

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»

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

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

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ И ДИАГНОСТИКА

Том 62

3 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

МАРТ

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 31.01.2017.

Подписано в печать 16.03.2017.

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

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 209.

**E-mail: oao-meditsina@mail.ru**

**WWW страница: www.medlit.ru**

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

**Индекс 71442 — для подписчиков**

**Подписка через Интернет: www.aks.ru,**

**www.pressa-ef.ru**

**Подписка на электронную версию:**

**eibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2017. № 3. 129—192.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 62  
3 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MARCH

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:  
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

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

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.A. Zyukina*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

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

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

## БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Салтыкова М.М. Структурно и функционально разные пулы жировой ткани: инсулиннезависимые висцеральные клетки, инсулинзависимые подкожные адипоциты и бурые клетки термогенеза ..... 132
- Аверьянова И.В., Максимов А.Л. Сезонная динамика основных показателей липидного и углеводного обмена у студентов аборигенов и европеоидов Северо-Востока России ..... 140
- Алиева Н.Р., Камилова А.Т., Арипов А.Н. Статус витамина D при заболеваниях тонкой кишки у детей в зоне повышенной солнечной инсоляции. .... 146

## ГЕМАТОЛОГИЯ

- Верлинский О.Ю., Жиленкова Ю.И., Козлов А.В., Бессмельцев С.С. Лабораторные маркеры выявления носительства бета-талассемии ..... 149
- Буркитбаев Ж.К., Абдрахманова С.А., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б. Внедрение NAT-скрининга инфекций у доноров крови Республики Казахстан ..... 154

## КОАГУЛОЛОГИЯ

- Столяр М.А., Ивашин Д.С., Ольховский И.А. К вопросу выбора антикоагулянтов при АДФ-индуцированном импедансном тесте агрегации тромбоцитов у пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями ... 156

## ИММУНОЛОГИЯ

- Шевченко О.П., Курабекова Р.М., Цирульникова О.М. Роль трансформирующего фактора роста бета 1 при заболеваниях печени. .... 161
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.В., Ваишуква М.А., Тотolian А.А. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16S рРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии ..... 165
- Шерстенникова А.К., Кашутин С.Л., Николаев В.И., Хлопина И.А. Уровень экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы ..... 170
- Верижникова Ж.Г., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Панавидина Т.А., Середавкина Н.В., Попкова Т.В., Айзина Н.Л., Насонов Е.Л. Клиническая информативность автоматизированных методов скринингового определения антинуклеарных антител с использованием непрямо реакции иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и мультиплексной технологии XMAP при системной красной волчанке. .... 173
- Драпкина О.М., Шойбонов Б.Б., Елиашевич С.О. Способ оценки функциональной активности C3-конвертазы классического пути активации комплемента ..... 177

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Львов Н.Д., Баринский И.Ф. Спектр маркеров герпесвирусных инфекций и алгоритм их лабораторной диагностики у детей с воспалительными процессами верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. .... 182
- Шипицына И.В., Осипова Е.В. Биопленкообразующая способность штаммов *Serratia* spp., выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом в монокультурах и в составе ассоциации микроорганизмов, полученных *in vitro* ..... 188

## BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Saltykova M.M. The structurally and functionally different pools of fat tissue: insulin-independent visceral cells, insulin-dependent subcutaneous adipocytes and brown cells of thermogenesis ..... 132
- Averyanova I.V., Maksimov A.L. The season dynamics of main indices of lipid and carbohydrate metabolism in students aborigines and Caucasians of the Northern-East of Russia ..... 140
- Alieva N.R., Kamilova A.T., Aripov A.N. The status of vitamin B under diseases of small intestine in children in the zone of increased sun insolation ..... 146

## HEMATOLOGY

- Verlinsky O.Yu., Zhilenkova Yu.I., Kozlov A.V., Bessmeltsev S.S. The laboratory markers of detection of beta-thalassemia carriage ..... 149
- Burkitbaev J.K., Abdrakhmanova S.A., Savchuk T.N., Zhiburt E.B. The implementation of NAT-screening of infections in blood donors of the Republic of Kazakhstan ..... 154

## COAGULOGY

- Stolyar M.A., Ivashin D.S., Olkhovskiy I.A. On the issue of selection of coagulants under ADP-induced impedance test of aggregation of thrombocytes in patients with chronic myeloproliferative tumors ..... 156

## IMMUNOLOGY

- Shevchenko O.P., Kurabekova R.M., Tsiurulnikova O.M. The role of transforming growth factor beta 1 under diseases of liver ..... 161
- Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenotrophomonas maltophilia* using the techniques of direct sequencing 16S p RNA and MALDI-ToF mass-spectrometry ..... 165
- Sherstennikova A.K., Kashutin S.L., Nikolaev V.I., Khlopina I.A. The level of expression of molecules of adhesion on lymphocytes depending on amount of their cytoplasm ..... 170
- Verizhnikova Zh.K., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Panafidina T.A., Seredavkina N.V., Popkova T.V., Aizina N.L., Nasonov E.L. The clinical informativeness of automated methods of screening detection of anti-nuclear antibodies using indirect reaction of immune fluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay and multiplex XMAP technology under systemic lupus erythematosus ..... 173
- Drapkina O.M., Shoibonov B.B., Eliashevich S.O. The mode of evaluation of functional activity of C3-convertase of classic path of activation of complement ..... 177

## MICROBIOLOGY

- Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Lvov N.D., Barinskiy I.F. The spectrum of markers of herpes viral infections and algorithm of their laboratory diagnostic in children with inflammatory processes of upper respiratory ways and ENT-organs ..... 182
- Shipitsyna I.V., Osipova E.V. The biofilm formation ability of strains *Serratia* spp., separated from wounds of patients with chronic osteomyelitis in mono-cultures and in composition of association of microorganisms harvested *in vitro* ..... 188

## БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., САЛТЫКОВА М.М., 2017

УДК 611-018.26

Титов В.Н.<sup>1</sup>, Салтыкова М.М.<sup>2</sup>

### СТРУКТУРНО И ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНЫЕ ПУЛЫ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: ИНСУЛИНЕЗАВИСИМЫЕ ВИСЦЕРАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, ИНСУЛИНЗАВИСИМЫЕ ПОДКОЖНЫЕ АДИПОЦИТЫ И БУРЫЕ КЛЕТКИ ТЕРМОГЕНЕЗА

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва;

<sup>2</sup>Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва

Согласно филогенетической теории общей патологии, *in vivo* функционируют 3 филогенетически, морфологически и функционально разные пулы жировых клеток. Первый – филогенетически ранний, ограниченный в числе клеток пул висцеральных жировых клеток (ВЖК) сальника и забрюшинной клетчатки. Поздний в филогенезе инсулин регуляторного действия на ВЖК не оказывает. ВЖК депонируют жирные кислоты (ЖК) в форме триглицеридов (ТГ) для обеспечения субстратами энергии реализации 6 биологических функций: биологической функции гомеостаза и трофологии, биологических функций эндоэкологии и адаптации, функции продолжения вида и когнитивной биологической функции. Патология ВЖК при алиментарном переизбытке физиологической пищи формирует метаболический синдром. В реализации механизма обратной связи ВЖК секретируют лептин. Второй – более поздний в филогенезе, потенциально больший по числу клеток пул инсулинзависимых подкожных адипоцитов (ИПА). Потенциально неограниченный по числу ИПА пул предназначен для обеспечения субстратами наработки аденозинтрифосфата всего одной биологической функции – функции локомоции, движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов. Свойством функции жировых клеток является то, что они депонируют ЖК в форме неполярных ТГ в составе липопротеинов при рецепторном эндоцитозе; высвобождают ЖК только в форме неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в межклеточную среду. НЭЖК связывает липидпереносящий белок альбумин. Основная патология ИПА – ожирение при выраженной пролиферации ИПА. Для реализации механизма обратной связи ИПА синтезируют адипонектин. Третий – пул бурых жировых клеток (БЖК), в митохондриях которых разобраны физико-химические процессы окисления и окислительного фосфорилирования. Митохондрии БЖК нарабатывают главным образом калории тепловой энергии. Функционируя у теплокровных животных, БЖК поддерживают постоянную температуру тела, биологическую функцию гомеостаза при зимней спячке (период гибнации) у животных и в первые недели постнатальной жизни у *Homo sapiens*. Три пула жировой ткани формируются из разных предшественников.

Ключевые слова: жировые клетки; висцеральные жировые клетки; инсулинзависимые подкожные адипоциты; бурые жировые клетки; ожирение; метаболический синдром; обзор.

Для цитирования: Титов В.Н., Салтыкова М.М. Структурно и функционально разные пулы жировой ткани: инсулинзависимые висцеральные клетки, инсулинзависимые подкожные адипоциты и бурые клетки термогенеза. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 132-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-132-139>

Titov V.N.<sup>1</sup>, Saltykova M.M.<sup>2</sup>

THE STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY DIFFERENT POOLS OF FAT TISSUE: INSULIN-INDEPENDENT VISCERAL CELLS, INSULIN-DEPENDENT SUBCUTANEOUS ADIPOCYTES AND BROWN CELLS OF THERMOGENESIS

<sup>1</sup>The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The state research center of the Russian Federation-the institute of medical biological problems of the Russian academy of sciences, 123007 Moscow, Russia

*Three phylogenetically, morphological and functionally different pools of fatty cells are function in vivo according phylogenetic theory of general pathology. The first one is a phylogenetically early and limited in number of cells pool of visceral fatty cells of omentum and retro-peritoneal cellular tissue. The late in phylogenesis insulin renders no regulatory effect on visceral fatty cells. The visceral fatty cells deposit fatty acids in the form of triglycerides providing with energy substrates implementation of six biological functions: biological function of homeostasis and trophology, biological functions of endoecology and adaptation, function of continuation of species and cognitive biological function. The pathology of visceral fatty cells under alimentary overeating of physiological food develops metabolic syndrome. In the process of implementation of feedback mechanism visceral fatty cells secrete leptin. The second one is a later in phylogenesis, potentially larger in number of cells pool of insulin-dependent subcutaneous adipocytes. This pool, potentially unlimited in number of insulin-dependent subcutaneous adipocytes, is destined to provide with energy substrates produced by adenosine triphosphate only one biological function - a function of locomotion, motion at the expense of contraction of cross-striated skeletal myocytes. The characteristic of function of fatty acids is that they deposit fatty acids in the form of non-polar triglycerides in composition of lipoproteins under receptor endocytosis; release fatty acids*

only in form of into intercellular medium. The unesterified fatty acids are bound by lipid-transporting protein albumin. The main pathology of insulin-dependent subcutaneous adipocytes is obesity with expressed proliferation of insulin-dependent subcutaneous adipocytes. The insulin-dependent subcutaneous adipocytes synthesize adiponectin for implementing feedback mechanism. The third one is a pool of brown fatty cells. The physical chemical processes of oxidation and oxidative phosphorylation are uncoupled in mitochondria of these cells. The mitochondria of brown fatty cells mainly produce calories of heat energy. The brown fatty cells, functioning in warm-blooded animals, support constancy of temperature of body, biological function of homeostasis under winter sleep (period of hibernation) in animals and in the first weeks of post-natal life of *Homo sapiens*. Three pools of fatty tissue are developed from different sources.

**Key words:** *fatty cells; visceral fatty cells; insulin-dependent subcutaneous adipocytes; obesity; metabolic syndrome; review*

**For citation:** Titov V.N., Saltykova M.M. The structurally and functionally different pools of fat tissue: insulin-independent visceral cells, insulin-dependent subcutaneous adipocytes and brown cells of thermogenesis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 132-139. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-132-139>*

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

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

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

Received 01.06.2016  
Accepted 29.11.2016

Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии, мы изложили морфологические, функциональные различия двух пулов жировых клеток *in vivo*. Это:

а) филогенетически ранний, ограниченный в числе клеток пул инсулиннезависимых висцеральных жировых клеток (ВЖК) сальника, забрюшинной клетчатки; поздний в филогенезе гуморальный медиатор инсулин регуляторного действия не оказывает;

б) поздний в филогенезе, потенциально больший по числу клеток пул инсулинзависимых подкожных адипоцитов (ИПА) [1]. ВЖК слабо реализуют биологическую функцию пролиферации, однако физиологично увеличивают размеры ВЖК, реализуя биологическую реакцию гипертрофии.

Биологическая реакция пролиферации (деление клеток) в ИПА определена, с одной стороны, индукцией биологической реакции пролиферации избытком экзогенного субстрата (жирных кислот пищи – ЖК) при афизиологичном переедании, с другой стороны – величиной пула ИПА, которая ограничена способностью систем организма реализовать *in vivo* биологические функции и биологические реакции при афизиологичном увеличении числа ИПА.

Филогенетически ранний пул независимых от инсулина ВЖК сальника – депо- субстратов, ЖК в форме неполярных триглицеридов (ТГ) предназначен для обеспечения субстратами энергии реализации *in vivo* 6 биологических функций (биологическая функция гомеостаза, трофологии, биологическая функция эндоэкологии, функция адаптации, биологическая функция продолжения вида и когнитивная функция). Филогенетически поздний пул ИПА реализует одну из филогенетически поздних функций – функцию локомоции, движение за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов [2].

Третий *in vivo* локальный пул бурых жировых клеток. Одновременно *in vivo* функционирует и третий пул жировых клеток, функция которого отличается от таковой пула ВЖК и большего по числу клеток пула ИПА; это не очень большой пул бурых жировых клеток (БЖК) [3]. Как и ВЖК и ИПА, БЖК реализуют *in vivo* биологические функции гомеостаза и адаптации, расходуя депонированные ЖК для продукции тепла с целью оптимального постоянства такого физико-химического, биологического параметра *in vivo*, как температура тела гомойотермных (теплокровных) животных; это относится и к виду *Homo sapiens*. Пул филогенетически ранних БЖК не зависит от регуляторного действия гормона инсулина. Функцию БЖК называют еще несократительным термогенезом.

При физиологичной общности трех пулов жировых клеток *in vivo* функция БЖК отличается от функции «светлых» ВЖК и ИПА. Все жировые клетки непрерывно реализуют три биологические реакции в процессе длительного депонирования ЖК: а) поглощение экзогенных ЖК в форме неполярных ТГ в составе липопротеинов низкой, позже в липопротеинах очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) путем апоВ-100 и филогенетически более позднего апоЕ/В-100 рецепторного эндоцитоза; б) длительное, динамичное депонирование ЖК, главным образом  $C_{18:1}$  олеиновой мононасыщенной ЖК (МЖК) и  $C_{16:0}$  пальмитиновой насыщенной ЖК (НЖК) в форме малых → больших → опять малых капель олеиновых и пальмитиновых ТГ в цитоплазме жировых клеток; в) высвобождение ЖК из ВЖК и ИПА в кровотоки и межклеточную среду после гидролиза *in situ* в клетках всех ТГ только в форме полярных, незтерифицированных ЖК (НЭЖК).

Процессы метаболизма проходят только в малых каплях ТГ; при небольшом объеме они имеют большую реакционно-способную поверхность ТГ; капли ТГ покрыты и отделены от цитоплазмы жировых клеток монослоем из фосфатидилхолина (ФХ) и незтерифицированного спирта холестерина (ХС). В плазме крови и межклеточной среде НЭЖК физиологично связывает липидпереносящий белок альбумин. Специфично альбумин связывает 2 молекулы  $C_{16}$  или  $C_{18}$  ЖК, менее неспецифично на поверхности молекулы – еще 2 ЖК. Функциональной особенностью ВЖК, ИПА и БЖК является то, что все они активно (рецепторно) поглощают ЖК в форме ТГ в составе ЛП; освобождают жировые клетки все депонированные ЖК только в форме полярных НЭЖК [4].

Параметры освобождения НЭЖК из жировых клеток определены двумя факторами: содержанием ХС в полярном монослое на поверхности капель неполярных ТГ в цитоплазме; чем больше ХС конденсировано между молекулами ФХ, тем менее интенсивно в жировых клетках происходит липолиз (гидролиза) ТГ; физико-химическими свойствами самих ТГ как субстрата для действия позиционнотипичной, гормонзависимой триглицеролацилгидролазы липазы, а далее ди- и моноацилгидролазы. Чем выше температура плавления позиционных изомеров ТГ, тем более неоптимален субстрат для гидролиза гормонзависимой липазой. Так, температура плавления позиционного изомера ТГ как олеил-олеат глицерола (ООО) составляет -15 °С, в то время как для иного изомера – пальмитоил-пальмитоил-пальмитат глицерола (ППП) точка плавления равна 49 °С; различие в физико-химическом параметре субстратов составляет более 60 °С. Соответственно этому константа скорости гидролиза

пальмитиновых ТГ и освобождения НЭЖК на порядки ниже по сравнению с гидролизом олеиновых ТГ как ООО [5].

Если депонированные ЖК в ВЖК и ИПА окисляют митохондрии во всех клетках *in vivo* после переноса их альбумином, ЖК, депонированные в БЖК, подвергаются окислению митохондрии *in situ*. При этом митохондрии БЖК не формируют макроэргический аденозинтрифосфат (АТФ), а генерируют эквивалентное количество тепла в форме калории. Оно рассеивается в окружающих тканях, поддерживая оптимальную температуру тела, биологическую функцию гомеостаза. Липолитические гормоны (катехоламины, трийодтиронин, глюкокортикоиды, соматотропный гормон аденогипофиза) интенсивно активируют липолиз в филогенетически разных клетках: в ВЖК, БЖК и ИПА. При этом ингибировать липолиз (гидролиз ТГ) может только инсулин и только в ИПА, но не в ВЖК и БЖК (рис. 1, см. обложку).

Наличие у грызунов локальных пулов бурой жировой ткани ассоциировано с низким содержанием ТГ в ВЖК и ИПА и высокой чувствительностью клеток к инсулину. Инсулинзависимыми *in vivo* являются только скелетные, поперечнополосатые миоциты, синцитий кардиомиоцитов, перипортальные гепатоциты, ИПА и оседлые макрофаги Купфера. Согласно методологическому приему биологической субординации и филогенетической теории общей патологии, новый фактор регуляции метаболизма инсулин логично настраивается над более ранними гуморальными регуляторами *in vivo*, логично с ними взаимодействует, но отменить действие более раннего медиатора более поздний не может. Инсулин не может влиять на регуляторное, липолитическое действие более ранних в филогенезе гормонов.

После установления активной роли БЖК и идентификации специфического фактора транскрипции, фактора роста, который регулирует функцию пула БЖК, возрос интерес к выяснению функциональной роли, биологического значения БЖК, особенностям их функции во взрослом организме, возможному компенсаторному участию БЖК в патогенезе ожирения, частота которого в популяции *Homo sapiens* возрастает повсеместно.

Специфичной патологией ВЖК является метаболический синдром (МС), патология ИПА проявляется в формировании иного патологического состояния – синдрома ожирения. Синдром же резистентности к инсулину (ИР), как и умеренное повышение АД, характерен как для МС, так и для ожирения, патологии как ВЖК, так и ИПА. В то же время компенсаторное повышение гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла при патологии ВЖК и ИПА на этапе инициирования сигнала в барорецепторах паракринного сообщества (ПС) клеток, органах и формирования афферентной сигнализации в сосудодвигательный центр продолговатого мозга реально происходит по-разному.

Повышение частоты ожирения в популяции *Homo sapiens* напоминает эпидемию, метаболическую пандемию, когда эпидемиологически обоснованные методы профилактики результата не приносят. Иногда это побуждает клиницистов без должного основания считать, что применение фармакологических препаратов может быть методом профилактики [6]. С позиций филогенетической теории общей патологии подобные предложения, тем более практические действия, являются полностью необоснованными. Метаболические пандемии вызывают атеросклероз и атероматоз, метаболическая (эссенциальная) артериальная гипертензия, МС, синдром ожирения, синдром ИР и неалкогольная жировая болезнь печени [7].

Ожирение наиболее часто рассматривают как результат дисбаланса между избыточным количеством поглощаемых с пищей субстратов для выработки клетками энергии, в первую очередь экзогенных ЖК; количеством потраченных субстра-

тов (ЖК и ТГ) в условиях низкого расхода энергии, уровня физической активности. У *Homo sapiens* есть биологическое право – потреблять пищу, которую он хочет и сколько хочет, но одновременно есть и биологическая «обязанность» – все съеденное истратить. Не можешь потратить, не ешь.

Патология ВЖК и клинически значимая картина МС в большей мере обусловлены феноменом переадресации физиологичной по всем параметрам пищи (избыточная индукция субстратом) при физиологичном уровне физической активности.

Одновременно ожирение как патологию ИПА в равной мере определяют как избыточное количество не в полной мере физиологичной пищи и явно сниженный уровень физической активности. В течение многих лет ко всем пулам жировых клеток относились как к единой ткани с функцией депонирования ЖК для окисления их в митохондриях с целью синтеза макроэргического АТФ. В физиологичных условиях пул ВЖК с ранних ступеней филогенеза реализовал три физиологичные реакции: активированное, активное поглощение клетками ЖК в форме ТГ в составе ЛПНП и ЛПОНП; активное депонирование ЖК в форме капель неполярных ТГ; высвобождение ЖК в межклеточную среду в форме только полярных НЭЖК.

На ранних ступенях филогенеза для реализации функциональной активности ВЖК на втором уровне регуляции метаболизма, уровне ПС клеток и органов для реализации трех биологических реакций необходимо большее число гуморальных медиаторов. Когда афизиологично перегруженные ТГ клетки ВЖК вынужденно формируют афизиологичную, компенсаторную биологическую реакцию стресса эндоплазматического ретикулума, ВЖК к большому числу физиологичных гуморальных медиаторов добавляют еще и гуморальный медиатор обратной связи – лептин. Это филогенетически поздний, гуморальный медиатор ВЖК ↔ нейросекреторные ядра гипоталамуса головного мозга [8].

Гуморальный медиатор лептин «старается», взаимодействуя с рецепторами ядер гипоталамической области мозга, понизить количество депонируемых в ВЖК жирных кислот, ТГ путем ингибирования чувства голода. Лептин стремится уменьшить индукцию субстратом, количество ТГ, которое поступает с пищей. Если действие лептина остается без ответа и чувство голода ингибировать не удастся, к секретируемым ВЖК гуморальным медиаторам и лептину присоединяется секрета комплекс провоспалительных медиаторов биологической реакции апоптоза в геноме запрограммированной гибели клеток.

Дифференцированные в филогенезе клетки жировой ткани являются производными рыхлой соединительной ткани (РСТ), поэтому формирование ими биологической реакции воспаления является филогенетически более ранней функцией, реализацией биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления. Важно понять, что в ответ на усиленную индукцию даже физиологичными ЖК организм по большому счету отвечает гибелью ВЖК; это происходит по типу запрограммированной в геноме биологической реакции апоптоза.

Столь большое количество секретируемых ВЖК гуморальных медиаторов дало авторам основание сравнивать функцию ВЖК и ИПА с эндокринными, эпителиальными клетками желез внутренней секреции [10]. Все гуморальные медиаторы ВЖК и ИПА действуют только локально, на уровне (в пределах) ПС клеток; к гормональной регуляции медиаторы, кроме секреции лептина ВЖК и адипонектина ИПА, отношения не имеют.

В то же время, согласно филогенетической теории общей патологии, независимо от гибели клеток по типу апоптоза или некроза в ответ на замусоривание межклеточной среды эндогенными флогогенами – тельцами апоптоза организм

генерализованно формирует биологическую реакцию воспаления. Она длительно нарушает *in vivo* функциональную активность органов и систем, блокируя реализацию биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция (М↔м) на уровне эндотелийзависимой вазодилатации в ПС клеток.

При афизиологичной перегрузке субстратами (ЖК и ТГ) ВЖК формируют стресс эндоплазматического ретикулума и погибают по типу апоптоза. Это происходит и когда они перегружены физиологичными позиционными изомерами ТГ – ООО. В популяциях средиземноморских стран частота атеросклероза и атероматоза является реально низкой, в то время как частота МС сопоставима с аналогичным показателем в других странах Европы. В то же время БЖК реализуют и специфичную активность: специфичную, биологическую и физико-химическую реакции термогенеза.

Эту функцию осуществляют только БЖК; способны ли ВЖК и ИПА хотя бы в малой мере реализовать биологическую реакцию термогенеза, и имеет ли это какое-либо отношение к формированию МС как патологии ВЖК и к синдрому ожирения как патологии ИПА, предстоит еще выяснить. БЖК формируют отдельно расположенные *in vivo* локальные участки жировой ткани. В раннем постнатальном периоде бурая жировая ткань, реализуя биологическую реакцию термогенеза, предотвращает переохлаждение новорожденных у млекопитающих и *Homo sapiens* на протяжении первых недель постнатального периода [11]. Продолжаются дебаты относительно функции БЖК у взрослых: осуществляют ли они биологическую реакцию термогенеза или подвержены физиологичной инволюции. Применение метода позитронной эмиссионной томографии с [<sup>18</sup>F]-флуоридезоксиглюкозой параллельно с компьютерной томографией выявило и у взрослых наличие локальных очагов бурой жировой ткани [12]. Содержание ее меняется с возрастом, зависит от ожирения; к тому же активность термогенеза в БЖК определяют и факторы внешней среды, температура окружающей среды и осо-

бенности климата [13]. Реальность участия БЖК в становлении патологии ИПА, формировании синдрома ожирения подлежит более пристальной оценке.

Относительно активности БЖК, поглощения ими кислорода и регуляции активности термогенеза роль БЖК в повышении температуры тела предстоит еще выяснить, хотя не исключено, что процесс термогенеза в БЖК может быть и снижен, формируя негативный баланс тепловой энергии. Наличие индуцибельных белых адипоцитов с функцией термогенеза, «бежевых» адипоцитов еще потребует пристального внимания.

*Бурые адипоциты и особенности функции жировых клеток in vivo.* БЖК доминируют в бурой жировой ткани (см. таблицу). Изначально можно полагать, что БЖК были равномерно распределены между белыми ИПА. В цитоплазме они содержат ЖК в мелких и крупных каплях ТГ; в то же время светлые и бурые жировые клетки различаются как морфологически, так и функционально.

В цитоплазме белые жировые клетки наиболее часто формируют одну большую каплю ТГ и имеют небольшое число митохондрий. В противоположность этому БЖК имеют несколько очагов формирования капель ТГ; большее число митохондрий, которые содержат; много цитохромов бурого цвета и высокую экспрессию «разобщающего протеина», термогенина, который сосредоточен на внутренней мембране митохондрий. Наиболее изученным гуморальным медиатором, который регулирует специфичную функцию БЖК и активность биологической реакции термогенеза, является разобщающий протеин-1 (РП-1), термогенин. Митохондрии в большинстве клеток продуцируют АТФ при действии АТФ-синтазы, используя формирование ею высокого градиента протонов (H<sup>+</sup>) по обе стороны внутренней мембраны клеточных органелл. РП-1 уменьшает градиент протонов, разобщает физико-химические реакции дыхательных цепей и фосфорилирования, активируя реакцию термогенеза.

#### Сопоставление функциональных и регуляторных свойств трех пулов жировой ткани *in vivo*

Биологические функции	ВЖК	ИПА	БЖК
	депо субстратов энергии, обеспечение всех функций <i>in vivo</i>	депо субстратов энергии, обеспечение одной функции локомоции	рассеяние энергии для поддержания температуры тела (термогенез)
Локализация	Сальник, забрюшинное пространство	Подкожная клетчатка	Область над ключицей, вокруг позвоночника, в области шеи
Относительное количество, %	15–17	80	1–3 (у новорожденных 200–300 г)
Размеры клеток	Крупные	Мелкие	Мелкие
Предшественники клеток	Не экспрессирующие <i>Muf5</i> стволовые клетки мезодермы ( <i>Muf5</i> -)	Не экспрессирующие <i>Muf5</i> стволовые клетки мезодермы ( <i>Muf5</i> -)	<i>Muf5</i> – экспрессирующие стволовые клетки мезодермы ( <i>Muf5</i> +)
Иннервация клеток	Высокая	Низкая	Высокая
Васкуляризация клеток	Высокая	Низкая	Высокая
Активаторы липолиза	Глюкокортикоиды, гормон роста, триiodтиронин, натрийуретические пептиды	Адреналин	Норадреналин
Секреция медиаторов на уровне организма	Лептин	Адипонектин	VEGF-A, ИЛ-6
Секреция адипокинов (уровень ПС клеток)	Ростзависимый онкогенный фактор, ИЛ-7, тканевой ингибитор металлопротеиназ (TIMP-) ангиотензиноген; ИЛ-6, FGF-21, ФНО-α, резистин	ФНО-α, резистин	При действии холода Т3, VEGF-A, IGF-1, ИЛ-6, ИЛ-1α ангиотензиноген; FGF-21
Рецепторы к гормонам	Глюкокортикоиды, андрогены	Инсулин, эстрогены	Инсулин, тиреоидные гормоны
Адренорецепторы	β3	α2	β2, β3
Патология пула клеток	МС	Ожирение	
Пролиферация	Низкая	Высокая	Высокая при охлаждении
Гипертрофия	Высокая	Низкая	Низкая

Термогенин (РР-1) локализован на внутренней мембране митохондрий БЖК; это основной гуморальный медиатор реакции термогенеза. Медиатор регулирует продукцию тепла в БЖК у новорожденных в течение первых недель постнатального периода. Он регулирует образование тепла и у тех видов млекопитающих, которые впадают в зимнюю спячку, в период биологической гибернации. При увеличении проницаемости внутренней мембраны митохондрий, которую инициирует термогенин, протоны, перенесенные в межмембранное, реакционно активное пространство, покидают его, возвращаясь в матрикс. Образование энергии в форме тепла, биологическую реакцию термогенеза РР-1 инициирует только в БЖК. Термогенин на кристах митохондрий разобщает физико-химические реакции клеточного дыхания (окисления) и окислительного фосфорилирования. В других тканях находят и иные термогенины. Полагают, что РР-1 задействован и в формировании активных форм кислорода (АФК), избыток которых в ПС клеток проявляет афизиологичное действие.

Изученным фактором, который стимулирует активность БЖК в жировой ткани, является норадреналин. Гуморальный, гидрофильный медиатор синапсов вегетативной, симпатической нервной системы оказывает регуляторное действие, связываясь с  $\beta_3$ -адренорецепторами на клеточной мембране БЖК. Далее норадреналин повышает функциональную активность БЖК, усиливает реализацию биологической реакции гипертрофии ВЖК, пролиферацию БЖК и образование «бежевых» жировых клеток из белых ИПА.

При связывании гормона с рецептором на плазматической мембране БЖК в цитоплазме клеток возрастает активность аденилатциклазы; в цитоплазме БЖК повышается содержание циклического аденозинмонофосфата (ц-АМФ). Далее при увеличении активности протеинкиназы А ц-АМФ в роли внутриклеточного медиатора активирует в БЖК гормонзависимую липазу (триглицеролгидролазу), ди- и моноацилгидролазу. В результате происходит гидролиз ТГ с освобождением трех ЖК в форме полярных НЭЖК и полярного трехатомного спирта глицерина. В митохондриях термогенин активирует окисление олеиновой МЖК, пальмитиновой НЖК с образованием калорий тепла. Регуляторное действие РР-1 смещает экспрессию генов в геноме митохондрий в сторону образования не макроэргического АТФ, а энергии в форме тепла [14].

Активность БЖК повышена в тех случаях, когда *in vivo* для сохранения биологической функции гомеостаза необходимо повысить образование тепла. Это происходит при охлаждении, активации термогенеза без озноба; при пробуждении видов животных от зимней спячки, а также у новорожденных животных и человека. Если БЖК у человека имеют меньшее функциональное значение, бурая жировая ткань все-таки является активной и реализует термогенез; он повышается после каждого приема пищи, при интенсивных сокращениях скелетных миоцитов, сократительном термогенезе. Это позволяет понять, почему некоторые люди не полнеют, даже если потребляют большее, чем физиологичное, количество пищи.

У пациентов с синдромом ожирения бурая жировая ткань развита менее выраженно; часто она просто отсутствует. Физиологично БЖК по сравнению с ВЖК имеют более высокий уровень кровоснабжения, лучшую васкуляризацию, содержат большее число митохондрий и цитохромов, в том числе цитохрома С. Несмотря на это, образование АТФ в митохондриях БЖК повышено лишь незначительно. БЖК при термогенезе активно окисляют как ЖК, так и глюкозу.

В БЖК в отличие от ВЖК и ИПА окисление и окислительное фосфорилирование не являются сопряженными реакциями; на это указывает слабая реакция с 2,4-динитрофенолом,

а также слабое регуляторное действие индукции аденозиндифосфатом (АДФ). При условиях преобладания в митохондриях реакций окисления над окислительным фосфорилированием образуются калории тепла и лишь немного макроэргического АТФ. С позиций хемиосмотической теории П. Митчелла высокий градиент протонов, который формируется на внутренней мембране митохондрий при образовании АТФ, при термогенезе выражен в меньшей мере.

Бежевые адипоциты (похожие на бурые) рассматривают как переходные формы между белыми жировыми клетками ВЖК и ИПА, которые продуцируют только АТФ, и БЖК, которые начинают реализовывать биологическую реакцию термогенеза. Бежевые адипоциты содержат меньше РР-1, формируют биологическую реакцию компенсации *in vivo*. БЖК и бежевые адипоциты имеют разное происхождение; первые формируются из клеток мезодермы, и это экспрессируют гены *Myf5* и *Pah7*. Происхождение бежевых жировых клеток среди ИПА в подкожной клетчатке находится в стадии обсуждения; более вероятно, родственниками бежевых клеток являются белые ИПА [15]. Однако многие придерживаются мнения, что они образуются из физиологичных предшественников [16].

При определении глобального профиля генов *in vitro* выделены два предшественника отдельно для белых и бежевых жировых клеток [17] (рис. 2, см. обложку). Бежевые адипоциты экспрессируют на клеточной мембране CD137-транслоказу для ЖК и только жировые клетки, которые дифференцировались из бежевых предшественников, могут превращаться в БЖК. В белых клетках эпидидимальной жировой клетчатки, которую относят к висцеральному пулу сальника, предшественники бежевых адипоцитов могут дифференцироваться и из белых ВЖК. Плюрипотентные предшественники, стромальные клетки экспрессируют общий маркер, которым является CD34-транслоказа ЖК. Регулируют адипогенез и альфа-рецепторы, активируемые пролифератором пероксином (РАПП- $\alpha$ ), и РАПП- $\gamma$ , которые располагаются на мембране ядра. РАПП вовлечен в процессы дифференцировки как белых ВЖК и ИПА, так и БЖК в жировой ткани наравне с большим цинксодержащим фактором транскрипции.

Свойства БЖК, которые превращают ТГ в  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , уменьшают содержание ТГ в жировых клетках и рассеивают тепловую энергию с поверхности тела, можно использовать с целью компенсации тех афизиологичных процессов, которые происходят при ожирении. У грызунов бурая жировая ткань располагается в области лопаток, почек и по ходу брюшной аорты. У новорожденных детей, как и у грызунов, БЖК локализованы между лопатками, в области почек; эта ткань с возрастом медленно подвергается инволюции [18]. Бурый цвет жировым клеткам придает большое количество митохондрий, которые к тому же содержат много цитохромов. Окраску последним придают ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ ; они имеют бурый цвет.

*Предшественники белых, бежевых и бурых жировых клеток.* Большую часть РР-1 митохондрии содержат в неактивной форме. Активация наступает, когда транспортеры переносят  $\text{C}_{16}$  и  $\text{C}_{18}$  ЖК через наружную и внутреннюю мембраны митохондрий. Бурая жировая ткань имеет хорошее кровоснабжение, плотную сеть артериол мышечного типа; кровоток в артериолах регулируют ПС и симпатическая нервная система. Это происходит путем синтеза в синапсах симпатических нервных волокон филогенетически раннего, гуморального медиатора норадреналина при его связывании с  $\beta_3$  на плазматической мембране БЖК.

Активация БЖК симпатической нервной системой состоит в экспрессии генов термогенеза, включая ферментные системы активации липолиза, освобождения ЖК из эфирной связи с глицерином, образование НЭЖК; активацию реакции ЖК с коэнзимом-А и наработку митохондриями калорий теп-

ла при действии РР-1 [19]. Фактором регуляции термогенеза у грызунов является и прием пищи, индукция субстратом. Можно ли пытаться использовать эту зависимость в профилактике синдрома ожирения у человека? Вероятно, да, однако у *Homo sapiens* физиологичная зависимость выражена в существенно меньшей мере по сравнению с грызунами.

Кластеры способных к термогенезу «бежевых» адипоцитов можно выявить в пуле БЖК при выдерживании животных на холоде или при модификации экспрессии генов. Возможно ли генетическое превращение *in vivo* белых ВЖК и ИПА в бежевые жировые клетки и далее в БЖК, окончательно не решено. Однако в процессе реализации биологической реакции адаптации можно превратить изначально белые ВЖК и ИПА в бежевые жировые клетки [20]. Длительное введение агонистов РАПП- $\alpha$  и РАПП- $\gamma$  тиазолидиндионов разным видам животных активирует реакции «побурения», превращения в бежевые части исходно белых ИПА [21]. Возможно, это способ регуляции не только потери тепловой энергии, но и снижения запасенных в жировых клетках ТГ.

