственно, находящихся в равновесии по Харди—Вайнбергу ($\chi^2 = 0,19$; $p > 0,05$). Генотипы AG и GG мы рассматривали как неблагоприятные в случае сочетания их с генотипом возбудителя Beijing [7]. В настоящем анализе исследовали сочетание аллеля -336G *CD209* (генотипы GG и AG) у пациентов и CC2-W148 штамма возбудителя. Определено 16 таких случаев (табл. 5). У этих больных значимо чаще ($\chi^2 = 24,1$; $p < 0,01$ с коррекцией по Йетсу) выявляли смешанные генотипы W148/nonW148 по сравнению с остальными пациентами. В вышеописанной группе обнаружены 4 случая ШЛУ, 2 случая преШЛУ, 5 случаев МЛУ. У остальных 5 больных выявлены полирезистентные штаммы. С учётом того, что всего в выборке обнаружено только 12 ШЛУ штаммов, имеет место значимое преобладание ШЛУ случаев среди группы больных с неблагоприятным сочетанием -336G аллеля и Beijing/CC2-W148 генотипа ($\chi^2 = 4,3$; $p < 0,05$ с коррекцией по Йетсу).

Обсуждение. Общее количество обнаруженных микст-генотипов значительно меньше ожидаемого, описанного в аналогичном исследовании [13], проведённом в Южной Африке, что, по-видимому, свидетельствует о достаточной эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий в ИОКТБ. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о том, что внутрибольничная трансмиссия высокоэпидемического стационара все же возможна. По всей видимости, наиболее уязвимой группой больных, подверженной потенциальному нозокомиальному заражению высоко-трансмиссивным штаммом CC2-W148, несущим МЛУ/ШЛУ, в противотуберкулезном стационаре являются ВИЧ-инфицированные больные, а также носители минорного аллеля -336G гена *CD209*. Следует отдельно отметить, что подавляющее большинство случаев обнаружения ДНК CC2-W148 в мокроте совпадало с выявлением Rif(+) мутаций в исследовании GeneXpert. По всей видимости этот феномен связан с конститутивными мутациями в *rpoB* гене, что приводит к эпидемическому распространению МЛУ штаммами этого генотипа.

Заключение. Разработанная тест-система для выявления клона CC2-W148 в мокроте и другом клиническом материале можно рассматривать в качестве инструмента для клинической диагностики, а также метода, пригодного для проведения профилактики нозокомиальных вспышек МЛУ ТБ, вызванных данным эпидемическим штаммом [5].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00160 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. World Health Organization, Geneva; 2015.
2. Dheda K., Ruhwald M., Theron G., Peter J., Yam W.C. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: past, present and future. *Respirology*. 2013; 18(2): 217—32.
3. Васильева И.А., Эрешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулёза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. Тверь: Триада; 2014.
4. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Реконструкция эпидемической истории «Пекинского» генотипа *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполитипирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 3: 25—9.
5. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Grashchenkova O., Steklova L. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21(8): 596—602.
6. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(7): 2615—24.
7. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732—6.
8. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat. Genet.* 2015; 47(3): 242—9.
9. Синьков В.В., Огарков О.Б., Мокроусов И.В., Жданова С.Н. Эволюционное значение несинонимичных замен в геноме *Mycobacterium tuberculosis* генотипа Ural. *Молекулярная медицина*. 2016; 14(4): 44—50.
10. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(11): 3757—9.
11. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Степаненко Л.А., Лац А.А., Синьков В.В., Унтанова Л.С. и др. Применение делеционного анализа по RD105 для выявления генотипа Пекин *Mycobacterium tuberculosis*. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2011; 2: 194—7.
12. Жданова С.Н., Зоркальцева Е.Ю., Огарков О.Б., Воробьева О.А., Унтанова Л.С., Алексеева Г.И. и др. Характеристика лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 105(6): 228—30.
13. Hanekom M., Streicher E.M., Van de Berg D., Cox H., McDermid C., Bosman M. et al. Population structure of mixed *Mycobacterium tuberculosis* infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70178. doi: 10.1371/journal.pone.0070178.

REFERENCES

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2015*. World Health Organization, Geneva; 2015.
2. Dheda K., Ruhwald M., Theron G., Peter J., Yam W.C. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: past, present and future. *Respirology*. 2013; 18(2): 217—32.
3. Vasilyeva I.A., Jergeshov A.Je. *Federal clinical recommendations for diagnosis and treatment of Tuberculosis with Multiply and Extensively Drug-Resistant Pulmonary*. Tver: Triada, 2014. (in Russian)
4. Sinkov V.V., Savilov E.D., Ogarkov O.B. Reconstruction of the epidemic history of the Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis in Russia and former soviet countries using spoligotyping. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2011; 3: 25—9. (in Russian)
5. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Grashchenkova O., Steklova L. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21(8): 596—602.
6. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L. et al. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(7): 2615—24.
7. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 –336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732—6.
8. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Wilery E. et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat. Genet.* 2015; 47(3): 242—9.
9. Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Mokrousov I.V., Zhdanova S.N. Evolutionary significance of non-synonymous substitutions for Mycobacterium tuberculosis of Ural genotype. *Molekulyarnaya meditsina*. 2016; 14(4): 44—50. (in Russian)
10. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(11): 3757—9.
11. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Stepanenko L.A., Laz A.A., Sinkov V.V., Untanova L.S. et al. The deletion analysis of RD105 is a useful tool in the evaluation of Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. *Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2011; 2: 194—7. (in Russian)
12. Zhdanova S.N., Zorkalzeva E.U., Ogarkov O.B., Untanova L.S., Alekseeva G.I., Savilov E.D. Description of drug resistant strains Mycobacterium tuberculosis by the molecular genetic technique. *Sibirskij meditsinskiy zhurnal*. 2011; 105(6): 228—30. (in Russian)
13. Hanekom M., Streicher E.M., Van de Berg D., Cox H., McDermid C., Bosman M. et al. Population structure of mixed Mycobacterium tuberculosis infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70178. doi: 10.1371/journal.pone.0070178.

Поступила 23.05.17

Принята к печати 30.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:578.823.2]-036.22-078

Зыкова Т.А.¹, Шевякова Е.А.¹, Колпаков С.А.²

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону;

²ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, Ростов-на-Дону, Россия

Освещена информация о проявлениях и возможных ассоциациях реовирусной инфекции. Приведены собственные результаты изучения распространённости, клинической значимости и возможностей серодиагностики реовирусной инфекции при различных патологических состояниях. Показано, что реовирусная инфекция широко распространена среди взрослого населения (60,6%) и детей (48,7%). Установлено, что с возрастом серопревалентность к реовирусам возрастает. Подтверждена этиологическая значимость реовирусов при различных острых заболеваниях, преимущественно респираторного тракта. Выявлено, что средний титр антител (АТ) к реовирусам нарастает у детей с острым гепатитом неустановленной этиологии и взрослых с хроническими неопухольвыми заболеваниями печени. Учитывая высокий уровень серопревалентности, подчеркнута значимость исследования парных сывороток в диагностике реовирусной инфекции.

Ключевые слова: реовирус; респираторно-вирусная инфекция; серопревалентность; злокачественные новообразования; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Зыкова Т.А., Шевякова Е.А., Колпаков С.А. Распространённость и возможности серологической диагностики реовирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 627-631. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-627-631>

Zykova T.A.¹, Shevyakova E.A.¹, Kolkpakov S.A.²

THE PREVALENCE AND POSSIBILITIES OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC OF REOVIRAL INFECTION

¹The Rostovskii research oncologic institute of Minzdrav of Russia, 344037 Rostov-on-Don, Russia

²The Rostovskii research institute of microbiology and parasitology of Rospotrebnadzor, 344000 Rostov-on-Don, Russia

Для корреспонденции: Зыкова Татьяна Алексеевна, канд. мед. наук, зав. лаб. вирусологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России; e-mail: tatiana2904@yandex.ru

The information about manifestations and possible associations of reoviral infection is covered. The original results of studying prevalence, clinical significance and possibilities of serodiagnostic of reoviral infection under various pathological conditions. It is demonstrated that reoviral infection is widespread among adult population (60.6%) and children (48.7%). It is established that with age seroprevalence to reoviruses increases. The etiological significance of reoviruses under various acute diseases predominantly respiratory ones is substantiated. It is established that average titer of antibodies to reoviruses increases in children with acute hepatitis of unclear etiology and in adults with chronic non-tumorous diseases of liver. The significance of studying of pair serums in diagnostic of reoviral infection is emphasized having regard to high level of seroprevalence.

Key words: reovirus; respiratory viral infection; seroprevalence; malignant neoplasm; laboratory diagnostic.

For citation: Zyкова Т.А., Шевырева Е.А., Колпаков С.А. The prevalence and possibilities of serological diagnostic of reoviral infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 627-631. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-627-631>*

For correspondence: Zyкова Т.А., candidate of medical sciences, the head of the laboratory of virology. e-mail: tatiana2904@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.05.2017
Accepted 06.06.2017

Введение. Роль вирусов в инфекционной патологии человека возрастает. Регистрируют большое количество клинически проявляющихся заболеваний с неустановленным этиологическим агентом и вытекающими последствиями: для больного — в лечении и прогнозе, для окружающих — в тактике предупреждения. Чаще с неустановленным возбудителем регистрируют такие заболевания, как острая кишечная инфекция, острая респираторно-вирусная инфекция, реже — менингит, менингоэнцефалит, гепатит, лихорадка и др. К вирусам, способным одновременно поражать органы дыхания, желудочно-кишечный тракт, головной мозг, гепатобилиарную, лимфоидную и сердечно-сосудистую системы относят и реовирусы. Большинство публикаций о реовирусах посвящено их роли в развитии острых респираторных заболеваний, особое внимание необходимо обратить на распространённость реовирусной инфекции (РВИ) при других патологических состояниях у детей и взрослых.

Возбудители РВИ — представители рода *Orthoreovirus* семейства *Reoviridae*. Это сферические вирусы, геном представлен сегментированной двуцепочечной РНК. Заболевания человека вызывают ортореовирусы млекопитающих, в последнее время появляются данные об инфицировании людей в Юго-Восточной Азии и ортореовирусами типа Нельсон-Бей (*Nelson Bay*). Существуют три основных серотипа ортореовируса млекопитающих, недавно открыт и изучается четвертый серотип. Реовирусы устойчивы в окружающей среде. Основной механизм передачи — аэрогенный, возможны алиментарный и вертикальный пути передачи. Ортореовирусы широко распространены по всему миру, серопревалентность среди лиц разных возрастов составляет в среднем 53,5% [1—6]. У детей реовирус встречают в 23—50%, максимальную серопозитивность отмечают в возрасте 5—6 лет. Значения средней геометрической титра антиген (АТ) в группах разных возрастов не отличаются [7]. Заболеваемость выше среди городского населения, отличается осенне-зимней сезонностью. В первую очередь заболевают дети раннего возраста [8].