Можно ли рассматривать превращение белых ИПА в бежевые жировые клетки как проявление биологической реакции адаптации в условиях депонирования в жировых клетках избытка ЖК в форме ТГ? Это предстоит еще выяснить [22]. Процесс побурения белых ИПА регулирует *in vivo* активность секреции гуморальных медиаторов, гормонов, а также действия факторов внешней среды, включая хроническое охлаждение; усиление физической активности и контроль поглощенных и запасенных субстратов в биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии [23].

Охлаждение организма (понижение температуры в тканях) воспринимают терморецепторы; они на третьем уровне регуляции метаболизма в организме передают сигнализацию по пути афферентные волокна  $\rightarrow$  нейросекреторные ядра гипоталамической области мозга  $\rightarrow$  эфферентные волокна симпатической нервной системы  $\rightarrow$  синапсы БЖК. Общепринято, что синапсы симпатических нервных волокон на границе со всеми жировыми клетками заменяют электрический сигнал на гуморальный.

Клетки прокальцитонина (РСТ) воспринимают только филогенетически раннее действие гидрофильных, гуморальных медиаторов. Результатом этого является цепь биохимических реакций, которые превращают белые ИПА в бежевые и активируют биологические реакции термогенеза. Показано, что в формировании бежевых клеток из ИПА в жировой ткани увеличивается содержание эозинофилов, повышается содержание ИЛ-2 (цитокин-4/13) и активирована функция оседлых макрофагов. Вероятно, они активно задействованы в регуляции превращений ИПА в бежевые клетки; последние готовы активировать биологическую реакцию термогенеза.

Привлеченные в область низкой температуры, вероятно, действием хемиаттрактантов, эозинофилы гематогенного происхождения продуцируют провоспалительные цитокины. Это происходит при формировании *in vivo* биологической реакции адаптации к длительному воздействию низкой температуры окружающей среды и на уровне организма [24]. В плане изменения фенотипа жировых клеток важно обратить внимание на биологические функции эозинофилов.

Повышение физической активности, мышечного сокращения скелетных миоцитов активирует побурение ИПА, формирование бежевых клеток и усиливает рассеяние тепловой энергии. Можно полагать, что формирование бежевых ИПА происходит *in vivo* при активации окисления в митохондриях как ЖК, так и ацетил-КоА, образованного из глюкозы, пирувата [25]. Гуморальные медиаторы, лиганды для РАПП- $\alpha$  на мембране ядра клеток, которые выделяют скелетные миоциты в условиях интенсивного сокращения, стимулируют все зависимые биохимические реакции, включая биоге-нез

митохондрий и экспрессию иных гуморальных медиаторов и метаболизм липидов в ядрах гипоталамуса [26].

Агонисты РАПП- $\alpha$  на мембране ядра клеток экспрессируют синтез гуморального медиатора, содержащего фибронектин; он, полагаят, формирует и секретирует иризин. Мнения о действии этого гуморального медиатора противоречивы; иризин в условиях физической нагрузки выделяют миоциты мышечной и человеческой. Он реально инициирует побурение белых ИПА, оказывает позитивное действие на метаболизм ЖК и глюкозы в условиях развитого синдрома ожирения. ИЛ-6 – провоспалительный цитокин (миокин) продуцируют скелетные миоциты при высоком уровне физической активности; он может быть задействован в формировании бежевых жировых клеток из белых ИПА [27]. Во всех случаях высокий уровень сокращения скелетных миоцитов сопровождается активным процессом термогенеза.

Воздействие факторов внешней среды (охлаждение тела, индукция избыточным количеством субстрата – пищи) также стимулирует образование бежевых ИПА. Это регулируется на уровне организма путем действия гипоталамического фактора. Этот фактор локально в БЖК стимулирует секрецию медиатора симпатической нервной системы, возможно, и в белых ИПА, активирует термогенез, реализуя биологическую функцию гомеостаза. При необходимости этот фактор уменьшает количество ЖК в клетках, активируя термогенез и рассеивая тепловую энергию. Полагают, что постоянная, генетически запрограммированная гиперэкспрессия гипоталамического нейротропного фактора пропорционально индукции субстратом активирует термогенез в БЖК, формируя фенотип худых людей [28].

Много гуморальных медиаторов секретируют клетки БЖК и бежевые клетки ИПА. Они включают фактор роста фибробластов; желудочковый и предсердный натрийуретические пептиды (НУП) [29]; костный морфогенетический фактор. Все они, вероятно, с разными целями, но по единому алгоритму активируют термогенез в клетках БЖК при усилении функции скелетных миоцитов [30].

Повышение функции БЖК, увеличение термогенеза и рассеяние тепловой энергии с поверхности тела, по сути, способствуют уменьшению содержания ЖК ТГ в жировых депо *in vivo*; однако можно ли это использовать как средство профилактики синдрома ожирения, неясно. Длительное повышение биологической реакции термогенеза действительно понижает содержание ТГ и глюкозы в сыворотке крови пациентов с избыточной массой тела [31]. У мышей при длительном пребывании на холоде формируется более высокий клиренс ТГ за счет активного поглощения ИПА олеиновых и пальмитиновых ЛПОНП путем апоЕ/В-100-эндоцитоза со всеми переносимыми ими ЖК.

Этот процесс зависит от повышения активности липолиза в БЖК; формирования пула НЭЖК в цитоплазме и активности CD36-транслоказы ЖК в рафтах плазматической мембраны БЖК. Длительное пребывание в помещении при низкой температуре и выраженная, компенсаторная активация биологической реакции термогенеза уменьшают гиперлипотеинемии (ГЛП) и выраженность синдрома ИР [15]. Активация термогенеза в БЖК *in vivo* может увеличить расход *in vivo*, оптимизировать регуляцию метаболизма как ЖК, так и глюкозы.

Экспериментальные доказательства биологического действия бурой жировой ткани и оптимизация метаболизма инициировали поиски генетических моделей животных и попытки трансплантации БЖК в эксперименте [32]. Трансплантация БЖК в висцеральные полости *in vivo* улучшает толерантность мышечной к глюкозе, повышает чувствительность к инсулину, понижает массу тела и уменьшает процентное содержание жировой ткани *in vivo*. Трансплантация бурой

жировой ткани компенсирует формирование синдрома ИР при переизбытке физиологичной по всем параметрам пищи. Вторым методом регуляции метаболизма ЖК и глюкозы *in vivo* может стать инициация превращения части белых ИПА в бежевые клетки, усиление биологической реакции термогенеза и утилизации части ТГ в форме энергии, калорий тепла.

Активаторы пролиферации БЖК, РАПП- $\alpha$  и РАПП- $\gamma$  создают условия для действия фармпрепаратов типа глитазонов, а, возможно, и подобных по действию нативных гуморальных медиаторов БЖК, о которых мы еще мало знаем [33]. Возможно, эти медиаторы, используя механизмы обратной связи, активируют термогенез в форме биологической реакции компенсации при реализации биологической функции адаптации с целью оптимизации (предотвращения) усиленной индукции субстратом, пищей при ее переизбытке, предотвращая формирование состояния стресса эндоплазматического ретикула [34, 35].

У новорожденных детей морфологически БЖК не отличаются от таковых у грызунов. БЖК подключичных пулов взрослого человека экспрессируют много факторов транскрипции, которые формируют превращение белых ИПА в бежевые жировые клетки. В противоположность этому БЖК взрослых секретируют гуморальные факторы, которые свойственны ИПА взрослых [36]. Клонированные стромальные клетки из БЖК, более вероятно, образовались из пула белых ИПА. Полагают, что образование БЖК происходит из белых ИПА в процессе превращения их в бурые (бежевые) клеток. Эти превращения вызваны теми нарушениями метаболизма ЖК, которые происходят *in vivo* в условиях длительного физиологического состояния адренергического стресса [37, 38].

Пребывание ежедневно в течение 2 ч в помещении с температурой 17°C на протяжении 6 нед повышает активность БЖК, активирует наработку и рассеяние тепловой энергии при умеренном понижении массы тела [39]. Длительное пребывание на холоде в течение 5–8 ч увеличивает рассеяние тепловой энергии, образованной в жировой ткани на 15–20% у пациентов (добровольцев), которые имеют позитивный ответ на холод. Содержание глюкозы при этом увеличивается на 30%, концентрация НЭЖК возрастает на 70%; это и есть субстраты для усиления наработки и рассеяния тепловой энергии. Потребность тканей в глюкозе при пребывании пациентов на холоде достоверно возрастает [40].

У пациентов с синдромом ИР пребывание на холоде в течение 10 дней повышает чувствительность к инсулину более чем на 40%. Поперечнополосатые, инсулинзависимые скелетные миоциты после длительного пребывания на холоде усиливают выставление на плазматическую мембрану дополнительного количества инсулинзависимых глюкозных транспортеров GLUT4 [41].

Существуют ли биологические основания рассматривать превращение белых ИПА в бежевые и далее в БЖК, реализацию биологической реакции термогенеза как способ противостоять *in vivo* агрессивному влиянию внешней среды, фактору переизбытка физиологичной по всем параметрам пищи, кроме ее количества? Можно ли столь непростым биологическим и физико-химическим методом компенсировать последствия избыточного (в несколько раз больше физиологического) содержания в пище пальмитиновой НЖК [42]? Сформированные на уровне организма механизмы обратной связи – секреция ВЖК гуморальных медиаторов лептина, ИПА адипонектина [43], ингибирование ими в ядрах гипоталамической области мозга чувства голода – в филогенезе эффективной системой так и не стали [44] (рис. 3, см. обложку).

Однако во всех наблюдениях активация разными способами несократительного мышечного термогенеза может происходить, мы полагаем, при ограничении индукции субстратом, уменьшении количества поедаемой пищи по древнему ки-

тайскому методу – «маленькая тарелка», при доминировании диеты святого Петра так, как это написано в Библии. Самым же важным, на наш взгляд, является включение в комплекс профилактических мероприятий когнитивной биологической функции, функции интеллекта. Согласно филогенетической теории общей патологии в филогенезе эта функция призвана приводить в соответствие все несогласованности регуляции метаболизма, становление которых происходило отдельно на трех уровнях относительного биологического совершенства: на аутокринном, уровне паракринных сообществ клеток, органов и систем органов и в организме. Худеть надо начинать с головы, с твердого внутреннего императивного желания похудеть; это всегда неприятно и всегда нелегко, однако *tertium non datum* (третьего не дано).

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 6–8, 10–43 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. Становление в филогенезе биологической функции питания. Функциональное различие висцеральных жировых клеток и подкожных адипоцитов. *Вопросы питания*. 2015; 84 (1): 15–24.
2. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз*. М.: ИНФРА-М; 2014.
3. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. *Буря жировая ткань: молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза*. Красноярск: Амальгама; 2002.
4. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А. *Жирные кислоты, триглицериды, гипертриглицеридемия, гипергликемия и инсулин*. М.: ИНФРА-М; 2016.
5. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишенин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138 (11): 517–9.
9. Солнцева А.В., Сукало А.В. Ожирение у детей. Вопросы этиологии и патогенеза. *Здравоохранение*. 2002; (1): 6–9.
44. Титов В.Н. Биологическая функция трофологии, биологические реакции экзо- и эндотрофии, патогенез метаболического синдрома, лептин и адипонектин (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (6): 27–38.

#### REFERENCES

1. Titov V.N. Formation in the phylogeny of the biological function of nutrition. The functional difference between visceral fat cells and subcutaneous adipocytes. *Voprosy pitaniya*. 2015; 84 (1): 15–24. (in Russian)
2. Titov V.N. *Phylogenetic Theory of General Pathology. The Pathogenesis of the Diseases of Civilization. Atherosclerosis [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez bolezney tsivilizatsii. Ateroskleroz]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
3. Medvedev L.N., Elsukova E.I. *Brown Adipose Tissue: Molecular and Cellular Bases of Regulated Thermogenesis [Buraya zhirovaya tkan': molekulyarno-kletochnye osnovy reguliruemogo termogeneza]*. Krasnoyarsk: Amal' gama; 2002. (in Russian)
4. Titov V.N., Rozhkova T.A., Amelyushkina V.A. *Fatty Acids, Triglycerides, Hypertriglyceridemia, Hyperglycemia, and Insulin (Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, Treatment Foundations) [Zhirnye kisloty, triglitseridy, gipertriglitseridemiya, giperqlikemiya i insulin]*. Moscow: INFRA-M; 2016. (in Russian)
5. Lisitsyn D.M., Razumovskiy S.D., Tishenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138 (11): 517–9. (in Russian)
6. Apovian C.M., Aronne L.J., Bessesen D.H., McDonnell M.E., Murad M.H., Pagotto U. et al. Pharmacological management of obesity:

- an endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100 (2): 342–62.
7. Singh D.P., Khare P., Zhu J., Kondepudi K.K., Singh J., Baboota R.K. et al. A novel probiotic-based preventive approach against high-fat diet-induced adiposity, nonalcoholic fatty liver and gut derangement in mice. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016; 40 (3): 487–96.
  8. Singh P., Sharma P., Sahakyan K.R., Davison D.E., Sert-Kuniyoshi F.H., Romero-Corral A. et al. Differential effects of leptin on adiponectin expression with weight gain versus obesity. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016; 40 (2): 266–74.
  9. Solntseva A.V., Sukalo A.V. Childhood obesity. Questions of etiology and pathogenesis. *Zdravookhraneniye*. 2002; (1): 6–9. (in Russian)
  10. Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2548–56.
  11. Harms M., Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 2013; 19 (10): 1252–63.
  12. van Marken Lichner W.D., Vanhommel J.W., Smulders N.M., Drossaerts J.M., Kemerink G.J., Bouvy N.D. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (15): 1500–8.
  13. Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (15): 1518–25.
  14. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84 (1): 277–359.
  15. Wang Q.A., Tao C., Gupta R.K., Scherer P.E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 2013; 19 (10): 1338–44.
  16. Wu J., Bostrom P., Sparks L.M., Ye L., Choi J.H., Giang A.H. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012; 150 (2): 366–76.
  17. Lee Y.H., Petkova A.P., Mottillo E.P., Granneman J.G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* 2012; 15 (4): 480–91.
  18. Lidell M.E., Betz M.J., Dahlqvist Leinhard O., Heglind M., Elander L., Slawik M. et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat. Med.* 2013; 19 (5): 631–4.
  19. Townsend K.L., Tseng Y.H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2014; 25 (4): 168–77.
  20. Barteld A., Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014; 10 (1): 24–36.
  21. Petrovic N., Walden T.B., Shabalina I.G., Timmons J.A., Cannon B., Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2010; 285 (10): 7153–64.
  22. Sidossis L., Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 2015; 125 (2): 478–86.
  23. Morrison S.F., Madden C.J., Tupone D. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2012; 3 (5): pii: 00005.
  24. Rao R.R., Long J.Z., White J.P., Svensson K.J., Lou J., Lokurkar I. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014; 157 (6): 1279–91.
  25. Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C. et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481 (7382): 463–8.
  26. de Moura R.F., Nascimento L.F., Ignacio-Souza L.M., Morari J., Razolli D.S., Solon C. et al. Hypothalamic stearoyl-CoA desaturase-2 (SCD2) controls whole-body energy expenditure. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016; 40 (3): 471–8.
  27. Knudsen J.C., Murholm M., Carey A.L., Biensø R.S., Basse A.L., Allen T.L. et al. Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e84910.
  28. Cao L., Choi E.Y., Liu X., Martin A., Wang C., Xu X. et al. White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab.* 2011; 14 (3): 324–38.
  29. Bordicchia M., Liu D., Amri E.Z., Ailhaud G., Dessi-Fulgheri P., Zhang C. et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (3): 1022–36.
  30. Schultz T.J., Huang T.L., Tran T.T., Zhang H., Townsend K.L., Shadrach J.L. et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (1): 143–8.
  31. Bartelt A., Bruns O.T., Reimer R., Hohenberg H., Itrich H., Peldschus K. et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 2011; 17 (2): 200–5.
  32. Stanford K.I., Middelbeek R.J., Townsend K.L., An D., Nygaard E.B., Hitchcox K.M. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 2013; 123 (1): 215–23.
  33. Puigserver P., Middelbeek R.J., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998; 92 (6): 829–39.
  34. Uldry M., Yang W., St-Pierre J., Lin J., Seale P., Spiegelman B.M. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006; 3 (5): 333–41.
  35. Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (15): 1518–25.
  36. Cypess A.M., White A.P., Vernochet C., Schulz T.J., Xue R., Sass C.A. et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* 2013; 19 (5): 635–9.
  37. Sidosis L.S., Porter C., Saraf M.K., Børsheim E., Radhakrishnan R.S., Chao T. et al. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab.* 2015; 22 (2): 219–27.
  38. Ouellet V., Labbe S.M., Blondin D.P., Phoenix S., Guérin B., Haman F. et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (2): 545–52.
  39. Yoneshiro T., Aita S., Kayahara T., Kameya T., Kawai Y., Iwanaga T. et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* 2013; 123 (8): 3404–8.
  40. Chondronikova M., Volpi E., Børsheim E., Porter C., Annamalai P., Enerbäck S. et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 2014; 63 (12): 4089–99.
  41. Hannsen M.J., Hoeks J., Schrauwen P. Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity. *Exp. Gerontol.* 2006; 41 (7): 658–62.
  42. Sinasac D.S., Riordan J.D., Spiezio S.H., Yandell B.S., Croniger C.M., Nadeau J.H. Genetic control of obesity, glucose homeostasis, dyslipidemia and fatty liver in a mouse model of diet-induced metabolic syndrome. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016; 40 (2): 346–55.
  43. Nakata M., Yamamoto S., Okada T., Gantulga D., Okano H., Ozawa K. et al. IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016; 40 (3): 425–33.
  44. Titov V.N. The biological function of trophic ecology, biological reactions of exo and endo trophy, the pathogenesis of the metabolic syndrome, leptin and adiponectin (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (6): 27–38. (in Russian)

© АВЕРЬЯНОВА И.В., МАКСИМОВ А.Л., 2017

УДК 616.153.45+616.153.915]-053.67:613.1-074

Аверьянова И.В., Максимов А.Л.

## СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У СТУДЕНТОВ АБОРИГЕНОВ И ЕВРОПЕОИДОВ СЕВЕРО-ВОСТОКА РОССИИ

ФГБУН «Научно-исследовательский центр "Арктика"» ДВО РАН, 685000, Магадан

*Изучены основные показатели липидного спектра и уровня глюкозы в крови у аборигенов и европеоидов в зимний и весенний периоды года. В исследованиях приняли участие 184 юноши в возрасте 17–21 года ( $18,2 \pm 0,8$ ), обучающиеся в Северо-Восточном государственном университете (Магадан). Исследование провели с использованием портативного биохимического экспресс-анализатора CardioChek PA (США) путем забора капиллярной крови, взятой в утренние часы натощак из пальца спустя 10–12 ч после последнего приема пищи.*

*Цель работы – сравнительное изучение особенностей сезонных колебаний основных характеристик липидного и углеводного обмена у аборигенов и уроженцев Северо-Востока России из числа европеоидов в 1–2 поколения (укорененная популяция).*

*Полученные в различные сезоны года результаты биохимических исследований показали, что средние значения всех изученных характеристик липидного профиля приближались к нижней границе нормальной вариации признака. Это, по всей видимости, связано с субстратно-энергетической недостаточностью, в частности с липидным алиментарным дефицитом, наблюдаемым у обследуемых нами студентов при анализе их рациона питания, где доля жиров не превышала 65–70 г в сутки.*

*При изучении углеводного обмена у юношей различных этнических групп выявлено, что уровень глюкозы находился на верхней границе референтного интервала нормогликемии. При этом в группе аборигенов отмечены сезонные перестройки в исследуемых величинах метаболического профиля, связанные с уменьшением уровня глюкозы в крови, тогда как в группе европеоидов аналогичной тенденции отмечено не было. По-видимому, данная сезонная динамика обменных процессов у молодых аборигенов указывает на эффективность их эволюционно закрепленных механизмов адаптации, сформированных в условиях Северо-Востока России.*

**Ключевые слова:** Север; студенты европеоиды и аборигены; липидный и углеводный обмен; сезоны года.

**Для цитирования:** Аверьянова И.В., Максимов А.Л. Сезонная динамика основных показателей липидного и углеводного обмена у студентов аборигенов и европеоидов Северо-Востока России. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 140-146. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-140-146>

*Averyanova I.V., Maksimov A.L.*

### THE SEASON DYNAMICS OF MAIN INDICES OF LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN STUDENTS ABORIGINES AND CAUCASIANS OF THE NORTHERN-EAST OF RUSSIA

The research center "Arktika" of the Far-East branch of the Russian academy of sciences, 685000 Magadan, Russia

*The article presents analysis of main indices of lipid specter and level of glucose in blood of aborigines and Caucasians during winter and spring seasons. The study covered 184 male youths aged from 17 to 21 years ( $18.2 \pm 0.8$ ) studying in the North-Eastern state university (Magadan). The study was implemented using portable biochemical express-analyzer CardioChek PA (USA) by means of capillary blood sampling taking in morning hours on an empty stomach from finger 10-12 hours later after last food intake.*

*The purpose of study was to compare characteristics of season variations of main characteristics of lipid and carbohydrate metabolism in aborigines and natives of the North-East of Russia from among Caucasians in 102 generation (autochthonic population).*

*The results of biochemical analyses, obtained in various seasons, demonstrated that average values of all analyzed characteristics of lipid profile approximated to lower limit of normal variation of indication. By all appearance, this is related to substrate energy inadequacy and with lipid alimentary deficiency in particular observed in examined students during analysis of their dietary intake where percentage of fat was in the limits of 65-70 g per day.*

*The analysis of carbohydrate metabolism in male youths of different ethnic groups established that level of glucose was at the higher limit of reference intervals of normoglycemia. At that, in the group of aborigines season reorientation in analyzed values of metabolic profile were observed related to decreasing of level of glucose in blood while in group of Caucasians similar tendency was not observed. Apparently, the given season dynamics of metabolic processes in young aborigines indicates to efficiency of their evolutionary fixed mechanisms of adaptation developed in conditions of the North-East of Russia.*

**Key words:** North; students; Caucasians; aborigines; lipid and carbohydrate metabolism; seasons

**For citation:** Averyanova I.V., Maksimov A.L. The season dynamics of main indices of lipid and carbohydrate metabolism in students aborigines and Caucasoids of the Northern-East of Russia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 140-146. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-140-146>

**For correspondence:** Averyanova I.V., candidate of biological sciences, research worker of laboratory of physiology of extreme conditions. e-mail: [Inessa1382@mail.ru](mailto:Inessa1382@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** *The study was implemented within the framework of program of fundamental studies of the Presidium of the Russian academy of sciences "The searching fundamental researches for the benefit of development of the Arctic zone of the Russian Federation" (project "The development of unified social economic and medical biological criteria of estimate of discomfort of environment and condition of adaptability of residents of circumpolar and arctic regions"). Also, at the expense of grant of the governor of the Magadanskaia oblast "The adaptive profile of metabolic and morpho-functional characteristics in migrants, adaptants and aborigines of the Magadanskaia oblast".*

Received 22.08.2016  
Accepted 15.09.2016

В конце прошлого и в начале текущего столетия однозначно доказано, что в развитии атеросклероза ведущую роль играет не количество потребляемых с пищей жиров, а соотношение их фракций в липидном пуле. На основе этого Национальной образовательной программой по холестерину в США и Европейским обществом по изучению атеросклероза предложена классификация гиперхолестеринемий, отражающая связь уровня холестерина и риск ИБС [1]. В тоже время рядом исследований различных групп пришлого населения Крайнего Севера установлено, что экстремальные природно-климатические условия негативно влияют на состояние сердечно-сосудистой системы и, в частности, активизируют атеросклеротические процессы у мигрантов-европеоидов, спустя три и более лет проживания в приполярных и арктических условиях [2–4]. Исследования в основном охватывали лиц старше 30 лет, прибывших в северные регионы из более комфортных климатических зон. При этом в доступной литературе практически отсутствуют сведения о состоянии липидного и углеводного обмена у молодых уроженцев Севера-Востока России из числа европеоидов. Известно, что помимо холодового фактора, экстремальными природно-климатическими условиями служат вариации светопериодики, которые вместе с температурным градиентом и определяют вклад сезонности (ритмичности) в изменения функционального состояния человека на Севере. Ритмический характер физиологических процессов – один из важнейших свойств живых систем, который находится под влиянием регулирующих механизмов целостного организма [5, 6]. Основой устойчивой адаптации организма служит поддержание стабильного и адекватного внешним условиям метаболизма [7]. Важный аспект изучения процессов липидного и углеводного обмена у жителей Севера связан с тем, что активация энергетических трат при действии холодового фактора происходит в значительной степени за счет липидных энергоносителей и активации их использования, а адаптивные перестройки в организме приводят к существенным изменениям именно липидного обмена [8]. Отмечено, что сезонность в условиях Севера оказывает доминирующее влияние на важнейшие показатели периферической крови, причем в определенные сезоны года она становится столь мощным фактором, что он практически нивелирует зависимость содержания липидов от возрастного аспекта [8].

Во многих работах аборигенное население Севера, сохранившее черты традиционного образа жизни и считающееся наиболее адаптированным, рассматривают как природную модель или как некий эталон приспособления к местным гео-климатическим условиям [9–13]. Очевидно, что в результате социального и научно-технического прогресса среда обитания аборигенов трансформируется столь быстро, что встает вопрос о соизмеримости ее изменения с эволюционно обусловленными адаптивными возможностями человека [11, 14, 15].

В связи с этим целью данного исследования стало сравнительное изучение в определенные сезоны года основных характеристик липидного и углеводного обмена аборигенов и уроженцев Северо-Востока России в 1–2 поколениях из числа европеоидов (укорененная популяция).

**Материал и методы.** В исследованиях приняли участие молодые жители Магаданской области в возрасте от 17 до

21 года, представители двух этнических групп, которые на момент исследования были студентами Северо-Восточного государственного университета с сопоставимыми условиями образа жизни.

Работу проводили с учетом сезонов года: в зимний и весенний периоды. Весной обследовали 66 европеоидов и 20 аборигенов, зимой – 77 европеоидов и 21 аборигена.

У всех обследованных с использованием портативного биохимического экспресс-анализатора CardioChek PA (США) провели определение глюкозы (ммоль/л), общего холестерина (ОХС, ммоль/л), триглицеридов (ТГ, ммоль/л), холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП, ммоль/л) и холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП, ммоль/л) в капиллярной крови, взятой в утренние часы натощак из пальца спустя 10–12 ч после последнего приема пищи. Для оценки атерогенного потенциала липидного профиля рассчитали следующие показатели: отношение общего холестерина к холестерину липопротеидов высокой плотности: ОХС/ЛПВП и показатель отношения холестерина липопротеидов низкой плотности к холестерину липопротеидов высокой плотности: ЛПНП/ЛПВП. Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по следующей формуле:  $КА = (ОХС - ЛПВП) / ЛПВП$  [16]. О нарушениях липидного профиля крови мы судили, исходя из Российских рекомендаций III пересмотра Комитета экспертов Всероссийского научного общества кардиологов 2007 г., составленных с учетом Европейских рекомендаций III пересмотра 2003 г. [17] и на основе третьего доклада экспертов NСЕР [1]. За гиперхолестеринемию принимали уровень ОХС  $\geq 5,18$  ммоль/л, повышенный уровень ЛПНП  $\geq 3,0$  ммоль/л, сниженный уровень ЛПВП  $\leq 0,9$  ммоль/л. К гипертриглицеридемии относили уровень ТГ  $\geq 1,77$  ммоль/л. Гипергликемию натощак диагностировали при концентрации глюкозы (ГЛ)  $\geq 5,6$  ммоль/л согласно критериям Международной диабетической федерации [18]. Потребление кислорода определяли с помощью метабографа MedGraphics VO2000 (США). Оценку типа питания проводили путем анализа суточных рационов с использованием программы «АСПОН-питание» (Санкт-Петербург).

Все обследования проводили в помещении с комфортной температурой, в первой половине дня. Исследование выполняли в соответствии с принципами Хельсинской Декларации (2008). Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом медико-биологических исследований при СВНЦ ДВО РАН (№ 004/013 от 10.12.2013). До включения в исследование у всех участников получено письменное информированное согласие.

Результаты статистически обрабатывали с применением пакета прикладных программ Statistica 7.0. Проверяли на нормальность распределения измеренных переменных с помощью теста Шапиро–Уилка. Результаты параметрических методов обработки представили в виде среднего значения ( $M$ ) и ошибки средней арифметической ( $\pm m$ ), значимость различий определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента при критическом уровне  $p < 0,05$  [19].

**Результаты.** В таблице представлены основные показатели углеводного и липидного обменов у обследованных лиц в весенний и зимний периоды. Из приведенных данных видно, что среди европеоидов ни по одному из изучаемых по-

**Сезонная динамика основных показателей липидного профиля и уровня глюкозы в крови у юношей различных этнических групп Магаданской области**

Изучаемые показатели	Европеоиды		Значимость различий между сезонами, <i>p</i>	Аборигены		Значимость различий между сезонами, <i>p</i>	Значимость различий в весенний период между этническими группами, <i>p</i>	Значимость различий в зимний период между этническими группами, <i>p</i>
	весенний период	зимний период		весенний период	зимний период			
ОХС, ммоль/л	3,57±0,09	3,38±0,08	0,10	3,14±0,13	2,93±0,11	0,23	< 0,001	< 0,001
ТГ, ммоль/л	0,82±0,05	0,79±0,05	0,76	0,68±0,04	0,64±0,05	0,80	< 0,05	< 0,05
ЛПВП, ммоль/л	1,29±0,04	1,30±0,04	0,91	1,27±0,08	1,50±0,06	0,05	0,82	< 0,001
ЛПНП, ммоль/л	1,73±0,09	1,59±0,07	0,23	1,49±0,08	1,14±0,04	< 0,01	< 0,05	< 0,001
КА, у. е.	1,94±0,12	1,89±0,18	0,81	1,56±0,16	1,04±0,12	< 0,01	< 0,05	< 0,001
ОХС/ЛПВП, у. е.	2,94±0,12	2,89±0,18	0,81	2,56±0,10	2,13±0,13	< 0,05	< 0,05	< 0,001
ЛПНП/ЛПВП, у. е.	1,48±0,10	1,42±0,12	0,75	1,20±0,11	0,88±0,07	< 0,01	< 0,05	< 0,001
Глюкоза, ммоль/л	5,43±0,06	5,39±0,05	0,55	5,51±0,08	5,26±0,08	< 0,05	0,42	0,17

казателей сезонных колебаний отмечено не было. Тогда как в группе аборигенов сезонная динамика присутствовала. Так, в зимней серии исследования отмечали снижение ЛПНП на фоне повышения концентрации ЛПВП, что привело к статистически значимому снижению расчетных индексов, характеризующих степень атерогенности липидного профиля: КА, отношений ОХС/ЛПВП и ЛПНП/ЛПВП. Помимо значимых сезонных колебаний показателей липидного спектра, в группе аборигенов зимой выявили снижение уровня глюкозы в крови.

Несмотря на то что уровень ОХС и ТГ в обследованных группах остается практически без изменений в различные сезоны года, данные показатели в группе европеоидов статистически значимо выше по сравнению с группой аборигенов. Весной между этническими группами значимых различий по ЛПВП отмечено не было. Более высокие показатели ЛПНП выявили у лиц из числа европеоидов как в весенний, так и зимний периоды года. Значимые отличия между изучаемыми группами наблюдали и по величине КА липидного спектра, хотя его показатели были ниже в группе аборигенов.

В процессе индивидуального анализа отклонений липидного профиля от нормативных величин в группе аборигенов не зафиксировали дислипидемий ни по одному из изучаемых показателей в весенний и зимний периоды исследования. Тогда как в группе укорененных европеоидов отмечали единичные случаи, когда показатели липидного профиля отклонялись от нормативных и средних величин. Так, в весенний и зимний периоды у одного обследуемого отметили повышенные значения общего холестерина в крови (более 5,18 ммоль/л). Гипертриглицеридемию выявили у четырех испытуемых в весенний и у трех – в зимний период года (значения превышали 1,77 ммоль/л). Высокое (более 3,0 ммоль/л) содержание ЛПНП весной зафиксировали у четырех обследуемых, а зимой – у двух юношей. Величины ЛПВП, выходящие за нижнюю границу нормы (менее 0,9 ммоль/л), отметили у 5 лиц – как в весенний, так и зимний период.

Анализ величин концентрации глюкозы в крови не выявил значимых сезонных различий между изучаемыми этническими группами. Однако у аборигенов в зимний период отмечали снижение концентрации глюкозы по отношению к весенней серии исследований. Индивидуальный анализ отклонения углеводного обмена показал, что во всей совокупной выборке встречались лица с повышенным уровнем глюкозы натощак, когда ее значения переходили за верхнюю границу принятой нормы (более 5,6 ммоль/л). При этом выявлен весьма значительный процент гипергликемии в группе европеоидов (36%) и в группе аборигенов (52%), который наблюдали в весенний период обследования. К зиме наблюда-

ли снижение количества лиц с гипергликемией до 20–21% по обеим изучаемым этническим группам.

*Обсуждение.* Уровень общего холестерина у юношей-европеоидов был выше, чем в аналогичной группе юношей-аборигенов как в весенний, так и зимний период обследования с отсутствием сезонных колебаний. Однако средние значения этого показателя у всех обследованных лиц в течение года находились на нижней границе нормальной вариации признака, что, по мнению ряда авторов, может выступать предпосылкой развития психосоматических нарушений [20–22].

Баланс уровня общего холестерина у аборигенов в зимний период года обеспечивается на фоне снижения концентрации ЛПНП и повышения ЛПВП, достигающей 51% в общем спектре, а также более низким уровнем ТГ (на 20% ниже, чем у европеоидов в тот же временной период). Л.Е. Панин (1983) указывает, что относительное содержание липопротеинов высокой плотности в крови у аборигенного населения может увеличиваться до 60% [24]. А.Н. Климов и Н.Г. Никольчев (1999) [16] и другие [23] показали, что у здоровых людей практически все ЛПНП образуются в сосудистом русле в результате преобразования липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), при этом крупные частицы ЛПОНП, содержащие эндогенные липиды и апо В-100, образуются в клетках печени и после поступления в кровяное русло подвергаются превращениям, в результате которых возникают ЛПНП. Отметим, что у обследуемых нами лиц уровень ЛПВП выше 1,55 ммоль/л оказывается весьма благоприятным в плане снижения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Он выступает как атерогенный фактор и отмечен у 18–20% европеоидов в обоих изучаемых сезонах. В группе аборигенов в процессе проводимых нами исследований отмечали в зимний период года выраженное до 43% увеличение количества лиц с уровнем ЛПВП более 1,5 ммоль/л, хотя весной их доля составляла только 20%.

Известно, что основная функция ЛПВП в жировом обмене – обеспечение обратного транспорта холестерина, с помощью которого ОХС возвращается из периферических тканей в печень для дальнейшего катаболизма, и это рассматривают как один из важнейших антиатерогенных факторов [25]. Исходя из этого, мы можем говорить об активизации обратного транспорта у юношей-аборигенов в осенний период года, что совпадает с результатами исследований других авторов, указывавших на высокоэффективный обратный транспорт холестерина у аборигенных жителей Севера [26].

Вместе с тем полученные нами у аборигенов величины уровня ТГ, которые вне зависимости от сезона года имели низкие значения, что не соответствовало результатам исследований, проводимых другими авторами на Европейском

Севере [8, 26]. По всей видимости, это может быть связано с тем, что у обследованных нами лиц на фоне уменьшения содержания жиров в рационе питания идет активное использование триглицеридов в метаболических процессах организма, как основного энергетического субстрата. Действительно, проанализировав суточные рационы питания у обследуемых двух этнических групп, мы выявили, что соотношение белков, жиров и углеводов у европеоидов составило 17:20:63%, а в группе аборигенов – 16:13:71% со сниженным суточным калоражем до 1776,4 ккал/сут у европеоидов и 2345,0 ккал/сут у аборигенов. Согласно исследованиям [27], такой тип питания считается углеводным. Он весьма сильно отличается от белково-липидного полярного метаболического типа питания, ранее характерного для аборигенного населения Севера с традиционным жизненным укладом. В среднем, по расчетам Панина Л.Е. (1983) и других исследователей, для обеспечения нормальной жизнедеятельности на Севере оптимальная калорийность суточного рациона должна находиться в пределах 3527 ккал/сут с потреблением жира до 156,7 г [28].

Л.Е. Панин (1983) и А.Д. Слоним (1969) показали, что при энергообеспечении человека на Севере идет усиление утилизации организмом липидов в части ТГ [24, 29]. В наших исследованиях у юношей-аборигенов, жителей Магаданской области, величины липопротеидов низкой плоскости в течение года имели статистически значимо более низкие показатели относительно сверстников-европеоидов, у которых эти цифры были близки к нижней границе принятой нормы, что свидетельствует об активном использовании жира в энергетическом обмене. Известно, что у аборигенов ЛПНП в большей степени служат транспортной формой эндогенного жира в организме [30]. Это в определенной степени способствует выведению ЛПНП из крови и тем самым влияет на показатели расчетных коэффициентов степени атерогенности. В работе Бойко Е.Р. установлено, что по мере увеличения длительности проживания популяции на Севере (в данном контексте говорится относительно популяции аборигенов) наблюдается тенденция к минимизации показателей липидов в крови, но цифры, указанные в работе, несколько выше величин, полученных в наших исследованиях [8].