В большинстве случаев инфекционный процесс протекает бессимптомно или с неярко выраженными проявлениями. Патогенез РВИ изучен недостаточно. Реовирусы репродуцируются в эпителиальных клетках слизистой оболочки полости рта, глотки и тонкой кишки, регионарных лимфатических узлах, откуда проникают в лимфу и кровь [9]. Частые проявления РВИ — воспа-

ление верхних дыхательных путей или энтериты (чаще у детей) [2]. Доказана способность реовирусов проникать трансплацентарно и оказывать эмбриопатическое действие. Клиническая картина РВИ разнообразна и определяется, по-видимому, возрастом и иммунным статусом инфицированного человека. Острая инфекция может сопровождаться фебрильной лихорадкой, головной болью, ринореей, гиперемией лица, инъекцией сосудов склер, конъюнктивитом, гиперемией слизистой оболочки миндалин, задней стенки глотки и дужек, сухим кашлем, лимфаденопатией, возможна гепатоспленомегалия. Катаральный синдром часто наблюдают в сочетании с клинической картиной острого гастроэнтерита, что позволяет дифференцировать РВИ от ОРВИ различной этиологии, энтеровирусных и бактериальных кишечных инфекций [8, 10, 11]. Установлено наличие РВИ у пациентов с корью, энтеровирусным везикулярным стоматитом, поражением печени, диареей; во всех случаях у больных титр АТ к реовирусу выше, чем у здоровых лиц [5]. Описано участие реовируса в развитии молниеносной генерализованной инфекции с летальным исходом [12]. Встречают упоминания об ассоциации РВИ с менингитом у детей [13—14]. Показано проявление РВИ у детей с заболеваниями гепатобилиарной системы: при атрезии желчевыводящих путей РНК реовируса обнаруживали у 55% пациентов, при кистах холедоха (фактор риска развития холангиокарциномы) — у 78%. У больных с прочими заболеваниями гепатобилиарной системы РНК реовируса обнаружена в 21% случаев. Ассоциация с РВИ установлена у детей с врождённым гепатитом [15]. У взрослых лиц с врождёнными холестатическими заболеваниями печени АТ к реовирусу встречали в 91% случаев, при других заболеваниях печени — у 70% [16]. Роль реовирусов в индукции повреждений эпителия желчных протоков и гепатоцитов подтверждена на экспериментальных моделях, причём патологические изменения, вызванные вирусной инфекцией, остаются в течение длительного времени даже при отсутствии вируса [17—20]. Реовирус — широко распространённый патоген. Установление серопревалентности может помочь выявить предполагаемые, но еще не доказанные ассоциации РВИ с патологией гепатобилиарной системы. Тропность реовирусов к активно делящимся клеткам указывает на необходимость выявления их наличия и при онкологических заболеваниях [7].

Лабораторную диагностику РВИ можно проводить

Частота выявления антител к реовирусам при исследовании одиночных сывороток

Группы	Дети				Взрослые			
	Обследованы	(+)	%	Титр АТ (log ₂)	Обследованы	(+)	%	Титр АТ (log ₂)
1-я	27	13	48,2 ± 9,8	6,8	191	120	62,8 ± 3,4	5,8
2-я	—	—	—	—	29	15	51,7 ± 9,4	6,5
3-я	105	36	34,3 ± 4,6	5,9	69	37	53,6 ± 6,0	5,9
4-я	37	18	48,7 ± 8,2	5,8	180	109	60,6 ± 3,6	5,4

путём выделения и идентификации вируса из слизи носоглотки, кала, СМЖ на культуре клеток, однако из-за сложности и длительности вирусологические исследования на практике проводят редко. Основной метод лабораторной диагностики — серологический (РТГА, РСК, РИФ) с исследованием парных сывороток. О болезни свидетельствует сероконверсия в 4 раза и более [8—9].

Цель исследования — изучение распространённости, оценка клинической значимости и возможности серодиагностики реовирусной инфекции при различных патологических состояниях.

Материал и методы. Исследование проведено на базе ФГБУ РНИОИ Минздрава России и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». Для определения вирусспецифических АТ использован диагностикум эритроцитарный реовирусный иммуноглобулиновый жидкий «РЕОТЕСТ» для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), разработанный в Ростовском научно-исследовательском институте микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. Диагностикум представляет собой 1% взвесь фиксированных эритроцитов барана, сенсibilизированных г-глобулиновой фракцией асцитной жидкости белых крыс, иммунизированных реовирусом [21—22]. Тест-система позволяет обнаруживать реовирусы непосредственно в биологическом материале в РНГА, проводить выявление и титрование АТ к реовирусу в РТНГА в сыворотках крови человека и животных. Чувствительность диагностикума «РЕОТЕСТ» составляет 1—2 нг по вирусному белку. Все обследованные разделены на четыре группы в зависимости от вида патологии: в 1-ю группу вошли больные острым гепатитом неустановленной этиологии, во 2-ю — больные хроническими неопухольными заболеваниями печени (жировой гепатоз, гепатохолецистит), в 3-ю — больные с острыми поражениями респираторного тракта, в 4-ю — здоровые лица. В каждой группе обследованы дети до 14 лет и взрослые пациенты старше 18 лет. Исследуемые сыворотки предварительно разводили 0,9% раствором хлорида натрия 1:4 и инактивировали на водяной бане при температуре 65°C в течение 20 мин. РТНГА проводили в объеме 75 мкл, использовали серийные двукратные разведения сывороток от 1:4 до 1:256.

Исследованы 169 одиночных и 121 парная сыворотка крови от детей, 469 одиночных и 170 парных сывороток от взрослых. Статистическую обработку данных проводили в соответствии с общепринятыми методами [23] с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение. Установлено, что серопревалентность к реовирусу с возрастом нарастает, напряжённость иммунитета при этом существенно не меняется. АТ к реовирусам обнаружены у 48,7 ± 8,2% здоровых

детей и у 60,6 ± 3,6% здоровых взрослых. В различных возрастных группах показатели иммунных к реовирусу детей распределились следующим образом: 0—2 года — 27,5 ± 5,1%, 3—6 лет — 53,3 ± 8,5%, 7—14 лет — 41,5 ± 6,7%. Отмечено нарастание средней геометрической титра АТ с возрастом. Всего у детей этот показатель составил 5,8 log₂, в том числе до 2 лет — 4,5 log₂, в 3—6 лет — 6,1 log₂, в 7—14 лет — 6,7 log₂. У взрослых средняя геометрическая титра АТ составила 5,4 log₂.

При различных патологических состояниях у детей (группы 1 и 3) серопревалентность к реовирусам по сравнению с 4-й группой снижалась, средний геометрический титр АТ нарастал. При однократном исследовании сывороток крови детей с выраженной клинической картиной уровень серопозитивных к реовирусам составил 37,1 ± 7,2%, средняя геометрическая титра АТ — 6,4 log₂.

Серопревалентность к реовирусам в группах здоровых (4-я группа) и больных (группы 1—3) взрослых практически не отличалась (60,6 ± 3,6% и 59,5 ± 6,3), в то время как средняя геометрическая титра АТ у больных была несколько выше (5,4 log₂ и 6,1 log₂).

Имеющиеся сведения о вовлечённости реовирусов в развитие патологии гепатобилиарной системы [15—20] заставили нас обратить особое внимание на эту группу пациентов, тем более что штамм реовируса, на основе которого разработан диагностикум, изолирован от больного с клиническим диагнозом «гепатит неустановленной этиологии» [22]. Среди пациентов 1-й группы количество лиц иммунных к реовирусу мало отличалось от показателей в соответствующих возрастных группах 4-й группы и составило 48,2 ± 9,8% у детей и 62,8 ± 3,4% у взрослых. Как в 1-й группе, так и в 4-й уровень серопревалентности к реовирусу у взрослых значительно был выше, чем у детей (см. таблицу). Средняя геометрическая титра АТ у детей в 1-й группе была на порядок выше (6,9 log₂), чем во 2-й группе (5,9 log₂).

У взрослых 1-й и 4-й групп явных отличий ни в частоте инфицирования, ни в напряженности иммунитета не наблюдали (см. таблицу). Средняя геометрическая титра АТ у этих больных составила 5,8 log₂ против 5,4 log₂. Число серопозитивных среди взрослых 2-й группы было несколько ниже, а средняя геометрическая титра АТ — на порядок выше, чем в 4-й группе (51,7% и 6,5 log₂ соответственно).

В 3-й группе уровень серопозитивных детей был значительно ниже, чем в 1-й и 4-й группах (34,29 ± 4,6%), при этом средняя геометрическая титра АТ не отличалась от такого же показателя 4-й группы (5,9 log₂). Среди взрослых 3-й группы АТ к реовирусам в РТНГА выявлены реже, чем в 4-й группе (53,1%) при незначительно возросшем показателе средней геометрической титра АТ (5,9 log₂).

При сходном уровне серопревалентности более высокий титр АТ к реовирусам наблюдали у детей с острым гепатитом неустановленной этиологии и взрослых с

хроническими неопухолевыми заболеваниями печени, что может косвенно свидетельствовать о вовлеченности реовируса в данные патологические процессы.

При исследовании парных сывороток сероконверсию у детей наблюдали в $10,8 \pm 2,8\%$ случаев, у взрослых — в $13,5 \pm 2,6\%$ случаев. В возрасте 0—2 лет сероконверсии к реовирусу не обнаружено ни у одного больного, в 3—6 лет обнаружено у $15,0 \pm 2,3\%$, в 7—14 лет — у $15,4 \pm 2,9\%$.

В 22,2% случаев с серологическим подтверждением диагноза РВИ отмечено параллельное нарастание титра АТ к другим вирусам, в том числе к пикорнавирусам — у одного больного, вирусу гриппа А(H_1N_1) — у трех, гриппа А(H_3N_2) — у одного, гриппа В — у двух, парагриппа 2-го типа — у одного. Этот факт заслуживает дополнительного рассмотрения для выяснения вопроса: стало ли это следствием одновременного инфицирования двумя вирусами или перекрестной иммунной реакцией.

В 69,5% случаев РВИ регистрировали при отсутствии АТ в начале заболевания, в том числе у детей — в 65,5%, у взрослых — в 73,9%. Сероконверсию в 92,3% случаев регистрировали у детей с клиническими диагнозами «грипп» и «ОРВИ», в 7,7% случаев острое поражение респираторного тракта сочеталось с клинической картиной менингита. У взрослых первичные диагнозы «грипп» и «ОРВИ» составили 52,2%, «лихорадка неясного генеза» — 21,6%, «пневмония, бронхит» — 8,7%, в 4,4% случаев лихорадка сочеталась с проявлениями менингита, в 13,1% — с экзантемой.