Наши данные сезонных изменений показателей липидного спектра могут свидетельствовать о региональных эволюционно сложившихся особенностях компенсаторно-приспособительных перестроек, определяющих метаболический профиль у аборигенов и укорененных европеоидов, который обеспечивает поддержание механизма антиатерогенной защиты при оптимальном обратном транспорте холестерина. В целом основные характеристики липидного профиля свидетельствуют об активном использовании в метаболизме жировых компонентов всеми обследованными этническими группами при большей выраженности процесса у аборигенов в зимний период.

Т.И. Кочан (2006) указывает, что при действительном переключении организма с «углеводного» типа обмена на «жировой» и при удовлетворении энергетических нужд за счет жиров отмечают повышение использования кислорода [31]. Ранее нами показано [32], что у молодых людей Магаданской области уровень потребления кислорода превышает должные величины, характерные для молодого человека в условиях Европейского Севера [33] на 25% и более. При этом мы отметили значимое повышение потребления кислорода в группе аборигенов в зимний период относительно весеннего (с  $306,4 \pm 15,1$  до  $353,2 \pm 16,2$  мл/л), что может быть следствием более выраженной активизации липидного обмена при адаптации к наступающим зимним холодам. Наличие сезонной биоритмики на Севере – адаптационное приспособление организма, сформировавшееся и закрепленное в процессе эволюции у разных народностей Севера. Аналогичная сезонная

динамика показателей липидного профиля у аборигенных жителей Северных территорий отмечена и в работах других авторов [11]. При этом в зимний период наблюдали тенденцию смещения липидных фракций ближе к нижним границам нормы, что трактуют как формирование компенсаторно-приспособительных механизмов обеспечения температурного гомеостаза в процессе длительной адаптации организма к отрицательным среднегодовым температурам.

Известно, что интегральным показателем уровня углеводного обмена в организме служит концентрация глюкозы в крови, при этом выход за пределы нормогликемического диапазона (3,3–5,6 ммоль/л для данной возрастной группы) свидетельствует о нарушениях регуляторных механизмов, а также может указывать на перестройку энергетического обмена [18]. При обследовании юношей Магадана выявлено, что в весенний период уровень глюкозы находился на верхней границе нормы референтного интервала с выявлением гипергликемии у 36% в группе европеоидов и 52% в выборке аборигенов. Зимой в группе аборигенов и укорененных европеоидов происходит небольшое, но статистически значимое снижение уровня глюкозы в крови.

Существует устоявшееся мнение относительно измененный метаболизма у населения северных территорий путем переключения с «углеводного» типа на «жировой». Так, Л.Е. Панин (1978) и Е.Р. Бойко (2005) указывают, что у жителей Севера в основе этих трансформаций лежит активизация использования липидных энергоносителей, в целях компенсации которых происходит торможение гликолиза с повышением утилизации жиров. Отмечают склонность к развитию гипогликемических состояний на фоне повышенных фракций липидного профиля [8, 30], чего в наших исследованиях не наблюдалось. Относительно данного вопроса можно согласиться с точкой зрения Т.И. Кочан (2007): автор рассматривает повышение концентрации глюкозы у северян в зимний период во взаимосвязи с торможением процесса гликолиза. Показано, что при интенсивном окислении компонентов жирового обмена (в частности, свободных жирных кислот) происходит выработка ацетил-КоА, который в свою очередь блокирует гликолиз на уровне пирувата и разворачивает в сторону анаэробного гликолиза (с увеличением образования лактата) и глюконеогенеза, в результате чего в крови возрастает содержание неиспользованной глюкозы (гипергликемия) [34].

Полученные в наших работах низкие показатели липидного спектра, такие как ОХЛ, ТГ, ЛПНП, на фоне повышенных показателей глюкозы в крови свидетельствуют, по-видимому, об использовании в метаболизме преимущественно жировых компонентов пищи. При этом столь низкие величины характеристики липидного профиля, полученные в наших исследованиях, скорее всего связаны с алиментарной липидной недостаточностью [35]. Замедление скорости гликолиза и минимизацию использования углеводов в энергетическом обмене у коренных и пришлых жителей северных широт связывают со снижением активности ферментов, участвующих в метаболизме углеводов [36, 37], хотя «патологическое» проявление дефицита ферментов сахаразы может возникать у аборигенных северян при переходе от традиционного питания к «европейскому» типу [38].

Также имеются данные о генетически обусловленном снижении активности ферментов-дисахаридаз у коренного населения приполярных регионов, питание которых ориентированных в первую очередь на потребление пищи животного происхождения [39]. Помимо этого, есть данные об ингибировании углеводного обмена на фоне повышения основного обмена, что непосредственно приводит к увеличению концентрации глюкозы сыворотки крови [40].

Выявленная нами динамика уровня глюкозы в крови в

группе юношей-аборигенов согласуется с результатами других авторов [8, 30], которые указывают на то, что для жителей Европейского Севера характерна сезонная обусловленность изменений углеводного обмена. Отмечают выраженную годовую динамику содержания глюкозы в крови у аборигенного населения Заполярья с наименьшими показателями в осенне-зимний период исследования у популяции Коми, что сопоставимо с нашими данными относительно годовых сдвигов концентрации глюкозы в крови. В работе Т.И. Кочан (2006) также имеются указания на наличие сезонной динамики основных показателей углеводного обмена [34].

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что средние значения всех изученных характеристик липидного профиля у обследуемых этнических групп близки к нижней границе нормальной вариации признака. Это, вероятно, связано с субстратно-энергетической недостаточностью, в частности с липидным алиментарным дефицитом, наблюдаемым у обследуемых нами молодых жителей Севера при анализе их рационов питания, где доля жиров не превышала 65–70 г в сутки.

В группе юношей-аборигенов отмечены сезонные перестройки в исследуемых величинах метаболического профиля, тогда как в группе европеоидов аналогичной тенденции не было. В группе аборигенов ЛПНП, а также все расчетные коэффициенты, отражающие степень атерогенности, имели значимое различие в течение года с максимумом в весенний и минимумом в зимний сезоны исследований. При этом ЛПВП имели более низкие концентрации весной, а повышались зимой. Это, вероятно, можно рассматривать как одно из условий более эффективного механизма обратного транспорта холестерина у аборигенного населения. Значения триглицеридов и общего холестерина в этой группе юношей в течение всего года находились на нижней границе физиологической нормы. При изучении углеводного обмена у юношей двух этнических групп выявили, что уровень глюкозы находился на верхней границе референтного интервала нормогликемии.

Сезонные колебания уровня глюкозы отмечали только среди обследованных аборигенов, при этом показатели статистически значимо снижались в зимний период, что указывает на более активное включение углеводов в метаболический обмен в период наиболее низких температур. Это, вероятно, связано с торможением гликолиза.

Наличие сезонной биоритмики на Севере – адекватное адаптационное приспособление организма, сформировавшееся и закрепленное в процессе эволюции у разных аборигенных популяций. В то же время известно, что разрушение либо нивелирование сезонной ритмики показателей энергетического метаболизма может вызываться изменениями в традиционном жизненном укладе, перестройками структуры питания, урбанистическими процессами. Оно рассматривается как проявление «антропоэкологического напряжения» [11]. В нашем случае в группе молодых аборигенов, несмотря на прессинг современных социально-экономических факторов среды обитания, все еще сохраняется сезонная динамика обменных процессов, указывая на эффективность эволюционно закрепленных механизмов адаптации, сформированных в условиях Северо-Востока России. В группе обследуемых юношей-европеоидов из числа уроженцев Севера сезонной динамики ни по одному из изучаемых показателей отмечено не было.

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

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации» (проект «Разработка унифицированных социально-экономических и

медико-биологических критериев оценки дискомфорта окружающей среды и состояния адаптированности жителей циркумполярных и арктических регионов»). Также за счет средств гранта губернатора Магаданской области «Адаптивный профиль метаболических и морфофункциональных характеристик у мигрантов, адаптантов и аборигенов Магаданской области».

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 25, 39 см. REFERENCES)

- Хаснулин В.И., Шургая А.М., Хаснулин А.В., Севостьянова Е.В. *Кардиометиопатии на Севере*. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2000.
- Евдокимов В.Г. *Функциональное состояние сердечно-сосудистой и дыхательной систем человека на Европейском Севере*: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Сыктывкар; 2004.
- Медведев М.А., Агаджанян Н.А., Ротов А.В., Пеккер Я.С. *Адаптационные характеристики и резервы человека*. Томск: UFOpress; 2005.
- Агаджанян Н.А., Радыш И.В., Северин А.Е., Ермакова Н.В. *Экология, адаптация и биоритмы. Авиакосмическая и экологическая медицина*. 1995; (3): 16–8.
- Мельников В.Н. *Человек в континентальном климате: вопросы биологии*. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2012.
- Агаджанян Н.А., Ермакова Н.В. *Экологический портрет человека на Севере*. М.: Крук; 1997.
- Бойко Е.Р. *Физиолого-биохимические основы жизнедеятельности человека на Севере*. Екатеринбург: УрО РАН; 2005.
- Казначеев В.П. *Современные аспекты адаптации*. Новосибирск: Наука; 1980.
- Бронникова Е.П. *Липидный обмен коренных жителей Азиатского Севера*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: М.; 1996.
- Бронникова Е.П., Манчук В.Т., Соловей Л.И. Особенности липидного обмена эвенков и эвенов. В кн.: Панин Л.Е., ред. *Материалы 13 Международного конгресса по приполярной медицине: тезисы*. Новосибирск; 2006: 49.
- Еськов В.М., Шатрова О.И., Козлова В.В., Нагорная М.А., Филатов М.А. Состояние показателей функциональных систем организма (ФСО) учащихся представителей народов ханты. *Экологический вестник Югории*. 2005; (2): 64–81.
- Суханова И.В., Максимов А.Л., Вдовенко С.И. Особенности адаптации у юношей Магаданской области: морфофункциональные перестройки (сообщение 1). *Экология человека*. 2013; (8): 3–10.
- Седов К.Р. Проблемы здоровья человека на БАМе. *Бюллетень СО АМН СССР*. 1981; (12): 19–27.
- Козлов А.И. Изменение генофонда северных популяций: «Закат этносов» или формирование новой адаптивной группы? *Вестник археологии, антропологии и этнографии*. 2014; (3): 99–107.
- Климов А.Н., Никульчева Н.Г. *Обмен липидов и липопротеидов и его нарушение: руководство для врачей*. СПб.: Питер Ком; 1999.
- Кухарчук В.В., Аронов Д.М., Бубнова М.Г., Волкова Э.Г., Грацианский Н.А., Довгалевский П.Я. и др. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2004; 3 (Приложение 2): 1–36.
- Шестакова М.В. Комментарии эндокринолога к Рекомендациям по сахарному диабету, преддиабету и сердечно-сосудистым заболеваниям ESC-EASD 2007. *Сахарный диабет*. 2008; (1): 97–9.
- Боровиков В.П. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов*. 2-е издание. СПб.: Питер; 2003.
- Доценко Э.А., Юпатов П.И., Чиркин А.А. Холестерин и липопротеины низкой плотности как эндогенные иммуномодуляторы. *Клиническая иммунопатология*. 2001; (3): 6–15.
- Еськов В.М., Катюхин В.Н., Рачковская В.А. Гендерные различия в динамике сердечно-сосудистых заболеваний с позиции компартментно-матричного корреляционного анализа. *Вестник новых медицинских технологий*. 2002; (3): 62–3.
- Розанов В.А., Мидько А.А. Системный липидный обмен и суицидальное поведение. *Нейронауки*. 2006; 4 (6): 3–13.

23. Творогова М.Г. Аполипопротеины – свойства, методы определения, клиническая значимость. *Лабораторная медицина*. 2005; (7): 29–37.
24. Панин Л.Е. *Биохимические механизмы стресса*. Новосибирск: Наука; 1983.
26. Цуканов В.В., Тонких Ю.Л., Бронникова Е.П., Манчук В.Т. Механизм нормолипидемии у северных народностей. *Клиническая медицина*. 1999; 77 (2): 38–9.
27. Влощинский П.Е., Панин Л.Е. Структура питания, состояние энергетического обмена и эндокринный статус в организованном коллективе на Крайнем Севере. *Вестник Уральского медицинского академического университета*. 2014; (2): 11–5.
28. Панин Л.Е., Березовиков П.Д., Андропова Т.И. Уточнение физиологических норм в пищевых веществах и энергии для различных климатических зон Востока СССР. В кн.: *Медико-биологические аспекты продовольственной программы на Востоке СССР*. Новосибирск; 1983: 3–53.
29. Слоним А.Д. Проблемы экологической физиологии человека. В кн.: *Физиология человека в природных условиях СССР*. Ленинград: Наука; 1969: 3–11.
30. Панин Л.Е. *Энергетические аспекты адаптации*. Ленинград: Медицина; 1978.
31. Кочан Т.И. Закономерности изменения показателей углеводного обмена в организме человека в зависимости от природных факторов Севера. *Экология человека*. 2006; (10): 3–7.
32. Максимов А.Л., Суханова И.В., Вдовенко С.И. Функциональные особенности организма юношей и девушек, жителей различных климато-географических зон Магаданской области. *Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова*. 2012; (1): 48–56.
33. Попова О.Н. *Характеристика адаптивных реакций внешнего дыхания у молодых лиц трудоспособного возраста, жителей Европейского Севера*: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2009.
34. Кочан Т.И. Годовой мониторинг влияния условий Севера на метаболизм и функционирование сердечно-сосудистой системы человека. *Успехи физиологических наук*. 2007; (1): 55–65.
35. Целих Е.Д., Головнев В.А., Елясин П.А. Показатели крови и мочи как критерий адекватности питания подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края. *Вестник новых медицинских технологий*. 2008; (4): 73–7.
36. Буганов А.А., Агбалян А.А., Ионова И.Е. Влияние фактора питания на состояние здоровья населения Крайнего Севера. *Медицина труда и промышленная экология*. 2003; (4): 25–8.
37. Раенгулов Б.М., Истомин А.В., Михайлов И.Г. Гигиеническая характеристика фактического питания малочисленных народов Крайнего Севера. *Казанский медицинский журнал*. 2001; (3): 308–10.
38. Боринская С.А., Козлов А.И., Яновский Н.К. Гены и традиции питания. *Этнографическое обозрение*. 2009; (3): 117–37.
40. Кейль В.Р., Кузнецова И.Ю., Митрофанов И.М., Николаев Ю.А., Одинцов С.В., Селятицкая В.Г. и др. *Здоровье трудящихся промышленных предприятий Севера. Стратегия разработки оздоровительных программ*. Новосибирск: Наука; 2005.
- Ecology, adaptation and biorhythms. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 1995; (3): 16–8. (in Russian)
6. Mel'nikov V.N. *Man in Continental Climate: Biology Issues [Chelovek v kontinental'nom klimате: voprosy biologii]*. Novosibirsk: Izdatel'stvo SO RAN; 2012. (in Russian)
7. Agadzhanian N.A., Ermakova N.V. *Ecological Portrait of Man in the North [Ekologicheskii portret cheloveka na Severe]*. Moscow: Kruk; 1997. (in Russian)
8. Boyko E.R. *Physiological and Biochemical Grounds for Human Vital Activity in the North [Fiziologo-biokhimicheskie osnovy zhiznedeyatel'nosti cheloveka na Severe]*. Ekaterinburg: UrO RAN; 2005. (in Russian)
9. Kaznacheev V.P. *Current Aspects of Adaptation [Sovremennye aspekty adaptatsii]*. Novosibirsk: Nauka; 1980. (in Russian)
10. Bronnikova E.P. *Lipid Metabolism in Indigenous People of the Asian North*: Diss. Moscow; 1996. (in Russian)
11. Bronnikova E.P., Manchuk V.T., Solovey L.I. Lipid metabolism characteristics in Evenk and Even people. In: Panin L.E., ed. *Proceedings of the 13th International Congress on Circumpolar Medicine: Abstracts [Materialy 13 Mezhdunarodnogo kongressa po pripolyarnoy meditsine: tezisy]*. Novosibirsk; 2006: 49. (in Russian)
12. Es'kov V.M., Shatrova O.I., Kozlova V.V., Nagornaya M.A., Filatov M.A. State of functional state indices in students representatives of the people of Khanty. *Ekologicheskii vestnik Yugorii*. 2005; (2): 64–81. (in Russian)
13. Sukhanova I.V., Maksimov A.L., Vdovenko S.I. Peculiarities of adaptation observed in young male residents of Magadan region: morphofunctional changes (Report 1). *Ekologiya cheloveka*. 2013; (8): 3–10. (in Russian)
14. Sedov K.R. Problems of human health in BAM. *Byulleten' SO AMN CSSR*. 1981; (12): 19–27. (in Russian)
15. Kozlov A.I. Change of the north populations' genofund "Decline of Ethnos" or formation of a new adaptive group? *Vestnik arheologii, antropologii i etnografii*. 2014; (3): 99–107. (in Russian)
16. Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. *Lipid and Lipoprotein Metabolism and its Disorder: Guide for Physicians [Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narushenie: rukovodstvo dlya vrachey]*. St. Petersburg: Piter Kom; 1999. (in Russian)
17. Kukharchuk V.V., Aronov D.M., Bubnova M.G., Volkova E.G., Gratsianskiy N.A., Dovgalevskiy P.Ya. et al. Diagnostics and correction of lipid metabolism disorders aimed at prevention and treatment of atherosclerosis. Russian recommendations. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2004; 3 (Prilozhenie 2): 1–36. (in Russian)
18. Shestakova M.V. Endocrinologist's comments to the Recommendations on diabetes mellitus, prediabetes and cardiovascular diseases ESC-EASD 2007. *Sakharnyy diabet*. 2008; (1): 97–9. (in Russian)
19. Borovikov V.P. *Statistica. The Art of Analyzing Data on a Computer: for Professionals [Statistica. Iskustvo analiza dannykh na komp'yutere: dlya professionalov]*. 2nd ed. St. Petersburg: Piter; 2003. (in Russian)
20. Dotsenko E.A., Yupatov P.I., Chirkin A.A. Cholesterol and low density lipoproteins as autogenous immune response modifiers. *Klinicheskaya immunopatologiya*. 2001; (3): 6–15. (in Russian)
21. Es'kov V.M., Katyukhin V.N., Rachkovskaya V.A. Gender-related differences in cardiovascular disease dynamics from the point of compartmental matrix analysis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2002; (3): 62–3. (in Russian)
22. Rozanov V.A., Mid'ko A.A. System lipid metabolism and suicidal behavior. *Neyronauki*. 2006; 4 (6): 3–13. (in Russian)
23. Tvorogova M.G. Apolipoproteins – properties, methods of determining, clinical value. *Laboratornaya meditsina*. 2005; (7): 29–37. (in Russian)
24. Panin L.E. *Biochemical Mechanisms of the Stress [Biokhimicheskie mekhanizmy stressa]*. Novosibirsk: Nauka; 1983. (in Russian)
25. Brewer H.B. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins, associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol*. 1999; 83 (9B): 3F–12F.
26. Tsukanov V.V., Tonkikh Yu.L., Bronnikova E.P., Manchuk V.T. The mechanism of normo lipidemia in peoples of the North. *Klinicheskaya meditsina*. 1999; 77 (2): 38–9. (in Russian)

## REFERENCES

27. Vloshchinskiy P.E., Panin L.E. Nutrition structure, state of energy metabolism and endocrine status in a formed community in the Extreme North. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; (2): 11–5. (in Russian)
28. Panin L.E., Berezovikov P.D., Andronova T.I. Specification of physiological norms in nutrition substrates and energy for different climatic areas of East USSR. In: *Medical and Biological Aspects of Food Program in East USSR [Mediko-biologicheskie aspekty prodovol'stvennoy programmy na Vostoke SSSR]*. Novosibirsk; 1983: 3–53. (in Russian)
29. Slonim A.D. Problems of ecological physiology of man. In: *Human Physiology in Natural Conditions of the USSR [Fiziologiya cheloveka v prirodnykh usloviyakh SSSR]*. Leningrad: Nauka; 1969: 3–II. (in Russian)
30. Panin L.E. *Adaptation Energy Aspects [Energeticheskie aspekty adaptatsii]*. Leningrad: Meditsina; 1978. (in Russian)
31. Kochan T.I. Patterns of alteration in human carbohydrate metabolism in dependence on natural factors of the North. *Ekologiya cheloveka*. 2006; (10): 3–7. (in Russian)
32. Maksimov A.L., Sukhanova I.V., Vdovenko S.I. Functional profiles typical of the male and female residents in different climatic-geographical areas of Magadan region. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2012; (1): 48–56. (in Russian)
33. Popova O.N. *Characteristics of External Respiration Adaptive Reactions in Young People of the Working Age, Residents of the European North*: Diss. Moscow; 2009. (in Russian)
34. Kochan T.I. A year monitoring of the influence of North conditions on human metabolism and cardiovascular system functioning. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2007; (1): 55–65. (in Russian)
35. Tselykh E.D., Golovnev V.A., Elyasin P.A. Blood and urine values as criteria of nutrition adequacy in Indigenous and newcomers of Khabarovskiy kraj. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2008; (4): 73–7. (in Russian)
36. Buganov A.A., Agbalyan A.A., Ionova I.E. The influence of a nutrition factor on the health state of the population in the Extreme North. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2003; (4): 25–8. (in Russian)
37. Raengulov B.M., Istomin A.V., Mikhaylov I.G. Hygienic characteristics of the actual nutrition in scanty people of the Extreme North. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2001; (3): 308–10. (in Russian)
38. Borinskaya S.A., Kozlov A.I., Yanovskiy N.K. Genes and nutrition traditions. *Etnograficheskoe obozrenie*. 2009; (3): 117–37. (in Russian)
39. Kozlov A., Vershubsky G., Borinskaya S., Sokolova M., Nuvano V. Activity of disaccharidases in arctic populations: evolutionary aspects disaccharidases in arctic populations. *J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.* 2005; 24 (4): 473–6.
40. Keyl' V.R., Kuznetsova I.Yu., Mitrofanov I.M., Nikolaev Yu.A., Odintsov S.V., Selyatitskaya V.G. et al. *Health of Industrial People in the North. Strategy of Working Out Health-Improving Programs [Zdorov'e trudyashchikhsya promyshlennykh predpriyatii Severa. Strategiya razrabotki ozdorovitel'nykh programm]*. Novosibirsk: Nauka; 2005. (in Russian)

Поступила 22.08.16

Принята к печати 15.09.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.341-072.1:577.16:613.165.2-053.2

Алиева Н.Р.<sup>1</sup>, Камилова А.Т.<sup>2</sup>, Арипов А.Н.<sup>2</sup>

## СТАТУС ВИТАМИНА D ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ТОНКОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ В ЗОНЕ ПОВЫШЕННОЙ СОЛНЕЧНОЙ ИНСОЛЯЦИИ

<sup>1</sup>Ташкентский педиатрический медицинский институт, 100140, Ташкент, Узбекистан;

<sup>2</sup>Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии Минздрава Республики Узбекистан, 100179, Ташкент, Узбекистан

*Цель исследования:* провести клиничко-лабораторные параллели между уровнями витамина D при заболеваниях тонкой кишки у детей. Обследованы 160 детей с заболеваниями тонкой кишки в возрасте 6 мес–18 лет. Пациенты были разделены на 3 группы: 60 детей с целиакией (Ц) в возрасте 3–16 лет, 60 детей с хроническим постинфекционным энтероколитом (ХПЭ) в возрасте 2–12 лет, 40 детей с аллергическим энтероколитом (АЭ) в возрасте 6 мес–4 лет. Контрольную группу составили 31 ребенок, из них 15 детей в возрасте 6 мес–4 лет и 16 детей в возрасте 5–18 лет. В ходе проводимой работы использовали стандартные для каждой нозологии клинические, параклинические и инструментальные методы исследования. Для изучения статуса витамина D определяли уровни кальцидиола и паратгормона (ПТГ). При проведении клиничко-лабораторных параллелей между уровнями витамина D при заболеваниях тонкой кишки у детей установлен высокий процент снижения витамина D (96,9%), причем при Ц и ХПЭ – в 100% случаях. Выявлена обратная связь между уровнями витамина D и ПТГ, а также активностью щелочной фосфатазы во всех группах больных, более заметная у больных Ц и ХПЭ. Низкие значения уровня витамина D установлены у всех детей с Ц и ХПЭ, тогда как при АЭ – в 87% случаев. Снижение уровня витамина D сопровождалось повышением содержания ПТГ и активности щелочной фосфатазы, причем наиболее высокие цифры его отмечены у больных Ц, далее следовали ХПЭ и АЭ.

**Ключевые слова:** витамин D; заболевания тонкой кишки; хронический энтероколит; целиакия; дети.

**Для цитирования:** Алиева Н.Р., Камилова А.Т., Арипов А.Н. Статус витамина D при заболеваниях тонкой кишки у детей в зоне повышенной солнечной инсоляции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (3): 146–149. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-146-149>

Alieva N.R.<sup>1</sup>, Kamilova A.T.<sup>2</sup>, Aripov A.N.<sup>2</sup>

THE STATUS OF VITAMIN D UNDER DISEASES OF SMALL INTESTINE IN CHILDREN IN THE ZONE OF INCREASED SUN INSOLATION

<sup>1</sup>The Tashkentskii` pediatric medical institute, 100140 Tashkent, the Republic of Uzbekistan

<sup>2</sup>The Republican specialized scientific practical medical center of pediatrics of Minzdrav of the Republic of Uzbekistan, 100179 Tashkent, the Republic of Uzbekistan

**Для корреспонденции:** Камилова Алтиной Турсуновна, д-р мед. наук, проф., рук. отдела гастроэнтерологии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра педиатрии Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент; e-mail: [okamilova@mail.ru](mailto:okamilova@mail.ru).

The study was carried out to trace clinical laboratory parallels between levels of vitamin D under diseases of small intestine in children. The examined sampling included 160 children aged from 6 months to 18 years with diseases of small intestine. The patients were separated to three groups: 60 children with celiac disease aged from 3-16 years; 60 children with chronic post-infectious enterocolitis aged from 2 to 12 years; 40 children with allergic enterocolitis aged from 6 months to 4 years. The control group consisted of 31 children, including 15 children aged from 6 months to 4 years and 16 children aged from 5 to 18 years. The standard clinical, para-clinical and instrumental techniques of investigation were applied to every nosology. To analyze status of vitamin B the levels of calcidiol and parathormone were determined. In the process of tracing clinical laboratory parallels between levels of vitamin D under diseases of small intestine in children high percentage of decreasing of vitamin D (96.9%) was detected, and at that in 100% under celiac disease and chronic post-infectious enterocolitis. The feedback was established between levels of vitamin D and levels of calcidiol and parathormone and also activity of alkaline phosphatase in all groups of patients though more evident in patients with celiac disease and chronic post-infectious enterocolitis. The low values of level of vitamin D were detected in all children with celiac disease and chronic post-infectious enterocolitis whereas only in 87% under allergic enterocolitis. The decreasing of level of vitamin D was accompanied by increasing of content of calcidiol and parathormone and activity of alkaline phosphatase at that the most high numbers are observed in patients with celiac disease and then chronic post-infectious enterocolitis and allergic enterocolitis.

**Key words:** vitamin D; diseases of small intestine; chronic enterocolitis; celiac disease; children

**For citation:** Alieva N.R., Kamilova A.T., Aripov A.N. The status of vitamin B under diseases of small intestine in children in the zone of increased sun insolation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 146-149. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-146-149>*

**For correspondence:** Kamilova A.T., doctor of medical sciences, professor, head of the department of gastroenterology. e-mail: [okamilova@mail.ru](mailto:okamilova@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study was implemented within the framework of applied grant of young scientists attached to the Minzdrav of the Republic of Uzbekistan "The status of vitamin D under diseases of intestine in children, effect of supplementation of vitamin D on course and prognosis of diseases" code: AĖCC-4

Received 25.10.2016  
Accepted 29.11.2016

Нарушения функций тонкой кишки – одна из актуальных проблем педиатрии в Центрально-Азиатском регионе. Значимость данной проблемы определяется тем, что заболевания кишечника являются хроническими, со склонностью к рецидивам и формированию тяжелых расстройств обмена веществ с развитием сложных нарушений функций всей системы пищеварения [1, 2].

Интерес к витамину D в мире очень высок. Исследования последних лет продемонстрировали большую распространенность его недостаточности у населения многих стран мира, в том числе в азиатских и африканских [1, 3, 4].

В связи с расширением понимания о значении витамина D в генезе многих заболеваний актуально изучение его влияния на течение ряда заболеваний, сопровождающихся синдромами мальдигестии и мальабсорбции у детей, – целиакии, хронического постинфекционного энтероколита, аллергического энтероколита, особенно в Узбекистане, количество солнечных дней в котором превышает 320.

Цель исследования: провести клинико-лабораторные параллели между уровнями витамина D при заболеваниях тонкой кишки у детей.

**Материал и методы.** Обследованы 160 детей с заболеваниями тонкой кишки, распределенные на 3 группы:

- 60 детей с целиакией (Ц) в возрасте 3–16 лет;
- 60 детей с хроническим постинфекционным энтероколитом (ХПЭ) в возрасте 2–12 лет;
- 40 детей с аллергическим энтероколитом (АЭ) в возрасте 6 мес–4 лет.

Контрольную группу составил 31 ребенок, из них 15 детей в возрасте 6 мес–4 лет и 16 детей в возрасте 5–18 лет.

Диагноз Ц верифицировали на основании критериев ESPGHAN.

Для установления диагноза АЭ были использованы клинико-anamnestические, параклинические (общий анализ крови, копрология, анализ кала на скрытую кровь, общий белок крови) и иммунологические исследования (IgE общий и специфический к пищевым антигенам методом ИФА, определение лимфокин-продуцирующей способности Т-лимфоцитов к аллергенам) [5].

Диагноз ХПЭ устанавливали на основании связи начала заболевания с перенесенной кишечной инфекцией. Параклинические исследования включали анализ крови, определение общего белка крови, анализ кала, в том числе на микрофлору, по показаниям – контрастную рентгеноскопию кишечника. Для изучения состояния всасывания в тонкой кишке использовали глюкозотолерантный тест (ГТТ).

Показатели физического развития оценивали в сравнительном аспекте со стандартами роста и развития детей, рекомендованными ВОЗ (2006). У пациентов биохимическим методом определяли в сыворотке крови уровни общего и ионизированного кальция, фосфора и активность щелочной фосфатазы. Для изучения статуса витамина D в организме иммуноферментным методом (аппарат «ElecSys2010») определяли уровни кальцидиола [25 (ОН)D<sub>3</sub>] и паратормона (ПТГ) сыворотки крови. Дефицитом витамина D считали снижение концентрации 25 (ОН)D<sub>3</sub> в сыворотке крови менее 20 нг/мл, достаточным уровнем витамина D – концентрацию более 30 нг/мл, недостатком – концентрацию в пределах 21–29 нг/мл [6].

**Результаты.** Болезненность в проекции тощей кишки, околопупочной области и по ходу сигмовидной кишки наблюдали у 36,6% больных ХПЭ, у 56,4% больных Ц, у 70% больных АЭ. Непереваренный, зловонный, кашицеобразный стул отмечен у 35 % больных ХПЭ, АЭ у 51,2% больных. Вздутие живота отмечали у 55 больных Ц (91,6%, из них умеренное – в 64,2% и выраженное – в 27,4% случаев) и у 81,7% больных ХПЭ. При АЭ вздутие живота отмечено в 67,5% случаях.

По результатам копрологии, чаще других у детей с Ц, ХПЭ и АЭ встречали гепатогенную и панкреатогенную стеаторею (85, 90 и 95% соответственно). Амилорею и креаторею в наших наблюдениях обнаруживали реже, чем стеаторею (40,6, 89,4, 89,6%). Клиническая картина АЭ характеризовалась ранним началом заболевания, в среднем в 11,4±0,6 мес, связанным с введением в питание белков коровьего молока (67,5%), а также частым неустойчивым стулом с прозрачной слизью (95%), рвотой (45%), выраженным метеоризмом (67%).

Таблица 1

**Показатели минерального обмена у детей с заболеваниями тонкого кишечника**

Группы	Уровень кальция, моль/л	Уровень ионизированного кальция, ммоль/л	Активность щелочной фосфатазы, ЕД/л	Уровень фосфора, моль/л
Ц	2,0±0,04	0,98±0,1	195,8±2,2**	1,1±0,07*
ХПЭ	2,3±0,06	1,03±0,1	175,3±2,4**	1,4±0,05
АЭ	2,2±0,02	1,05±0,1	102,2±2,5*	1,4±0,06
Контроль	2,35±0,08	1,2±0,2	95,5±1,4	1,48±0,05

Примечание: \* – достоверность данных к контрольной группе (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ).

Таблица 2

**Показатели уровней ПТГ и витамина D у обследованных детей**

Группы	Уровень ПТГ, пг/мл	Уровень витамина D <sub>3</sub> , нг/мг
Ц	29,3±1,9***	14,8±1,04***
ХПЭ	27,2±1,4***	18,6±2,1*
АЭ	15,6±1,3**	22,8±1,8*
Контроль	9,1±0,5	45,1±8,04

Примечание: \* – достоверность данных к контрольной группе (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ).

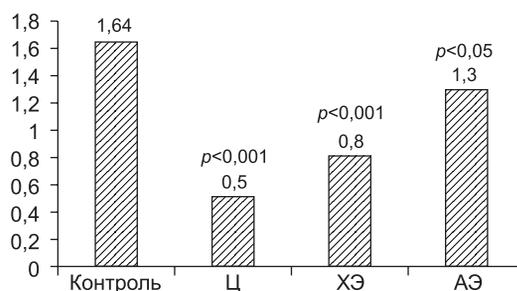
Показатели физического развития демонстрировали, что крайне низкий рост отмечен лишь в группе детей с Ц (36,6%). Отставание в росте в пределах -2СО...-3СО выявлено у 40% больных Ц и 35% больных ХПЭ. При АЭ показатели длины роста были в пределах нормы.

Белково-энергетическая недостаточность питания (БЭНП) тяжелой степени при Ц выявлена в 8,3% случаев, в то время как при ХПЭ и АЭ она отсутствовала. БЭНП средней степени отмечена примерно с одинаковой частотой при Ц и ХПЭ (30,7 и 36,6% соответственно) и в 12,5 % случаев при АЭ.

Таким образом, полученные нами данные при изучении клинической картины заболеваний тонкой кишки свидетельствуют об их полиморфизме. Несмотря на идентичность клинических проявлений Ц, ХПЭ и АЭ, выраженные клинические признаки метаболических нарушений достоверно чаще отмечены при Ц, реже – при ХПЭ, а при АЭ – в незначительной степени. Данные ГТТ показали, что по сравнению с контрольной группой уровень гликемии у детей с Ц и ХПЭ был соответственно в 3,3 и 2 раза ниже показателей контрольной группы ( $p < 0,001-0,01$ ), а при АЭ – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок).

Тенденция к уменьшению содержания общего и ионизированного кальция отмечена при всех формах заболеваний ( $p > 0,05$ ). Уровень фосфора был снижен у всех больных, но достоверное снижение отмечено только у детей с Ц (1,1±0,07 моль/л против 1,48±0,05 моль/л;  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Во всех группах пациентов активность щелочной фосфатазы была достоверно повышена по сравнению с контрольной группой, особенно у больных Ц и ХПЭ ( $p < 0,001$ ). Дефицит витамина D выявлен у 48 (80%) больных Ц, из них у каждого четвертого пациента (15) – ниже 10 нг/мл. В остальных случаях установлено недостаточное содержание витамина D (20%). При ХПЭ дефицит витамина D выявлен у 34 больных (57%), что в 1,4 раза реже, чем у больных Ц. Недостаточное содержание витамина D констатируется у 26 (43%) больных, что более чем в 2 раза чаще по сравнению с больными Ц.



Сравнительный анализ общего белка и уровня гликемии у детей с заболеваниями тонкого кишечника (в моль/л).

У детей с АЭ дефицит витамина D выявлен у 10 детей (25%), что более чем в 3 раза реже, чем у больных Ц. Недостаточное содержание витамина D выявлено у 27 (62%) детей с АЭ. У 13% детей с АЭ отмечены нормальные значения витамина D. Средний уровень витамина D был достоверно снижен во всех группах детей, но более выражен у больных Ц. Средний уровень ПТГ повышен во всех группах и более выражен у детей с Ц и ХПЭ (табл. 2).

**Обсуждение.** Наши результаты по статусу витамина D, полученные у больных Ц, совпадают с результатами исследований других авторов [7, 8], которые установили, что дефицит витамина D и связанное с ним разрежение костной ткани достигают до 70% у больных Ц. Авторы обращают внимание на то, что нарушению всасывания витамина D способствует затруднение оттока желчи, обусловленное снижением активности панкреатической липазы. Следствие этого – возникновение дефектов формирования мицелл, способствующих нарушению всасывания витамина D. Предполагают, что если холецистокинин, ответственный за секрецию желчи и выделение панкреатической липазы, функционирует некорректно, то поверхность для абсорбции витамина D нарушается [9].

Низкое усвоение витамина D у пациентов с мальабсорбцией (муковисцидоз и синдром короткой кишки) отмечают ряд авторов [10]. Так, например, у больных муковисцидозом установлена недостаточная абсорбция витамина D в связи с выраженной экзокринной недостаточностью поджелудочной железы [11]. Первичный механизм дефицита витамина D у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника связывают с низким количеством белка, в частности альбумина. Недавние данные экспериментальных исследований на животных предполагают, что витамин D вовлечен в регулирование эпителиального заживления слизистой оболочки кишечника. Эти наблюдения могут, по крайней мере, частично объяснить ассоциации между дефицитом витамина D и развитием воспалительных заболеваний кишечника [3].

**Заключение.** Низкие показатели уровня витамина D установлены у всех детей с целиакией и постинфекционным энтероколитом, тогда как при аллергическом энтероколите – в 87% случаев. Снижение уровня витамина D сопровождалось повышением уровня паратгормона и активности щелочной фосфатазы, причем наиболее высокие цифры его отмечены у больных целиакией, далее следовали хронический постинфекционный энтероколит и аллергический энтероколит.

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

**Финансирование.** Исследование было выполнено в рамках прикладного гранта молодых ученых при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан «Статус витамина D при заболеваниях кишечника у детей, влияние саплементации витамина D на течение и прогноз заболеваний». Шифр: АЕСС-4.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 6–11 см. REFERENCES)

5. Мирзамухамедов Д.М. *Диагностическое значение лимфотоксина у детей с atopической бронхиальной астмой. Методические рекомендации.* Ташкент; 1989.

REFERENCES

1. Fraser D.R. Vitamin D-deficiency in Asia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004; 89–90 (1–5): 491–5.
2. Garg M., Lubel J.S., Sparrow M.P., Holt S.G., Gibson P.R. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease – established concepts and future directions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012; 36 (4): 324–44.
3. Raman M., Milestone A.N., Walters J.R., Hart A.L., Ghosh S. Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2011; 4 (1): 49–62.
4. Raftery T., Martineau A.R., Greiller C.L., Ghosh S., McNamara D., Bennett K. et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United European Gastroenterol. J.* 2015; 3 (3): 294–302.
5. Mirzamukhamedov D.M. *Diagnostic Value of Lymphotoxin in Children with Atopic Asthma. Methodical Recommendations [Diagnosticheskoe znachenie limfotoksina u detey s atopicheskoy*

- bronkhial'noy astmoy. Metodicheskie rekomendatsii].* Tashkent; 1989. (in Russian)
6. Mouli V.P., Ananthakrishnan A.N. Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014; 39 (2): 125–36.
7. Da Silva G.A. Celiac disease: effects on bone mineralization. *J. Pediatr. (Rio J.)* 2003; 79 (4): 282–3.
8. Meyer D., Stavropoulos S., Diamond B., Shane E., Green P.H. Osteoporosis in a north american adult population with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2001; 96 (1): 112–9.
9. Holick M.F., Binkley N.C., Bischoff-Ferrari H.A., Gordon C.M., Hanley D.A., Heaney R.P. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96 (7): 1911–30.
10. Haworth C.S., Jones A.M., Adams J.E., Selby P.L., Webb A.K. Randomised double blind placebo controlled trial investigating the effect of calcium and vitamin D supplementation on bone mineral density and bone metabolism in adult patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2004; 3 (4): 233–6.
11. Lark R.K., Lester G.E., Ontjes D.A., Blackwood A.D., Hollis B.W., Hensler M.M. et al. Diminished and erratic absorption of ergocalciferol in adult cystic fibrosis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73 (3): 602–6.

Поступила 11.11.16

Принята к печати 29.11.16

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155.194.125-074

Верлинский О.Ю.<sup>1</sup>, Жиленкова Ю.И.<sup>2</sup>, Козлов А.В.<sup>2</sup>, Бессмельцев С.С.<sup>3</sup>

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ВЫЯВЛЕНИЯ НОСИТЕЛЬСТВА БЕТА-ТАЛАССЕМИИ

<sup>1</sup>Институт репродуктивной генетики, Чикаго, США;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», 191024, Санкт-Петербург

*В статье представлены результаты обследования 110 пациентов (57 мужчин, 53 женщины, в возрасте от 2 до 58 лет) с микроцитарными гипохромными анемиями. Использованный набор лабораторных маркеров, включающий гематологические параметры (MCV, индекс Менцера), биохимические (сывороточное железо, ферритин), данные электрофореза (Hb A2, Hb F) и молекулярно-генетического анализа (мутации бета-глобинового гена) позволили выявить и доказать носительство талассемии у 70 из 110 пациентов с микроцитарными анемиями. Предложенный набор маркеров можно использовать в скрининговых программах и для дифференциальной диагностики носителей бета-талассемии и пациентов с железодефицитной анемией (ЖДА).*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** бета-талассемия; индекс Менцера; изоэлектрофокусирование; микроцитарные анемии.

**Для цитирования:** Верлинский О.Ю., Жиленкова Ю.И., Козлов А.В., Бессмельцев С.С. Лабораторные маркеры выявления носительства бета-талассемии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (3): 149-153. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-149-153>

*Verlinsky O.Yu.<sup>1</sup>, Zhilenkova Yu.I.<sup>2</sup>, Kozlov A.V.<sup>2</sup>, Bessmeltsev S.S.<sup>3</sup>*

THE LABORATORY MARKERS OF DETECTION OF BETA-THALASSEMIA CARRIAGE

<sup>1</sup>The institute of reproductive genetics, Chicago, USA

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

<sup>3</sup>The Russian research institute of hematology and transfusiology of the Federal medical biological agency of Russia, 191024 St. Petersburg, Russia

**Для корреспонденции:** Жиленкова Юлия Исмаиловна, аспирант каф. клин. лаб. диагностики СЗГМУ им. И.И. Мечникова; e-mail: [yuliaismailovna@mail.ru](mailto:yuliaismailovna@mail.ru)

*The article presents the results of examination of 110 patients (57 males and 53 females aged from 2 to 58 years) with microcytic hypochromic anemia. The kit of laboratory markers comprised hematological parameters (MCV, Mentzer Index), biochemical (serum iron, ferritin), electrophoresis data (Hb, A<sub>2</sub>, Hb F) and molecular genetic analysis data (mutations of beta-globin gene). The application of this kit permitted to detect and to prove carriage of thalassemia in 70 out of 110 patients with microcytic anemia. The proposed markers' kit can be applied in screening programs and in differential diagnostic of agents of beta-thalassemia and patients with iron-deficiency anemia.*

**Key words:** beta-thalassemia; Mentzer index; isoelectrofocusing; microcytic cells.

**For citation:** Verlinsky O.Yu., Zhilenkova Yu.I., Kozlov A.V., Bessmeltsev S.S. The laboratory markers of detection of beta-thalassemia carriage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 149-153. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-149-153>*

**For correspondence:** Zhilenkova Yu.I., post-graduate student of the chair of clinical laboratory diagnostic. e-mail: [yuliais@mailovna@mail.ru](mailto:yuliais@mailovna@mail.ru)

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

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

Received 19.07.2016  
Accepted 15.08.2016

Бета-талассемия – широко распространенное наследственное нарушение синтеза гемоглобина [1, 2]. По данным ВОЗ, около 1,5% населения Земли – носители бета-глобинового гена, ежегодно рождается не менее 40 000 детей с синдромом талассемии [3]. Талассемия широко распространена в районе так называемого малярийного пояса: в бассейне Средиземного моря, Ближнем Востоке, Закавказье, странах Юго-Восточной и Средней Азии [4, 5]. Активные миграционные процессы привели к распространению носительства бета-глобинового гена по всему миру, в том числе и в России, преимущественно за счет усиления миграционных потоков из Азербайджана, Грузии, Узбекистана и Таджикистана, где талассемия встречается наиболее часто [6, 7].

Гомозиготная форма бета-талассемии остается тяжелым заболеванием. Лечение талассемии и осложнений, связанных с заболеванием и его терапией, требует ресурсного обеспечения – как медицинского, так и финансового. Определенные трудности испытывают клиницисты при диагностике малых форм, сопровождающихся умеренной микроцитарной гипохромной анемией. Выявление пациентов с малыми формами бета-талассемии – важная задача, с точки зрения профилактики рождения детей, гомозиготных по аномальным глобиновым генам. Данная проблема во многих странах решается с помощью различных скрининговых программ, основанных на лабораторном обследовании пациентов групп риска с целью обнаружения носителей бета-глобинового гена [8, 9].

В России этой проблеме до настоящего времени не уделяли должного внимания, что создает трудности в дифференциальной диагностике микроцитарных гипохромных анемий и в ряде случаев ведет к неверной тактике терапии пациентов с малыми формами талассемий.

Цель работы – разработка лабораторных критериев для выявления носителей талассемии в группе пациентов с микроцитарными анемиями.

**Материал и методы.** В исследование были включены 110 пациентов различных возрастных групп (57 мужчин, 53 женщины, в возрасте от 2 до 58 лет, 16,4±1,2, медиана 12,5 лет), направленных на обследование и лечение в Детский консультативно-диагностический центр и Российский НИИ гематологии и трансфузиологии в Санкт-Петербурге с предварительным диагнозом «микроцитарная (MCV < 80 фл) гипохромная (MCH < 27 пг) анемия с Hb > 90 г/л».

Все пациенты постоянно проживали в Санкт-Петербурге, имели различный национальный состав: 40% составили пациенты из азербайджанских семей; 33,8% – из русских семей, которые (с их слов) не имели ни кавказских, ни средиземноморских корней; 11,3% – болгары, киприоты; 8,7% – дагестанцы; 6,2% – пациенты из смешанных семей (один из родителей русский, другой – выходец с Кавказа или Средиземноморья).

Использовали следующие параметры: 1) эритроцитарные (Sysmex XT-4000i, Япония) и индекс Менцера (RBC/Hb); 2) сывороточное железо и ферритин (Cobas 6000, Roche, Швейцария); 3) фракции гемоглобина (изоэлектрофокусирование (ИЭФ) на агарозе, система для электрофореза SAS1 и SAS2 HelenaBioSciences, Великобритания). Использовали «отрезные» значения (cutoff), рекомендованные производителем: Hb A<sub>2</sub> > 3,7%, HbF > 2%; 4) мутации бета-глобинового гена (метод обратной гибридизации продуктов мультиплекса ПЦР с олигонуклеотидными зондами, фиксированными на стрипах, тест-система β-Globin StripAssay Kit, ViennaLab Diagnostics, Австрия).

Материалом для исследования служила венозная кровь. Для гематологического исследования, электрофореза и молекулярно-генетического анализа кровь собирали в пробирки с K<sub>3</sub>ЭДТА в качестве антикоагулянта, для получения сыворотки – в пробирки с активатором свертывания (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica for Windows, 6.0. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ . Аналитические характеристики тестов проанализировали с использованием ROC-анализа (программа MedCalc Software, Belgium).

**Результаты.** По результатам электрофореза, показателей обмена железа и индекса Менцера (табл. 1, 2 и 3) пациенты были разделены на две группы. В основную группу вошли 70 пациентов (37 мужчин, 33 женщины, возраст от 2 до 58 лет, 14,5±1,5, медиана 9 лет) с малой формой бета-талассемии. Группу сравнения образовали 40 пациентов с ЖДА (17 мужчин, 23 женщины, возраст от 2 до 54 лет, 16,3±2,15, медиана 13,5 лет).

Как следует из представленных в табл. 1 данных, в основной группе количество эритроцитов было достоверно выше, чем в группе сравнения ( $p < 0,05$ ), тогда как значения параметров MCV и MCH были ниже ( $p < 0,05$ ). Различия по показателям MCHC и RDW были недостоверными ( $p > 0,05$ ). Сравнение аналитических характеристик основных эритроцитарных параметров и индекса Менцера (M) для дифференциальной диагностики малой формы бета-талассемии и ЖДА показало, что наибольшей чувствительностью обладает параметр MCV, а специфичностью – индекс Менцера. Значение LR(+) – способность положительных результатов этих тестов распознавать наличие заболевания – расценивалась как «отличная» для индекса Менцера = 34. Величина отношения правдоподобия LR(-) позволила расположить исследуемые тесты по способности отрицательного результата распознавать отсутствие заболевания и расценивалась как отличная для MCV = 0,03 (табл. 2).

Поскольку в обследованных нами группах присутство-

Таблица 1

Таблица 3

**Эритроцитарные параметры у пациентов основной и группы сравнения**

Параметры	Основная группа (n = 70)	Группа сравнения (n = 40)	p
Hb, г/л	110±12	106±9	> 0,05
RBC, ×10 <sup>12</sup> /л	5,7±0,6	4,7±0,5	< 0,05
MCV, фл	58,9±5,6	70,8±4,7	< 0,05
MCH, пг	19,4±1,9	22,9±2,4	< 0,05
MCHC, г/л	329±11	324±26	> 0,05
RDW, %	17,3±2,1	16,8±2,2	> 0,05

**Концентрация сывороточного железа и ферритина у пациентов основной и группы сравнения**

Параметры	Основная группа (n = 70)	Группа сравнения (n = 40)	p
Железо, мкмоль/л	17,8±5,2	7,4±3,6	< 0,05
Ферритин, нг/мл	40,2±23,6	6,4±4,1	< 0,05

Таблица 4

**Мутации, выявленные в образцах ДНК, выделенных из крови пациентов основной группы**

Мутация	Тип талассемии	Частота, %
Codon 8 (-AA)	β0	36
IVS 1.110 (G > A)	β+	26
Codon 5 (-CT)	β0	7
IVS 2.1 (G > A)	β0	6
IVS 2.745 (C > G)	β+	5
IVS 1.5 (G > C)	β+	5
IVS 1.6 (T > C)	β+	6
IVS 1.1 (G > A)	β0	4
Codon 8/9	β0	3
-101 (C > T)	β+	1
Мутация не выявлена	–	1
Всего...		100

вали пациенты с дефицитом железа, определяли концентрацию сывороточного железа и ферритина (табл. 3). Концентрация сывороточного железа оказалась достоверно ниже у пациентов с ЖДА (7,9±3,7 мкмоль/л, p < 0,01) и оставалась в пределах референтных значений у пациентов с малой бета-талассемией (17,9±5,7 мкмоль/л). В то же время у 11,5% пациентов основной группы данный показатель также оказался снижен. Концентрация ферритина в сыворотке крови у лиц группы сравнения была также достоверно ниже (7,1±0,6 нг/мл, p < 0,01), что свидетельствовало в пользу ЖДА, в то время как у пациентов основной группы она находилась в пределах нормы (42,2±23 нг/мл), и лишь у 2,7% была снижена.

У пациентов основной группы диагноз «талассемия» подтверждали с помощью ИЭФ (Hb A2 > 3,7% и/или Hb F > 2%): содержание Hb A2 колебалось от 4 до 7,9%, медиана – 5,1%; Hb F – от 7 до 12%, медиана – 9,9%). В группе сравнения при разделении фракций гемоглобина получены следующие данные: содержание Hb A колебалось в пределах от 97 до 98%, Hb A2 – от 1,7 до 3,5% (медиана 2,4%).

Для подтверждения носительства бета-талассемии проведен молекулярно-генетический анализ (табл. 4).

Как следует из табл. 4, на долю двух мутаций (Codon 8 (-AA) и IVS 1.110 (G > A)) приходится 62%, остальные 8 мутаций обнаружены у 37% больных. У 1 пациента с использованием данной тест-системы мутация не была выявлена.

**Обсуждение.** В последние годы носительство бета-талассемии в России существенно возросло и грозит превратиться в серьезную проблему для здравоохранения вследствие интенсификации миграционных потоков, увеличения доли носителей и рождения гомозиготного потомства [10].

В свое время признание важности данной проблемы в США и Европе повысило обеспокоенность органов здравоохранения, которые в кооперации с ВОЗ предприняли ряд важных шагов в реализации следующих направлений: 1) сбор и анализ эпидемиологической информации; 2) разработка стандартов и руководств для проведения лаборатор-

ных исследований; 3) выпуск национальных руководств по лечению талассемии; 4) создание обучающих программ для медицинских работников, больных, их родителей и сообщества в целом [11].

В рамках данных программ на лабораторию было возложено выполнение комплекса методов различной сложности, которые включали гематологические, биохимические, молекулярно-генетические. Существенных различий в структуре программ не наблюдали, отдельные детали были обусловлены популяционным и этническим составом определенного региона и частотой носительства бета-глобинового гена. Не последнюю роль играли и финансовые возможности системы здравоохранения [10, 11].

В регионах с высокой распространенностью талассемии в скрининговых программах на 1-м этапе предпочтительнее отдавали доступным лабораторным методам и расчету эритроцитарных индексов [12–14]. Недавние публикации показали, что интерес к ним не ослабевает, их продолжают использовать, однако ведут и поиск новых индексов и их сочетаний [15–17]. В регионах с низкой распространенностью бета-глобинового гена скрининг начинают, как правило, с выявления группы предполагаемых носителей путем сбора семейного анамнеза и оценки клинической картины, хотя далеко не всегда малые формы талассемии имеют выраженные клинические проявления [8, 18].

Для подтверждения талассемии у пациентов групп риска используют различные методы разделения фракций гемоглобина: электрофорез на носителях (ацетатцеллюлозе, агарозе), изоэлектрофокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез (КЭ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [19–21]. Разработка полностью автоматизированных систем на основе ИЭФ, КЭ и ВЭЖХ позволила шире использовать их в

Таблица 2

**Аналитические характеристики основных эритроцитарных параметров и индекса Менцера для разделения пациентов на группы**

Индексы	Площадь под кривой (AUC)	Отрезные значения (cutoff)	Чувствительность, %	Специфичность, %	Отношение правдоподобий (LR)		p
					+LR	-LR	
MCV, фл	0,935	65,0	97,5	82,5	5,57	0,03	< 0,01
MCH, пг	0,882	20,1	90	77,5	4	0,13	< 0,01
Индекс М	0,951	11,4	85	97,5	34	0,15	< 0,01

лабораториях, заменив менее информативный электрофорез на ацетатцеллюлозной мембране в качестве скринингового метода первого ряда [19]. С их помощью удается проводить количественную оценку вариантов гемоглобина, в том числе и фракции  $A_2$  для  $\beta$ -талассемии. Выбор методологии и оборудования диктуется объемом рабочей нагрузки, типом исследуемого материала (жидкая кровь или «сухая капля»), чувствительностью и специфичностью метода, стоимостью аппаратуры и наличием квалифицированных кадров [8, 10, 12]. Во многих руководствах с целью минимизирования ошибок рекомендуют использовать не менее двух технологий, основанных на разных аналитических принципах. В частности, для более надежного определения фракции  $A_2$  в методических указаниях Британского комитета по стандартизации в гематологии (BCSH) рекомендуют сочетать ИЭФ и ВЭЖХ [8]. Совершенствование систем разделения гемоглобина на основе КЭ способствовало росту его популярности в качестве основного метода в первую очередь в европейских странах (Франция) и позволило уточнить референсные значения [22, 23].

В США и ряде европейских стран (Великобритания, Германия) для идентификации вариантов гемоглобина в последние годы широко используют метод масс-спектрометрии [24]. Несмотря на высокую разрешающую способность, метод не позволяет выявлять весь спектр значимых вариантов гемоглобина (в том числе и достаточно распространенных – HbD и C). В связи с этим он не способен полностью заменить электрофорез и ВЭЖХ [25].

Решающим аргументом для подтверждения носительства талассемии остается выявление талассемических мутаций [26]. К настоящему времени известно не менее 200 мутаций данного гена, и этот список постоянно пополняется [27].

Возможности направленного поиска мутаций способствует наличие данных о распространенности тех или иных молекулярных дефектов бета-глобинового гена в определенных регионах. В странах с высоким распространением талассемии спектр мутаций в целом изучен. Для некоторых стран (Азербайджан, Таджикистан и Китай) характерен достаточно широкий набор талассемических мутаций [28, 29]. В других странах (Кипр, Греция, Италия) у подавляющего большинства населения встречается 2–3 мутации [30].

В тех странах, где распространение талассемии связано в первую очередь с миграционными процессами (Россия, страны Восточной и Западной Европы), поиск наиболее часто встречающихся талассемических мутаций продолжается [6, 31].

В связи с увеличением доли носителей бета-талассемии в России и недостаточным знакомством практикующих врачей с данной проблемой, появилась потребность в разработке новых лабораторных подходов к выявлению пациентов с данной патологией.

Полученные нами данные (см. табл. 1–4) позволили предложить набор лабораторных маркеров, пригодных для использования, в том числе и в скрининговых программах, и разработать диагностический алгоритм, включающий несколько этапов.

Первый этап – выявление носителей бета-талассемии в группе пациентов с микроцитарной анемией на основе эритроцитарного параметра MCV, индекса Менцера (M) и показателей обмена железа. Использование MCV (<65 фл) в сочетании с индексом M (<11,5) позволило выявить из 70 пациентов 66 (94,3%), у которых диагноз «малая форма бета-талассемии» был подтвержден на последующих этапах. У оставшихся 4 пациентов из этой группы (5,7%) на фоне микроцитоза MCV < 80 фл и индекса M > 11,5 концентрация железа и ферритина в сыворотке находились в пределах референтных значений, что не позволило исклю-

чить их из группы риска лиц с подозрением на носительство талассемии.

У 11,5% больных с подтвержденной талассемией наблюдали снижение концентрации сывороточного железа и ферритина. Это указывает на возможность сочетания гемоглобинопатии и ЖДА, особенно у детей младшей возрастной группы. При этом необходимо учитывать, что в случаях тяжелой железодефицитной анемии у пациентов с талассемией уровень Hb A2 может быть снижен (снижение иногда достигает 0,5%) [32].

Второй этап – подтверждение диагноза «талассемия» у выявленных на первом этапе пациентов с использованием ИЭФ. Его результаты позволили подтвердить наличие бета-талассемии у 68 (97,1%) из 70 человек, у которых она выявлена ранее.

Третий этап – выявление мутации бета-глобинового гена для окончательного подтверждения носительства талассемии.

Ввиду недостаточной изученности спектра талассемических мутаций в различных регионах России мы остановили выбор на тест-системе, которая позволяет одновременно охватить 22 мутации бета-глобинового гена, характерных для региона Средиземноморья (Med): – 101 (C>T); – 87 (C > G); – 30 (T > A); Codon 5 (-CT); Codon 6 (G > A) HbC; Codon 6 (A > T) HbS; Codon 6 (-A); Codon 8 (-AA); Codon 8/9 (+G); Codon 15 (TGG > TGA); Codon 27 (G > T); IVS1-1 (G > A); IVS1-5 (G > C); IVS1-6 (T > C); IVS1-110 (G > A); IVS1-116 (T > G); IVS1-130 (G > C); Codon 39 (C > T); Codon 44 (-C); IVS2-1 (G > A); IVS2-745 (C > G); IVS2-848 (C > A).

Наличие мутации бета-глобинового гена в основной группе было выявлено у 69 (98,6%) пациентов из 70. Все-го обнаружено 10 вариантов талассемических мутаций. Среди них: Codon 8 (-AA) – 38% (занимает 1-е место по частоте в Азербайджане) и IVS 1.110 (G > A) – 27% (наиболее частая мутация у народов Средиземноморья) [28, 29]. Остальные мутации: Codon 5 (-CT), IVS 2.1 (G > A), IVS 2.745 (C > G), IVS 1.5 (G > C), IVS 1.6 (T > C), IVS 1.1 (G > A), Codon 8/9 и -101 (C > T) – обнаружены у 37% пациентов.

**Заключение.** Таким образом, использованный нами комплексный подход, включающий учет гематологических, биохимических лабораторных маркеров, результаты электрофореза и молекулярно-генетического анализа, позволил установить носительство бета-талассемии у 70 пациентов в группе микроцитарных анемий.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5, 8–20, 23–24, 30–32 см. REFERENCES)

- Токарев Ю.Н. Гемоглобинопатии: географическое распространение, этиопатогенез, диагностика, принципы лечения и профилактика. *Терапевтический архив*. 1998; 70 (5): 2–74.
- Лохматова М.Е., Сметанина Н.С., Финогонова Н.А. Эпидемиология гемоглобинопатий в Москве. *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского*. 2009; 87 (4): 46–50.
- Жиленкова Ю.И., Пшеничная К.И., Ивашикина Т.М. Распространенность гемоглобинопатий среди детей Санкт-Петербурга. *Медицинский алфавит*. 2015; 1 (2): 29–31.
- Верлинский О.Ю., Жиленкова Ю.И., Бессмельцев С.С., Козлов А.В. Использование электрофореза на агарозе в диагностике различных типов гемоглобинопатий. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова*. 2016; 8 (1): 22–6.
- Комарова И.Н. Современные подходы к лабораторной диагностике гемоглобинопатий. *Детская больница*. 2009; (3): 38–41.

29. Абдулалимов Э.Р., Асадов Ч.Д., Мамедова Т.А., Кафарова С.Н., Кулиева Е.Д. Сравнительная характеристика двух методов выявления мутаций бета-глобинового гена. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (1): 56–9.

## REFERENCES

1. Cao A., Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet. Med.* 2010; 12 (2): 61–76.
2. Weatherall D.J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. 2010; 115 (22): 4331–6.
3. Modell B., Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull. World Health Organ.* 2008; 86 (6): 480–7.
4. Tokarev Yu.N. Haemoglobinopathies: geographic distribution, etio-pathogenesis, diagnostics, principles of treatment and prevention. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1998; 70 (5): 2–74. (in Russian)
5. Galanello R., Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010; 5: 11.
6. Lokhmatova M.E., Smetanina N.S., Finogenova N.A. Epidemiology of haemoglobinopathies in Moscow. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2009; 87 (4): 46–50. (in Russian)
7. Zhilenkova Yu.I., Pshenichnaya K.I., Ivashikina T.M. Prevalence of haemoglobinopathies among children in St. Petersburg, Russia. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 1 (2): 29–31. (in Russian)
8. Ryan K., Bain B.J., Worthington D., James J., Plews D., Mason A. et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br. J. Haematol.* 2010; 149 (1): 35–49.
9. Cousens N., Gaff C. Carrier screening for beta-thalassaemia: a review of international practice. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010; 18 (10): 1077–83.
10. Old J., Galanello R., Eleftheriou A. *Prevention of Thalassaemia and other Haemoglobin Disorders*. 2nd ed. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation; 2013.
11. Cappellini M.D., Cohen A., Eleftheriou APh, Piga A., Porter J, Tahaer A. *Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia [Internet]*. 2nd ed. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation; 2008. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK173968/>.
12. Alkindi S., Pathare A., Al-Madhani A., Al-Haddabi H., Al-Abri Q., Gravell D. et al. Neonatal Screening Mean haemoglobin Ali red cell indices in cord blood from Omani neonates. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2011; 11 (4): 462–9.
13. Rahim F., Ahadi R. Thalassaemia and Haemoglobin Disorders in the Khuzestan Province of Iran. *J. Clin. Diagn. Res.* 2008; 2 (3): 820–6.
14. Karnpean R., Pansuwan A., Fucharoen G., Fucharoen S. Evaluation of the URIT-2900 automated hematology analyzer for screening of thalassemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian populations. *Clin. Biochem.* 2011; 44 (10-11): 889–93.
15. Bordbar E., Taghipour M., Zucconi B. Reliability of Different RBC Indices and Formulas in Discriminating between  $\beta$ -Thalassemia Minor and other Microcytic Hypochromic Cases. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2015; 7 (1): e2015022.
16. Sehgal K., Mansukhani P., Dadu T., Irani M., Khodajji S. Sehgal index: A new index and its comparison with other complete blood count-based indices for screening of beta thalassemia trait in a tertiary care hospital. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2015; 58 (3): 310–5.
17. Schoorl M., Schoorl M., van Pelt J., Bartels P.C. Application of innovative hemocytometric parameters and algorithms for improvement of microcytic anemia discrimination. *Hematol. Rep.* 2015; 7 (2): 5843.
18. Langlois S., Ford J.C., Chitayat D., Chitayat D., Désilets V.A., Farrell S.A. et al. Carrier screening for thalassemia and hemoglobinopathies in Canada. *Joint SOGC-CCMG Clinical Practice Guideline*. 2008; (218): 950-9. Available at: <https://sogc.org/wp-content/uploads/2013/01/gui218CPG0810.pdf>.
19. Bain B.J. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2012.
20. Khera R., Singh T., Khuana N., Gupta N., Dubey A.P. HPLC in characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinicohematological correlation. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2015; 31 (1): 110–5.
21. Verlinskiy O.Yu., Zhilenkova Yu.I., Bessmel'tsev S.S., Kozlov A.V. Use of the agarose electrophoresis in the diagnosis of different types of hemoglobinopathies. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni I.I. Mechnikova*. 2016; 8 (1): 22–6. (in Russian)
22. Komarova I.N. Modern approaches to laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Detskaya bol'nitsa*. 2009; (3): 38–41. (in Russian)
23. Brants A. Detection of hemoglobinopathies and thalassemias using automated separation systems. *MLO Med Lab Obs.* 2014; 46 (1): 24–6.
24. Traeger-Synodinos J., Hartevelde C.L. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark. Med.* 2014; 8 (1): 119–31.
25. Kleinert P., Schmid M., Zurbriggen K., Speer O., Schmutz M., Roschitzki B. et al. Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants. *Clin. Chem.* 2008; 54 (1): 69–76.
26. Kutlar A., Sickle Cell Center, Georgia Health Sciences University, USA. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. In: *XXXVIII. Ulusal Hematoloji Kongresi (Turkish)*. Antalya; 2012: 107–11.
27. Kuliev A., Rechitsky S., Verlinsky O. *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis*. 3rd ed. Chicago, Illinois, USA: CRC Press; 2014.
28. Old J., Henderson S. Molecular diagnostics for haemoglobinopathies. *Expert Opin Med. Diagn.* 2010; 4 (3): 225–40.
29. Abdalalimov E.R., Asadov Ch.D., Mamedova T.A., Kafarova S.N., Kulieva E.D. The comparative characteristic of two methods of detection of mutations of betaglobin gene. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (1): 56–9. (in Russian)
30. Bozkurt G. Results from the north Cyprus thalassemia prevention program. *Hemoglobin*. 2007; 31 (2): 257–64.
31. Divoka M., Partschova M., Kucerova J., Mojzickova R., Cermak J., Pospisilova D. Molecular Characterization of  $\beta$ -Thalassemia in the Czech and Slovak Populations: Mediterranean, Asian and Unique Mutations. *Hemoglobin*. 2016; 40 (3): 156–62.
32. Arshad M., Ahmed S., Ali N. Effect of Iron Deficiency on the Phenotype of  $\beta$ -Thalassaemia Trait. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2016; 26 (3): 230–1.

Поступила 19.07.16  
Принята к печати 15.08.16

Буркитбаев Ж.К.<sup>1</sup>, Абдрахманова С.А.<sup>1</sup>, Савчук Т.Н.<sup>1</sup>, Жибурт Е.Б.<sup>2</sup>

## ВНЕДРЕНИЕ NAT-СКРИНИНГА ИНФЕКЦИЙ У ДОНОРОВ КРОВИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

<sup>1</sup>Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения (РГП на ПХВ) «Научно-производственный центр трансфузиологии» Минздравсоцразвития Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Казахстан;

<sup>2</sup>ФГБУ Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 105203, Москва, Россия

*В статье проведен анализ скрининга маркеров инфекций у доноров с применением метода нуклеиновых кислот вирусов (NAT) за четыре года. Авторы сравнивают аналогичные мировые показатели, оценивают эффективность данной методики в республике. В результате исследований выявлено, что продуктивность NAT в Казахстане существенно превышает среднемировые значения, и внедрение данного метода позволило предотвратить переливание инфицированной крови.*

**Ключевые слова:** скрининг; NAT-исследования; доноры; маркеры инфекций.

**Для цитирования:** Буркитбаев Ж.К., Абдрахманова С.А., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б. Внедрение NAT-скрининга инфекций у доноров крови Республики Казахстан. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 154-156. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-154-156>

Burkitbaev J.K.<sup>1</sup>, Abdrahmanova S.A.<sup>1</sup>, Savchuk T.N.<sup>1</sup>, Zhiburt E.B.<sup>2</sup>

### THE IMPLEMENTATION OF NAT-SCREENING OF INFECTIONS IN BLOOD DONORS OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

<sup>1</sup>The R&D production center of transfusiology of Minzdravsocrazvitia of the Republic of Kazakhstan, 010000 Astana, the Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup>The N.I. Pirogov National medical surgical center of Minzdrav of Russia, 105203 Moscow, Russia

*The article presents analysis of screening of markers of infections in donors using the nucleic amplification technique (NAT) within 4 years. The comparison is made with similar international indices and evaluation was applied to efficiency of the given technique in Kazakhstan. The study established that productivity of NAT technique in Kazakhstan significantly exceeds average international values. The implementation of the given technique permitted to prevent transfusion of infected blood.*

**Key words:** screening; NAT-analysis; donors; infection marker

**For citation:** Burkitbaev J.K., Abdrahmanova S.A., Savchuk T.N., Zhiburt E.B. The implementation of NAT-screening of infections in blood donors of the Republic of Kazakhstan. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 154-156. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-154-156>

**For correspondence:** Savchuk T.N., the head of the Republican reference-laboratory of blood service. e-mail: [omninpct16@mail.ru](mailto:omninpct16@mail.ru)

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

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

Received 11.08.2016  
Accepted 29.11.2016

**Введение.** Скрининг маркеров инфекций у доноров – важнейший элемент инфекционной безопасности в службе крови [1]. Наряду с серологическими маркерами в мире все активнее внедряют скрининг нуклеиновых кислот вирусов (технологии амплификации нуклеиновых кислот, nucleic acid amplification technology, NAT), позволяющий сократить период «окна» (W.K. Roth и соавт., 2012). В Казахстане повышение качества работы службы крови – государственная задача [2–5].

С 2012 г. внедрен обязательный двухэтапный скрининг донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции. Разрешается проводить пулирование образцов донорской крови для исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Центры крови оснащают закрытыми автоматизиро-

ванными лабораторными системами Cobas S-201 для ПЦР-тестирования (Roche). С 2012 г. в государственном мониторинге добавлены данные о выполнении ПЦР-исследования доноров крови. Алгоритм обследования доноров основан на двухэтапном последовательном скрининге: 1) исследование на наличие серологических маркеров гемотрансфузионных инфекций; 2) все образцы, имеющие отрицательный результат на серологические маркеры, тестируют в ПЦР (табл. 1).

Цель исследования – оценить эффективность NAT-скрининга инфекций у доноров крови Казахстана.

**Материал и методы.** Изучили статистические показатели обследования доноров крови в Республике Казахстан (РК) в 2012–2015 гг. Данные обработаны с использованием дескриптивных статистик при уровне значимости  $p < 0,01$ .

**Результаты.** В 2015 г. обследовано на 2,3% доноров больше, чем в 2012 г. Количество отводов из-за положительного результата скрининга серологических маркеров сократилось на 15,2%, а доля таких доноров – на 17,3% ( $p < 0,01$ ; отношение шансов (ОШ) = 0,83; доверительный интервал (ДИ) 95% – от 0,72 до 0,95;  $\chi^2 = 6,85$ ), что связано как с работой

**Для корреспонденции:** Савчук Татьяна Николаевна, рук. республиканской референс-лаборатории службы крови «Научно-производственный центр трансфузиологии» Минздравсоцразвития Республики Казахстан; e-mail: [omninpct16@mail.ru](mailto:omninpct16@mail.ru), [tanyusha\\_astana@mail.ru](mailto:tanyusha_astana@mail.ru)

Таблица 1

**Охват доноров двухэтапным скринингом в Республике Казахстан**

Показатель	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Обследовано доноров на 1-м этапе (ИХЛА/ИФА-скрининг)	302 163	303 561	312 510	309 181
Выявлено инфекций по результатам 1-го этапа, <i>n</i> (%)	12558 (4,16)	11264 (3,71)	11191 (3,58)	10652 (3,44)
Количество доноров, подлежащих тестированию на втором этапе методом ПЦР	289 605	292 297	301 319	298 529
Количество доноров, протестированных методом ПЦР	233 499	284 799	301 319	298 225
Доля доноров, обследованных методом ПЦР, %	80,6	97,4	100	99,9

по рекрутированию здоровых доноров, так и с повышением специфичности серологической диагностики. В 2014 г. удалось достичь 100% NAT-скрининга донаций, в 2015 г. из-за единичного отказа оборудования в Актау 304 образца донорской крови (0,1%) не прошли NAT-тестирование.

Большую и возрастающую часть NAT-скрининга проводят на автоматизированных системах (табл. 2). В 2015 г. доля таких исследований увеличилась на 24% по сравнению с 2012 г. ( $p < 0,01$ ; ОШ = 4,43; ДИ 95% – от 1,82 до 10,08;  $\chi^2 = 12,05$ ).

Согласно действующим правилам контроля качества и безопасности донорской крови и ее компонентов, разрешается проведение ПЦР-скрининга с применением пулирования по 6 образцов проб крови доноров в один пул [6]. В связи с этим количество выполненных ПЦР-исследований меньше, чем обследованных лиц (табл. 3). Благодаря расширению автоматизации затраты реагентов с учетом контрольных постановок, перестановок по причинам положительных и невалидных пулов сократились в 2012–2015 гг. с 0,52 до 0,32 теста на 1 донора.