Заключение. Установлено широкое распространение РВИ, серопозитивные здоровые дети составили 45,7%, взрослые — 60,6%. Для серодиагностики РВИ недостаточно проведения однократного исследования, для постановки диагноза следует исследовать парные сыворотки. Подтверждение этиологической значимости реовируса у детей и взрослых чаще отмечено при клинических диагнозах «грипп» и «ОРВИ». При однократном исследовании сывороток крови наиболее высокий показатель средней геометрической титра АТ отмечен у детей с острым вирусным поражением печени и взрослых с хроническими неопухолевыми заболеваниями печени.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Урываев Л.В., Львов Д.К. Реовирусы. В кн.: Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008: 202—6.
2. Reoviridae — dsRNA Viruses — dsRNA Viruses (2011) — International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017 [cited 15 May 2017]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae
3. Singh H., Shimojima M., Ngoc T., Quoc Huy N., Chuong T., Le Van A. et al. Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. *J. Med. Virol.* 2015; 87(12): 2145—8.
4. Yamanaka A., Iwakiri A., Yoshikawa T., Sakai K., Singh H., Himeji D. et al. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014; 9(3): e92777.
5. Bai B., Shen H., Hu Y., Hou J., Liu Z., Li R. et al. Serological survey of a new type of reovirus in humans in China. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(10): 2155—8.
6. Selb B., Weber B.A. Study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and Western blot. *J. Virol. Methods*. 1994; 47(1-2): 15—25.
7. Tai J.H., Williams J.V., Edwards K.M., Wright P.F., Crowe J.E. Jr., Dermody T.S. Prevalence of Reovirus-Specific Antibodies in Young

- Children in Nashville, Tennessee. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(8): 1221—4.
8. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. *Инфекционные болезни и эпидемиология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
9. Кузнецов С.В., Вовк Т.Г., Ольховская О.Н. и др. *Дифференциальная диагностика острых респираторных вирусных инфекций у детей*. Методические указания для студентов V—VI курсов и врачей-интернов. Харьков: ХНМУ; 2015.
10. Киселева О.И., Маринича И.Г., Соминина А.А. *Группы и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия*. СПб.: Боргес; 2003.
11. Купченко А.Н., Понежева Ж.Б. Современные принципы диагностики и лечения ОРВИ. *Архивъ внутренней медицины*. 2016; 6(1): 6—12.
12. Колпаков С.А., Щербаков В.В., Колпакова Е.П. *Случай генерализованной реовирусной инфекции. Актуальные проблемы медицинской вирусологии*. Материалы научно-практической конференции. 1999; 1: 98.
13. Johansson P.J., Sveger T., Ahlfors K., Ekstrand J., Svensson L. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996; 28(2): 117—20.
14. Tyler K.L., Barton E.S., Ibach M.L., Robinson C., Campbell J.A., O'Donnell S.M. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(9): 1664—75.
15. Richardson S.C., Bishop R.F., Smith A.L. Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1994; 9(3): 264—8.
16. Minuk G.Y., Paul R.W., Lee P.W. The prevalence of antibodies to reovirus type 3 in adults with idiopathic cholestatic liver disease. *J. Med. Virol.* 1985; 16(1): 55—60.
17. Tyler K.L., Sokol R.J., Oberhaus S.M., Le M., Karrer F.M., Narkewicz M.R. et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology*. 1998; 27(6): 1475—82.
18. Stanley N.F., Joske R.A. Animal model of human disease. Chronic biliary obstruction. Animal model: Chronic biliary obstruction caused by Reovirus type 3. *Am. J. Pathol.* 1975; 80(1): 185—8.
19. Papadimitriou J.M. The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection. Light and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* 1968; 52(3): 595—611.
20. Wilson G.A., Morrison L.A., Fields B.N. Association of the reovirus S1 gene with serotype 3-induced biliary atresia in mice. *J. Virol.* 1994; 68(10): 6458—65.
21. Колпаков С.А., Колпакова Е.П. *Гепатиты реовирусной этиологии. Разработка эритроцитарной тест-системы для диагностики реовирусных инфекций. Актуальные проблемы медицинской вирусологии*. Материалы научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения М.П. Чумакова. 1999; 2: 98.
22. Колпаков С.А., Колпакова Е.П. *Особенности выделения РНК реовируса из клинического материала. Живые и биокосные системы*. 2014; 10. Available at: <http://jbsk.ru/archive/issue-10/article-5>
23. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1999.

REFERENCES

1. Uryvaev L.V., Lvov D.K. Reoviruses. In: Lvov D.K., ed. *Medical virology*. Moscow: MIA; 2008: 202—6. (in Russian)
2. Reoviridae — dsRNA Viruses — dsRNA Viruses (2011) — International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017 [cited 15 May 2017]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae
3. Singh H., Shimojima M., Ngoc T., Quoc Huy N., Chuong T., Le Van A. et al. Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. *J. Med. Virol.* 2015; 87(12): 2145—8.
4. Yamanaka A., Iwakiri A., Yoshikawa T., Sakai K., Singh H., Himeji D. et al. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014; 9(3): e92777.
5. Bai B., Shen H., Hu Y., Hou J., Liu Z., Li R. et al. Serological survey of a new type of reovirus in humans in China. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(10): 2155—8.
6. Selb B., Weber B. A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and Western blot. *J. Virol. Methods*. 1994; 47(1-2): 15—25.

- Tai J.H., Williams J.V., Edwards K.M., Wright P.F., Crowe J.E. Jr., Dermody T.S. Prevalence of Reovirus-Specific Antibodies in Young Children in Nashville, Tennessee. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(8): 1221—4.
- Pokrovsky V.I., Pak S.G., Brico N.I., Danilkin B.K. *Infectious diseases and epidemiology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
- Kuznetsov S.V., Vovk T.G., Olkhovskaya O.N. et al. Differential diagnostics of acute respiratory viral infections in children. Methodical instructions for students of V—VI courses and interns. Kharkov: KhNMU; 2015. (in Russian)
- Kiseleva O.I., Marynicha I.G., Somnina A.A. *Influenza and other respiratory viral infections: epidemiology, prevention, diagnosis and therapy*. St. Petersburg: Borges; 2003. (in Russian)
- Kupchenko A.N., Ponezheva Z.B. Actual methods of diagnosis and treatment ARVI. *Archiv vnutrenney meditsiny*. 2016; 6(1): 6—12. (in Russian)
- Kolpakov S.A., Shcherbakov V.V., Kolpakova E.P. *The case of generalized reovirus infection. Actual problems of medical virology. Proceedings of the scientific-practical conference*. 1999; 1: 98. (in Russian)
- Johansson P.J., Sveger T., Ahlfors K., Ekstrand J., Svensson L. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996; 28(2): 117—20.
- Tyler K.L., Barton E.S., Ibach M.L., Robinson C., Campbell J.A., O'Donnell S.M. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(9): 1664—75.
- Richardson S.C., Bishop R.F., Smith A.L. Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1994; 9(3): 264—8.
- Minuk G.Y., Paul R.W., Lee P.W. The prevalence of antibodies to reovirus type 3 in adults with idiopathic cholestatic liver disease. *J. Med. Virol.* 1985; 16(1): 55—60.
- Tyler K.L., Sokol R.J., Oberhaus S.M., Le M., Karrer F.M., Narkewicz M.R. et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology*. 1998; 27(6): 1475—82.
- Stanley N.F., Joske R.A. Animal model of human disease. Chronic biliary obstruction. Animal model: Chronic biliary obstruction caused by Reovirus type 3. *Am. J. Pathol.* 1975; 80(1): 185—8.
- Papadimitriou J.M. The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection. Light and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* 1968; 52(3): 595—611.
- Wilson G.A., Morrison L.A., Fields B.N. Association of the reovirus S1 gene with serotype 3-induced biliary atresia in mice. *J. Virol.* 1994; 68(10): 6458—65.
- Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Hepatitis of reovirus etiology. Development of erythrocyte assay for the diagnostics of reovirus infection. Actual problems of medical virology: Proceedings of the scientific-practical conference dedicated to the 90th anniversary of the birth of M.P. Chumakov. 1999; 2: 98. (in Russian)
- Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Peculiarities of isolating reovirus RNA from clinical material. Live and bio-inert systems. 2014; 10. Available at: <http://jbsk.ru/archive/issue-10/article-5> (in Russian)
- Glanz S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. Moscow: Praktika. 1999. (in Russian)

Поступила 20.05.17
Принята к печати 06.06.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.34-002.1-022-078

Шепелин А.П.¹, Марчихина И.И.¹, Полосенко О.В.¹, Шолохова Л.П.¹, Ажермачева Н.И.¹, Доброхотский О.Н.², Борзенкова Т.Х.²

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ АГАРА И БУЛЬОНА МОССЕЛЯ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, Серпуховской район, Московская область, Россия;

²Противочумная станция ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164» Федерального медико-биологического агентства, Испытательный лабораторный центр, 142279, п. Оболенск, Серпуховской район, Московская область, Россия

Культуральная диагностика острых кишечных инфекций (ОКИ) основывается на использовании питательных сред для селективного накопления энтеробактерий. Разработка состава и технологии производства отечественных импортозамещающих питательных сред является важной практической задачей для обеспечения лабораторий качественными медицинскими изделиями. В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора разработаны и зарегистрированы в установленном порядке питательная среда для селективного накопления энтеробактерий сухая (бульон Мосселя) и питательная среда для селективного выделения и учёта энтеробактерий сухая (агар Мосселя), предназначенные для селективного накопления, выделения и учёта энтеробактерий семейства *Enterobacteriaceae* из клинического материала и других объектов.

Проведена сравнительная оценка ростовых и ингибиторных свойств новых питательных сред производства ГНЦ ПМБ с зарубежными аналогами с использованием клинического материала. Доказано полное соответствие отечественных бульона и агара Мосселя зарубежным аналогам при использовании этих сред с целью селективного накопления, выделения и учёта *Enterobacteriaceae* из клинического материала и получения объективных результатов бактериологического контроля.

Ключевые слова: питательные среды; энтеробактерии; бульон и агар Мосселя; жёлчь очищенная сухая.