В 2015 г. количество отводов из-за положительного результата NAT-скрининга увеличилось на 65,5%, а доля таких доноров – на 66,7% ( $p < 0,01$ ; ОШ = 1,68, ДИ 95% – от 1,21 до 2,32;  $\chi^2 = 9,94$ ) (табл. 4).

Все эти доноры имели отрицательный результат в серологическом тестировании.

В 2012–2013 гг. на территории РК зарегистрирована

Таблица 2

**Использование автоматизации в NAT-скрининге доноров крови в РК**

Показатель	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Доля скрининга образцов донорской крови методом ПЦР на автоматических системах закрытого типа, %	75	86	88	93
Доля скрининга образцов донорской крови методом ПЦР на автоматических системах открытого типа, %	7	1	0	0
Доля скрининга образцов донорской крови методом ПЦР с ручной пробоподготовкой, %	19	13	12	7

Таблица 3

**Количество и результаты ПЦР-исследований и затраты на реагенты**

Показатель	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Количество доноров, подлежащих тестированию на втором этапе методом ПЦР	289 605	292 297	301 319	298 225
Всего проведено исследований	149 235	92 645	95 577	96 100
Выявлено инфекций по результатам второго этапа, <i>n</i> (%)	185 (0,06)	201 (0,07)	267 (0,09)	306 (0,10)

Таблица 4

**Результаты дискриминаторного теста**

Вирус	2014 г.		2015 г.	
	абс.	%	абс.	%
ВИЧ	2	0,8	18	5,9
ВГВ	182	73,4	204	66,7
ВГС	60	24,2	84	27,4
Не определен	4	1,6	0	0

первая версия мультиплексного теста (Taq Screen MPX v 1.0), которая при положительном результате не указывает конкретно вирус. Для дифференцировки возбудителя требовалось проведение дискриминаторного тестирования. В региональных центрах крови не было оборудования для проведения дополнительного тестирования. Компоненты крови, заготовленные от ПЦР MPX-положительных доноров, браковали.

В 2014 г. начался переход центров крови на работу со 2-й версией мультиплексного теста (TaqScreen MPX v 2.0), с помощью которой исследовано 248 образцов, положительных в мультиплексном тесте. В 2015 г. обследованы все 306 образцов, без неопределенных результатов дискриминантного теста.

Для оценки эффективности NAT-тестирования донорской крови определяют показатель NAT yield («продуктивность»). По данным всемирного исследования, количество серологически отрицательных NAT-положительных образцов на 1 млн доноров составляет: для ВИЧ – 1,93; для ВГВ – 8,50; для ВГС – 1,86 [7]. Этот показатель весьма вариативен и, например, в некоторых больницах Индии достигает 1,5% [8].

Продуктивность NAT в Казахстане (табл. 5) существенно превышает среднемировые значения.

**Заключение.** Внедрение NAT-скрининга донорской крови позволило предотвратить переливание инфицированной крови: ВИЧ – 1 случай на 16 568 – 150 660 донаций; ВГВ – 1

Таблица 5

**Количество донаций, среди которых NAT предотвратил 1 случай переливания инфицированной крови**

Вирус	2014 г.	2015 г.
ВИЧ	150 660	16 568
ВГВ	1 656	1 462
ВГВ	5 022	3 550

случай на 1462 – 1656 донаций; ВГС – 1 случай на 3550 – 5022 донаций.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 7–8 см. REFERENCES)

1. Жибурт Е.Б. *Трансфузиология*. СПб.: Питер; 2002.
2. Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Жибурт Е.Б. Донорство крови и жизнь. Корреляции. *Трансфузиология*. 2013; 14 (4): 24–8.
3. Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Магзумова Р.З., Шестаков Е.А., Жибурт Е.Б. Эволюция структуры доноров и донаций крови и ее компонентов в Республике Казахстан. *Вестник Национального медико-хирургического центра имени Н.И. Пирогова*. 2013; 8 (4): 59–61.
4. Скорикова С.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Жибурт Е.Б. Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови г. Астаны. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (1): 38–40.
5. Буркитбаев Ж.К., Скорикова С.В., Абдрахманова С.А., Жибурт Е.Б. Основные показатели развития донорства крови и ее компонентов в Республике Казахстан. *Журнал службы крови (Казахстан)*. 2014; (2): 91–7.
6. Приказ исполняющего обязанности Министра здравоохранения Республики Казахстан № 684 от 10.11.2009 «Об утверждении Правил контроля качества и безопасности донорской крови и ее компонентов». Астана; 2009.

#### REFERENCES

1. Zhiburt E.B. *Transfusion [Transfuziologiya]*. St. Petersburg: Piter; 2002. (in Russian)
2. Skorikova S.V., Burkitbaev Zh.K., Zhiburt E.B. Blood donation and life. Correlations. *Transfuziologiya*. 2013; 14 (4): 24–8. (in Russian)
3. Skorikova S.V., Burkitbaev Zh.K., Magzumova R.Z., Shestakov E.A., Zhiburt E.B. The evolution of the structure of donors and donations of blood and blood components in the Republic of Kazakhstan. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra imeni N.I. Pirogova*. 2013; 8 (4): 59–61. (in Russian)
4. Skorikova S.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Zhiburt E.B. The prevalence of HIV, HCV, HBV infections in blood donors in Astana. *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (1): 38–40. (in Russian)
5. Burkitbaev Zh.K., Skorikova S.V., Abdрахmanova S.A., Zhiburt E.B. Key indicators of blood donation and its components in the Republic of Kazakhstan. *Zhurnal sluzhby krovi (Kazakhstan)*. 2014; (2): 91–7. (in Russian)
6. Order of the Acting Minister of Health of the Republic of Kazakhstan № 684 of 10.11.2009 “On Approval of the Rules of quality control and safety of donor blood and its components.” Astana; 2009. (in Russian)
7. Roth W.K., Busch M.P., Schuller A., Ismay S., Cheng A., Seed C.R. et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang.* 2012; 102 (1): 82–90.
8. Naidu N.K., Bharucha Z.S., Sonawane V., Ahmed I. Nucleic acid testing: Is it the only answer for safe blood in India. *Asian J. Transfus. Sci.* 2016; 10 (1): 79–83.

Поступила 11.08.16

Принята к печати 29.11.16

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.419-006-036.12-07:616.155.2-008.1

Столяр М.А.<sup>1,3</sup>, Ивашин Д.С.<sup>2</sup>, Ольховский И.А.<sup>1,2</sup>

### К ВОПРОСУ ВЫБОРА АНТИКОАГУЛЯНТОВ ПРИ АДФ-ИНДУЦИРОВАННОМ ИМПЕДАНСНОМ ТЕСТЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

<sup>1</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, Красноярск;

<sup>2</sup>ФГБУН «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 660041, Красноярск, Россия

Проведена оценка влияния антикоагулянтов, используемых при взятии венозной крови, на агрегацию тромбоцитов и эффект ацетилсалициловой кислоты (АСК) *in vitro* у 111 пациентов с подозрением на хронические миелопролиферативные опухоли и 16 здоровых добровольцев. Использовали вакутейнеры (Becton Dickinson) с цитратом 3,2%, с гепарином (Becton Dickinson) и системы S-Monovette (Sarstedt AG & Co) с рекомбинантным гирудином. Исследование агрегации проводили методом импеданса в цельной крови до и после предварительной инкубации проб крови с АСК в концентрации 0,1 мМ, индукцию осуществляли АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Показано, что АДФ-индуцированная амплитуда агрегации при использовании гепарина и гирудина значительно выше по сравнению с ее уровнем в пробах цитратной крови. При этом АСК парадоксально увеличивает амплитуду агрегации в пробах с гепарином, но не в пробах с цитратом или гирудином. Использование гирудина позволяет оценивать влияние АСК как на агрегационную, так и на дезагрегационную составляющую тромбоцитарных функций при эритро- и тромбоцитозах и может быть рекомендовано как предпочтительное при тестировании индивидуальной чувствительности пациентов к АСК.

Ключевые слова: антикоагулянты; агрегация тромбоцитов; импеданс; хронические миелоидные опухоли.

Для цитирования: Столяр М.А., Ивашин Д.С., Ольховский И.А. К вопросу выбора антикоагулянтов при АДФ-индуцированном импедансном тесте агрегации тромбоцитов у пациентов с хроническими миелопролиферативными опухолями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (3): 156-160. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-156-160>

Для корреспонденции: Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, доц., дир. Красноярского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, ст. науч. сотр. ФГБУН «Красноярский научный Центр СО РАН», 660036, Красноярск; e-mail: [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

Stolyar M.A.<sup>1,3</sup>, Ivashin D.S.<sup>2</sup>, Olkhovsky I.A.<sup>1,2</sup>

ON THE ISSUE OF SELECTION OF COAGULANTS UNDER ADP-INDUCED IMPEDANCE TEST OF AGGREGATION OF THROMBOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELO-PROLIFERATIVE TUMORS

<sup>1</sup>The Krasnoyarskii` branch of the hematological center of Minzdrav of Russia, 660036 Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup>The Krasnoyarskii` research center of the Siberian branch of the Russian academy of sciences, 660036 Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup>The Siberian federal university, 660041 Krasnoyarsk, Russia

*The evaluation was implemented concerning impact of anticoagulants used during venous blood sampling, on aggregation of thrombocytes and acetylsalicylic acid effect in vitro in 111 patients with suspicion to chronic myelo-proliferative tumors and 16 healthy volunteers. The vacutainers (Becton Dickinson) with 3.2% citrate, with heparin (Becton Dickinson) and S-Monovette system (Sarstedt AG & Co) with recombinant hirudin were applied. The analysis of aggregation was implemented using the technique of impedance in whole blood before and after preliminary incubation of blood samples with acetylsalicylic acid effect in 0.1 mM concentration. The induction was implemented by ATP in final concentration of 5 mkM. It is demonstrated that ATP-induced amplitude of aggregation under application of heparin and hirudin is significantly higher in comparison with its level in samples of citrate blood. At that, acetylsalicylic acid effect paradoxically increases amplitude of aggregation in samples with heparin but not in samples with citrate or hirudin. The application of hirudin permits evaluating impact of acetylsalicylic acid effect both at aggregation and disaggregation component of thrombocyte functions under erythrocytosis and thrombocytosis and can be recommended as a preferable approach in testing individual sensitivity of patients to acetylsalicylic acid effect.*

**Key words:** anticoagulant; aggregation of thrombocytes; impedance; chronic myeloid tumors

**For citation:** Stolyar M.A., Ivashin D.S., Olkhovsky I.A. On the issue of selection of coagulants under ADP-induced impedance test of aggregation of thrombocytes in patients with chronic myelo-proliferative tumors. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 156-160. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-156-160>*

**For correspondence:** Olkhovsky I.A., candidate of medical sciences, associate professor, director of the Krasnoyarskii` branch of the hematological center, senior researcher of Krasnoyarskii` research center of the Siberian branch of the Russian academy of sciences. e-mail: [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study was carried out within the framework of budget programs of The Krasnoyarskii` branch of the hematological center and The Siberian federal university; Additional financial support was received from regional public organization "The Krasnoyarskaia kraevaia association of medical laboratory diagnostic"

Received 29.07.2016  
Accepted 26.09.2016

**Введение.** Тромботические и геморрагические осложнения – наиболее распространенные клинические проявления и причины смерти у пациентов с Rh-негативными хроническими миелопролиферативными опухолями (ХМО). Снижение гематокрита, повышение вязкости крови и агрегационной активности тромбоцитов в патогенезе ХМО во многом обуславливается соматическими мутациями в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR* клеток миелоидного ряда [1–2]. Ацетилсалициловая кислота (АСК) наряду с циторедуктивной терапией признана эффективным средством профилактики сосудистых тромбозов [1–4]. Вместе с тем высокая частота развития синдрома Виллебранда при клональных тромбоцитозах приводит к кровоточивости и служит противопоказанием к приему АСК [5]. Кроме того, среди пациентов довольно часто наблюдается резистентность к действию АСК, что обуславливает актуальность использования индивидуальных тестов оценки чувствительности к дезагрегантам. Однако серьезной проблемой использования тестов агрегации тромбоцитов *in vitro* оказываются методические вопросы стандартизации и недостаточная корреляция с клиническими проявлениями нарушения гемостаза [6,7]. Ранее нами была показана высокая межиндивидуальная вариация результатов тестирования, ограничивающая использование референтных границ в оценке результатов импедансной агрегометрии [8]. По данным разных исследований, выявление сниженной или повышенной чувствительности к АСК также широко варьирует и зависит как от используемого метода оценки функций тромбоцитов, так и от выбранного при взятии крови антикоагулянта [9–10].

Получение цельной крови для исследования гемостаза традиционно осуществляют в пробирки с цитратом натрия. Однако известно, что цитрат связывает ионы кальция, необходимые для полноценной активации тромбоцитов, а также способен индуцировать секрецию гранул и формирование

тромбоцитарных микровезикул. В ряде исследований у здоровых доноров и у пациентов с сердечно-сосудистой патологией на терапии АСК проводили сравнение результатов агрегометрии в пробах с гепарином или гирудином в качестве альтернативного антикоагулянта при взятии проб крови [11–12]. Выявлено, что нефракционированный и низкомолекулярный гепарин в отличие от гирудина стимулируют агрегацию в импедансометрическом тесте в пробах цельной крови у добровольцев как до, так и после приема АСК [13]. Гиперагрегационный феномен авторы связывают с активацией гепарином  $\alpha IIb\beta 3$  тромбоцитарных рецепторов [14]. Также отмечено, что агрегационный эффект гепарина усиливается, если пациент накануне исследования принимал АСК [15]. Данные о влиянии гепарина и АСК *in vivo* на тромбоцитарный гемостаз в доступной литературе отсутствуют. Очевидно, недостаточное изучение преаналитических аспектов агрегометрии – одно из основных препятствий стандартизации метода и его востребованности в клинической практике.

Производители импедансометрических агрегометров Multiplate рекомендуют использовать при взятии крови в качестве антикоагулянта наряду с цитратом натрия также и гирудин [16]. Вместе с тем однозначных клинических рекомендаций по выбору антикоагулянтов для импедансометрического определения аспиринорезистентности до сих пор не существует.

Цель работы – сравнительное исследование влияния цитрата, гепарина и гирудина на импедансометрическую оценку агрегации тромбоцитов и эффект АСК *in vitro* у пациентов с эритро- и тромбоцитозами.

**Материал и методы.** В исследование включены данные анализа агрегации тромбоцитов 111 пациентов, направленных в лабораторию врачами-гематологами Красноярска с подозрением на ХМО, 16 здоровых добровольцев составили группу контроля.

Таблица 1 грамм представлены на рисунке.

**Характеристика обследованных пациентов, Ме (C<sub>25</sub>–C<sub>75</sub>)**

Показатель	Пациенты с ХМО (мутации в генах <i>JAK2</i> или <i>CALR</i> )		Пациенты без онкогенных мутаций в генах <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i>	
	гепарин	гирудин	гепарин	гирудин
<i>n</i>	25	21	40	25
Мужчины/женщины	9/16	7/14	23/17	20/5
Возраст, годы	64 (55–68)	53 (43–66)	49 (34–60)	44 (30–55)
Тромбоциты, ·10 <sup>9</sup> /л	368 (267–724)	682 (367–862)	238 (167–315)	287 (217–483)*
Эритроциты, ·10 <sup>12</sup> /л	4,87 (4,25–6,22)	5,44 (5,13–6,43)	5,46 (4,59–5,93)	5,41 (5,05–5,75)
Лейкоциты, ·10 <sup>9</sup> /л	8,02 (5,63–10,65)	10,59 (7,05–16,37)	8,11 (6,33–9,91)	9,9 (7,37–12,87)
Гематокрит, %	42,5 (38,3–47,2)	43,9 (42,1–49,9)	46,6 (36,8–49,1)	45,4 (42,8–48,3)

Примечание. \* – *p* = 0,004.

Венозную кровь у 65 пациентов отбирали параллельно в вакутейнеры с цитратом натрия 3,2% и гепарином (BD Vacutainer), а у 46 пациентов – в вакутейнеры с цитратом натрия 3,2% и S-Monovette с рекомбинантным гирудином (г-гирудин, Sarstedt AG & Co). Для проведения гематологических и молекулярно-генетических исследований у всех пациентов дополнительно брали кровь в вакутейнеры с ЭДТА. Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1. Анализ функций тромбоцитов проводили на агрегометре Хронолог-700 (Chrono-Log, США) методом импеданса в цельной крови не позднее чем через 4 ч после взятия крови. Индукция агрегации осуществлялась 5 мкМ АДФ (НПО «Ренам», Россия). Оценка динамики агрегации проводили в пробах до и после предварительной (15 мин) инкубации цельной крови с АСК в конечной концентрации 0,1 мМ. Тест с АСК был предложен ранее для оценки ЦОГ-независимых механизмов агрегации тромбоцитов [17]. Интенсивность агрегации тромбоцитов оценивали по параметру амплитуды (Ом) – максимального подъема агрегационной кривой. Изменение амплитуды и лаг-фазы агрегации для гепарина и гирудина по сравнению с цитратом вычисляли как разницу между параметром после инкубации и параметром до инкубации с АСК. Примеры полученных агрегато-

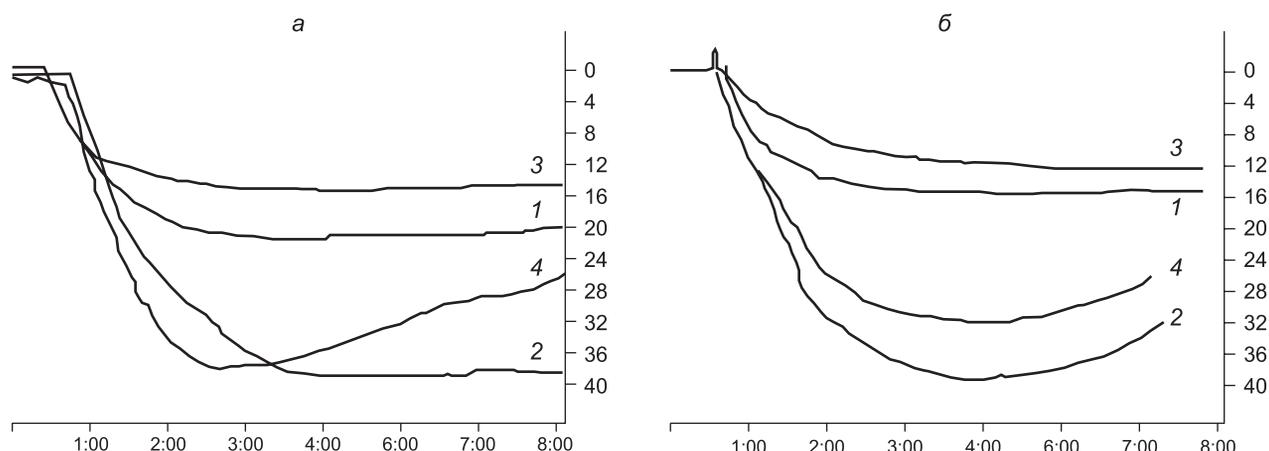
грамм представлены на рисунке. Анализ параметров гемограммы осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе SYSMEX XT-2000i (Sysmex согр., Япония). Выявление соматических мутаций в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL* проводили методом ПЦР, как было описано ранее [18]. В целом среди обследованных методом агрегометрии пациентов соматическая мутация V617F в гене *JAK2* обнаружена у 37 пациентов, мутации в гене *CALR* были у 9 пациентов, мутаций в гене *MPL* среди включенных в исследование пациентов не выявлено.

Для проведения статистической обработки использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0. Статистический анализ данных между связанными выборками проводили с использованием критерия Вилкоксона. Описательная статистика представлена в виде значений медианы (Ме), верхнего и нижнего квартилей (C<sub>25</sub>–C<sub>75</sub>).

**Результаты и обсуждение.** Из табл. 1 видно, что группа пациентов с ХМО с соматическими мутациями в генах *JAK2* или *CALR* отличалась от группы лиц, не имеющих данных мутаций, более высоким значением количества тромбоцитов. При сравнении показателей гемограммы пациентов в образцах крови с разными антикоагулянтами статистически значимых отличий не обнаружено.

Оценка влияния отдельных антикоагулянтов на агрегацию показала, что на фоне и гепарина и гирудина наблюдается значительно более выраженный агрегационный ответ на АДФ по сравнению с пробами крови, взятыми в вакутейнеры с цитратом как у пациентов с подозрением на ХМО, так и в группе добровольцев (табл. 2, 3). Это согласуется с результатами ряда исследований, проведенными у пациентов с другими заболеваниями [11, 12].

Вместе с тем при использовании в качестве антикоагулянта гепарина повышение амплитуды агрегации наблюдалось в



Импедансометрические агрегатограммы с различными антикоагулянтами.

*а* – с цитратом и гирудином. 1 – цитрат; 2 – гирудин; 3 – цитрат + АСК; 4 – гирудин + АСК. После инкубации с АСК в пробе с гирудином у данного пациента наблюдают дезагрегацию.

*б* – с цитратом и гепарином. 1 – цитрат; 2 – гепарин; 3 – цитрат + АСК; 4 – гепарин + АСК. В пробе с гепарином у данного пациента наблюдают дезагрегацию.

По оси абсцисс – время (мин) после внесения АДФ, по оси ординат – сопротивление электрическому току (Ом).

Таблица 2

**Агрегация тромбоцитов в пробах цельной крови у обследованных пациентов при использовании цитрата и гепарина**

Показатель	Контроль			Пациенты с ХМО с соматическими мутациями (JAK2, CALR)			Пациенты без мутаций в генах		
	цитрат	гепарин	Δ	цитрат	гепарин	Δ	цитрат	гепарин	Δ
До инкубации проб с АСК									
Амплитуда, Ом	6,5 (4–10)	15 (10,5–16,5)	6 (4,5–9,5)	12 (3,5–15)	23 (17–30)*	12,5 (4–20,5)	10 (3,5–14,5)	20,5 (12,5–27)*	12 (8–18)*
Частота дезагрегации, %	0	0		4	0		2,5	2,5	
После инкубации проб с АСК									
Амплитуда, Ом	6 (4–7)	14,5 (11–19)	11, (7–12,)	3 (0,5–16)	24 (13–29,5)*	12,5 (10–22,5)	8 (4–14)	23 (16–30)*	13 (9–18)*
Частота дезагрегации, %	0	0		4	0		0	0	

Примечание. \* – отличия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3

**Агрегация тромбоцитов цельной крови у обследованных пациентов при использовании цитрата и гирудина**

Показатель	Контроль			Пациенты с ХМО с соматическими мутациями (JAK2, CALR)			Пациенты без мутаций в генах		
	цитрат	гирудин	Δ	цитрат	гирудин	Δ	цитрат	гирудин	Δ
До инкубации проб с АСК									
Амплитуда, Ом	6,5 (4–10)	12 (10–15)	6 (3–9)	7 (2–9)	23 (15–29)*	17 (8–20)*	6 (3–11)	17 (11–24)	10 (8–15)*
Частота дезагрегации, %	0	0		0	28,6		0	14,3	
После инкубации проб с АСК									
Амплитуда, Ом	6 (4–7)	9 (8–11)	4 (3–5)	8 (0–11)	24 (17,5–35)*	18 (11–22)*	5 (2–10)	18 (13–27)*	13 (9–16)*
Частота дезагрегации, %	0			9,5	23,8		0	19	

Примечание. \* – отличия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

равной степени как у пациентов с соматическими мутациями, так и без них. В то время как при использовании гирудина такой эффект в большей степени ( $p < 0,05$ ) был характерен для пациентов с онкогенными мутациями. Однако ни один из использованных антикоагулянтов не оказывал влияния на выраженность эффекта АСК в сравниваемых группах.

Вместе с тем добавление АСК к пробам с гепарином часто вызывает «парадоксальное» увеличение амплитуды агрегации по сравнению с действием АСК в образцах цитратной крови, что нашло отражение в средних значениях амплитуды агрегации на фоне АСК, представленных в табл. 2. Данный феномен не был ранее описан в литературе, однако существуют указания на то, что ингибиторы ЦОГ-1 не способны блокировать агрегацию в гепаринизированной крови [12].

Представляет интерес оценка феномена дезагрегационного эффекта АДФ среди обследованных групп. Установлено, что при использовании гирудина в качестве антикоагулянта случаи дезагрегации на стандартной концентрации АДФ регистрируют в 3,5 раза чаще, чем при использовании цитрата (см. табл. 3). Механизмы дезагрегационного эффекта АДФ у пациентов с ХМО требуют дополнительного исследования. Мы предполагаем, что выраженность АДФ-деагрегации при инкубации проб с АСК может служить не менее информативным показателем чувствительности к АСК, чем амплитуда максимальной агрегации [20].

Гепарин не рекомендован как антикоагулянт выбора ни для одного из известных методов агрегометрии. В нашем исследовании показано парадоксальное активирующее действие гепарина на агрегацию тромбоцитов в цельной крови после инкубации с АСК. При этом ранее нами также описан

гиперагрегационный эффект АСК на плазменный гемостаз в тесте тромбодинамики [21]. Возможно, данный феномен связан с ацетилированием плазменных белков, участвующих в регуляции функций тромбин-антитромбинового комплекса, и его также следует учитывать в итоговой оценке лабораторной аспиринорезистентности. Клиническое значение гиперагрегационного эффекта АСК, выявленного в тестах *in vitro*, требует дополнительного изучения.

**Заключение.** Использование в качестве антикоагулянтов гепарина и гирудина при импедансной агрегометрии проб цельной крови приводит к более высоким значениям АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. При этом абсолютные значения амплитуды исходной агрегации и значения эффекта АСК статистически не отличаются в группах пациентов с клональными и реактивными миелолифолиферативными процессами. Обнаруженный гиперагрегационный эффект гепарина, усиливающийся АСК в тестах *in vitro*, требует дополнительного изучения и оценки возможных клинических рисков совместного использования гепарина с ингибиторами ЦОГ.

Преимущество использования гирудина в качестве антикоагулянта позволяет оценивать влияние АСК как на агрегационную, так и на дезагрегационную составляющие тромбоцитарных функций и может быть рекомендовано с целью тестирования индивидуальной чувствительности к АСК.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность представительству фирмы Sarstedt AG & Co за любезно предоставленные разовые системы взятия венозной крови – S-Monovette® с рекомбинантным гирудином, а также врачам-гематологам М.А. Михалеву и Е.В. Васильеву за подбор пациентов с ХМО.

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

**Финансирование.** Настоящее исследование проведено в рамках бюджетных программ НИР ФГБУН КНЦ СО РАН и ФГАОУ ВО СФУ. Дополнительная финансовая поддержка была получена от региональной общественной организации РОО «Красноярская краевая ассоциация медицинской лабораторий диагностики».

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–7, 9–16, 19  
см. REFERENCES)

8. Столяр М.А., Ольховский И.А. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (6): 359–63.
17. Ольховский И.А., Столяр М.А. Особенности агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене JAK2: гендерные отличия и эффект ацетилсалициловой кислоты. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59 (1): 11–4.
18. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Виноградова Е.Ю. и др. Определение мутации в гене кальретикулина у пациентов с подозрением на хронические миелопролиферативные неоплазии. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59 (3): 12–5.
20. Ивашин Д.С., Столяр М.А., Ольховский И.А. Количественная оценка величины АДФ-деагрегации тромбоцитов в импедансометрическом аспириновом тесте у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями. В кн.: *Материалы VII Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии*. М.; 2015: 175–6.
21. Столяр М.А., Ольховский И.А. Исследование влияния аспирина на параметры роста фибринового сгустка в тесте тромбодинамики. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59 (S1): 122.

## REFERENCES

1. Manoharan A., Gemmell R., Brighton T., Dunkley S., Lopez K., Kyle P. Thrombosis and bleeding in myeloproliferative disorders: identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies. *Br. J. Haematol.* 1999; 105 (3): 618–25.
2. Landolfi R., Gennaro L.D. Pathophysiology of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011; 96 (2): 183–6.
3. Landolfi R., Marchioli R., Kutti J., Gisslinger H., Tognoni G., Patrono C. et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350 (2): 114–24.
4. De Stefano V., Za T., Rossi E., Vannucchi A.M., Ruggeri M., Elli E. et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008; 93 (3): 372–80.
5. Tiede A., Rand J.H., Budde U., Ganser A., Federici A.B. How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 2010; 117 (25): 6777–85.
6. Hayward C.P., Pai M., Liu Y., Moffat K.A., Seecharan J., Webert K.E. et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (4): 676–84.
7. Velik-Salchner C., Maier S., Innerhofer P., Streif W., Klingler A.,

- Kolbitsch C. et al. Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. *Anesth. Analg.* 2008; 107 (6): 1798–806.
8. Stolyar M.A., Ol'khovskiy I.A. On issue of detection of limits of normal reaction of thrombocytes in testing of impedance aggregometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (6): 359–63. (in Russian)
9. Gorog D.A., Sweeny J.M., Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs—fact or artifact? *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6 (5): 365–73.
10. Hankey G., Eikelboom J. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006; 367: 606–17.
11. Kaiser A.F., Neubauer H., Franken C.C., Krüger J.C., Mügge A., Meves S.H. Which is the best anticoagulant for whole blood aggregometry platelet function testing? Comparison of six anticoagulants and diverse storage conditions. *Platelets*. 2012; 23 (5): 359–67.
12. Wallén N.H., Ladjevardi M., Albert J., Bröijersén A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb. Res.* 1997; 87 (1): 151–7.
13. Chen J.H., Karlberg K.E., Sylvén C. Heparin and low molecular weight heparin but not hirudin stimulate platelet aggregation in whole blood from acetylsalicylic acid treated healthy volunteers. *Thromb. Res.* 1991; 63 (3): 319–29.
14. Gao C., Boylan B., Fang J., Wilcox D.A., Newman D.K., Newman P.J. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated outside-in signaling. *Blood*. 2011; 117 (18): 4946–52.
15. Salzman E.W., Rosenberg R.D., Smith M.H., Lindon J.N., Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 1980; 65 (1): 64–73.
16. Johnston L.R., Larsen P.D., La Flamme A.C., Harding S.A. Methodological considerations for the assessment of ADP induced platelet aggregation using the Multiplate® analyser. *Platelets*. 2013; 24 (4): 303–7.
17. Ol'khovskiy I.A., Stolyar M.A. Features platelet aggregation in patients with JAK-2: gender differences and effect of aspirin. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 59 (1): 11–4. (in Russian)
18. Ol'khovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasil'ev E.V., Vinogradova E.Yu. et al. Identification of the calreticulin mutations at patients with suspected to chronic myeloproliferative neoplasms. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 59 (3): 12–5. (in Russian)
19. Glusa E. Platelet aggregation in recombinant-hirudin-anticoagulated blood. *Haemostasis*. 1991; 21 (Suppl. 1): 116–20.
20. Ivashin D.S., Stolyar M.A., Ol'khovskiy I.A. A quantitative estimate of the ADP-platelet disaggregation in impedance aspirin test in patients with myeloproliferative diseases. In: *Materials of the VII Russian Conference on Clinical Hemostasis and Hemorheology in Cardiovascular Surgery [Materialy VII Vserossiyskoy konferentsii po klinicheskoy gemostazologii i gemoreologii v serdechno-sosudistoy khirurgii]*. Moscow; 2015: 175–6. (in Russian)
21. Stolyar M.A., Ol'khovskiy I.A. Investigation of the aspirin effect on the growth parameters of fibrin clot in the trombodinamics test. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 59 (S1): 122. (in Russian)

Поступила 29.07.16

Принята к печати 26.09.16

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.36-092:612.017.1

Шевченко О.П.<sup>1,2</sup>, Курабекова Р.М.<sup>1</sup>, Цирульникова О.М.<sup>1,2</sup>

### РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА 1 ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва;

<sup>2</sup>Кафедра трансплантологии и искусственных органов ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», 119991, Москва, Россия

*В обзоре представлен анализ литературы, посвященной роли трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) при различных заболеваниях печени. Проанализированы 46 источников литературы, более половины из которых опубликованы за последние пять лет. При заболеваниях печени TGF-β1 играет ключевую роль не только в развитии фиброза, но и в поддержании иммунного гомеостаза. Хроническое повреждение печени приводит к активации звездчатых клеток печени и усилению ими продукции различных цитокинов, в том числе TGF-β1, который в свою очередь стимулирует звездчатые клетки и гепатоциты, приобретающие свойства миофибробластов и продуцирующие белки экстрацеллюлярного матрикса, что в результате ведет к развитию фиброза. TGF-β1 обладает также противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами: участвует в подавлении дифференцировки Th клеток 1-го и 2-го типа и таким образом в контроле воспалительных процессов. Клинические данные о роли TGF-β1 при различных заболеваниях печени во многом противоречивы, что, вероятно, связано с его дозозависимым плейотропным действием. Величина уровня TGF-β1 в крови может отражать сложный баланс между фиброгенным и иммуносупрессивным эффектами цитокина. Определение содержания цитокина в крови может иметь диагностическое и прогностическое значение для оценки состояния печени.*

**Ключевые слова:** заболевания печени; TGF-β1; биомаркеры; цитокин.

**Для цитирования:** Шевченко О.П., Курабекова Р.М., Цирульникова О.М. Роль трансформирующего фактора роста бета 1 при заболеваниях печени. Клиническая лабораторная диагностика 2017; 62 (3): 161-164. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-161-164>

Shevchenko O.P.<sup>1,2</sup>, Kurabekova R.M.<sup>1</sup>, Tsiurnikova O.M.<sup>1,2</sup>

#### THE ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 UNDER DISEASES OF LIVER

<sup>1</sup>The academician V.I. Shumakov Federal research center of transplantology and artificial organs of Minzdrav of Russia, 123182 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

*The review present analysis of publications considering role of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) under various diseases of liver. The analysis was applied to 46 published articles more than a half of which were published in last five years. Under diseases of liver, TGF-β1 plays a key role both in development of fibrosis and in maintenance of immune homeostasis. The chronic damage of liver results in activation of liver stellated cells and intensification of their production of various cytokines, including TGF-β1 that stimulates stellated cells and hepatocytes acquiring characteristics of miofibroblasts and producing proteins of extracellular matrix that results in development of fibrosis. TGF-β1 also has anti-inflammatory and immune suppressive characteristics manifested in suppression of differentiation of Th cells type I and II thereby controlling inflammatory processes. The clinical data of role of TGF-β1 under various diseases of liver in many ways are contradictory that probably related to its dosage-dependent pleiotropic effect. The value of level of TGF-β1 in blood can reflect complicated balance between fibrinogen and immune suppressive effects of cytokine. The detection of content of cytokine in blood can have diagnostic and prognostic significance in evaluation of condition of liver.*

**Key words:** diseases of liver; TGF-β1; biomarker; cytokine.

**For citation:** Shevchenko O.P., Kurabekova R.M., Tsiurnikova O.M. The role of transforming growth factor beta 1 under diseases of liver. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 161-164. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-161-164>

**For correspondence:** Shevchenko O.P., doctor of medical sciences, professor. e-mail: [transplant2009@mail.ru](mailto:transplant2009@mail.ru)

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

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

Received 17.10.2016  
Accepted 01.11.2016

**Введение.** Хронические заболевания печени различной этиологии, приводящие к поражению клеток печени, воспалению и в итоге к стеатозу, циррозу – конечной стадии печеночной недостаточности, не поддаются в настоящее время эффективной терапии и служат показанием к трансплантации печени. Для определения показаний к трансплантации проводят диагностику фиброза печени, золотым стандартом которой остается биопсия – инвазивная процедура, представляющая значительный риск для пациентов. Исследование ключевых молекул, регулирующих развитие фиброза, и разработка неинвазивных методов с использованием новых прогностических и диагностических лабораторных биомаркеров – актуальная задача лабораторной диагностики [1–4].

Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1) – клеточный медиатор, который оказывает разнонаправленное действие на пролиферацию и дифференцировку клеток и таким образом регулирует иммунный ответ, апоптоз, фиброгенез и канцерогенез в различных органах [5–7]. Показано, что уровень TGF- $\beta$ 1 изменяется при аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваниях, а также при фиброзе различных тканей и может иметь важное прогностическое и диагностическое значение [8–11]. Данные о роли TGF- $\beta$ 1 при заболеваниях печени противоречивы и не дают однозначного представления о том, какие процессы отражает уровень цитокина в крови. Его обычно рассматривают как индикатор развития фиброза печени, однако TGF- $\beta$ 1 также обладает противовоспалительным и иммуносупрессивным действием и может отражать развитие иммунных процессов в печени [12, 13].

TGF- $\beta$ 1 – представитель большого семейства цитокинов, которые синтезируются практически во всех клетках организма. У млекопитающих описано три изоформы TGF- $\beta$ : 1, 2 и 3, которые кодируются уникальными последовательностями на разных хромосомах. Биологические функции TGF- $\beta$  реализуются после связывания с рецепторами трех типов (TGF- $\beta$ RI, -II и -III), являющимися серин-тионинными киназами, активирующими различные сигнальные пути клетки. TGF- $\beta$  запускает апоптоз во многих типах клеток, блокируя переход клеточного цикла через фазу G1 [14].