Для цитирования: Шепелин А.П., Марчихина И.И., Полосенко О.В., Шолохова Л.П., Ажермачева Н.И., Доброхотский О.Н., Борзенкова Т.Х. Клинические испытания агара и бульона Мосселя. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(10): 631-635. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-631-635>

Shepelin A.P.¹, Marchikhina I.I.¹, Polosenko O.V.¹, Sholokhova L.P.¹, Azhermacheva N.I.¹, Dobrokhotsky O.N.², Borzenkova T.Kh.²

THE CLINICAL TRIALS OF AGAR AND MOSSEL EE BROTH

¹The state research center of applied microbiology and biotechnology of Rosпотребнадзор, 142279 village Obolensk, Serpuhovskoi district, Moskovskaia oblast, Russia

²The anti-plague station "the medical sanitary station № 164" of the Federal medical biological agency of Russia, test laboratory center, 142279 village Obolensk, Serpuhovskoi district, Moskovskaia oblast, Russia

Для корреспонденции: Полосенко Ольга Вадимовна, канд. биол. наук. зав. сектором микробиологических исследований; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

The cultural diagnostic of acute intestinal infections is based on application of growth medium for selective cumulation of enterobacteria. The development of composition and technology of production of national import-substituting growth medium is an important task for supporting laboratories with high quality medical products. In the state research center of applied microbiology and biotechnology are developed and registered in established procedure a dry growth medium for selective cumulation of enterobacteria (Mossel EE broth) and dry growth medium for selective isolation and counting of enterobacteria (Mossel agar). Both media are intended for selective cumulation, isolation and counting of enterobacteria of family Enterobacteriaceae in clinical material and other objects. The comparative evaluation was applied concerning growth and inhibiting characteristics of new growth media produced by the state research center of applied microbiology and biotechnology against foreign analogues using clinical material. The total correspondence of national Mossel broth and Mossel agar to foreign analogues in case of using these media with the purpose of selective cumulation, isolation and counting of enterobacteria of family Enterobacteriaceae in clinical material and obtaining objective results of bacteriologic control.

Key words: *growth media; enterobacteria; Mossel broth; Mossel agar; dry purified bile*

For citation: *Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Polosenko O.V., Sholokhova L.P., Azhermacheva N.I., Dobrokhotsky O.N., Borzenkova T.Kh. The clinical trials of agar and Mossel EE broth. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 631-635. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-631-635>*

For correspondence: *Polosenko O.V., candidate of biological sciences, the head of the sector of microbiological studies. e-mail: polosenko.olga@yandex.ru*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.05.2017
Accepted 25.05.2017

Среди острых кишечных заболеваний (ОКИ) в последние годы доминируют инфекции, вызываемые патогенными и условно-патогенными бактериями (УПБ). Роль кишечных патогенов в заболеваемости населения постоянно возрастает. Сложность проблемы ОКИ заключается в отсутствии чётких критериев определения потенциальной способности кишечных патогенов вызывать патологический процесс. Недостаточно изучены особенности эпидемиологии и профилактики ОКИ, вызываемых энтеробактериями. УПБ являются нормальными обитателями различных биотопов организма человека. При снижении резистентности организма и при определённых эпидемиологических условиях они могут вызывать как эндогенные, так и экзогенные инфекции. Патогенность большинства энтеробактерий обусловлена их способностью вырабатывать термолабильные и термостабильные энтеротоксины. Поражение желудочно-кишечного тракта при ОКИ чаще всего наблюдается в форме гастроэнтерита, характеризуется различной степенью обезвоживания организма, возникающего вследствие нарушения водно-солевого баланса при рвоте и диарее, и сопровождается сердечно-сосудистыми нарушениями из-за потери электролитов, в первую очередь калия. Степень тяжести болезни, а следовательно, и жизнь больного зависят от быстрых результатов бактериологического исследования, подтверждающих этиологию заболевания. Культуральная диагностика острых ОКИ основывается на использовании питательных сред для селективного накопления энтеробактерий.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора является одним из ведущих производителей питательных сред в России, номенклатура выпускаемых препаратов включает более 100 наименований. Большинство питательных сред прошли все этапы государственных испытаний, зарегистрированы в качестве медицинских изделий Росздравнадзором и разрешены для применения в практическом здравоохранении. Питательные среды производства ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора широко используются бактериологическими лабораториями России для выделения и идентификации энтеробактерий, диагностики особо опасных инфекций, дисбиозов,

дифтерии, гнойных бактериальных менингитов, при контроле микробной загрязнённости нестерильных лекарственных средств и др. [1—3].

В практике работы микробиологических лабораторий наряду с использованием отечественных питательных сред определённое распространение получили питательные среды зарубежного производства «HiMedia» (Индия), «Merck» (Германия), «Pronadisa» (Испания) и др.

Многолетняя практика производства сухих питательных сред в ГНЦ ПМБ позволяет разрабатывать новые питательные среды на основе имеющейся сырьевой базы и внедрять их в практику производства с целью расширения номенклатуры выпускаемых сухих питательных сред для санитарной и клинической микробиологии. В 2016 г. разработаны и зарегистрированы в установленном порядке питательная среда для селективного накопления энтеробактерий сухая (бульон Мосселя) и питательная среда для селективного выделения и учёта энтеробактерий сухая (агар Мосселя), предназначенные для селективного накопления, выделения и учёта *Enterobacteriaceae* из клинического материала и других объектов.

Селективное накопление энтеробактерий в бульоне Мосселя обусловлено тем, что высокая концентрация жёлчи крупного рогатого скота в совокунности с бриллиантовым зелёным почти полностью подавляют рост сопутствующей микрофлоры, а глюкоза способствует росту энтеробактерий. Большая буферная ёмкость питательной среды защищает культуру от биоцидного действия накапливающейся кислоты. С целью достижения прозрачности готовой питательной среды специально разработана технология дополнительного осветления жёлчи очищенной сухой с использованием двухзамещённого фосфата натрия.

Селективный учёт и выделение энтеробактерий на агаре Мосселя возможны благодаря наличию в среде кристаллического фиолетового и солей жёлчных кислот, в значительной степени угнетающих рост сопутствующих микроорганизмов. Бактерии, ферментирующие глюкозу с образованием кислоты, обнаруживают по изменению цвета индикатора и зонам репреципитации вокруг колоний за счёт присутствия в среде жёлчи. На данной питательной среде обнаруживаются все представители семейства *Enterobacteriaceae*, однако она не

является абсолютно специфичной для этих микроорганизмов, так как некоторые сопутствующие бактерии проявляют аналогичные признаки роста.

Цель работы — провести сравнительные клинические испытания зарубежных и отечественных питательных сред Мосселя, разработанных по программе импортозамещения в ГНЦ ПМБ.

Материал и методы. В бактериологической лаборатории Противочумной станции ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164 Федерального медико-биологического агентства» на базе испытательного лабораторного центра совместно с сотрудниками ГНЦ ПМБ провели исследование образцов клинического материала с применением медицинских изделий — бульона и агара Мосселя производства ФБУН ГНЦ ПМБ с целью подтверждения возможности использования их по назначению.

Исследованы 35 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию для исследования (кал, моча); из них испражнения (кал) — 20 образцов, моча — 15 образцов. Каждый исследуемый образец зашифрован (номера всех образцов, указанных в настоящем Протоколе, соответствуют номерам, присвоенным этим образцам в Журнале регистрации патогенных биологических агентов (ПБА). Препарат сравнения для бульона Мосселя — питательный бульон для энтеробактерий по Мосселю (бульон Мосселя) MERCK кат. № 1.05394.0500. Препарат сравнения для агара Мосселя — питательная среда VRBD agar to MOSSEL MERCK кат. № 1.10275.0500.

В качестве вспомогательных сред и сред сравнения для выделения энтеробактерий использовали:

— питательную среду для обнаружения и выделения колиформных бактерий и кишечных патогенов сухую (агар МакКонки-ГРМ) РУ № ФСР 2009/05628, серия 15, годен до 09.2017 г.;

— питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) РУ № ФСР 2007/00001, серия 453, годен до 07.2020 г.;

— питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон) РУ № ФСР 2007/00002, серия 544, годен до 07.2020 г.;

— питательную среду для выделения стафилококков сухую (Стафилококкагар) РУ № ФСР 2011/10007, серия 354, годен до 07.2017 г.;

— питательную среду для выделения энтеробактерий сухую (агар Эндо-ГРМ) РУ № ФСР 2007/00375, серия 65, годен до 07.2018 г.;

— питательную среду для выделения сальмонелл сухую (агар Висмут-сульфит-ГРМ) РУ № ФСР 2008/03237, серия 707, годен до 07.2018 г.

В работе использованы: набор для окраски по Граму и набор реагентов «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов», набор № 2 для межродовой и видовой дифференциации энтеробактерий (СИБ) производства НПО «Микроген» Минздрава России.

Взятие исследуемого материала и посев на питательные среды проводили в соответствии с нормативными документами [4—6].

Результаты и обсуждение. Бульон Мосселя. Клинический материал засеивали в бульон Мосселя и в питательный ГРМ-бульон, используемый в качестве неингибиторного накопительного бульона. Во всех 35 клинических образцах визуально наблюдалось помутнение как бульона Мосселя, так и ГРМ-бульона. После инкубации

в течение 24 ч при 37°C из бульона Мосселя и из ГРМ-бульона делали высев по 0,1 мл на чашки с ГРМ-агаром, агаром МакКонки-ГРМ, стафилококкагаром. После инкубации посевов в течение 24—48 ч при 37°C визуально определяли наличие колоний с характерными для энтеробактерий культуральными свойствами. Колонии на ГРМ-агаре, используемом в микробиологической диагностике в качестве накопительной среды или для контроля роста, не имели характерной морфологии и не подлежали предварительной дифференциации.

На агаре МакКонки при высевах как из импортного, так и из бульона Мосселя производства ГНЦ ПМБ выросло пять типов колоний с характерной для энтеробактерий морфологией:

1) колонии *E. coli* — гладкие, круглые, не слизистые, от розового до красного цвета, диаметром 1,5—3,5 мм;

2) колонии *S. flexneri* — прозрачные, гладкие, круглые, блестящие, бесцветные или бледно-розового цвета, диаметром 1,0—2,0 мм;

3) колонии *S. typhimurium* — круглые, гладкие, бесцветные, диаметром 1,5—3,0 мм;

4) колонии *P. mirabilis* — круглые, гладкие, блестящие, бесцветные, диаметром 2,0—4,0 мм; «роение» подавлено;

5) колонии *E. faecalis* — мелкие, розово-красного цвета, диаметром до 1,0 мм.

На Стафилококкагаре при высевах как из импортного, так и из бульона Мосселя производства ГНЦ ПМБ выросло три типа колоний с характерной для энтеробактерий морфологией:

1) колонии *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* — белого цвета, выпуклые, круглые, непрозрачные, блестящие, с ровными краями, диаметром 1,5—3,5 мм;

2) колонии *S. aureus* — светло-желтого оттенка, выпуклые, круглые, непрозрачные, блестящие, с ровными краями, диаметром 2,0—4,0 мм;

3) колонии *P. mirabilis* — нежные, без «роения».

Для подтверждения принадлежности к семейству *Enterobacteriaceae* из 1—2 выросших колоний с чашки готовили мазки и окрашивали их по Граму, определяли биохимические свойства с помощью СИБ.

Результаты исследований доказали возможность селективного накопления энтеробактерий при проведении культурального исследования клинического материала с целью получения дополнительной информации при диагностике ОКИ, вызванных энтеробактериями. После появления видимого роста бактерий на испытываемой среде — бульоне Мосселя проведены дополнительные исследования и доказана принадлежность выросших на бульоне Мосселя микроорганизмов к семейству *Enterobacteriaceae*. Доказано преимущество использования бульона Мосселя по сравнению с неингибиторными бульонами при работе с клиническими образцами, обильно обсемененными грамположительной микрофлорой (энтерококками, стафилококками и др.), поскольку при высевах из неингибиторного бульона после накопления на соответствующие плотные среды выделение энтеробактерий затруднено.

Выявляемость энтеробактерий на испытываемой и контрольной средах представлена в табл. 1.

Агар Мосселя. Клинический материал засеивали в ГРМ-бульон, используемый в качестве среды накопления. После инкубации в течение 24 ч при 37°C во всех 35 пробирках с посевами наблюдался рост в виде диффузного помутнения бульона. Из бульона делался высев

по 0,1 мл на чашки с агаром Мосселя. После инкубации посевов в течение 24 ч при 37°C визуально определяли наличие колоний с характерной для энтеробактерий морфологией: круглые, малинового цвета колонии с зоной преципитации, диаметром 1,0—3,0 мм. Во всех 35 высевах на агар Мосселя визуально наблюдался характерный для энтеробактерий рост колоний в количестве от единичных до 1000 колоний на чашке. Для подтверждения принадлежности к семейству *Enterobacteriaceae* из 1—2 колоний с чашки готовили мазки, окрашивали их по Граму и отсеивали на дифференциально-диагностические среды: агар Эндо-ГРМ, Висмут-сульфит-ГРМ-агар. Биохимические свойства определяли с помощью СИБ. Посев на среду сравнения VRBD agar to MOSSEL MERCK показал результаты, аналогичные результатам на испытуемой среде. Посев на неингибиторную среду ГРМ-агар показал невозможность учёта результатов — наблюдалось сплошное «роение» или сливной рост.

Характеристика колоний микроорганизмов, отобранных как подозрительные на принадлежность к роду Энтеробактерий.

Для среды агар Мосселя: круглые, малинового цвета колонии, с зоной преципитации, диаметром 1,0—3,0 (все энтеробактерии).

Для агара Эндо-ГРМ:

1) круглые, малинового цвета с металлическим блеском или без него, диаметром 2,0—3,0 мм (*E. Coli* лактозоположительные);

2) бесцветные или слегка розового цвета, со слабо выраженным центром (*E. coli* лактозонегативные, шигеллы);

3) круглые, прозрачные, диаметром 1,5—2,5 мм (сальмонеллы);

4) круглые, расплывчатые, слизистые, интенсивно розового цвета, без металлического блеска;

5) круглые, интенсивно розового цвета, без металлического блеска.

Для ВСА:

1) круглые, чёрные, с блестящей зоной вокруг них, диаметром 1,0—3,0 мм (сальмонелла 1);

2) круглые, зелёные, с тёмным центром, диаметром 1,0—2,5 мм (сальмонелла 2);

3) круглые, темно-зелёные, диаметром 0,8—1,2 мм (сальмонелла 3);

4) полиморфные, чёрные с металлическим блеском или без него, диаметром 1,0—2,0 мм (сальмонелла 4);

5) круглые, зеленовато-коричневые, без «роения», диаметром 0,5—1,5 мм (*E. coli*);

6) круглые, светло-зелёного цвета, диаметром 1,0—2,0 мм (*P. vulgaris*).

Выявляемость энтеробактерий на испытуемой и контрольной средах представлена в табл. 2.

Во всех 35 образцах клинического материала при посеве на агар Мосселя обнаружены энтеробактерии, что подтверждено дополнительными тестами (мазки по Граму, высева на дифференциальные среды, подтверждение биохимических свойств с помощью СИБ).

Выводы. Выявляемость энтеробактерий с использованием бульона и агара Мосселя производства ФБУН ГНЦ ПМБ при сравнении с зарубежными аналогами доказала

Таблица 1

Выявляемость энтеробактерий на испытуемой и контрольной средах при посеве клинического материала

Наименование	Испытуемая среда:	Контрольная среда
	бульон Мосселя	
	Количество посевов (образцы)	
	35	35
Количество положительных находок*	35 (диффузное помутнение среды во всех пробирках с посевами клинических образцов)	35 (диффузное помутнение среды во всех пробирках с посевами клинических образцов)
Энтеробактерии**, в том числе:	38	38
<i>E. coli</i>	26	26
<i>Citrobacter</i>	2	2
<i>Enterobacter</i>	4	4
<i>Klebsiella</i>	1	1
<i>Proteus</i>	3	3
<i>Salmonella</i>	1	1
<i>Shigella</i>	1	1
<i>Staphylococcus</i>	—	—
<i>Enterococcus</i>	—	—
<i>Bacillus</i>	—	—
Выявляемость энтеробактерий, % ± m совпадений результатов исследования положительных проб*	95 ± 2%	95 ± 2%

Примечание. * — при доверительной вероятности 90%, при учёте среднего результата, полученного двумя специалистами; ** — количество выделенных энтеробактерий указано условно, так как учтены только выборочно проидентифицированные «подозрительные» на энтеробактерии колонии.

Таблица 2

Выявляемость энтеробактерий на испытуемой и контрольной средах при посеве клинического материала

Наименование	Испытуемая среда	Контрольная среда
	— агар Мосселя	
	Количество посевов (образцы)	
	35	35
Количество положительных находок*	35 (круглые, малинового цвета колонии, с зоной преципитации, d 1,0—3,0 мм)	35 (круглые, малинового цвета колонии, с зоной преципитации, d 1,0—3,0 мм)
Энтеробактерии, в том числе**	37	37
<i>E. coli</i>	23	23
<i>Citrobacter</i>	2	2
<i>Enterobacter</i>	4	4
<i>Klebsiella</i>	1	1
<i>Proteus</i>	3	3
<i>Salmonella</i>	1	1
<i>Hafnia</i>	1	1
<i>Shigella</i>	2	2
Выявляемость энтеробактерий, % ± m совпадений результатов исследования положительных проб*	95 ± 2%	95 ± 2%

Примечание. * — при доверительной вероятности 90%, при учёте среднего результата, полученного двумя специалистами; ** — подтверждение проводилось для колоний, выделенных с агара Мосселя.

полное соответствие отечественных питательных сред зарубежным аналогам и возможность их использования для селективного накопления, выделения, учёта *Enterobacteriaceae* из клинического материала и получения объективных результатов бактериологического контроля.

Результаты проведённых клинических испытаний учтены при проведении государственной регистрации в Росздравнадзоре РФ: на агар Мосселя и бульон Мосселя получены регистрационные удостоверения.

Обоснованное применение отечественных питательных сред позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии и отказаться от импортных поставок, не снижая при этом качества микробиологических исследований. Это обеспечит поддержание биобезопасности Российской Федерации на должном уровне и возможность дать адекватный ответ на возникающие вызовы и новые биологические угрозы [7].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63—5.
2. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; 16(2): 18—20.
3. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Дятлов И.А. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2015; 56(4): 39—43.
4. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. МУ 04-723/3. М.: МЗ СССР; 1984.

5. Приказ Минздрава СССР № 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. 1985.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316—08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
7. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (8): 61—5.

REFERENCES

1. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. Current approaches to import substitution in the field of nutrient medium production. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 63—5. (in Russian)
2. Shepelin A.P. Status and trends of development of nutrient medium production in Russia. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 16(2): 18—20. (in Russian)
3. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Dyatlov I.A. Nutrient media to identify staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2015; 4(56): 39—43. (in Russian)
4. Guidelines for microbiological diagnosis of enterobacteria-associated diseases [Metodicheskie ukazaniya po mikirobiologicheskoy diagnostike zabolevaniy, vyzyvayemykh enterobakteriyami]. МУ 04-723/3. Moscow: MH USSR, 1984. (in Russian)
5. The order of Ministry of Health USSR No. 535 On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. 1985: 95. (in Russian)
6. *Methods to control bacteriological nutrient media. Methodical instructions [Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred. Metodicheskie ukazaniya]*. МУК 4.2.2316—08. Moscow: Federal Center for Hygiene & Epidemiology, Rospotrebnadzor; 2008: 7. (in Russian)
7. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. Status and trends of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(8): 61—5. (in Russian)

Поступила 15.05.17

Принята к печати 25.05.17

© СУХИНА М.А., САФИН А.Л., 2017

УДК 616.34-008.311.4-022:579.852.13]-078

Сухина М.А., Сафин А.Л.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*-АССОЦИИРОВАННЫХ ДИАРЕЙ; МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава РФ, 123423, Москва, Россия

Clostridium difficile-ассоциированная инфекция (CDI) — одна из основных причин нозокомиальной диареи. Сложность лабораторной диагностики ведёт к прогрессированию заболевания, вызывающему обширные воспалительные изменения в стенке толстой кишки, характеризующиеся поверхностным некрозом слизистой оболочки с образованием «псевдомембран», приводящих к формированию токсического мегаколона, перфорации кишечной стенки, перитониту, сепсису. Основная роль в постановке диагноза принадлежит индикации возбудителя и детекции его токсинов. Ни один лабораторный тест не может быть использован в качестве самостоятельного метода лабораторной диагностики CDI. Многоэтапная диагностика может стать адекватной стратегией для быстрого и полного выявления антибиотикоассоциированных диарей.

Ключевые слова: *Clostridium difficile*; *Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция; глутаматдегидрогеназа; ПЦР риботина NAP/BI/027; токсигенные штаммы; токсин А; токсин В; бинарный токсин; антибиотикоассоциированная диарея.

Для корреспонденции: Сухина Марина Алексеевна, канд. биол. наук, рук. отд. микробиологических и иммунологических исследований; e-mail: marinamari272015@gmail.com

Для цитирования: Сухина М.А., Сафин А.Л. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей; методы детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* (Обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(10): 635-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-635-640>

Sukhina M.A., Safin A.L.

THE ACTUAL CONDITION OF LABORATORY DIAGNOSTIC OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE-ASSOCIATED DIARRHEA; THE METHODS OF DETECTION OF TOXIGENIC STRAINS (REVIEW OF PUBLICATIONS)

The A.N. Ryjikh state research center of coloproctology of Minzdrav of Russia, 123423 Moscow, Russia

The Clostridium difficile-associated infection (CDI) is one of the main causes of nosocomial diarrhea. The complicity of laboratory diagnostic results in progression of disease bringing on extensive inflammatory alterations in the wall of large intestine and characterizing by superficial necrosis of mucous membrane with development of "pseudo-membranes" resulting in development of toxic megacolon, perforation of intestinal wall, peritonitis and sepsis. The main role in diagnosing plays indication of agent and detection of its toxins. None of laboratory tests can be applied as an independent technique of laboratory diagnostic of CDI. The multi-step diagnostic can become an appropriate strategy for quick and full detection of antibiotic-associated diarrhea.