TGF- $\beta$ 1 считают главным профиброгенным цитокином, который при повреждении ткани печени оказывает стимулирующий эффект на продукцию коллагена фибробластами и гепатоцитами [6, 7]. Все типы непаренхиматозных клеток печени способны экспрессировать TGF- $\beta$ 1, причем Купферовские и эндотелиальные клетки секретируют его на базовом уровне, а звездчатые клетки печени служат основным источником цитокина при воспалении и состояниях активации фиброгенеза [15, 16]. В условиях хронического повреждения ткани печени под действием различных стимулов звездчатые клетки печени активируются, что ведет к увеличению продукции различных цитокинов, в том числе и TGF- $\beta$ 1. Цитокин стимулирует активацию звездчатых клеток, приобретающих в результате свойства миофибробластов и в свою очередь производящих белки экстрацеллюлярного матрикса [17, 18].

TGF- $\beta$ 1 обладает также противовоспалительным и иммуносупрессивным действием и играет ключевую роль в развитии и регуляции иммунного ответа: нулевая мутация в гене TGF- $\beta$ 1 T-лимфоцитов мышей приводит к развитию тяжелого воспалительного процесса, мультиорганный инфильтрации лейкоцитами, продукции аутоантител и ранней гибели животного [19]. В иммунной системе цитокин продуцируют практически все типы лимфоцитов и клеток стромы, он оказывает на клетки плейотропный аутокринный и паракринный эффекты, направленность которых различна в тимусе и периферическом кровотоке. В экспериментах на мышах с полным дефицитом цитокина продемонстрировано, что в ти-

мусе TGF- $\beta$ 1 стимулирует дифференцировку CD8<sup>+</sup> Т-клеток и Т-клеток натуральных киллеров, но ингибирует развитие натуральных регуляторных (супрессорных) Т-клеток. На периферии TGF- $\beta$ 1 участвует в регуляции опосредованной Т-клетками аутоиммунной толерантности путем активной иммуносупрессии Th1- и Th2-клеток и, напротив, активации регуляторных Т-клеток и Th17-клеток [19–21]. Главная роль TGF- $\beta$ , синтезируемого Т-клетками и присутствующего в плазме крови, состоит в супрессии дифференцировки Th-клеток 1-го и 2-го типов и таким образом в контроле воспалительных процессов [22].

Уровень TGF- $\beta$ 1 в крови здоровых людей значительно варьирует: от 0,5 до 80 нг/мл, по данным разных авторов, не зависит от пола и зависит от возраста [8, 23–26]. Согласно данным Y. Okamoto и соавт. [24], уровень TGF- $\beta$ 1 обратно коррелирует с возрастом: в сыворотке здоровых детей до 14 лет уровень цитокина (61,7 $\pm$ 18,5 нг/мл) достоверно выше, чем у здоровых взрослых (40,3 $\pm$ 17,7 нг/мл).

При различных заболеваниях печени, включая гепатит, кистозный фиброз, цирроз и атрезию желчевыводящих путей, концентрация TGF- $\beta$ 1 изменяется в ткани печени и в крови [8, 23, 25, 27]. У детей с билиарной атрезией, фульминантным гепатитом и циррозом печени уровень TGF- $\beta$ 1 в плазме крови снижен [25, 28, 29] и, по данным J.N. Rosensweig [25], в среднем составляет 13 $\pm$ 2 нг/мл, в то время как у здоровых детей – 42 $\pm$ 6 нг/мл. У детей с хроническим гепатитом В наблюдали повышенный по сравнению с контролем уровень цитокина в сыворотке крови [30]. У взрослых пациентов уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови при таких заболеваниях печени, как гепатоцеллюлярная карцинома, гепатит В и С, цирроз печени, значительно выше (>61 нг/мл), чем у здоровых взрослых (14,4 $\pm$ 8,8 нг/мл) и может служить диагностическим маркером этих заболеваний [23].

Клинические данные о связи уровня TGF- $\beta$ 1 в крови и степени развития фиброза печеночной ткани несколько противоречивы. В работе S. Kanzler и соавт. [27] у взрослых пациентов с хроническим гепатитом С наблюдали высокие уровни цитокина как в ткани печени, так и в сыворотке крови, которые коррелировали со степенью развития фиброза печени. В других работах [25, 30] показано, что уровень цитокина в крови детей с билиарной атрезией, фульминантным гепатитом, циррозом печени и хроническим гепатитом В не коррелирует со степенью фиброза. С другой стороны, P. Valva и соавт. [8] показали наличие связи уровня TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови с выраженностью фиброза печени у детей и взрослых, но только в группе пациентов со средней степенью выраженности заболевания в отличие от пациентов со слабо или сильно выраженным фиброзом. Таким образом, уровень TGF- $\beta$ 1 в крови не всегда коррелирует с развитием фиброза печени и в зависимости от степени выраженности заболевания может быть как низким, так и высоким.

Трансплантация печени у детей с билиарной атрезией приводит к некоторому возрастанию уровня TGF- $\beta$ 1 в плазме крови с 12 $\pm$ 6 до 19 $\pm$ 12 нг/мл, который, однако, остается ниже такового у здоровых пациентов (28 $\pm$ 17 нг/мл) [29]. Показано, что уровень TGF- $\beta$ 1 в крови после трансплантации печени может зависеть от различных клинических параметров, таких как исходный диагноз, совместимость с донором, посттрансплантационные осложнения (отторжение, дисфункция трансплантата и инфекционные заболевания).

У реципиентов в возрасте от 2 до 25 лет через 1–17 лет после трансплантации более высокий уровень цитокина наблюдали при АВ0 несовместимой (7,4 $\pm$ 2,2 нг/мл) по сравнению с АВ0 совместимой трансплантацией (3,8 $\pm$ 2,2), а также у реципиентов, оперированных в связи с метаболическими заболеваниями печени, такими как ацидемия, тирозинемия, недостаточность аргиназы и др. (8,1 $\pm$ 2,8 нг/мл), по сравне-

нию с реципиентами, оперированными в связи с билиарной атрезией ( $4 \pm 1$  нг/мл) [31, 32]. Авторы полагают, что более высокий уровень цитокина может быть связан с риском развития фиброза и отторжения в дальнейшем.

В другой работе при исследовании 60 реципиентов печени в возрасте 1–17 лет, через 1–16 лет после трансплантации [33] наблюдали тенденцию к повышенному уровню TGF- $\beta$ 1 в крови реципиентов с хорошей функцией трансплантата ( $44,7 \pm 7,3$  нг/мл) по сравнению с таковым у пациентов с отторжением ( $32,7 \pm 3,3$  нг/мл) или в контрольной группе ( $36,3 \pm 4,8$  нг/мл). Несмотря на отсутствие достоверных отличий в уровне цитокина в указанных группах, авторы предполагают важную роль TGF- $\beta$ 1 в формировании иммунной толерантности трансплантата и рассматривают цитокин как биомаркер эффективности иммуносупрессивной терапии.

На уровень цитокина могут влиять вирусные и бактериальные инфекции: в одной из работ показано, что после трансплантации печени экспрессия цитокина в мононуклеарных клетках периферической крови выше у пациентов с активной цитомегаловирусной инфекцией по сравнению с таковыми без инфекции и здоровыми людьми [34]. Однако другим исследователям [35] не удалось обнаружить отличий в уровне экспрессии TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 лимфоцитами периферической крови после трансплантации печени у взрослых реципиентов с клинически манифестированной инфекцией и без таковой. Авторы считают, что уровень цитокина недостаточно специфичен для диагностики послеоперационных инфекционных осложнений.

Уровень TGF- $\beta$ 1 в крови реципиентов после трансплантации печени может также зависеть от вида иммуносупрессанта: уровень цитокина выше в крови пациентов, получавших ингибиторы кальциневрина (медиана  $152,5$  нг/мл), по сравнению с таковым у пациентов, получавших эверолимус, ингибитор пролиферации и синтеза ряда белков, в том числе TGF- $\beta$ 1 (медиана  $12,7$  нг/мл) [36]. Авторы рассматривают TGF- $\beta$ 1 как профиброгенный цитокин и полагают, что эверолимус снижает уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке и, вероятно, риск развития фиброза в трансплантированной печени. Однако статистически значимых отличий показателей эластограммы печени в двух группах не наблюдали, что не подтверждает связь уровня TGF- $\beta$ 1 с развитием фиброза, так как на показатель сывороточных цитокинов могли влиять и другие факторы.

В последние годы показано, что отличающийся от нормальных значений уровень цитокина может быть не только следствием заболевания, но и его причиной. Ген TGF- $\beta$ 1 обладает значительным полиморфизмом, который, предполагают, может служить причиной генетически детерминированной активности цитокина и его связи с различными заболеваниями [37–41]. Анализ связи полиморфизма гена TGF- $\beta$  у реципиентов печени показал предрасположенность определенного генотипа к развитию фиброза печени и почечной недостаточности [42, 43]. Отмечено, что высокопродуцирующий генотип TGF- $\beta$ 1 служит фактором риска развития аутоиммунного гепатита у детей [41], а в сочетании с другими цитокинами – хронической нефропатии трансплантата [44].

В работе D. Eurich и соавт. [43] у 192 пациентов после трансплантации печени были исследованы два типа полиморфизма и их связь с развитием фиброза печени. Показано, что замена на С-аллель в кодоне 25 была связана с фиброзом печени. С другой стороны, не удалось обнаружить связи полиморфизма гена TGF- $\beta$ 1 и острого отторжения или рецидивов заражения вирусом гепатита В у пациентов с трансплантацией печени в исследовании H. Xie и соавт. [45].

Возможно, клиническое значение может иметь не только полиморфизм отдельного гена TGF- $\beta$ 1, но и взаимодействие различных генов. Так, у пациентов с диабетом 1-го типа, являющимся многофакторным аутоиммунным заболеванием,

где важно взаимодействие и полиморфизм генов HLA и инсулина, также обнаружена взаимосвязь генов HLA и различных цитокинов, в частности TGF- $\beta$ 1 [46].

Несмотря на то что в настоящее время не представлено однозначных клинических доказательств связи уровня TGF- $\beta$ 1 в крови с развитием фиброза или инфекционным поражением печени, очевидно, что плейотропные эффекты цитокина дозозависимы и его концентрация в крови пациентов с заболеваниями печени может отражать баланс между фиброгенным и иммуносупрессивным эффектами TGF- $\beta$ 1. При низких уровнях цитокина существует риск развития воспалительных реакций, а при его высоких уровнях возрастает риск фиброза и инфекций. Дальнейшее накопление данных о связи уровня TGF- $\beta$ 1 с различными клиническими и лабораторными показателями при заболеваниях печени позволит получить более четкие представления о биологической роли и диагностической значимости этого цитокина.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–46 см. REFERENCES)

1. Курабекова Р.М., Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Цирульникова И.Е., Олефиренко Г.А., Готье С.В. Трансформирующий фактор роста b1 при трансплантации печени детям раннего возраста. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; XVI (4): 27–32.
2. Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Цирульникова И.Е., Курабекова Р.М., Олефиренко Г.А., Степанова О.И. и др. Динамика инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) при трансплантации печени детям от донора, не совместимого по группе крови. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; XVI (2): 46–51.
3. Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Олефиренко Г.А., Пищулина М.Э., Цирульникова И.Е., Бугров А.В. и др. Уровень sCD30 при трансплантации печени детям с врожденными и наследственными заболеваниями печени и желчевыводящих путей. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2011; XIII (4): 37–42.
4. Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Гичкун О.Е., Макарова Л.В., Цирульникова И.Е., Ахаладзе Д.Г. и др. Прогностическое значение растворимой формы лиганда CD40 при трансплантации печени детям с врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2012; XIV (2): 15–9.

#### REFERENCES

1. Kurabekova R.M., Shevchenko O.P., Tsurul'nikova O.M., Tsurul'nikova I.E., Olefirenko G.A., Got'e S.V. Transforming growth factor b1 in children of early age with liver transplantation. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2014; XVI (4): 27–32. (in Russian)
2. Shevchenko O.P., Tsurul'nikova O.M., Tsurul'nikova I.E., Kurabekova R.M., Olefirenko G.A., Stepanova O.I. et al. Dynamics of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in children after AB0-incompatible liver transplantation. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2014; XVI (2): 46–51. (in Russian)
3. Shevchenko O.P., Tsurul'nikova O.M., Olefirenko G.A., Pishchulina M.E., Tsurul'nikova I.E., Bugrov A.V. et al. Plasma level of soluble CD30 in pediatric living-donor liver transplant patient. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2011; XIII (4): 37–42. (in Russian)
4. Shevchenko O.P., Tsurul'nikova O.M., Gichkun O.E., Makarova L.V., Tsurul'nikova I.E., Akhaladze D.G. et al. Prognostic value of soluble CD40 ligand after liver transplantation in children with congenital and hereditary diseases of hepatobiliary system. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2012; XIV (2): 15–9. (in Russian)
5. Blobel G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342 (18): 1350–8.
6. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 2008; 214 (2): 199–210.
7. Lee S.J., Kim K.H., Park K.K. Mechanisms of fibrogenesis in liver

- cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World J. Hepatol.* 2014; 6 (4): 207–16.
8. Valva P., Casciato P., Diaz Carrasco J.M., Galdame O., Galoppo M.C. et al. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23218.
  9. Harris W.T., Muhlebach M.S., Oster R.A., Knowles M.R., Clancy J.P., Noah T.L. Plasma TGF-beta (1) in pediatric cystic fibrosis: potential biomarker of lung disease and response to therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 2011; 46 (7): 688–95.
  10. Vinagre I., Sanchez-Quesada J.L., Sanchez-Hernandez J., Santos D., Ordonez-Llanos J., De Leiva A. et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc. Diabetol.* 2014; 13: 34.
  11. Lazarenko L.M., Nikitina O.E., Nikitin E.V., Demchenko O.M., Kovtonyuk G.V., Ganova L.O. et al. Development of biomarker panel to predict, prevent and create treatments tailored to the persons with human papillomavirus-induced cervical precancerous lesions. *EPMA J.* 2014; 5 (1): 1.
  12. Gruppuso P.A., Mead J.E., Fausto N. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* 1990; 50 (5): 1464–9.
  13. Kang L.I., Mars W.M., Michalopoulos G.K. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells.* 2012; 1 (4): 1261–92.
  14. Massague J., Gomis R.R. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006; 580 (12): 2811–20.
  15. Bissell D.M., Wang S.S., Jarnagin W.R., Roll F.J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* 1995; 96 (1): 447–55.
  16. Ikeda H., Nagoshi S., Ohno A., Yanase M., Maekawa H., Fujiwara K. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 250 (3): 769–75.
  17. Leask A., Abraham D.J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004; 18 (7): 816–27.
  18. Tan Z., Qian X., Jiang R., Liu Q., Wang Y., Chen C. et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J. Immunol.* 2013; 191 (4): 1835–44.
  19. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007; 26 (5): 579–91.
  20. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441 (7090): 235–8.
  21. Marie J.C., Liggitt D., Rudensky A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* 2006; 25 (3): 441–54.
  22. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S., Robertson A.K., Flavell R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 99–146.
  23. Yasmin Anum M.Y., Looi M.L., Nor Aini A.H., Merican I., Wahidah A., Mohd Radzi A.H. et al. Combined assessment of TGF-beta-1 and alpha-fetoprotein values improves specificity in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and other chronic liver diseases in Malaysia. *Med. J. Malaysia.* 2009; 64 (3): 223–7.
  24. Okamoto Y., Gotoh Y., Uemura O., Tanaka S., Ando T., Nishida M. Age-dependent decrease in serum transforming growth factor (TGF)-beta 1 in healthy Japanese individuals; population study of serum TGF-beta 1 level in Japanese. *Dis. Markers.* 2005; 21 (2): 71–4.
  25. Rosensweig J.N., Omori M., Page K., Potter C.J., Perlman E.J., Thorgeirsson S.S. et al. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr. Res.* 1998; 44 (3): 402–9.
  26. Redondo S., Navarro-Dorado J., Ramajo M., Medina U., Molina-Sanchez P., Garces Z. et al. Age-dependent defective TGF-beta1 signaling in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 9: 24.
  27. Kanzler S., Baumann M., Schirmacher P., Dries V., Bayer E., Gerken G. et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J. Viral Hepat.* 2001; 8 (6): 430–7.
  28. Tsau Y.K., Lu M.Y., Ni Y.H. Nephromegaly and elevated plasma hepatocyte growth factor-transforming growth factor-beta1 ratio in infants with fulminant hepatitis or biliary atresia. *Am. J. Kidney Dis.* 2001; 38 (2): 279–85.
  29. Cheng C.H., Tsau Y.K., Tsai I.J. Kidney volume and plasma hepatocyte growth factor-transforming growth factor beta1 ratio among children with biliary atresia before and after liver transplantation: the reversibility of nephromegaly. *Am. J. Kidney Dis.* 2005; 46 (5): 830–6.
  30. Lebensztejn D.M., Sobaniec-Lotowska M., Kaczmarek M., Werpachowska I., Sienkiewicz J. Serum concentration of transforming growth factor (TGF)-beta 1 does not predict advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51 (55): 229–33.
  31. Hussein M.H., Hashimoto T., AbdEl-Hamid Daoud G., Kato T., Hibi M., Tomishige H. et al. Pediatric patients receiving ABO-incompatible living related liver transplantation exhibit higher serum transforming growth factor-beta1, interferon-gamma and interleukin-2 levels. *Pediatr. Surg. Int.* 2011; 27 (3): 263–8.
  32. Hussein M.H., Hashimoto T., Suzuki T., Daoud G.A., Goto T., Nakajima Y. et al. Children undergoing liver transplantation for treatment of inherited metabolic diseases are prone to higher oxidative stress, complement activity and transforming growth factor-beta1. *Ann. Transplant.* 2013; 18: 63–8.
  33. Briem-Richter A., Leuschner A., Krieger T., Grabhorn E., Fischer L., Nashan B. et al. Peripheral blood biomarkers for the characterization of alloimmune reactivity after pediatric liver transplantation. *Pediatr. Transplant.* 2013; 17 (8): 757–64.
  34. Zhang Y., Wang Y.L., Liu Y.W., Li Q., Yuan Y.H., Niu W.Y. et al. Change of peripheral blood mononuclear cells IFN-gamma, IL-10, and TGF-beta1 mRNA expression levels with active human cytomegalovirus infection in orthotopic liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2009; 41 (5): 1767–9.
  35. Dudek K., Koziak K., Placha G., Komasiwicz O., Zieniewicz K., Zurakowski J. et al. Early expression of hepatocyte growth factor, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 and -beta2 in symptomatic infection in patients who have undergone liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2009; 41 (1): 240–5.
  36. Fernandez-Yunquera A., Ripoll C., Banares R., Puerto M., Rincon D., Yepes I. et al. Everolimus immunosuppression reduces the serum expression of fibrosis markers in liver transplant recipients. *World J. Transplant.* 2014; 4 (2): 133–40.
  37. Dhaouadi T., Sfar I., Bardi R., Jendoubi-Ayed S., Abdallah T.B., Ayed K. et al. Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 2013; 45 (6): 2152–7.
  38. Javor J., Ferencik S., Bucova M., Stuchlikova M., Martinka E., Barak L. et al. Polymorphisms in the genes encoding TGF-beta1, TNF-alpha, and IL-6 show association with type 1 diabetes mellitus in the Slovak population. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2010; 58 (5): 385–93.
  39. Kim Y.H., Kim T.H., Kang S.W., Kim H.J., Park S.J., Jeong K.H. et al. Association between a TGFBR2 gene polymorphism (rs2228048, Asn389Asn) and acute rejection in Korean kidney transplantation recipients. *Immunol. Invest.* 2013; 42 (4): 285–95.
  40. Mu H.J., Xie P., Chen J.Y., Gao F., Zou J., Zhang J. et al. Association of TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, and IFN-gamma gene polymorphism with acute rejection and infection in lung transplant recipients. *Clin. Transplant.* 2014; 28 (9): 1016–24.
  41. Paladino N., Flores A.C., Fainboim H., Schroder T., Cuarterolo M., Lezama C. et al. The most severe forms of type I autoimmune hepatitis are associated with genetically determined levels of TGF-beta1. *Clin. Immunol.* 2010; 134 (3): 305–12.
  42. Eurich D., Neumann U.P., Boas-Knoop S., Neuhaus R., Bahra M., Neuhaus P. et al. Transforming growth factor-beta1-gene polymorphism in the development of kidney disease after liver transplantation. *Transplantation.* 2012; 93 (5): 555–60.
  43. Eurich D., Bahra M., Boas-Knoop S., Lock J.F., Golembus J., Neuhaus R. et al. Transforming growth factor beta1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus-induced liver disease. *Liver Transpl.* 2011; 17 (3): 279–88.
  44. Nikolova P.N., Ivanova M.I., Mihailova S.M., Myhailova A.P., Baltadjieva D.N., Simeonov P.L. et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation-impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl. Immunol.* 2008; 18 (4): 344–8.
  45. Xie H.Y., Wang W.L., Yao M.Y., Yu S.F., Feng X.N., Jin J. et al. Polymorphisms in cytokine genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis B in Chinese liver transplant recipients. *Arch. Med. Res.* 2008; 39 (4): 420–8.
  46. Kumar R., Goswami R., Agarwal S., Israni N., Singh S.K., Rani R. Association and interaction of the TNF-alpha gene with other pro- and anti-inflammatory cytokine genes and HLA genes in patients with type 1 diabetes from North India. *Tissue Antigens.* 2007; 69 (6): 557–67.

Поступила 17.10.16

Принята к печати 01.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.9-022.7-078

Останкова Ю.В.<sup>1</sup>, Семенов А. В.<sup>1,2</sup>, Зуева Е.В.<sup>1</sup>, Вашукова М.А.<sup>3</sup>, Тотолян А.А.<sup>1,2</sup>

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 16S РРНК И MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

<sup>1</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ГК «Медика», 194017, Санкт-Петербург

*Внутригоспитальные, или внутрибольничные инфекции – одна из наиболее серьезных проблем медицины, особенно при наличии у пациентов фоновой иммуносупрессии различного генеза, обусловленной как самим заболеванием, так и соответствующей терапией. Для выбора адекватной терапии не только необходимо установление наличия инфекции, но также идентификация возбудителя и определение его резистентности. При этом высокая гетерогенность штаммов и множественная резистентность нозокомальных инфекций к антибиотикам и антимикробным химиопрепаратам, стандартизация антибактериальной профилактики и ряд других причин становятся препятствием не только для определения лекарственной чувствительности бактерии, но и для самой идентификации патогена у пациента. Одним из наиболее сложных в антибактериальной терапии патогенов, вызывающих гнойно-септические заболевания, служат бактерии рода *Stenotrophomonas* spp., единственный клинически значимый вид которых – *Stenotrophomonas maltophilia* – обладает первичной множественной антибиотикорезистентностью. Очевидна значимость ранней идентификации *S. maltophilia*. При использовании MALDI-ToF масс-спектрометрии показано сокращение времени видовой идентификации первичной бактериальной культуры до 1–2 ч, включая пробоподготовку и анализ полученных спектров. При использовании секвенирования 16S рРНК показано сокращение общего времени видовой идентификации патогена из клинического образца (крови) до 10–12 ч, включая пробоподготовку и сравнение с последовательностями, представленными в международной базе данных. Данный метод позволяет исключить из анализа длительный этап получения чистой гемокультуры возбудителя. Использование секвенирования 16S рРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии в качестве альтернативных высокоточных методов сокращает время идентификации бактерий, в том числе позволяя выявить возбудитель непосредственно в крови пациента, таким образом оптимизируя комплексное лечение и сокращая время подбора адекватной терапии, что особенно важно для онкологических больных, поскольку чувствительность культуральных методов может быть снижена вследствие профилактической антибиотикотерапии.*

**Ключевые слова:** внутрибольничные инфекции; *Stenotrophomonas maltophilia*; MALDI-ToF масс-спектрометрия; секвенирование 16S рРНК.

**Для цитирования:** Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.В., Вашукова М.А., Тотолян А.А. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16S РРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 165-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170>  
Ostankova Yu. V.<sup>1</sup>, Semenov A. V.<sup>1,2</sup>, Zueva E. V.<sup>1</sup>, Vashukova M. A.<sup>3</sup>, Totolian A. A.<sup>1,2</sup>

THE IDENTIFICATION OF STENOTPHOMONAS MALTOPHILIA USING THE TECHNIQUES OF DIRECT SEQUENATION 16S P RNA AND MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

<sup>1</sup>The Pasteur research institute of epidemiology and microbiology of the Rospotrebnadzor, 197101 St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>The I.P. Pavlov first Sankt-Pereburgskii` state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Medika, 194017 St. Petersburg, Russia

*The in-hospital infections are one of the most serious problems of medicine, especially if patients have a background immunosuppression of various genesis conditioned by both disease itself and corresponding therapy. The detection of presence of infection and identification of agent and detection of its resistance are needed for choosing adequate therapy. At that, high heterogeneity of strains and multiple resistance of nosocomial infections to antibiotics and antimicrobial pharmaceuticals and standardization of antibacterial prevention and number of other causes becomes an obstacle for both determination of medicinal sensitivity of bacterium and for identification of pathogen itself in patient. One of the most complicated in antibacterial therapy pathogens causing pyo-septic diseases, are bacteria *Stenotrophomonas* spp., the only significant species out of them - *Stenotrophomonas maltophilia* has primary multiple antibiotic resistance. The significance of early identification of *S. maltophilia* is obvious. The application of MALDI-ToF mass-spectrometry requires shortage of time of species identification of primary bacterial culture up to 1-2 hours including sampling preparation and analysis of obtained specters. The sequencing of 16S rRNA requires shortage of total time of species identification of pathogen from clinical sample (blood) up to 1-12 hours, including sampling preparation and comparison with successions presented in international data base. The given technique permits to exclude out of analysis prolonged period of obtaining a pure hemoculture of agent. The application of sequencing of 16S rRNA and MALDI-ToF mass-spectrometry as an alternative high-precision techniques shorten time of identification of bacteria, including detection of agent directly in blood of patient. Hence, occurs optimization of complex treatment and shortage of time of selection of adequate therapy that is especially important in case of oncological patients because sensitivity of cultural methods can be diminished due to preventive antibiotics' therapy.*

**Key words:** in-hospital infections; *Stenotrophomonas maltophilia*; MALDI-ToF mass-spectrometry; sequencing of 16S rRNA.

**Для корреспонденции:** Останкова Юлия Владимировна, науч. сотр. лаб.молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; e-mail: shenna1@yandex.ru

**For citation:** Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenotrophomonas maltophilia* using the techniques of direct sequencing 16S rRNA and MALDI-ToF mass-spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (3): 165-170. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170>

**For correspondence:** Ostankova Yu.V., research worker of the laboratory of molecular immunology. e-mail: shennal@yandex.ru

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

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

Received 17.10.2016  
Accepted 29.11.2016

**Введение.** Одна из серьезнейших проблем при госпитализации пациентов с иммуносупрессией различного генеза – осложнения основного заболевания в виде внутрибольничных инфекций, нередко приводящих к летальному исходу. При этом наибольшую опасность для здоровья и жизни пациентов несут штаммы с повышенной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Высокую распространенность внутрибольничных инфекций со множественной резистентностью объясняют активным использованием антибиотиков [5].

Для выбора адекватной терапии не только необходимо установить наличие инфекции, но также идентифицировать возбудитель и определить его резистентность. На данный момент этапы лабораторного исследования занимают неоправданно большое количество времени, уменьшая вероятность положительного исхода лечения больного. Несмотря на наличие внутрибольничной инфекции практически в любом стационаре, большинство клиницистов уделяют этому факту недостаточно внимания, рассматривая некоторые внутрибольничные инфекции как условно-патогенные, и не включают выявление и идентификацию патогена в постоянную практику [1, 8]. При возникновении осложнений у пациента для исключения или подтверждения бактериемии проводят бактериологический посев крови (или другого биологического материала) на стерильность (иногда в 2–3 повторах) и только после этого начинают работы по идентификации возбудителя и определению его устойчивости к лекарственным препаратам [7]. Преимущественно в стационарах используют микроскопические, серологические и биохимические методы, требующие достаточного длительного времени, необходимого для идентификации микроорганизма. Так, например, для диагностики генерализованных инфекций используют запатентованный экспресс-метод, подразумевающий ускоренные сроки получения информации о наличии микроорганизмов в крови, т. е. на 3–4-й день от момента отбора клинического материала [3, 4]. Использование аппаратных модификаций классических методов облегчает работу, уменьшает вероятность контаминаций и сокращает время, необходимое для идентификации микроорганизмов. Однако этапы культивирования некоторых микроорганизмов могут занимать не менее 30 ч. Показано, что, например, при идентификации коллекции клинических изолятов грамотрицательных палочек с использованием идентификационных карт анализатора Vitek-2 частота ошибочной диагностики может составлять более 30% [23].

Именно недостатки лабораторной диагностики, по мнению ряда авторов (например Г.Г. Онищенко и др., 2007), – одна из главных причин высокого процента смертности от септических осложнений при гнойно-септических заболеваниях [6].

Одним из наиболее сложных в антибактериальной терапии патогенов, вызывающих гнойно-септические заболевания, служат бактерии рода *Stenotrophomonas spp.*, единственный клинически значимый вид которых – *Stenotrophomonas maltophilia* – обладает первичной множественной антибиотико-резистентностью [9, 20]. При этом *S. maltophilia* поражает преимущественно иммуносупрессированных больных, в том

числе с онкологическими заболеваниями, а сама инфекция характеризуется септическим течением с высокой летальностью [2]. Показана распространенность *S. maltophilia* не только в больничной среде, но и в воде, продуктах питания [22]. Высокая гетерогенность штаммов *S. maltophilia* и множественная резистентность к антимикробным препаратам становятся препятствием не только для определения лекарственной чувствительности бактерии, но и для выявления ее у пациента, особенно в случае онкологических заболеваний [16]. Использование антибиотиков в профилактических целях, в том числе в виде интраоперационной профилактики, у больных раком, с одной стороны, снижает смертность пациентов, с другой – уменьшает чувствительность культуральных диагностических тестов [12, 18]. В большинстве случаев раннее использование антибиотиков оправдано, так как оно позволяет эффективно бороться с внутрибольничными инфекциями до того, как они приводят к развитию нозокомиальных осложнений у пациентов с онкологией. Однако, если патогеном оказывается бактерия с множественной резистентностью как *S. maltophilia*, антибактериальные препараты не только не противостоят инфекции, но и затрудняют ее идентификацию [19].

Таким образом, очевидна значимость ранней идентификации *S. maltophilia* с использованием некультуральных методов.

Цель исследования – идентификация *S. maltophilia* в клиническом материале (кровь) и в первичной культуре с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии и секвенирования 16S рНК.

**Материал и методы.** Пациент Г., 65 лет, рак гортани с метастазированием, IVB стадия. На фоне проведенной химиотерапии развилась картина сепсиса (уровень прокальцитонина (PCT) в крови 620 нг/мл). В стационаре выделили микроорганизм из крови пациента, но видовая идентификация стандартными культуральными методами результатов не дала.

В дальнейшей работе с целью идентификации возбудителя сепсиса были использованы следующие клинические образцы: 1) кровь, 5 мл в вакуумной пробирке с K<sub>2</sub>EDTA пациента Г.; 2) первичная бактериальная культура от пациента Г.

Идентификацию проводили двумя методами: секвенированием по Сэнгеру 16S рНК и MALDI-TOF масс-спектрометрией выделенной культуры.

**1. Идентификация возбудителя в культуре и крови и на основе 16S рНК секвенирования.** Выделение нуклеиновых кислот (НК) проводили двумя методами, принцип действия которых основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, и последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом и/или этанолом (хлороформ-солевая экстракция) и с помощью тест-системы «АмплиПрайм Рибо-преп» производства ФБУН ЦНИИЭ. Выход рНК при использовании тест-системы был меньше, однако достаточный для дальнейшей работы с полученной НК. Обратную транскрипцию проводили на неспецифичных праймерах. Для ПЦР использовали перекрывающиеся пары универсальных праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 пар

оснований (п. о.), сконструированных на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли по следующей схеме. Реакционная смесь для ПЦР включала: 15 пмоль/л каждого олигопраймера, 2 ммоль/л каждого нуклеозидтрифосфата 5 мкл, 6,7 ммоль/л  $MgCl_2$ , 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы, DMSO 10% конечного объема, 1 мкг матрицы, воду без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. Амплификацию проводили при условиях: после денатурации (95°C, 5 мин) устанавливали 32 цикла амплификации в режиме 94°C, 20 с (денатурация); 52–58°C, 30 с (отжиг праймеров); 72°C, 1 мин (синтез). Финальный синтез длился при 72°C 7 мин.

Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по методике, рекомендованной для Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany). Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера и визуализировали в агарозном геле. Очищенный фрагмент концентрации 30–50 фмоль использовали для постановки секвенирующих реакций с прямым и обратным праймером. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере и помещали в генетический анализатор.

Анализировали фрагменты на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., USA). Первичный анализ полученной последовательности проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с последовательностями, представленными в международной базе данных. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW [13]. Для построения филогенетических деревьев использовали метод UPGMA, bootstrap,  $n = 500$  [21].

**2. Идентификация бактериальной культуры с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-ToF) масс-спектрометрии.** Для идентификации бактериальной культуры применяли 2 метода нанесения образца.

Метод прямого нанесения бактериальных клеток на мишень. Для этого колонию клеток наносили тонким слоем на поверхность ячейки 96-местной стальной MALDI мишени и подсушивали на воздухе. Затем поверх клеток наносили 1 мкл матрицы. В качестве матрицы использовали раствор  $\alpha$ -циано-4-гидрокси-коричной кислоты в 50% ацетонитриле/2,5% трифторуксусной кислоте.

Метод этанольно-муравьинокислотной экстракции и осаждения разрушенных клеток центрифугированием. Образец экстракта (1 мкл) наносили на поверхность ячейки MALDI мишени. После высыхания на образец наслаивали 1 мкл матрицы.

Масс-спектры были получены в линейном режиме на масс-спектрометре Microflex LRF MALDI-ToF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия) с помощью программного обеспечения Flex Control (Bruker Daltonics). Каждый спектр получен в диапазоне масса/заряд ( $m/z$ ) от 2000 до 20 000 и представлял собой сумму ионов, полученных от 140 лазерных вспышек, выполненных в различных регионах одной и той же ячейки. Перед каждым

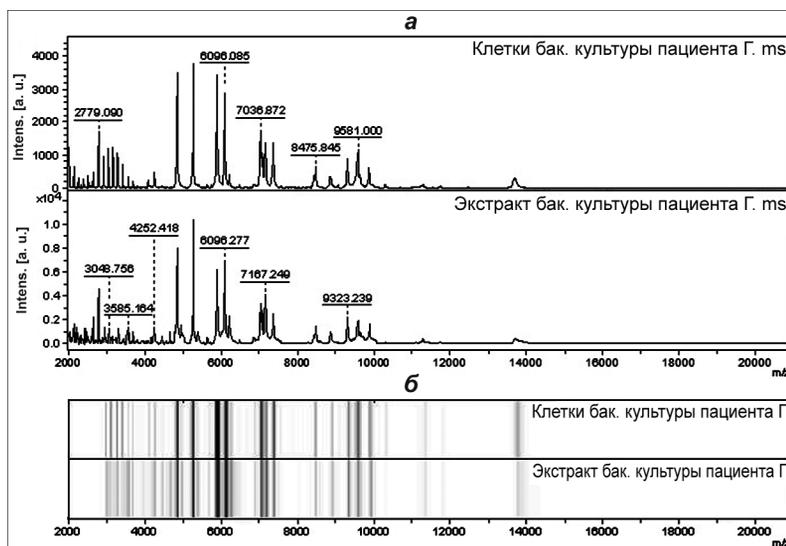


Рис. 1. Спектры образцов клеток и экстракта бактериальной культуры, полученные MALDI-ToF масс-спектрометрией (а); те же масс-спектры в виде псевдогеля (б).

измерением прибор калибровали с помощью бактериального тест-стандарта (БТС) (Bruker Daltonik GmbH, Германия), представляющего собой экстракт *Escherichia coli* DH5alpha. Калибровку считали удовлетворительной в диапазоне масс-спектров белковых пиков  $\leq 300$  ppm. Идентификацию осуществляли с помощью программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik, Германия), база данных которой содержит

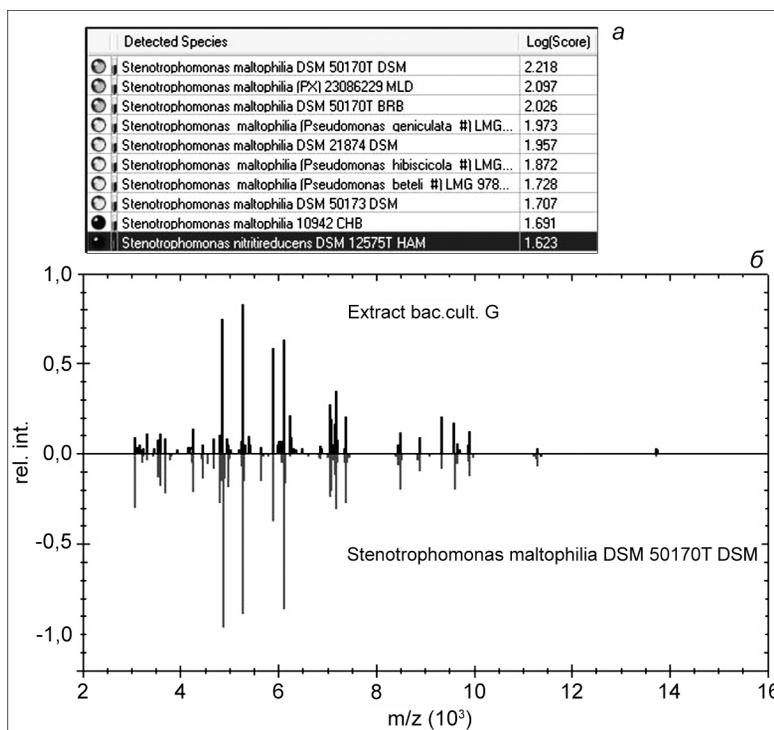


Рис. 2. Количественная оценка совпадения между профилями экстракта бактериальной культуры, выделенной из крови пациента Г. и эталонных штаммов *Stenotrophomonas* spp. из базы данных MALDI Biotyper 3.1 (а); сравнение профиля экстракта бактериальной культуры, выделенной из крови пациента Г. и эталонного профиля *S. maltophilia* DSM 50170T (б).