Key words: *Clostridium difficile*; *Clostridium difficile*-associated infection; glutamatedehydrogenase; polymerase chain reaction; ribotype NAP1/BI/027; toxigenic strains; toxin A; toxin B; binary toxin; antibiotic-associated diarrhea

For citation: Sukhina M.A., Safin A.L. The actual condition of laboratory diagnostic of *Clostridium difficile*-associated diarrhea; the methods of detection of toxigenic strains (review of publications). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (10): 635-640. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-635-640>

For correspondence: Sukhina M.A., candidate of biological sciences, the head of the department microbiological and immunologic studies. e-mail: marinamari272015@gmail.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.05.2017
Accepted 30.05.2017

Введение. Заселение кишечника и пролиферация токсигенных штаммов *Clostridium difficile* — одна из основных причин нозокомиальной диареи. Встречаемость CDI и частота рецидивов инфекции, устойчивой к стандартной терапии, постоянно растёт [1, 2]. Во многих странах ведётся мониторинг распространённости CDI [3]. Рост заболеваемости CDI в Северной Америке и Европе с начала XXI века связывают с появлением высоковирулентного штамма риботипа NAP₁/BI/027, который характеризуется усиленной продукцией токсинов А, В и бинарного токсина [4, 5]. Данные штаммы высоко вирулентны, что обуславливает большую смертность от CDI, вызванной данным риботипом. В 2013 г. в Великобритании умерло 3 тыс. человек, в США — 20 тыс. [6]. Лечение пациентов требует больших материальных затрат, на одного впервые заболевшего необходимо более 16 тыс. долларов, расходы на лечение рецидивирующей CDI составляют более 28 тыс. долларов [7, 8]. Ещё большие материальные затраты необходимы для организации мероприятий по предотвращению распространения токсигенной *C. difficile* в лечебных учреждениях. В США в 2006 г. такие расходы превысили 3,2 млрд долларов [9].

Ещё одна проблема CDI — высокая частота носительства токсигенных штаммов *C. difficile* среди здорового населения. Доля носителей составляет до 15% здоровых взрослых, 84% новорождённых, 57% пожилых людей в домах престарелых [10]. Распространение *C. difficile* обусловлено биологическими свойствами микроорганизма, которые защищают бактерию от повреждающего воздействия кислорода, температуры, химических и дезинфицирующих веществ [11—13], что затрудняет лабораторную диагностику CDI.

Разработаны несколько алгоритмов диагностики [14]. Двухэтапный, включающий детекцию глутаматадегидрогеназы (ГДГ) в качестве скрининга и детекцию экзотоксинов TcdA и TcdB серологическим методом, — наиболее распространённый, поддержан Американскими и Европейскими национальными клиническими рекомендациями [15, 16]. Данный подход не позволяет диагностировать CDI в случае наличия штамма риботипа NAP₁/BI/027, продуцирующего бинарный токсин. Оценён трёхэтапный алгоритм лабораторной диагностики CDI, включающий детекцию ГДГ в образцах стула на 1-м этапе с использованием ИФА тест-систем и выделение кокультуры *C. difficile* из положительных образ-

цов просветных фекалий [17]. Такой алгоритм позволяет на 24,4% (37/156) чаще выявлять *C. difficile* в сравнении с одноэтапным определением токсинов А и В *C. difficile* в стуле, что ведёт к снижению распространённости CDI на 4,2% (с 11,4 до 15,6%) [12].

Лабораторная диагностика CDI. Лабораторная диагностика CDI проводится культуральным, серологическими, молекулярно-генетическими методами. Золотым стандартом диагностики остаётся культуральный метод — выделение чистой культуры и определение её цитотоксичности на культуре клеток.

Существует несколько лабораторных тестов для индикации токсигенных *C. difficile*. В большинстве случаев используются тесты для определения токсинов непосредственно в образцах просветных фекалий. В США рынок коммерческих тест-систем для выявления токсигенных *C. difficile* составляет более 10 млн долларов в год [18]. Методы лабораторной диагностики CDI, в которых оценивалась чувствительность, специфичность, время, затраченное на осуществление методики, представлены в таблице [18].

Определение ГДГ *C. difficile* серологическим методом в образцах просветных фекалий. ГДГ — фермент, преобразующий глутамат в α -кетоглутарат. Он имеется у многих эукариот и прокариот, включая ряд видов рода *Clostridium*, в том числе *C. difficile*. ГДГ кодируется геном *Glud* и присутствует у всех штаммов *C. difficile* вне зависимости от выработки токсинов. ГДГ обладает высокой чувствительностью для диагностики CDI и имеет прогностическую ценность. Недостаток этого исследования — наличие ГДГ у других представителей рода *Clostridium* (например, *C. sordellii*), что снижает специфичность метода и обуславливает перекрестное реагирование [19, 20].

Проведена оценка диагностической точности обнаружения ГДГ при диагностике CDI [21] на основании 42 источников, включающих 3055 положительных и 2618 отрицательных сравнений (DOR 115; 95% ДИ: 77—172, I2 = 12%). Установлено, что детекция ГДГ обеспечивает быстрое отсеивание отрицательных результатов, при этом себестоимость теста, особенно по сравнению с молекулярными методами диагностики, низка [21].

Для детекции ГДГ в фекалиях ранее использовалась латекс-агглютинация (РАЛ), основанная на определении

токсина А *C. difficile* в просветных фекалиях за счёт связывания со специфическими антителами, фиксированными на частицах латекса. РАЛ обладала рядом достоинств: низкой стоимостью, простотой, быстротой исполнения (результаты можно оценить через 30 мин). Несмотря на преимущества, РАЛ имеет низкую чувствительность и специфичность. Сейчас РАЛ вытеснили количественные серологические тесты. В лабораторной практике используется иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). Результаты ИХА могут быть оценены через 15—20 мин, с заявленной чувствительностью 93% и специфичностью — 75% [22]. Преимуществом ИФА в отличие от РАЛ является более высокая специфичность за счёт количественной оценки с использованием стандарта. Широкое распространение получили автоматические ИФА-анализаторы, которые нивелируют человеческий фактор при интерпретации результатов, имеются доступные коммерческие ИФА-тест-системы низкой стоимости. Различные модификации ИФА позволяют одновременно выявить токсины А и В в просветных фекалиях. По данным сравнительного исследования, чувствительность ИФА составляет 66%, специфичность — 93—96% [22].

Проведены сравнения нескольких методов диагностики: ИФА — определение ГДГ (*C. DIFFCHEK-60TM*, TechLab Inc.; США), токсинов А и В (*C. diff tox A + B*; Diagnostic Auto Inc.; США), полимеразной цепной реакции (ПЦР) (*GeneXpert C. difficile*; Cepheid, США) [19]. В качестве скринингового теста для индикации *C. difficile* предлагается использовать определение ГДГ, что может предотвратить ложноотрицательные результаты и повысить точность диагностики CDI [19]. Детекция ГДГ в образцах просветных фекалий не позволяет судить о способности *C. difficile* продуцировать токсины и вызывать заболевание. Дальнейший диагностический алгоритм предполагает определение токсинов А и В в стуле больных доступными методами: 1) ИФА, ИХА; 2) выделение чистой культуры *C. difficile*, с определением её токсигенности (ПЦР), что имеет высокую прогностическую ценность [21].

Определение токсинов *C. difficile* в образцах просветных фекалий. Одним из значимых результатов исследований последних 30 лет стало с открытием нового возбудителя CDI — гипервирулентного фторхинолонрезистентного штамма

C. difficile риботипа NAP₁/BI/027. С продукцией 3 токсинов связывают патогенность *C. difficile*.

Токсин А (TcdA) с молекулярной массой 308 кД — энтеротоксин. Воздействуя на кишечный эпителий, он вызывает секрецию жидкости, воспаление и некроз слизистой оболочки. Механизм токсина В, молекулярная масса которого составляет 269 кД, обусловлен цитотоксическим действием, вызывающим гибель энтероцитов [23]. *C. difficile* риботипа NAP₁/BI/027 содержит дополнительный фактор вирулентности, она способна синтезировать бинарный токсин, который образует на поверхности энтероцита комплекс, состоящий из АДФ-рибозил-трансферазы и рецептора, проникающего в клетку путём рецептор-опосредованного эндоцитоза и эндосомального обмена. В цитоплазме этот комплекс нарушает нормальные клеточные функции посредством АДФ-рибозилирования глобулярного актина, что вызывает дезорганизацию цитоскелета и ведёт к гибели клетки [23]. Бинарный токсин улучшает адгезию и увеличивает способность к колонизации *C. difficile*, индуцируя синтез микротрубочек в основании клеточных выступов [23]. ИФА-детекция токсинов — более быстрая и менее трудоёмкая, но имеют низкую чувствительность (52—90%) и специфичность (75%) [24—26] по сравнению с культуральным методом. Коммерческие ИФА тест-системы позволяют детектировать один из токсинов либо одновременно оба токсина. Предпочтение следует отдавать тест-системам, которые позволяют определять оба токсина в просветных фекалиях одновременно. Это обусловлено тем, что некоторые штаммы возбудителя (в частности, относящиеся к серогруппе F) продуцируют только токсин В [18]. Встречаются штаммы *C. difficile*, вызывающие развитие заболевания, продуцирующие токсин А, который не обнаруживается серологическим методом. Такие штаммы имеют мутацию гена *tcdA* в 139-й позиции [30—32].

Преимущества ИФА заключаются в невысокой себестоимости и достоверности получаемых результатов [24].

Для увеличения чувствительности с сохранением скорости тестирования в 2008 г. разработан 2-этапный алгоритм лабораторной диагностики [6, 27, 28]. Данный алгоритм имеет ограничение — невозможность определить чувствительность возбудителя к антибактериальным препаратам.

Методы лабораторной диагностики CDI [18]

Метод исследования	Цель исследования	Чувствительность, %	Специфичность, %	Время, необходимое для выполнения исследования	Примечание
Культуральный	Выделение токсигенной культуры	89—100	84—99	48—72 ч	Высокая чувствительность и специфичность, возможность изучения резистентности к антибактериальным препаратам. Трудность культивирования, необходимость использования специального оборудования
Исследование на культуре клеток, ЦПД	Токсин В	67—100	85—100	28—48 ч	Рекомендуется использовать в сочетании с культуральным методом. Возможно полуколичественное определение путём титрования проб. (L.R. Peterson и соавт., 1988)
Реакция нейтрализации токсина (на культуре фибробластов)	Токсин В	—	—	28—48 ч	Хорошая чувствительность и специфичность. Использовать целесообразно в сочетании с цитопатогенным тестом
РАЛ	ГДГ	58—92	80—96	30 мин	Низкая чувствительность и специфичность. Можно использовать только для экспресс-диагностики
ИФА	ГДГ, токсины А/В	63—99	75—100	2—4 ч	Можно использовать как скрининговый тест. Для окончательной диагностики может потребоваться 2—3-кратное исследование
ИХА	ГДГ, токсины А/В	—	—	15 мин	Можно использовать как скрининговый тест. Для окончательной диагностики может потребоваться 2—3-кратное исследование
ПЦР	Ген кодирующий токсин А, В, бинарный токсин	—	—	2—4 ч	Хорошая чувствительность и специфичность, возможно определение бинарного токсина

Методы, направленные на детекцию ГДГ, токсинов А, В, бинарного токсина — быстрые, но не позволяют определить чувствительность возбудителя к антибиотикам.

Выделение токсигенной культуры *Clostridium difficile*. Выделение *C. difficile* из образцов просветных фекалий с последующим её типированием по способности продуцировать токсины и определением чувствительности к антибактериальным препаратам остается золотым стандартом диагностики CDI.

Clostridium difficile — грамположительная спорообразующая палочка. По типу дыхания — облигатный анаэроб. Впервые культуру *C. difficile* выделили I.C. Hall и E. O'Toole в 1935 г. [29] из фекалий здоровых новорождённых. В 1977 г. J. Bartlett [30] связал наличие этого возбудителя с возникновением колита, развившегося после терапии клиндамицином. Изначально микроорганизм назван *Bacillus difficilis* из-за характерной морфологии и трудности культивирования.

Для выделения *C. difficile* используется селективная среда CCFA (Cycloserine Co-foxotin Fructose Agar), предложенная в 1979 г. W. George и соавт. [31], содержащая цефокситин, циклосерин, фруктозу. Эта питательная среда получила широкое распространение, в том числе в России, так как отвечает пищевым потребностям *C. difficile*. Проведение предварительной пробоподготовки перед посевом на питательную среду, такое как прогревание проб фекалий при 70°C в течение 10 мин или обработка пробы абсолютным спиртом 1 ч, обеспечивает образование плоских, округлой или неправильной формы, с неровным или ризонидным краем, матовых, диаметром 2—4 мм, бело-жёлтых колоний *C. difficile* через 24—48 ч инкубации в бескислородной атмосфере. Рост *C. difficile* сопровождается появлением характерного запаха, подобного запаху р-крезола или лошадиного помёта. Использование для выделения *C. difficile* других питательных сред, например агара с циклосерином и маннитолом, кровяного агара с циклосерином и маннитолом, не имеет преимуществ перед средой CCFA. Различные добавки к среде CCFA стимулируют рост *C. difficile* [31, 32].

Поскольку выделение культуры *C. difficile* не означает её способность вызывать заболевание, у клинических изолятов необходимо определять токсигенность *in vitro*. Для этого отбирают 4—6 колоний, которые культивируются в сердечно-мозговом бульоне в анаэробных условиях при температуре 35—37°C в течении 24 ч. В фильтратах суточной бульонной культуры выявляют наличие экзотоксина. Для этого определяют наличие цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток, либо ген токсинов А, В, бинарного токсина методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем. Описаны культуры *C. difficile*, не проявляющие ЦПД в культуре клеток, но *in vitro* продуцирующие токсин, хотя титр токсина у них ниже, чем у штаммов, обладающих ЦПД в культуре клеток [24, 33]. Это объясняет расхождение между клиническими и лабораторными результатами.

Недостаток культурального метода диагностики состоит в его трудоёмкости, необходимости специальных навыков работы с культурой и анаэробного оборудования. Выделение токсигенной культуры *C. difficile* возможно только в хорошо оснащённых лабораториях, имеющих высококвалифицированный персонал.

Чувствительность культурального метода диагностики CDI достигает 98% [24, 31], но исследование длится 2—3 сут. Актуальным остаётся поиск новых методов диагностики CDI, перспективными молекулярно-биологические методы исследования.

Молекулярно-биологические методы диагностики CDI. Молекулярно-биологические методы позволяют детектировать геном *C. difficile* и его репликацию. К таким методам относятся: 1) полимеразная цепная реакция (ПЦР) — типирование, данный метод получил распространение из-за своей доступности, эффективности, высокой специфичности (97%) и чувствительности (91%); 2) гель-электрофорез в пульсирующем поле; 3) мультилокусный анализ и определение мультилокусной последовательности [25]. ПЦР — пер-

спективный метод диагностики CDI. Для выявления токсигенных штаммов *C. difficile* используется амплификация специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсин А и/или В. Разработана методика, позволяющая амплифицировать специфический для *C. difficile* участок гена, кодирующий токсин А и не имеющий перекрестной реакции с участком ДНК токсигенных штаммов *C. sordellii* [34]. ПЦР позволяет определять способность *C. difficile* к токсинообразованию и синтезу других факторов патогенности, что важно для диагностики CDI [35, 36]. Существуют разные модификации ПЦР. Для повышения эффективности ПЦР предложен 2-этапный протокол [37], в котором использованы праймеры к участку 16S рибосомальной РНК *C. difficile* (Downstream primer: B CCGTCAATTCMTTTRAGTTT / Upstream primer: PG-48 CTCTTGAAACTGGGAGACTTGA), что позволило получить 100% чувствительность по сравнению с культуральным методом. Высокая чувствительность (95,5%) и специфичность (99%) показана в исследованиях с использованием тест-системы Becton Dickinson (BD) MaxCdiff на основе ПЦР для детекции токсигенных *C. difficile* [38]. Совпадение детекции *C. difficile* с помощью тест-системы BD MaxCdiff и выделение токсигенной культуры составило 98,5% [36]. Амплификация нуклеиновых кислот для детекции токсигенной *C. difficile* обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но в России она не доступна для клинической лабораторной диагностики из-за отсутствия зарегистрированных Росздравнадзором тест-систем.

Рост резистентности к антибиотикам вызывает обеспокоенность клиницистов, фармакологов, микробиологов, так как появляется большое количество мультирезистентных штаммов бактерий, что ставит под угрозу способность лечить инфекции, повышает расходы на лечение и смертность. Широкое применение антибактериальных препаратов способствует селекции резистентных микроорганизмов и появлению бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Растущая популяция *C. difficile* синтезирует токсин-индуцирующий мессенджер, относящийся к группе тиолактона, который накапливается во внеклеточной среде, активируя 2-компонентную систему AgrC₂A₂, что повышает активность транскрипции генов, кодирующих токсины, и играет ключевую роль в развитии кластридиального колита. Новые тест-системы для диагностики CDI позволили раскрыть ряд механизмов передачи сигнала AgrC₂A₂ [39].

Лабораторная диагностика CDI базируется на сочетании методов: детекция ГДГ и токсинов в стуле пациента серологическим методом, ПЦР-РВ, микроскопия, выделение токсигенной культуры. Эти методы показали хорошую производительность [40—42], но имеют ряд недостатков, таких как низкая чувствительность, специфичность, трудоёмкость, субъективность и т. д.

Мультиплексные решения для диагностики CDI. Развивается мультиплексный молекулярный анализ для индикации и идентификации патогенов, в том числе возбудителей антибиотикассоциированной диареи. Проведено сравнение 3 коммерческих мультиплексных панелей [FilmArray GI панель (BioFire Диагностика), Luminex xTag GI патоген панель (GPP) (Luminex Corporation, Канада), Nanosphere Verigene кишечно-патогенный тест (Nanosphere, Inc., Northbrook, IL)], одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) для индикации возбудителей желудочно-кишечных заболеваний (в том числе *C. difficile*) из клинических образцов фекалий [43]. Каждая из мультиплексных панелей для диагностики CDI утверждена в качестве дополнительного средства диагностики, использование этих тестов при скрининге бессимптомных пациентов не утверждено и требует дальнейшего изучения [44]. Учитывая сложность диагностики и необходимость индикации вирулентных штаммов *C. difficile*, продуцирующих не только токсины А и

В, но и бинарный токсин, целесообразно использовать тест-систему Verigene CDF Test, позволяющую протестировать 1 образец за 2,5 ч и определить наличие *C. difficile*, токсинов А и В, штаммов риботипа NAP₁/BI/027, продуцирующих бинарный токсин, не детектируемый серологическим методом. Используются микрочип нуклеиновой кислоты, который обнаруживает *C. difficile* токсины А и В в неоформленных образцах стула и может адекватно идентифицировать риботип NAP₁/BI/027. Применение мультиплексных панелей увеличивает скорость и количество определяемых патогенов [43].

Проблемы, связанные с интерпретацией результатов, полученных с помощью мультиплексных панелей, не позволяют использовать их для скрининговых исследований. Разработка и внедрение высокоэффективных мультиплексированных молекулярных панелей позволит клиническим лабораториям быстро и правильно диагностировать CDI [41, 45—47].

Выявление *Clostridium difficile* на основании определения летучих органических соединений. Один из методов диагностики CDI — определение летучих органических соединений в стуле больного. Летучие органические соединения (ЛОС) — конечные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут быть использованы для диагностики заболевания [48, 49]. Проведены исследования, в которых запах стула пациентов, имеющих CDI, различали медицинские работники, ухаживающие за этими больными. Сотрудники в состоянии различить CDI стул с чувствительностью 55% и специфичностью 83%, с отрицательной прогностической ценностью 92%. Средний медицинский персонал правильно определил *C. difficile* в 31 из 37 случаев, с чувствительностью 84% и специфичностью 77% [50, 51]. Исследование собачьего обоняния показало 83% чувствительность и 98% специфичность идентификации *C. difficile* [52]. Для быстрой идентификации ЛОС профиля, связанного с *C. difficile*, *Campylobacter jejuni* и ротавирусами, использована газожидкостная масс-спектрометрия (GC-MS) [53]. В просветных фекалиях, ассоциированных с *C. difficile*, обнаружены продукты брожения фруктозы и производных фуранозы. В 2007 г. GC-MS применена для идентификации ЛОС в кале, полученном от пациентов с язвенным колитом и больных CDI [54]. В 2014 г. использован «электронный нос» для газовой хроматографии, результаты, обработанные искусственными нейронными сетями, применены для распознавания образцов, позволявших различать *C. difficile*-положительный и -отрицательный стул с 85% чувствительностью и 80% специфичностью [49].

Несмотря на обнадеживающие результаты, демонстрирующие высокую чувствительность и специфичность, использование 2-фтор-4-метилфенола как одного маркера для диагностики CDI нецелесообразно. Имеются более быстрые и доступные методы выявления токсигенной *C. difficile*.

Заключение. В мире отмечается экспоненциальный рост заболеваемости клостридиальной инфекцией [6]. Неразрешимой проблемой остаётся отсутствие единого подхода к лабораторной диагностике CDI.