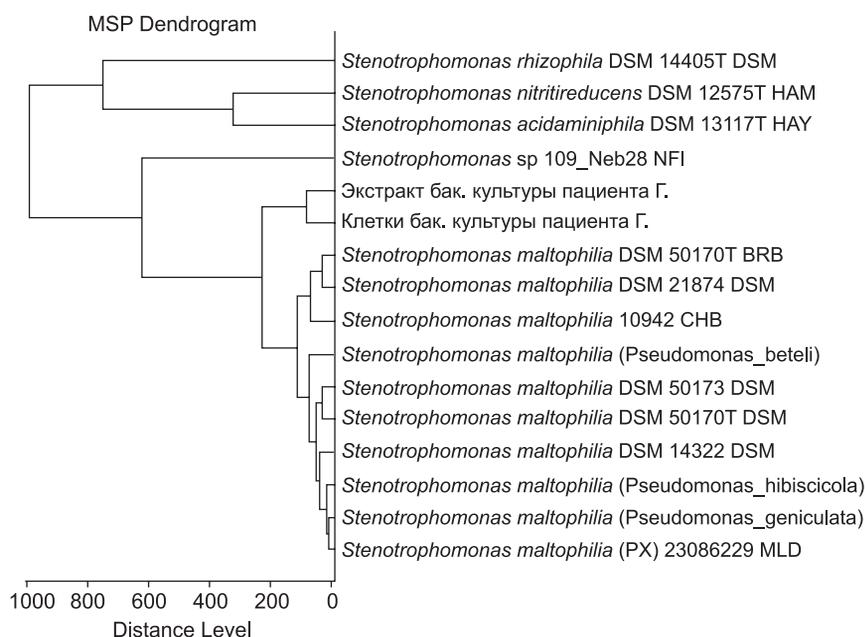


Рис. 3. Дендрограмма на основании профилей масс-спектров клеток и экстракта бактериальной культуры выделенной из крови пациента Г., а также эталонных масс-спектров бактериальных штаммов *Stenotrophomonas* spp. из базы данных MALDI Biotyper 3.1. Расстояние отображено в относительных единицах.

спектры 5627 клеточных организмов. Полученные спектры сравнивали со спектрами, имеющимися в таксономической библиотеке Bruker. Результат сравнения оценивали в баллах (общий десятичный логарифм значений пиков, совпадающих в спектре образца и эталонного спектра). Значения баллов от 3 до 2 соответствовали идентификации до вида, значения от 1,99 до 1,70 означали вероятность идентификации до рода. Более низкие оценки свидетельствовали о ненадежном соответствии спектров с базой данных.

**Результаты.** Методом MALDI-ToF масс-спектрометрии получены спектры высокого качества как при прямом нанесении клеток на мишень, так и при использовании образца экстракта клеток (рис. 1). Оба образца содержали идентичные основные белковые пики, однако их интенсивность была выше у образца экстракта клеток. В то же время у образца бактериальных клеток в диапазоне  $m/z = 2500-3500$  Da наблюдали колоколообразный кластер полисахаридных пиков, служащий исключительной особенностью спектра *S. maltophilia*.

Результаты идентификации бактериальной культуры, выделенной из крови пациента, представлены на рис. 2. Наиболее высокая оценка совпадения исследуемого изолята была со штаммом *S. maltophilia strain DSM 50170T*. Оценка сравнения с эталонными спектрами других штаммов *S. maltophilia* из библиотеки варьировала в широком диапазоне. При этом все 10 наиболее совпадающих профилей представлены штаммами, относящимися к роду *Stenotrophomonas*, что свидетельствует о наличии чистой бактериальной монокультуры. Сравнение меры сходства между исследуемым изолятом и эталонными штаммами *Stenotrophomonas* spp. выполнено с помощью кластерного анализа специфических пиков масс-спектров этих штаммов путем построения дендрограммы. Как видно на рис. 3, исследуемая бактериальная культура вошла в единый кластер профилей штаммов *S. maltophilia*, отличающийся от кластера профилей других видов *Stenotrophomonas*, что

наглядно подтверждает результаты идентификации выделенной культуры.

Методом секвенирования получены последовательности НК. Фрагменты объединяли согласно перекрывающимся участкам. Идентификацию фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с международной базой данных GenBank относительно наиболее идентичных трех нуклеотидных последовательностей с совпадением не менее 99%. Инфекционные агенты в представленных клинических образцах крови и культуры были идентичны друг другу на 100%, что позволило идентифицировать исследуемый образец как *S. maltophilia*. Наиболее идентичным штаммом оказался *S. maltophilia strain S2*.

При сравнении полученного фрагмента с представленными в базе данных последовательностями штаммов *S. maltophilia strain S2* и *strain DSM 50170T* показано их высокое сходство. Отличия составили менее 1% общей протяженности фрагмента. При известной гетерогенности патогена это доказывает идентичность результата анализа методами секвенирования и MALDI-ToF масс-спектрометрии. Типирование на основе 16S последовательности позволяет выявлять различия даже в близкородственных штаммах, идентичность которых составляет 99% (рис. 4, таблица).

**Обсуждение.** При использовании метода MALDI-ToF масс-спектрометрии показано сокращение времени видовой идентификации бактериальной культуры до 1–2 ч, включая пробоподготовку и анализ полученных спектров, в то время как для традиционных методов идентификации культуры с помощью автоматических микробиологических анализаторов необходимо до 2 сут.

Время, затраченное на видовую идентификацию патогена из клинического образца (крови) методом прямого секвенирования 16S рНК, не превышало 10–12 ч, включая пробоподготовку и сравнение с последовательностями, представленными в международной базе данных. Данный метод позволяет исключить из анализа длительный этап выделения из крови пациента живых возбудителей инфекции, включающий в себя инкубацию в бактериологическом анализаторе для регистрации бактериального роста, высев на твердые питательные среды для получения чистой культуры возбудителя.

Пациенту Г. проводили профилактическую терапию антибиотиками цефалоспоринового ряда, что позволяет предполагать устойчивость выделенного инфекционного агента [14, 15]. В последние годы получает все более широкое распространение активное применение цефалоспоринов последних поколений в профилактической терапии пациентов с онколо-

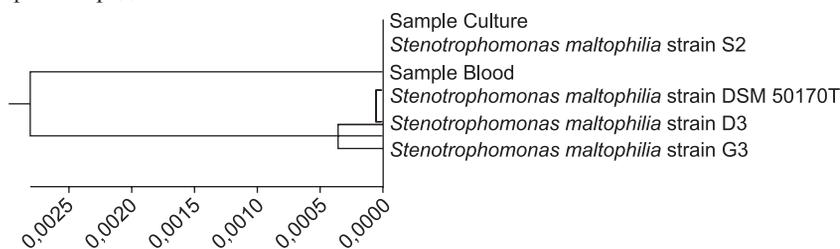


Рис. 4. Степень генетического сходства идентифицируемых фрагментов *S. maltophilia*, полученных из образцов крови и бактериальной культуры с последовательностями, представленными в международной базе данных.

**Степень генетического различия штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* strain S2 и *Stenotrophomonas maltophilia* strain DSM 50170T**

Штамм	Последовательность
<i>S. maltophilia</i> strain S2	...GC-AGT...GGACG...CTGGG...CT-GC...
<i>S. maltophilia</i> strain DSM 50170T	...GCAAGT...GGGCG...CT-GG...CTTGC...

гическими заболеваниями. Можно предположить, что именно этот факт стал причиной повышения частоты встречаемости *S. maltophilia* как внутрибольничной инфекции, приводящей к тяжелым сепсисам [9, 11]. Исходя из распространенности *S. maltophilia* в природной и техногенной окружающей среде, а также у здоровых людей, мы считаем необходимым внимательно рассмотреть вероятность того, что применение некоторых цефалоспоринов может становиться толчком к активации «спящей» бактерии *S. maltophilia* в качестве септического агента. Мы видим здесь два возможных пути. Возможно, некоторые цефалоспорины III поколения могут инициировать процесс токсикообразования у данной бактерии (как это отмечено в работах с *Clostridium difficile*), для которой, как и для *S. maltophilia*, показаны распространенность во внутрибольничной и внебольничной среде, возможность бессимптомного носительства, а также тяжелые клинические формы, приводящие к летальному исходу [10, 17]. Вторая возможная причина – невольный селективный отбор, осуществляющийся за счет воздействия цефалоспоринов на более простые внутрибольничные инфекции и позволяющий активное развитие устойчивой к данным антибиотикам *S. maltophilia*, которая в норме не выдерживает конкуренции за источники питания с другими патогенами.

При комплексном лечении пациентов с онкологическими или иными заболеваниями, характеризующимися выраженной иммуносупрессией, проводимая периоперационная антибиотикопрофилактика, нередко без оснований перерастающая в так называемую профилактическую антибиотикотерапию, в случае актуальности *S. maltophilia* и других возбудителей может значительно минимизировать возможности рутинных методов бактериологической диагностики и тем самым привести к тяжелым последствиям, вплоть до развития внутригоспитального сепсиса и летального исхода. Показанная возможность применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах, а также возможность применения прямого секвенирования для ускорения идентификации микроорганизмов из клинических образцов, без затрат времени на выращивание чистой культуры позволяют успешно бороться с данной проблемой.

Использование современных высокоточных методов сокращает время идентификации бактерий, в том числе позволяя выявлять возбудитель непосредственно из крови пациента без затрат времени на посев, выращивание культуры и дальнейшую идентификацию стандартными бактериологическими методами и вне зависимости от используемой в отношении пациента тактики антибактериальной терапии. Введение предложенных методов в практику в дополнение к уже существующим культуральным позволит своевременно подобрать адекватную терапию для пациентов.

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

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

**ЛИТЕРАТУРА (пп. 9–23 см. REFERENCES)**

1. Акимкин В.Г., Музыченко Ф.В. Профилактика внутрибольничных инфекций в лечебно-профилактических учреждениях Министерства обороны Российской Федерации. *Военномедицинский журнал*. 2007; 328 (9): 51–6.

2. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003; 5 (1): 1–16.

3. Каргальцева Н.М. Способ диагностики бактериемии. Патент РФ № 2098486; 1995.

4. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Кафтырева Л.А., Пастушков В.Л., Колосовская Е.Н., Кучеренко Е.В. и др. *Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока*. СПб.; 2010.

5. Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (2): 16–30.

6. Онищенко Г.Г. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 2 октября 2007 г. № 0100/9938-07-32 «О заболеваемости ВБИ в Российской Федерации». М.; 2007.

7. Организация лечебного процесса и особенности лечения внутрибольничных инфекций – Комплексный и индивидуальный подходы к терапии ВБИ. Этиотропная, патогенетическая, симптоматическая и иммунотерапия ВБИ. 17.08.2012. Available at: <http://bolezni.by/vnutribolnichnye-infektsii/158-organizatsiya-lechebnogo-protsessa-i-osobennosti-lecheniya-vnutribolnichnykh-infektsij>.

8. Покровский В.И., Семина Н.А., Ковалева Е.П. Эпидемиология и профилактика внутрибольничных инфекций в Российской Федерации. *Стерилизация и госпитальные инфекции*. 2006; (1): 8–11.

**REFERENCES**

1. Akimkin V.G., Muzychenko F.V. Prevention of nosocomial infections in health care facilities of the Ministry of Defense of the Russian Federation. *Voennomeditsinskiy zhurnal*. 2007; 328 (9): 51–6. (in Russian)

2. Zubkov M.N. Non-fermenting bacteria: classification, general characteristics, role in human pathology. Identification of *Pseudomonas* spp. and similar microorganisms. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5 (1): 1–16. (in Russian)

3. Kargal'tseva N.M. *Method for Diagnosing Bacteremia*. Patent RF N 2098486; 1995. (in Russian)

4. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Kaftyreva L.A., Pastushenkov V.L., Kolosovskaya E.N., Kucherenko E.V. et al. *Microbiological Methods of Diagnosing Bloodstream Infections [Mikrobiologicheskie metody diagnostiki infektsii krovotoka]*. St. Petersburg; 2010. (in Russian)

5. Kozlov R.S. Nosocomial infections: epidemiology, pathogenesis, prevention and control. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2 (2): 16–30. (in Russian)

6. Onishchenko G.G. Letter of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare on October 2, 2007 № 0100/9938-07-32 “The incidence of nosocomial infections in the Russian Federation.” Moscow; 2007. (in Russian)

7. Organization of the treatment process and especially the treatment of hospital-acquired infections – Comprehensive and individual approaches to the treatment of nosocomial infections. Causal, pathogenetic, symptomatic and immunotherapy. 17.08.2012. Available at: <http://bolezni.by/vnutribolnichnye-infektsii/158-organizatsiya-lechebnogo-protsessa-i-osobennosti-lecheniya-vnutribolnichnykh-infektsij>. (in Russian)

8. Pokrovskiy V.I., Semina N.A., Kovaleva E.P. Epidemiology and prevention of nosocomial infections in the Russian Federation. *Sterilizatsiya i gospital'nye infektsii*. 2006; (1): 8–11. (in Russian)

9. Denton M., Kerr K.G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11 (1): 57–80.

10. Dubberke E.R., Gerding D.N., Classen D. Strategies to prevent clostridium difficile infections in acute care hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2008; 29 (Suppl. 1): 81–92.

11. Gales A.C., Jones R.N., Forward K.R., Linares J., Sader H.S., Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: Geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–1999). *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (Suppl. 2): S104–13.

12. Guembe M., Marin M., Martín-Rabadán P., Echenagusia A., Camúñez F., Rodríguez-Rosales G. et al. Use of universal 16S rRNA gene PCR as a diagnostic tool for venous access port-related bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (3): 799–804.

13. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL W: improved soft-

- ware for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 1992; 8 (2): 189–91.
14. Higgins C.S., Murtough S.M., Williamson E. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001; 7 (6): 308–15.
  15. Ismaeel N.A. Susceptibilities of 97 strains of *Xanthomonas maltophilia* to antibiotics and the effect of beta-lactamase inhibitors. *Microbios.* 1997; 91 (367): 97–103.
  16. Kataoka D., Fujiwara H., Kawakami T. The indirect pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003; 22 (6): 601–6.
  17. Kim J., Smathers S.A., Prasad P., Leckerman K.H., Coffin S., Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001–2006. *Pediatrics.* 2008; 122 (6): 1266–70.
  18. Ley B.E., Linton C.J., Bennett D.M., Jalal H., Foot A.B., Millar M.R. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 17 (4): 247–53.
  19. Maha I.Z., Tawfik R.E., Muhammed I.Z., Seham M.S., Maggie R.M., Wafaa M.B. Value of 16S rRNA Gene Amplification for Early Detection of Bacteremia in Immunocompromised Patients. *The Journal of American Science.* 2014; 10 (1): 165–72.
  20. Schaumann R., Stein K., Eckhardt C., Ackermann G., Rodloff A.C. Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* – a prospective. *Infection.* 2001; 29 (4): 205–8.
  21. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. Nei: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
  22. Wilkinson F.H., Kerr K.G. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)*. 1998; 7 (1): 12–4.
  23. Zbinden A., Böttger E.C., Bosshard P.P., Zbinden R. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of Gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (7): 2270–3.

Поступила 17.10.16  
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 612.112.94.083

Шерстеникова А.К.<sup>1</sup>, Кашутин С.Л.<sup>1</sup>, Николаев В.И.<sup>2</sup>, Хлопина И.А.<sup>1</sup>

## УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ НА ЛИМФОЦИТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗМЕРОВ ИХ ЦИТОПЛАЗМЫ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Архангельск;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», 195067, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Как известно, лимфоциты являются истинными иммунными клетками, специализированными на распознавании антигена (Ag) в организме. Их поведение в крови регулируется несколькими классами белков адгезии, в том числе селектинами, интегринами, иммуноглобулинами. Сведений об уровне экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы у практически здоровых лиц нет. Цель исследования: определение уровня экспрессии молекул адгезии лимфоцитов в зависимости от размеров их цитоплазмы. В венозной крови на проточном цитометре определяли уровень экспрессии молекул адгезии у 50 человек (22 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет, не имеющих хронической патологии в анамнезе. При изучении лимфоцитогаммы дифференцировали лимфоциты по величине клетки с учетом размеров цитоплазмы: малые лимфоциты – до 8 мкм, средние – от 8 до 12 мкм, большие – больше 12 мкм. У мужчин наблюдали тенденцию к снижению концентрации лимфоцитов с экспрессированной молекулой L-селектина. Выявлено отсутствие гендерных различий в уровне лимфоцитов с рецептором LFA-1, а также лимфоцитов с молекулой ICAM-1. У мужчин концентрация лимфоцитов с рецептором LFA-3 была выше, чем у женщин, но только в виде тенденции. Отмечался более низкий уровень экспрессии молекулы PECAM-1 у мужчин. Корреляционный анализ между уровнем экспрессии молекул адгезии и концентрацией лимфоцитов, различающихся по размеру цитоплазмы, показал, что при увеличении размеров цитоплазмы лимфоцитов увеличивается количество статистически достоверных корреляций. Большая часть лимфоцитов (67,97%) экспрессировала молекулу LFA-1. Шеддинг молекул L-селектина среди лимфоцитов протекает значительно активнее, чем у моноцитов. При этом к миграции более предрасположены среднеплазменные лимфоциты и большие гранулярные лимфоциты, идентифицированные как естественные киллеры. Однако лимфоциты вступающие в состояние лимфолиферации, обладают меньшей способностью к адгезии.

Ключевые слова: лимфоциты; молекулы адгезии; размер цитоплазмы лимфоцитов.

Для цитирования: Шерстеникова А.К., Кашутин С.Л., Николаев В.И., Хлопина И.А. Уровень экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (3): 170–172. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-170-172>

Sherstennikova A.K.<sup>1</sup>, Kashutin S.L.<sup>1</sup>, Nikolaev V.I.<sup>2</sup>, Khlopina I.A.<sup>1</sup>

THE LEVEL OF EXPRESSION OF MOLECULES OF ADHESION ON LYMPHOCYTES DEPENDING ON AMOUNT OF THEIR CYTOPLASM

<sup>1</sup>The Northern state medical university, 163000 Arkhangelsk, Russia

<sup>2</sup>The I.I. Mechnikov North-Western state medical university, 195067 St. Petersburg, Russia

The lymphocytes are true immunocytes specialized in discerning antigen in organism. Their behavior in blood is regulated by several classes of adhesion proteins, including selectin, integrin, immunoglobulin. In healthy humans there is no data concerning level of expression of adhesion molecules on lymphocytes depending on size of their cytoplasm. The study was carried out

to determine level of expression of adhesion molecules of lymphocytes depending on size of their cytoplasm. The flow cytometer was applied to determine in venous blood level of expression of adhesion molecules in 50 individuals (22 males and 28 females) aged from 20 to 60 years and having no chronic pathology in anamnesis. The analysis of lymphocytogram permitted to differentiate lymphocytes according volume of cell considering size of cytoplasm: small lymphocytes- up to 8  $\mu\text{m}$ ; medium - from 8 to 12  $\mu\text{m}$ ; large - more than 12  $\mu\text{m}$ . In males a tendency was established concerning decreasing of concentration of lymphocytes with expressed molecule of L-selectin. The absence was detected concerning gender differences in level of lymphocytes with receptor LFA-1 and also lymphocytes with molecule ICAM-1. In males concentration of lymphocytes with receptor LFA-3 was higher than in females but only as a tendency. The lower level of expression of molecule PECAM-1 in males was observed. The correlation analysis between level of expression of adhesion molecules and concentration of lymphocytes differing in size of cytoplasm, demonstrated that at increasing of size of cytoplasm of lymphocytes increases number of statistically reliable correlations. The shedding of molecules of L-selectin in lymphocytes proceeds significantly more active than in monocytes. At that, medium plasma lymphocytes and large granular lymphocytes identified as natural killers are more predisposed to migration. However, lymphocytes entering condition of lympho-proliferation have less ability to adhesion.

**Key words:** lymphocytes; adhesion molecules; size of cytoplasm.

**For citation:** Sherstennikova A.K., Kashutin S.L., Nikolaev V.I., Khlopina I.A. The level of expression of molecules of adhesion on lymphocytes depending on amount of their cytoplasm. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 170-172. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-170-172>*

**For correspondence:** Sherstennikova A.K., candidate of medical sciences, associate professor of the chair of normal physiology. e-mail: a.sherstennikova@yandex.ru

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

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

Received 01.04.2016  
Accepted 15.06.2016

Регуляция миграции и расселения иммунокомпетентных клеток в периферических органах, процесса специфического хоминга в лимфоидные органы, участие в клеточном взаимодействии при развитии иммунного ответа – все это относится к функциям молекул адгезии [8].

Как известно, реализация процессов миграции связана с L-селектинами, интегринами и молекулами суперсемейства иммуноглобулинов. На первом этапе – непрочной адгезии – в процесс адгезии вступают селектины, в том числе L-селектины, экспрессируемые на лимфоцитах, но это не обеспечивает миграцию клеток через эндотелий [9]. Преодоление эндотелиального барьера осуществляется после наступления прочной адгезии при участии двух других групп адгезинов: интегринов и членов суперсемейства иммуноглобулинов [10]. На лимфоцитах экспрессируются такие важные для преодоления эндотелиального барьера интегрины, как LFA-1 и LFA-3, взаимодействующие с членами суперсемейства иммуноглобулинов, представленными на эндотелиальных клетках: ICAM-1, ICAM-2 и VCAM-1 [1]. За фазой прочной адгезии следует этап собственно миграции лимфоцитов через эндотелий, связанной с экспрессией молекул PECAM [10].

Если миграция лимфоцитов в очаг воспаления достаточно хорошо исследована, то данные об их миграции в ткани в условиях отсутствия антигенной нагрузки, роли которой могут выступать инфекция, химическое или радиационное повреждение, стандартная иммунная нагрузка, единичны и разрозненны [1, 2, 5, 6]. Отсутствуют количественные данные об уровне экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах, в том числе в зависимости от размеров их цитоплазмы, поскольку этот критерий может указывать на уровень синтетической активности лимфоцитов и активность бласттрансформации [2]. Кроме того, представляет интерес изучение соотношения уровня экспрессии молекул L-селектина и уровня экспрессии молекул фазы прочной адгезии – LFA-1, LFA-3 и ICAM-1.

Таким образом, физиологическое осмысление процессов миграции лимфоцитов, а также условий, при которых она может активизироваться или замедляться, является особенно важной для интерпретации резервов стабильности и сохранения гомеостаза.

**Материал и методы.** Проведено обследование 50 лиц (22 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет, не имеющих хронической патологии в анамнезе. Венозную кровь для

исследования брали утром натощак. На проточном цитометре FC-500 фирмы Beckman Coulter определяли экспрессию лимфоцитами молекул L-селектина (CD62L), LFA-1 (CD11a), ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), PECAM-1 (CD31).

На мазке крови, зафиксированном смесью Никифорова и окрашенном по Романовскому-Гимзе, определяли удельный вес лимфоцитов среди других лейкоцитов – эозинофилов, базофилов, нейтрофилов, моноцитов.

При изучении лимфоцитогаммы дифференцировали лимфоциты по величине клетки с учетом размеров цитоплазмы: малые лимфоциты – до 8  $\mu\text{m}$ , средние – от 8 до 12  $\mu\text{m}$ , большие – больше 12  $\mu\text{m}$  [6]. Отдельно выделяли популяцию больших гранулярных лимфоцитов, которые являются морфологическими аналогами естественных киллеров [5].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью SPSS 13.0 for Windows. Распределение параметров было ненормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета медианы (Md) и межквартильного интервала Q25Q75. Вероятность различий оценивали по непараметрическому критерию Колмогорова-Смирнова.

**Результаты и обсуждение.** Общее содержание лимфоцитов периферической крови составило  $2,56 \times 10^9$  кл/л (2,05; 3,2) при этом молекулу L-селектина экспрессировали  $0,32 \times 10^9$  кл/л (0,12; 0,64) лимфоцитов, что составило 11,42% (4,5; 23,38) от общего числа лимфоцитов. У мужчин наблюдали тенденцию к снижению концентрации лимфоцитов с данной молекулой ( $0,25 \times 10^9$  кл/л (0,13; 0,47) против  $0,4 \times 10^9$  кл/л (0,09; 0,71);  $Z = 0,88$ ;  $p = 0,4$ ). Молекулу LFA-1 экспрессировали  $1,73 \times 10^9$  кл/л (1,15; 2,27) лимфоцитов, что составило 67,97% (44,71; 77,69) от общего их числа. У мужчин и женщин различия в уровне лимфоцитов с рецептором LFA-1 не регистрировались ( $1,71 \times 10^9$  кл/л (1,26; 2,37) и  $1,79 \times 10^9$  кл/л (1,08; 2,26);  $Z = 0,67$ ;  $p = 0,75$ ). Среднее содержание лимфоцитов с молекулой ICAM-1 было на уровне  $0,29 \times 10^9$  кл/л (0,1; 0,68), что составило 11,56% (4,37; 21,6) от общего числа лимфоцитов, – без существенных гендерных различий ( $0,24 \times 10^9$  кл/л (0,03; 0,79) против  $0,3 \times 10^9$  кл/л (0,11; 0,61);  $Z = 0,74$ ;  $p = 0,64$ ). Уровень лимфоцитов, экспрессирующих молекулу LFA-3, был равен  $0,91 \times 10^9$  кл/л (0,31; 2,28), что составило 33,02% (12,66; 82,6) от общего числа лимфоцитов. У мужчин концентрация лимфоцитов с рецептором LFA-3 была выше, чем у женщин, но только на уровне тенденции ( $1,36 \times 10^9$  кл/л (0,4; 2,69) про-

тив  $0,91 \times 10^9$  кл/л (0,29; 2,18);  $Z = 0,55$ ;  $p = 0,92$ ). Молекулу PECAM-1 экспрессировали в среднем  $0,41 \times 10^9$  кл/л (0,13; 0,75) лимфоцитов, что составило 12,56% (3,7; 28,6) от общего числа лимфоцитов с тенденцией к более низкому уровню этих клеток у мужчин ( $0,33 \times 10^9$  кл/л (0,07; 0,63) против  $0,55 \times 10^9$  кл/л (0,19; 0,82);  $Z = 0,73$ ;  $p = 0,64$ ).

Малые лимфоциты в структуре лимфоцитогаммы составили 26% (16; 37), среднеплазменные – 44% (36; 50), большие – 10 (5; 16,5), большие гранулярные лимфоциты – 16 (12; 23,5).

Корреляционный анализ между уровнем экспрессии молекул адгезии и концентрацией лимфоцитов, различающихся по размеру цитоплазмы, показал, что при увеличении размеров цитоплазмы лимфоцитов увеличивается количество статистически достоверных корреляций. Так, если содержание малых лимфоцитов коррелировало только с содержанием лимфоцитов с рецептором LFA-1 ( $\rho = 0,38$ ;  $p = 0,03$ ), концентрация среднеплазменных лимфоцитов уже была связана с концентрацией лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы LFA-1 ( $\rho = 0,57$ ;  $p = 0,001$ ), LFA-3 ( $\rho = 0,43$ ;  $p = 0,016$ ), и L-селектином ( $\rho = 0,35$ ;  $p = 0,013$ ). Подобную ситуацию регистрировали в случае больших гранулярных лимфоцитов, тогда как между уровнем больших лимфоцитов и лимфоцитов, экспрессирующих изучаемые молекулы адгезии, статистически значимых корреляций не было выявлено.

Итак, в условиях отсутствия антигенной стимуляции 11,42% лимфоцитов экспрессируют молекулы L-селектина, 67,97% – молекулы LFA-1, 11,56% – ICAM-1, 33,02% – LFA-3, 12,56% – PECAM-1. Как известно, L-селектин обеспечивает роллинг-эффект, и адгезия, вызванная селектинами, обратима, кратковременна и малоэффективна. Более прочную и не обратимую адгезию лимфоцитов на эндотелии обуславливают  $\beta_2$  интегрины, к которым относится молекула LFA-1 [2, 8]. В соответствии с результатами исследования большая часть лимфоцитов экспрессировала эту молекулу – 67,97%, что в 6 раз больше, чем удельная доля лимфоцитов, экспрессирующих молекулу L-селектина (11,42%). Для сравнения, соотношение уровней экспрессии молекул LFA-1 и L-селектина у нейтрофилов составило 1,5, а моноцитов 2,3 [3, 4]. Кроме того, учитывая статистически достоверные корреляции между уровнем среднеплазменных лимфоцитов, а также больших гранулярных лимфоцитов и уровнем экспрессии молекул LFA-1, LFA-3, можно полагать, что к миграции более предрасположены именно среднеплазменные лимфоциты и большие гранулярные лимфоциты, идентифицированные как естественные киллеры. Напротив, между концентрацией больших лимфоцитов статистически достоверных корреляций выявлено не было. А поскольку уровень больших лимфоцитов может указывать на активность лимфопролиферации в периферической крови, создается впечатление, что лимфоциты, вступающие в состояние лимфопролиферации, обладают меньшей способностью к адгезии [1].

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 9–10 см. REFERENCES)

1. Добродеева Л.К. *Грипп и ОРЗ, иммунологическая реактивность коренного и пришлого населения Севера Европейской территории СССР*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Архангельск: 1989.

2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Рыжкова А.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки. *Вестник новых медицинских технологий*. 2009; 16 (2): 14–6.

3. Кашутин С.Л., Пустынная М.В., Гудков А.Б., Данилов С.И., Ключарева С.В., Пирятинская В.А. Уровень экспрессии молекул адгезии на моноцитах, в зависимости от морфологической дифференцировки их ядер. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (10): 21–2.

4. Кашутин С.Л., Данилов С.И., Верещагина Е.Н. Уровень экспрессии молекул адгезии на нейтрофилах, в зависимости от сегментации их ядер. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (11): 45–8.

5. Пичугина Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при иммунодефицитных патологиях. *Лабораторная медицина*. 2008; (9): 39–44.

6. Федоров Н.А. *Нормальное кроветворение и его регуляция*. М.: Медицина; 1976.

7. Филиппова О.Е., Добродеева Л.К., Щеголева Л.С., Шашкова Е.Ю. Соотношение фенотипов лимфоцитов периферической крови у людей в процессе физиологической регуляции иммунного ответа. *Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Медико-биологические науки*. 2014; (4): 73–80.

8. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. *Клетки иммунной системы*. СПб.: 1998.

#### REFERENCES

1. Dobrodeeva L.K. *Influenza and Respiratory Diseases, the Immunological Reactivity of the Radical and Alien Population of the North European Part of the USSR*: Diss. Arkhangel'sk; 1989. (in Russian)

2. Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Ryzhkova A.I. Neutrophil extracellular traps. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; 16 (2): 14–6. (in Russian)

3. Kashutin S.L., Pustynnaya M.V., Gudkov A.B., Danilov S.I., Klyuchareva S.V., Piryatinskaya V.A. The level of adhesion molecules expression on monocytes depending on their morphological differentiation of nuclei. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (10): 21–2. (in Russian)

4. Kashutin S.L., Danilov S.I., Vereshchagina E.N. The level of adhesion molecules expression on neutrophils depending on their nuclei segmentation. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (11): 45–8. (in Russian)

5. Pichugina L.V. Change phenotype of lymphocytes non-immunodeficient pathologies. *Laboratornaya meditsina*. 2008; (9): 39–44. (in Russian)

6. Fedorov N.A. *Normal Hematopoiesis and its Regulation [Normal'noe krovetvorenie i ego regulyatsiya]*. Moscow: Meditsina; 1976. (in Russian)

7. Filippova O.E., Dobrodeeva L.K., Shchegoleva L.S., Shashkova E.Yu. The ratio of the peripheral blood lymphocyte phenotypes in humans in the physiological regulation of the immune response. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Seriya: Mediko-biologicheskie nauki*. 2014; (4): 73–80. (in Russian)

8. Freydlin I.S., Totolyan A.A. *Cells of the Immune System [Kletki immunnnoy sistemy]*. St. Petersburg; 1998. (in Russian)

9. Albert-Wolf M., Meuer S.C., Wallich R. Dual function of recombinant human CD58: inhibition of T cell adhesion and activation via CD2 pathway. *Int. Immunol*. 1991; 3 (12): 1335–47.

10. Koopman G., Keehnen R.M., Lindhout E., Newman W., Shimizu Y., van Seventer G.A. et al. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J. Immunol*. 1994; 152 (8): 3760–7.

Поступила 01.04.16

Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.5-002.525.2-031.81-078.33:681.3

Верижникова Ж.Г.<sup>1</sup>, Александрова Е.Н.<sup>1</sup>, Новиков А.А.<sup>1</sup>, Панафилина Т.А.<sup>1</sup>, Середавкина Н.В.<sup>1</sup>, Попкова Т.В.<sup>1</sup>, Айзина Н.Л.<sup>2</sup>, Насонов Е.Л.<sup>1</sup>

## КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОВ СКРИНИНГОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ, ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ХМАР ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИР им В.А. Насоновой», 115522, Москва;

<sup>2</sup>ГУЗ города Москвы «Детская городская поликлиника № 121 управления здравоохранения Южного административного округа», 115580, Москва

*Антинуклеарные антитела (АНА) – гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными компонентами ядра и цитоплазмы. АНА – основной серологический маркер системной красной волчанки (СКВ). Внедрение в клиническую практику новых высокопроизводительных методов иммунного анализа с использованием автоматизированных систем создает предпосылки для стандартизации и улучшения воспроизводимости определения АНА.*

*Цель работы – сравнить диагностическое значение автоматизированных методов скринингового определения АНА (непрямой реакции иммунофлюоресценции на клетках HEp-2 (НРИФ-HEp-2), иммуноферментного анализа (ИФА) и мультиплексного иммунного анализа (МИА) с использованием суспензионной технологии xMAP) в сыворотках больных СКВ. Исследованы сыворотки 94 пациентов с СКВ. Группу сравнения составили 70 больных другими ревматическими заболеваниями; контрольная группа состояла из 30 здоровых доноров. Скрининговое определение АНА методом НРИФ-HEp-2 проводили на автоматической платформе AKLIDES, ИФА – на автоматическом анализаторе ALEGRIA, МИА – при помощи BioPlex 2200.*

*Метод НРИФ-HEp-2 показал наиболее высокую диагностическую чувствительность (ДЧ) по сравнению с ИФА и МИА-BioPlex 2200 (96,8; 79,8 и 82,9% соответственно). Общая диагностическая специфичность (ДС) определения АНА методом НРИФ-HEp-2 была ниже таковой у ИФА и МИА-BioPlex 2200 (40, 70 и 57% соответственно). В группе здоровых доноров наиболее низкую ДС имел скрининговый анализ АНА с помощью МИА-BioPlex 2200 (80%), в то время как при использовании НРИФ-HEp-2 и ИФА показатели ДС составляли 93,3 и 96,7% соответственно. Исследование АНА к смеси из 26 ядерных антигенов методом ИФА было целесообразным лабораторным тестом для диагностики СКВ (отношение правдоподобия положительного результата – 2,66). По уровню отношения правдоподобия отрицательного результата НРИФ-HEp-2 – более информативный тест для исключения диагноза СКВ, чем методы ИФА и МИА-BioPlex 2200 (0,08; 0,29 и 0,3 соответственно).*

*Таким образом, определение АНА методом НРИФ-HEp-2 служит наиболее предпочтительным первичным скрининговым тестом для диагностики СКВ. ИФА антител к смеси ядерных антигенов и МИА на основе технологии xMAP – менее предпочтительные скрининговые тесты для диагностики СКВ по сравнению с НРИФ-HEp-2 из-за наличия ложноотрицательных результатов в 20 и 17% случаев соответственно. ИФА и МИА более целесообразно использовать как подтверждающие тесты, позволяющие определять антиген-специфические АНА у больных СКВ с положительными результатами НРИФ-HEp-2.*

**Ключевые слова:** антинуклеарные антитела; скрининговое определение; клиническая информативность; непрямая реакция иммунофлюоресценции; иммуноферментный анализ; мультиплексный иммунный анализ; системная красная волчанка.