Чаще всего используют ускоренные методы детекции токсинов А и В *C. difficile* в просветных фекалиях, такие как ИХА и ИФА. Бинарный токсин возможно обнаружить только с помощью ПЦР. Длительная диагностика CDI обуславливает несвоевременное проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий, что создаёт предпосылки к персистенции возбудителя и его широкому распространению как в пределах одного отделения, так и в рамках всего лечебного учреждения. Исследования, направленные на разработку оптимального диагностического алгоритма клостридиальной инфекции, чрезвычайно актуальны и позволяют применять персонализированный подход в лечении CDI.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 3—17, 19—31, 33—54 см. REFERENCES)

1. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L.K. Z. (Перевод с английского: Пикунов Д.Ю.). Клостридиальный колит — важная проблема в хирургии. *Колопроктология* 2014; 4(50): 17—23.
2. Шельгин Ю.А., Абдулганиева Д.И., Абдулхаков Р.А., Алексеева О.П., Ачкасов С.И., Барановский А.Ю. и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом. *Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии и колопроктологии*. 2015; 25(1): 48—65.
3. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2002; 4: 200—32.
4. Кветная А.С., Макриди П.С., Бехтерева М.К. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции. *Журнал Инфектологии*. 2013; 5: 5—12.

REFERENCES

1. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L.K. Z. (Translation from English: Pikunov D.Y.). Clostridial colitis is an important problem in surgery. *Koloproktologiya* 2014; 4(50): 17—23. (in Russian)
2. Shelygin Y.A., Abdulganieva D.I., Abdulkhakov R.A., Alekseeva O.P., Achkasov S.I., Baranowski A.Y. et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association and Association of Coloproctologists of Russia for the diagnosis and treatment of adults with ulcerative colitis. *Rossiiskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 2015; 25(1): 48—65. (in Russian)
3. Cole S.A., Stahl T.J. Persistent and Recurrent *Clostridium difficile* Colitis. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2015; 28: 65—9.
4. Killgore G., A.T., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pepin J., Frost E.H., Savelkoul P., Nicholson B., van den Berg R.J., Kato H., Sambol S.P., Zuckowski W., Wood C., Limbago B., Gerdin D.N. and MLC. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat an. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 431—7.
5. Hunt J.J., Ballard J.D. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology and molecular biology Reviews*. 2013; 77: 567—81.
6. Tschudin-Sutter S., Braissant O., Erb S., Stranden A., Bonkat G., Frei R. et al. Growth Patterns of *Clostridium difficile* — Correlations with Strains, Binary Toxin and Disease Severity: A Prospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016; 11: 1—10.
7. Drozd E.M., Inocencio T.J., Braithwaite S., Jagun D., Shah H., Quon N.C. et al. Mortality, Hospital Costs, Payments, and Readmissions Associated With *Clostridium difficile* Infection Among Medicare Beneficiaries. *Infectious Diseases in Clinical Practice (Baltimore, Md.)*. 2015; 23: 318—23.
8. Rodrigues R., Barber G.E., Ananthkrishnan A.N. A Comprehensive Study of Costs Associated With Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2017; 7: 38: 196—202.
9. Judith A., Brien, Lahue B.J., Caro J.J., Davidson D.M., Hogenauer C., Hammer H.F. et al. The emerging infectious challenge of *clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2007; 28: 1219—27.
10. Surawicz C.M., Brandt L.J., Binion D.G., Ananthkrishnan A.N., Curry S.R., Gilligan P.H. et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology*. 2013; 108: 478—98; quiz 499.
11. Na X., Martin A.J., Sethi S., Kyne L., Garey K.W., Flores S.W. et al. A multi-center prospective derivation and validation of a clinical prediction tool for severe *Clostridium difficile* infection. *PLoS One* 2015; 10.
12. Kurti Z., Lovasz B.D., Mandel M.D., Csima Z., Golovics P.A., Csako B.D. et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. *World Journal Gastroenterology*. 2015; 21: 6728—35.
13. Kazanowski M., Smolarek S., Kinnarney F., Grzebieniak Z. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities — A systematic review. *Techniques in Coloproctology*. 2014; 18: 223—32.
14. Benedek O., Podbielski A., Warnke P. Laboratory experience with the liaison analyzer in the diagnosis of *Clostridium difficile* — associated diarrhea. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2016; 6: 215—8.
15. Cohen S.H., Gerding D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G.,

- McDonald L.C. et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection control and hospital epidemiology*. 2010; 31: 431—55.
16. Goret J., Blanchi J., Eckert C., Lacombe S., Petit A., Barbut F. et al. Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Gut Pathogens*. 2015; 7: 33.
17. Wright Donna FR. Largest Ever European Clinician Consensus Report on Clostridium Difficile Infection Provides Recommendations for Improved Management of CDI / Pressemittteilung Astellas EMEA 2014.
18. Lobzin Y.V., Zakharenko S.M., Ivanov G.A. Modern ideas about the infection of Clostridium difficile. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2002; 4: 200—32. (in Russian)
19. Yoldas O., Altindis M., Cufali D., Asik G., Kesli R. A Diagnostic Algorithm for the Detection of Clostridium difficile-Associated Diarrhea. *Balkan Medical Journal*. 2016; 33: 80—6.
20. Girinathan B.P., Braun S., Sirigreddy A.R., Lopez J.E., Govind R. Importance of glutamate dehydrogenase (GDH) in Clostridium difficile colonization in vivo. *PLoS One* 2016; 11: 1—18.
21. Arimoto J., Horita N., Kato S., Fuyuki A., Higurashi T., Ohkubo H. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for Clostridium difficile: Systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016; 6: 29754.
22. Vanpoucke H., Baere T.D., Claeys G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/or antigen in stool specimens. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001; 2: 55—64.
23. Awad M.M., Johanesen P.A., Carter G.P., Rose E., Awad M.M., Johanesen P.A. et al. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*. 2014; 5: 579—93.
24. Turgeon D.K., Novicki T.J., Quick J., Carlson L., Miller P., Ulness B. et al. Six Rapid Tests for Direct Detection of Clostridium difficile and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. *Journal Clinical Microbiology*. 2003; 41: 667—70.
25. Le R., Wallet G.F. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Ann. Biol. Clin. Synthèse Ann. Biol. Clin.* 2013; 71: 395—400.
26. Ticehurst J.R., Aird D.Z., Dam L.M., Borek A.P., Hargrove J.T., Carroll K.C. Effective detection of toxigenic Clostridium difficile by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *Journal Clinical Microbiology*. 2006; 44: 1145—9.
27. Fenner L., Widmer A.F., Goy G., Rudin S., Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of Clostridium difficile. *Journal Clinical Microbiology*. 2008; 46: 328—30.
28. Burnham C.-A.D., Carroll K.C. Diagnosis of Clostridium difficile infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26: 604—30.
29. Hall I., O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis. *American Journal of Diseases*. 1935; 49(2): 390—402.
30. Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L., Kasper D.L. Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of Clostridium in Hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*. 1977; 136: 701—5.
31. George W.L., Sutter V.L., Citron D., Finegold S.M. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *Journal Clinical Microbiology*. 1979; 9: 214—9.
32. Kvetnaya A.S., Makridi P.S., Bekhtereva M.K. The current state of laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated infection. *Zhurnal Infektologii*. 2013; 5: 5—12. (in Russian)
33. Qa'Dan M., Ramsey M., Daniel J., Spyres L.M., Safiejko-Mroccka B., Ortiz-Leduc W. et al. Clostridium difficile toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cellular Microbiology*. 2002; 4: 425—34.
34. O'Horo J.C., Jones A., Sternke M., Harper C., Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012; 87: 643—51.
35. Kim H., Jeong S.H., Kim M., Lee Y., Lee K.. Detection of Clostridium difficile toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of C. difficile infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61: 274—7.
36. Collins D., Elliott B., Riley T.V. Molecular methods for detecting and typing of Clostridium difficile. *Pathology*. 2015; 47: 211—8.
37. Kuhl S.J., Tang Y.J., Navarro L., Gumerlock P.H., Silva J. Diagnosis and Monitoring of Clostridium difficile Infections with the Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases*. 1993; 16: 4: S234—S238.
38. Putsathit P., Morgan J., Bradford D., Engelhardt N., Riley T.V. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic Clostridium difficile in human stool specimens. *Pathology*. 2015; 47: 165—8.
39. Ciaran P., Kelly M.D., Thomas J., La Mont M.D. Clostridium difficile —associated diarrhea and colitis. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 1939—40.
40. Beckmann C., Heining U., Marti H., Hirsch H.H. Gastrointestinal pathogens detected by multiplex nucleic acid amplification testing in stools of pediatric patients and patients returning from the tropics. *Infection* 2014; 42: 961—70.
41. Vocale C., Rimoldi S.G., Pagani C., Grande R., Pedna F., Arghittu M. et al. Comparative evaluation of the new xTAG GPP multiplex assay in the laboratory diagnosis of acute gastroenteritis. Clinical assessment and potential application from a multicentre Italian study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 34: e33—7. A
42. Mengelle C., Mansuy J.M., Prere M.F., Grouteau E., Claudet I., Kamar N. et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19: E458—65.
43. Binnicker M.J. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *Journal Clinical Microbiology*. 2015; 53: 3723—8.
44. Spina A., Kerr K.G., Cormican M., Barbut F., Eigentler A., Zerva L. et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015; 21: 719—28.
45. Stockmann C., Rogatcheva M., Harrel B., Vaughn M., Crisp R., Poritz M. et al. How well does physician selection of microbiologic tests identify Clostridium difficile and other pathogens in paediatric diarrhoea? Insights using multiplex PCR-based detection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015; 21: 179.e9—179.e15.
46. Spigaglia P., Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among Clostridium difficile clinical isolates. *Journal Clinical Microbiology*. 2002; 40: 3470—5.
47. Rand K.H., Tremblay E.E., Hoidal M., Fisher L.B., Grau K.R., Karst S.M. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: Implications for infection control. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015; 82: 154—7.
48. Chan D.K., Leggett C.L., Wang K.K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. *World Journal Gastroenterology*. 2016; 22: 1639—49.
49. McGuire N.D., Ewen R.J., de Lacy Costello B., Garner C.E., Probert C.S.J., Vaughan K. et al. Towards point of care testing for C. difficile infection by volatile profiling, using the combination of a short multi-capillary gas chromatography column with metal oxide sensor detection. *Measurement Science and Technology*. 2014; 25: 65108.
50. Wilson A.D., Baietto M. Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors*. 2011; 11: 1105—76.
51. Chan D.K., Leggett C.L., Wang K.K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. *World Journal Gastroenterology*. 2016; 28; 22: 1639—49.
52. Maurer M., McCulloch M., Willey A.M., Hirsch W., Dewey D. Detection of Bacteriuria by Canine Olfaction. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016; 3: ofw051.
53. Bomers M.K., Menke F.P., Savage R.S., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., van Agtmael M.A., Covington J.A. et al. Rapid, accurate, and on-site detection of C. difficile in stool samples. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015; 110: 588—94.
54. Garner C.E., Smith S., de Lacy Costello B., White P., Spencer R., Probert C.S.J. et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB Journal*. 2007; 21: 1675—88.