**Для цитирования:** Вержникова Ж.Г., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Панафилина Т.А., Середавкина Н.В., Попкова Т.В., Айзина Н.Л., Насонов Е.Л. Клиническая информативность автоматизированных методов скринингового определения антинуклеарных антител с использованием непрямой реакции иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и мультиплексной технологии ХМАР при системной красной волчанке. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 173-177. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-173-177>

*Verzhnikova Zh.G.<sup>1</sup>, Aleksandrova E.N.<sup>1</sup>, Novikov A.A.<sup>1</sup>, Panafidina T.A.<sup>1</sup>, Seredavkina N.V.<sup>1</sup>, Popkova T.V.<sup>1</sup>, Aizina N.L.<sup>2</sup>, Nasonov E.L.<sup>1</sup>*

THE CLINICAL INFORMATIVENESS OF AUTOMATED METHODS OF SCREENING DETECTION OF ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES USING INDIRECT REACTION OF IMMUNE FLUORESCENCE, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND MULTIPLEX XMAP TECHNOLOGY UNDER SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

<sup>1</sup>The V.A. Nasonova research institute of rheumatology, 115522 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The children municipal polyclinic №121 of the health department of the southern administrative okrug, 115580 Moscow, Russia

*The antinuclear antibodies (ANA) consist heterogeneous group of auto antibodies reacting with various components of nucleus and cytoplasm. The ANA is a main serological marker of systemic lupus erythematosus (SLE). The implementation in clinical practice of new highly productive techniques of immune analysis using automated systems sets up prerequisites for standardization and amelioration of reproducibility of detection of ANA.*

**Для корреспонденции:** Вержникова Жанна Григорьевна, врач КЛД лаб. клин. иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний; e-mail: [verzhnikovs@gmail.com](mailto:verzhnikovs@gmail.com)

*The study was carried out to compare diagnostic significance of automated techniques of screening detection of ANA (indirect immunofluorescence test on cells HEp-2 (IIFT-HEp-2)), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and multi-complex immune analysis (MIA, using suspension technology xMAP) in serum of patients with SLE.*

*The serums from 94 patients with SLE were analyzed. The comparison group included 70 patients with other rheumatic diseases. The control group consisted of 30 healthy donors. The screening detection of ANA using technique IIFT-HEp-2 was implemented on automated platform AKLIDES, ELISA - on automated analyzer ALEGRIA and MIA on automated analyzer BioPlex 2200.*

*The technique IIFT-HEp-2 demonstrated the most high diagnostic sensitivity as compared with ELISA and MIA- BioPlex 2200 (96.8%; 79.8% and 82.9% correspondingly). The general diagnostic specificity of detection of ANA using technique IIFT-HEp-2 was lower than in case of ELISA and MIA-BioPlex 2200 (40%, 70% and 57% correspondingly). In the group of healthy donors the lowest diagnostic specificity was observed in ANA screening analysis using MIA-BioPlex 2200 (80%) while in case of applying IIFT-HEp-2 and ELISA indices of diagnostic specificity made up 93.3% and 96.7% correspondingly. The ANA analysis of mix of 26 nuclear antigens using ELISA technique was a reliable laboratory test for diagnostic of SLE (likelihood ratio of positive result - 2.66). By the level of likelihood ratio of negative result of the IIFT-HEp-2 technique was more informative test for exclusion of diagnosis of SLE than techniques of ELISA and MIA-BioPlex 2200 (0.08; 0.29 and 0.3 correspondingly).*

*The detection of ANA using technique of is the most preferable primary screening test for diagnostic of SLE. The ELISA of antibodies to mix of nuclear antigens and MIA on the basis of xMAP technology are less preferable screening tests for diagnostic of SLE as compared with IIFT-HEp-2 because of false-negative results in 20% and 17% of cases correspondingly. ELISA and MIA are to applied as confirmatory screening tests permitting to detect antigen-specific ANA in patients with SLE with positive results of IIFT-HEp-2.*

**Key words:** *antinuclear antibodies; screening detection; clinical informativeness; indirect immunofluorescence test; immunoenzyme analysis; multiplex immune analysis; systemic lupus erythematosus*

**For citation:** *Verizhnikova Zh.G., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Panafidina T.A., Seredavkina N.V., Popkova T.V., Aizina N.L., Nasonov E.L. The clinical informativeness of automated methods of screening detection of anti-nuclear antibodies using indirect reaction of immune fluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay and multiplex XMAP technology under systemic lupus erythematosus. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 173-177. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-173-177>*

**For correspondence:** *Verizhnikova Zh.G., physician of of laboratory of clinical immunology and molecular biology of rheumatic diseases. e-mail: [verizhnikovs@gmail.com](mailto:verizhnikovs@gmail.com)*

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

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

Received 13.07.2016  
Accepted 01.08.2016

Системная красная волчанка (СКВ) – аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся поликлональной активацией В-клеток и гиперпродукцией широкого спектра органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и цитоплазмы, вызывающих иммуновоспалительное повреждение тканей и внутренних органов [1]. Антиядерные антитела (АНА) – основной серологический маркер СКВ. В сыворотках пациентов с СКВ обнаруживают антитела к ДНК, гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (ЭЯА) (Sm, U1RNP, Ro/SSA, La/SSB, рибосомальному белку Р – RibP), ядрышковым антигенам и другим клеточным структурам [2–4]. Положительные результаты определения АНА входят в число диагностических критериев СКВ [4–6]; их применяют для оценки активности, прогноза и характеристики отдельных клинико-лабораторных субтипов заболевания [2–4, 6–8]; они служат предикторами развития СКВ у бессимптомных пациентов [9].

В последние годы особое внимание уделяют методическим аспектам определения АНА [3, 4, 10, 11]. Современные методы исследования АНА основаны на применении высокотехнологичных автоматизированных систем с использованием как униплексных технологий (непрямая реакция иммунофлуоресценции (НРИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноблот, хемилюминесцентный иммунный анализ), так и мультиплексных диагностических платформ. Актуальная проблема диагностики СКВ – стандартизация и клиническая валидация новых методов выявления АНА, включающая оценку их диагностической значимости и разработку алгоритмов тестирования аутоантител [10, 12].

Международными экспертами рекомендована двухэтапная стратегия определения АНА в сыворотке крови: на 1-м этапе проводят скрининг АНА методом НРИФ с использованием в качестве субстрата HEp-2 клеток (эпителиальные клетки рака горлани человека) (НРИФ-HEp-2); на 2-м этапе пациентам с положительными результатами НРИФ-HEp-2 проводят подтвержда-

ющие («рефлекс») тесты для выявления специфических антигенов к отдельным ядерным антигенам (двухспиральной-дсДНК, ЭЯА) с помощью ИФА, иммуноблота (ИБ), хемилюминесцентного иммунного анализа (ХЛИА), мультиплексного иммунного анализа (МИА) [3, 4, 13]. Особо отмечают необходимость внедрения в лабораторную практику автоматизированных систем интерпретации клеточных флуоресцентных тестов с целью стандартизации и улучшения воспроизводимости НРИФ-HEp-2 при первичном скрининговом исследовании АНА [10, 14]. В то же время активно обсуждают возможность скринингового исследования АНА с помощью ИФА, МИА и других методов твердофазного анализа [3, 10, 12, 15].

Цель данного исследования – сравнить диагностическое значение трех автоматизированных методов скринингового определения АНА (НРИФ-HEp-2, ИФА и МИА) в сыворотках пациентов с СКВ.

**Материал и методы.** Исследованы сыворотки 94 пациентов с верифицированным диагнозом СКВ согласно критериям SLICC 2012 г. (80 женщин и 14 мужчин) в возрасте 35,9 (16,0–65,0) лет с длительностью заболевания 113,5 (2,0–576,0) мес, наблюдавшихся в НИИР им. В.А. Насоновой в 2016 г. У большинства пациентов отмечали хронический вариант течения СКВ. Активность заболевания по шкале SLEDAI-2K составляла 9,7 (0–40) балла, индекс повреждения SLICC/ACR Damage Index (ИП) соответствовал 1,6 (0–18) балла.

В группу сравнения вошли 70 больных: 10 – синдромом Шегрена (СШ), 16 – системной склеродермией (ССД), 10 – ревматоидным артритом (РА), 14 – полимиозитом/дерматомиозитом (ПМ/ДМ), 10 – анкилозирующим спондилитом (АС), 10 – остеоартрозом (ОА). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Образцы сывороток крови хранили при -70°C.

Скрининговое исследование АНА в сыворотках крови

Таблица 1

**Клиническая информативность трех автоматизированных методов скринингового определения АНА в сыворотках пациентов с СКВ (НРИФ-HEp-2, ИФА и МИА-BioPlex 2200) (n = 94)**

Метод	Диагностическая чувствительность, %	Диагностическая специфичность, %				ОП общая	
		системные аутоиммунные ревматические заболевания (n = 50)	другие ревматические заболевания (n = 20)	здоровые доноры (n = 30)	общая группа (n = 100)	ПР	ОР
НРИФ-HEp-2	96,8*‡	10,0	35,0	93,3	40,0*‡	1,61	0,08
ИФА	79,8	42,0	100,0	96,7	70,0	2,66	0,29
МИА-BioPlex 2200	82,9	34,0	80,0	80,0	57,0	1,93	0,3

Примечание. ОП – отношение правдоподобия; ПР – положительный результат, ОР – отрицательный результат. \* –  $p < 0,05$  по отношению к ИФА; ‡ –  $p < 0,05$  по отношению к МИА-BioPlex 2200.

проводили тремя автоматизированными методами: НРИФ-HEp-2 с помощью автоматизированной системы AKLIDES (Medipan GmbH, ФРГ), ИФА на анализаторе Alegria (ANA-detect, Orgentec, ФРГ) и МИА на основе суспензионной технологии xMAP (BioPlex 2200 ANA Screen, Laboratories Inc. Hercules, CA, США). Позитивные результаты измерения АНА соответствовали следующим значениям:  $\geq 1:160$  (НРИФ-HEp-2),  $\geq 1,3$  у. е. (ИФА) и  $\geq 1,0$  AI (Antibody Index) (МИА-BioPlex 2200).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для измерения степени согласованности результатов определения АНА различными методами использовали коэффициент каппа (κ) Коэна [16]. Результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75 процентиля. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Оценивали клиническую информативность скрининговых методов исследования АНА путем расчета диагностической чувствительности и специфичности (ДЧ и ДС), отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата теста (ОППР и ОПОР).

**Результаты.** При скрининговом исследовании АНА в сыворотке крови степень согласованности результатов (κ) между НРИФ-HEp-2 и ИФА (0,438), НРИФ-HEp-2 и МИА-BioPlex 2200 (0,426) была ниже, чем у ИФА и МИА-BioPlex 2200 (0,726). У больных СКВ скрининговое определение АНА методом НРИФ-HEp-2 показало наиболее высокую ДЧ по сравнению с ИФА и МИА-BioPlex 2200 (96,8; 79,8 и 82,9% соответственно,  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

При использовании НРИФ-HEp-2 ложноотрицательные результаты скринингового исследования АНА регистрировали у 3% больных СКВ, ИФА – у 20%, МИА-BioPlex 2200 – у 17%. Общая ДС определения АНА методом НРИФ-HEp-2 была ниже таковой у ИФА и МИА-BioPlex 2200 (40, 70 и 57% соответственно,  $p < 0,05$ ). В группе здоровых доноров наиболее низкую ДС имел скрининговый анализ АНА с помощью МИА-BioPlex 2200 (80%), в то время как при использовании НРИФ-HEp-2 и ИФА показатели ДС составляли 93,3 и 96,7% соответственно. Исследование АНА к смеси из 26 ядерных антигенов методом ИФА являлось целесообразным лабораторным тестом для диагностики СКВ (ОППР – 2,66). По уровню ОПОР НРИФ-HEp-2 – более информативный тест для исключения диагноза СКВ, чем методы ИФА и МИА-BioPlex 2200 (0,08; 0,29 и 0,3 соответственно).

**Обсуждение.** Согласно международным рекомендациям золотым стандартом и первичным скрининговым методом определения совокупности АНА в сыворотке крови служит НРИФ-HEp-2, позволяющая выявлять антитела к 100–150 ядерным антигенам [3–5, 13, 17, 18]. Вместе с тем в практике клинко-диагностических лабораторий широкое распространение получили скрининговые методы определения АНА на основе ИФА, ХЛИА, ИБ и мультиплексных биоаналитических технологий. По мнению экспертов Европейской

Таблица 2

**Диагностическое значение различных методов скринингового определения АНА в сыворотках больных СКВ**

Автор, год	n	Метод	Диагностическая чувствительность, %	Диагностическая специфичность, %				ОП	
				САРЗ	РЗ	ЗД	общая группа	положительный результат	отрицательный результат
Shovman O., 2005 [20]	113	ИФА	93,0	18,3	71,0	93,0	60,8	2,37	0,12
		AthenaMultiLyte	91,0	17,0	73,0	94,0	61,3	2,35	0,15
Moder K.G., 2007 [21]	332	ИФА	81,4	20,6	–	–	–	1,03	0,89
		BioPlex 2200	66,3	37,1	–	–	–	1,05	0,91
Bonilla E., 2007 [23]	35	НРИФ-HEp-2 (>1:50)	90,6	–	–	–	76,0	3,78	0,12
		AthenaMultiLyte	49,1	–	–	–	87,0	3,78	0,59
Hanly J.G., 2010 [22]	192	НРИФ-HEp-2 (>1:160)	81,3	–	–	–	–	–	–
		ИФА	46,6	–	–	–	–	–	–
		BioPlex 2200	75,5	–	–	–	–	–	–
Op de Beeck K., 2012 [24]	80	НРИФ-HEp-2000 (>1:80)	90,0	28,8	–	94,0	61,4	2,33	0,16
		BioPlex 2200	79,0	25,7	–	94,6	60,2	1,98	0,35
Bruner B.F., 2012 [25]	1540	НРИФ-HEp-2 (>1:120)	85,6	–	–	81,7	–	4,67	0,18
		BioPlex 2200	67,4	–	–	90,5	–	7,10	0,36
Tozzoli R., 2013 [10]	95	НРИФ-HEp-2 (>1:80)	89,5	38,4	–	95,0	66,7	2,69	0,16
		BioPlex 2200	81,1	29,5	–	94,2	61,9	2,13	0,31
Scholz J., 2015 [26]	174	НРИФ-HEp-2 AKLIDES (>1:80)	98,9	8,4	–	83,2	45,8	1,82	0,02
		CytoBeadANA	100	2,5	–	80,2	41,4	1,71	∞

антиревматической лиги (EULAR) и Американской коллегии ревматологов (ACR), данные методы твердофазного анализа не могут заменить первичный скрининг АНА с помощью НРИФ-HEp-2, так как идентифицируют антитела к ограниченному количеству (8–10) очищенных/рекомбинантных антигенов или смеси антигенов (ядерному гомогенату) с измененными либо утраченными эпитопами, что приводит к увеличению числа ложноотрицательных результатов до 35% [19]. Мы также обнаружили более высокую частоту ложноотрицательных результатов скринингового исследования АНА в сыворотках больных СКВ методами ИФА (20%) и МИА-BioPlex 2200 (17%) по сравнению с НРИФ-HEp-2 (3%). При этом показали, что определение АНА методом НРИФ-HEp-2 с использованием автоматизированной платформы AKLIDES обладает большей ДЧ, чем ИФА и МИА-BioPlex 2200, а по уровню ОПОР скрининг АНА в НРИФ-HEp-2 оказывается самым результативным тестом ( $< 0,2$ ) для исключения диагноза СКВ. В нашей работе общая ДС всех трех скрининговых методов измерения АНА в сыворотках пациентов с СКВ имела низкие значения (от 40 до 70%). Уровень ОППР ( $> 2$  и  $\leq 5$ ) позволял отнести ИФА АНА к числу предпочтительных скрининговых тестов для диагностики СКВ. Данные литературы, касающиеся изучения клинической информативности различных скрининговых методов выявления АНА при СКВ, немногочисленны и весьма противоречивы, что может быть обусловлено различиями в тест-системах, значениях «cut off» и подборе групп больных (табл. 2) [10, 20–26].

При скрининговом выявлении АНА суспензионные мультиплексные технологии и ИФА в большинстве случаев демонстрируют меньшую ДЧ по сравнению с НРИФ-HEp-2, что согласуется с данными нашего исследования [10, 22–25]. Общая ДС различных скрининговых методов определения АНА при СКВ, как и в нашей работе, была невысокой и составляла в среднем 62%. Зарубежными авторами получены сходные с нашими данные о наибольшей информативности НРИФ-HEp-2 для исключения диагноза СКВ по уровню ОПОР ( $< 0,2$ ) [10, 23–26]. Вместе с тем в ряде исследований скрининговое определение АНА с помощью НРИФ-HEp-2 обладало более высокими показателями ОППР (2,3–4,7) для диагностики СКВ, чем в нашей работе [10, 23–25]. Результаты сравнительной оценки ОППР скрининговых тестов для измерения АНА в сыворотках больных СКВ на основе ИФА и МИА имеют неоднозначный характер [10, 20–26]. Таким образом, преимущества и ограничения ИФА и МИА по сравнению с классическим скрининговым методом определения АНА при СКВ на основе НРИФ-HEp-2 нуждаются в дальнейшем изучении. В связи с этим в рекомендациях EULAR и ACR подчеркивают, что лаборатории, проводящие скрининговое определение АНА с помощью ИФА, ИБ, МИА и других твердофазных методов иммунного анализа, должны предоставить данные о такой же или более высокой чувствительности и специфичности этих техник по сравнению с НРИФ-HEp-2 [3, 4, 13]. Международные рекомендации (2013) допускают применение новых иммунометрических методов для одноэтапного скрининга и тестирования АНА при условии обязательного проведения повторного исследования АНА с помощью НРИФ-HEp-2 в случае расхождения результатов измерения АНА с клиническими данными [3].

#### Выводы

1. Определение АНА методом НРИФ-HEp-2 служит наиболее результативным первичным скрининговым тестом для диагностики СКВ.

2. ИФА антител к смеси ядерных антигенов и МИА на основе технологии xMAP – менее предпочтительные скрининговые тесты для диагностики СКВ по сравнению с НРИФ-HEp-2 из-за наличия ложноотрицательных результатов в 20 и 17% случаев соответственно.

3. ИФА и МИА более целесообразно использовать как подтверждающие тесты, позволяющие определять антиген-специфические АНА у пациентов с СКВ с положительными результатами НРИФ-HEp-2.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–13, 15–26 см. REFERENCES)

1. Системная красная волчанка. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Ревматология. Клинические рекомендации*. 2-е издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010: 429–81.
2. Александрова Е.Н., Новиков А.А. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Ревматология. Клинические рекомендации*. 2-е издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010: 19–76.
14. Александрова Е.Н., Верижникова Ж.Г., Новиков А.А., Баранов А.А., Абайтова Н.Е., Лапкина Н.А. и др. Автоматизированный анализ антиядерных антител методом непрямой реакции иммунофлюоресценции с использованием HEp-2 клеток. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (3): 30–5.

#### REFERENCES

1. Systemic lupus erythematosus. In: Nasonov E.L., ed. *Rheumatology. Clinical Guidelines [Revmatologiya. Klinicheskie rekomendatsii]*. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2010: 429–81. (in Russian)
2. Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases. In: Nasonov E.L., ed. *Rheumatology. Clinical Guidelines [Revmatologiya. Klinicheskie rekomendatsii]*. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2010: 19–76. (in Russian)
3. Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M. et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73 (1): 17–23.
4. Solomon D.H., Kavanaugh A.J., Schur P.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002; 47 (4): 434–44.
5. Kavanaugh A.F., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2002; 47 (5): 546–55.
6. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (8): 2677–86.
7. Hengstman G.J., van Engelen B.G., Venrooij W.J. Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004; 16 (6): 692–9.
8. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124 (1): 71–81.
9. Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007; 56 (6): 1736–44.
10. Tozzoli R., Bonaguri C., Melegari A., Antico A., Bassetti D., Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51 (1): 129–38.
11. Meroni P.L., Biggoggero M., Pierangeli S.S., Sheldon J., Zegers I., Borghi M.O. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014; 10 (1): 35–43.
12. Mahler M., Meroni P.L., Bossuyt X., Fritzler M.J. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 315 179.
13. Meroni P.L., Schur P.H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69 (8): 1420–2.
14. Aleksandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Baranov

- A.A., Abaytova N.E., Lapkina N.A. et al. The automated analysis of anti-nuclear antibodies using technique of indirect reaction of immunofluorescence with application of HEP-2-cells. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60 (3): 30–5. (in Russian)
15. Sohn K.Y., Khan W.I. ANA Testing. From Microscopy to Multiplexing. *Clinical Laboratory News*. 2014; 40 (6). Available at: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2014/june/ana-testing>.
16. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Measurement*. 1960; 20: 137–46.
17. Tozzoli R., Bizzaro N., Tonutti E., Villalta D., Bassetti D., Manoni F. et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117 (2): 316–24.
18. Reveille J.D., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003; 49 (3): 399–412.
19. Satoh M., Tanaka S., Chan E.K. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmunehrheumatic diseases. *Front. Immunol.* 2015; 6: 181.
20. Showman O., Gilburd B., Zandman-Goddard G., Yehiely A., Langevitz P., Shoenfeld Y. Multiplexed AteNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2005; 38 (1): 105–9.
21. Moder K.G., Wener M.H., Weisman M.H., Ishimori M.L., Wallace D.J., Buckeridge D.L. et al. Measurement of antinuclear antibodies by multiplex immunoassay: a prospective, multicenter clinical evaluation. *J. Rheumatol.* 2007; 34 (5): 978–86.
22. Hanly J.G., Thompson K., McCurdy G., Fougere L., Theriault C., Wilton K. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Methods*. 2010; 352 (1–2): 147–52.
23. Bonilla E., Francis L., Allam F., Ogrinc M., Neupane H., Phillips P.E. et al. Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Immunol.* 2007; 124 (1): 18–21.
24. Op De Beeck K., Vermeersch P., Verschuerec P., Westhoven R., Marien G., Blockmans D. et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun. Rev.* 2012; 12 (2): 137–43.
25. Bruner B.F., Guthridge J.M., Lu R., Vidal G., Kelly J.A., Robertson J.M. et al. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (11): 3677–86.
26. Scholz J., Grossmann K., Knütter I., Hiemann R., Sowa M., Röber N. et al. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (12): 1991–2002.

Поступила 13.07.16

Принята к печати 01.08.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-056.257-092:612.124.017.11-07

Драпкина О.М.<sup>1</sup>, Шойбонов Б.Б.<sup>1,2</sup>, Елиашевич С.О.<sup>1</sup>

## СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ С3-КОНВЕРТАЗЫ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

<sup>1</sup>ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава РФ; 101990, Москва;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва

*Разработан метод определения стабилизации С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента в сыворотке крови человека. Метод включает в себя два этапа и основан на проведении реакции лизиса сенсibilизированных антителами эритроцитов барана 0,8% сывороткой крови человека. Предварительно проводят инкубацию двух проб (опытной и контрольной) в течение 10 мин, затем реакцию активации комплемента останавливают добавлением буфера, содержащего 10 мМ ЭДТА. В контрольной пробе определяют степень лизиса эритроцитов, а опытную пробу дополнительно инкубируют в течение 30 мин при 37°С, затем определяют степень лизиса. Активность С3-конвертазы рассчитывают как разность между степенью лизиса в опытной и контрольной пробах. При разнице более 10% расценивают как патологическое состояние, обусловленное стабилизацией С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента. Проведены исследования стабилизации С3-конвертазы классического пути активации комплемента у 31 пациента с абдоминальным ожирением. Показано, что у 87% больных с абдоминальным ожирением выявлена стабилизация С3-конвертазы.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** система комплемента; ЭДТА; стабилизация С3-конвертазы; C3a-desArg; абдоминальное ожирение.

**Для цитирования:** Драпкина О.М., Шойбонов Б.Б., Елиашевич С.О. Способ оценки функциональной активности С3-конвертазы классического пути активации комплемента. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (3): 177–181. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-177-181>

*Drapkina O.M.<sup>1</sup>, Shoibonov B.B.<sup>1,2</sup>, Eliashevich S.O.<sup>1</sup>*

THE MODE OF EVALUATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF C3-CONVERTASE OF CLASSIC PATH OF ACTIVATION OF COMPLEMENT

<sup>1</sup>The state research center of preventive medicine of Minzdrav of Russia, 101990 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The P.K. Anokhin research institute of normal physiology, 125315 Moscow, Russia

**Для корреспонденции:** Шойбонов Батожаб Батожаргалович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения ФФГУ Научно-исследовательский центр профилактической медицины, e-mail: shoibonov@mail.ru

*The technique of detection of stabilization of C3-convertase classical way of activation of system of complement in human blood serum. The technique comprises two stages and is based on applying a reaction of lysis of erythrocytes of sheep sensitized by antibodies using 0.8% human blood serum. Preliminary an incubation of two samples (experimental and control) is applied during 10 min. and then reaction of activation of complement is stopped by adding a buffer containing 10 mM of EDTA. In control sample degree of lysis of erythrocytes is established and experimental sample is additionally incubated during 30 min at 37°C and then degree of lysis is determined. The activity of C3-convertase is calculated as a difference between degree of lysis in experimental and control samples. The difference more than 10% is considered as a pathological state conditioned by stabilization of C3-convertase of classical way of activation of system of complement. The studies were carried out concerning stabilization of C3-convertase of classical way of activation of complement in 31 patients with abdominal obesity. It is demonstrated that in 87% of patients with abdominal obesity stabilization of C3-convertase was established.*

**Key words:** system of complement; EDTA; stabilization of C3-convertase; C3a-desArg; abdominal obesity.

**For citation:** Drapkina O.M., Shoibonov B.B., Eliashevich S.O. The mode of evaluation of functional activity of C3-convertase of classic path of activation of complement. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 177-181. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-177-181>*

**For correspondence:** Shoibonov B.B., candidate of chemical sciences, leading researcher of the department of fundamental and applied aspects of obesity. e-mail: shoibonov@mail.ru

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

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

Received 05.08.2016  
Accepted 20.08.2016

**Введение.** Система комплемента – составная часть врожденного иммунитета, которая участвует главным образом в антибактериальной защите, индукции и усилении гуморального иммунного ответа, солибилизации и элиминации иммунных комплексов [1]. Активация системы комплемента – один из эффекторных механизмов воспаления, филогенетически возникший ранее высокоспециализированного антительного ответа на антигены. Функционирование комплемента обеспечивается благодаря содружественному взаимодействию около 40 белков крови, которые обладают протеолитическими свойствами и активируются по каскадному принципу. Часть белков находятся в свободном состоянии в крови, другая часть оказываются мембраносвязанными [2].

Известны три пути активации системы комплемента: классический, альтернативный и лектиновый. Центральный ферментативный комплекс всех путей активации – C3-конвертаза. Перефразируя известную поговорку времен раннего Средневековья «все дороги ведут в Рим», можно сказать, что «все дороги ведут к C3». Ключевой момент любого из каскадов активации комплемента – расщепление C3 компонента на C3a и C3b, осуществляемое C3-конвертазой. Присоединение дополнительных молекул C3b к C3-конвертазе приводит к образованию C5-конвертаз, которые расщепляют C5 на C5a и C5b и запускают реакцию формирования мембраноатакующего комплекса (МАК) – гидрофобного «зонда», который, внедряясь в липидный бислой, приводит к разрыву клеточной мембраны и лизису клеток-мишеней [2, 3].

Классический путь является Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-зависимым каскадом, который в норме запускают иммунные комплексы, активирующие C1, первый компонент комплемента, который содержит одну молекулу C1q и по две молекулы C1r и C1s. Активация C1 в результате связывания C1q-субкомпонента с Fc-фрагментом иммуноглобулинов иммунного комплекса и образования активных протеиназ C1r и C1s инициирует ферментативный каскад комплемента, приводящий к образованию C3-конвертазы классического пути (C4bC2a) [4, 5]. Период полураспада C4bC2a составляет в норме около 3–5 мин, и образовавшиеся в ходе реакции C3a и C3b имеют наряду с последующей каскадной активацией и формированием МАК свои провоспалительные, иммуномодулирующие и метаболические эффекты.

Ранее установлена роль C3, C4, C3a, C5a белков системы комплемента как предикторов риска больших сердечно-сосудистых событий (инфаркта, инсульта) [6]. Компоненты

комплемента широко изучают в качестве биомаркеров риска сердечно-сосудистых катастроф в проспективных клинических исследованиях. Так, показано, что высокий уровень C3 служит предиктором риска больших сердечно-сосудистых событий (фатальный/нефатальный инфаркт миокарда, инсульт) в когорте здоровых мужчин и женщин [7]. Среди пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС) после проведения аортокоронарного шунтирования, повышенный уровень C3 компонента был ассоциирован с риском смерти и ИМ у женщин [8]. В когорте здоровых мужчин уровень C4-компонента коррелировал с риском смерти и развитием ИМ [9]. Кроме этого, изучали взаимосвязь активированных C3-конвертазой компонентов системы комплемента. Так, C3a и C5a продемонстрировали свою предикторную ценность в выявлении лиц с субклиническим атеросклерозом [10]. В когорте пациентов с диагностированной ИБС повышение уровня C3a и C5a было ассоциировано с риском рестеноза стента с лекарственным покрытием [11]. У лиц с верифицированным атеросклерозом периферических артерий нижних конечностей C5a служил предиктором больших сердечно-сосудистых событий [12].

Большие перспективы открываются при изучении инактивированной формы C3a компонента. C3a служит мощным анафилатоксином, увеличивающим проницаемость кровеносных сосудов в очаге и способствующим миграции фагоцитирующих клеток и факторов гуморального иммунитета. Под действием карбоксипептидаз В и N происходит инаktivация C3a с образованием C3a-desArg – белка, стимулирующего ацилирование в реакции синтеза триглицеридов в печени и жировой ткани [13]. Белки комплемента по отдельности широко изучают, однако в этом контексте не было предпринято попыток по определению функциональной активности ключевого ферментного комплекса – C3-конвертазы. Для изучения функциональной активности C3-конвертазы мы спланировали и провели исследование.

Цель исследования – разработка метода определения стабилизации C3-конвертазы классического пути активации комплемента и оценка вклада функциональной активности C3-конвертазы в процессы развития комплемент-опосредованного ожирения.

**Материал и методы.** В работе использовали 5,5-дизилбарбитуровую кислоту (веронал) и ее натриевую соль (мединал), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА)

фирмы Serva (ФРГ), остальные реактивы (квалификация не ниже ч. д. а.). Эритроциты барана, консервированные для реакции связывания комплемента, предоставлены ЗАО «ЭКО-лаб» (Электрогорск, Россия). Приготовление эритроцитов барана (ЭБ), эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика (ЭБ-А<sub>к</sub>), изотонического вероналового буфера (VBS), буфера, содержащего ионы Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (VBS<sup>2+</sup>) или ЭДТА (VBS-E), описано в работе [14].

Полученные данные были статистически обработаны с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2015 и надстройки Attestat for Excel 12.0.5. В зависимости от типа данных и с учетом характера распределения применяли критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проведении корреляционного анализа использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные в тексте представлены в виде средней арифметической и ее среднеквадратичного отклонения (M±SD) при параметрическом распределении. При распределении, отличном от нормального, данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q25–Q75)). Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения  $p < 0,05$ .

**Результаты. Определение оптимальной концентрации буфера для полного ингибирования активации системы комплемента.** К 200 мкл суспензии эритроцитов барана (ЭБ) ( $1,5 \cdot 10^8$  кл/мл) добавляли 40 мкл разведенной 1:9 пулированной сыворотки крови человека от 10 здоровых доноров и 20–100 мкл VBS-E (интервал концентрации 0,4–2,0 ммоль/л ЭДТА в системе), доводили объем до 500 мкл буфером VBS<sup>2+</sup> и инкубировали 30 мин при 37°C. Одновременно проводили контроль на спонтанный (200 мкл ЭБ + 200 мкл VBS<sup>2+</sup>) и полный лизис ЭБ (200 мкл ЭБ + 200 мкл H<sub>2</sub>O). После инкубации останавливали реакцию гемолиза добавлением 2,5 мл охлажденного 0,15 М раствора NaCl, центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин и определяли степень гемолиза по величине A<sub>405</sub> супернатанта. Степень лизиса эритроцитов (У) рассчитывали по формуле:

$$Y(\%) = [(X-R)/(H-R)] \cdot 100,$$

где: H, R и X – величины оптической плотности A<sub>405</sub> супернатанта в гемолитических системах при полном лизисе, в контроле спонтанного лизиса ЭБ и в опытной пробе соответственно.

Степень ингибирования (СИ) определяли как разность показателей лизиса в контрольной пробе и в опытных пробах, содержащих возрастающие концентрации VBS-ЭДТА, по формуле:

$$СИ(\%) = (100 - Y),$$

где: 100 – степень лизиса в контрольной пробе, Y – степень лизиса в опытных пробах. Полученные данные приведены в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, лизис эритроцитов барана ингибируется дозозависимо при повышении концентрации ЭДТА в гемолитической системе. Таким образом, при концентрации ЭДТА в системе выше 1,4 ммоль/л наблюдают полное ингибирование гемолитической активности системы комплемента за счет хелатирования ионов кальция и магния.

**Методика определения функциональной активности C3-конвертазы классического пути активации системы компле-**

**мента.** Определение активности C3-конвертазы классического пути основано на том, что период полураспада C3-конвертазы составляет около 3–5 мин, и при добавлении буфера, содержащего ЭДТА, при связывании ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> полностью ингибируется активация комплемента по всем трем путям активации. Согласно разработанной нами методике 200 мкл эритроцитов барана ( $1,5 \cdot 10^8$  кл/мл) инкубировали в течение 10 мин с 4 мкл сыворотки крови человека в конечном объеме 500 мкл, доведенном буфером VBS<sup>2+</sup>. Реакцию активации комплемента останавливали добавлением 100 мкл буфера VBS, содержащего 10 мМ ЭДТА. В контрольную пробу сразу добавляли 2,5 мл охлажденного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень лизиса. Опытную пробу инкубировали дополнительно в течение 30 мин при 37°C. После инкубации определяли степень лизиса. Активность C3-конвертазы определяли как разность между степенью лизиса в опытной и контрольной пробах. Референсным значением для степени стабилизации C3-конвертазы считали 10%.

Проведены результаты исследования функциональной активности C3-конвертазы в сыворотках крови 20 доноров. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, в 5 сыворотках активность C3-конвертазы была больше 10% и в среднем составила  $13,8 \pm 2,0\%$ . В оставшихся 15 пробах среднее значение активности C3-конвертазы составило  $3,8 \pm 1,9\%$ . Активность C3-конвертазы на уровне  $3,8 \pm 1,9\%$  согласуется с литературными данными. Повышенная почти в 4 раза активность C3-конвертазы в 5 сыворотках свидетельствует о стабилизации C3-конвертазы классического пути активации системы комплемента.

Таблица 2

**Активность C3-конвертазы классического пути активации системы комплемента в сыворотках крови доноров**

№ сыворотки	Опыт, процент лизиса	Контроль, процент лизиса	Активность C3-конвертазы, %
1	72	60	12
2	12	10	2
3	49	36	13
4	89	77	12
5	7	3	4
6	12	10	2
7	11	5	6
8	8	4	4
9	13	10	3
10	15	13	2
11	18	15	3
12	90	84	6
13	12	13	1
14	53	37	16
15	16	14	2
16	16	21	5
17	10	3	7
18	81	77	4
19	57	41	16
20	13	7	6
M±m			6,3±4,8

Таблица 1

**Ингибирование лизиса эритроцитов барана 0,8% пулированной сывороткой крови человека буфером, содержащим 10 мМ ЭДТА**

ЭДТА в гемсистеме, мМ	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,8	2,0	0
СИ, %	3	7	14	17	76	100	100	100	0

Таблица 3

**Антропометрические данные, показатели углеводного и липидного обмена у пациентов (n = 31)**

Показатель	M±m
Возраст, годы	43,7±8,8
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	29,7±5
Окружность талии, см	97,4±9
Общий холестерин, ммоль/л	5,5±0,9
Триглицериды, ммоль/л	2,4±0,5
Хс-ЛПНП, ммоль/л	3,8±0,9
Хс-ЛПВП, ммоль/л	1,0±0,3
Глюкоза, ммоль/л	5,0±1,2

Определение стабилизации С3-конвертазы классического пути активации комплемента в сыворотках крови лиц с абдоминальным ожирением. Обследован 31 пациент в возрасте 41±9 лет, 16 (52%) – женщины. Абдоминальное ожирение устанавливали согласно критериям Международной Федерации Диабета (IDF, 2009) по величине окружности талии (ОТ): ОТ ≥ 94 см у мужчин и ≥80 см у женщин. Наличие и степень ожирения выявляли с помощью критериев ВОЗ (2003) в соответствии с величиной индекса массы тела (ИМТ). Ожирение диагностировали при ИМТ ≥ 30 кг/м<sup>2</sup>.

Всем пациентам определяли содержание в крови глюкозы натощак, общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (Хс-ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП), триглицеридов с использованием коммерческих наборов (Cotman, Польша).

Предлагаемым способом оценки функциональной активности С3-конвертазы были тестированы сыворотки крови 31 пациента с абдоминальным ожирением. Общая характеристика пациентов и показатели метаболического профиля представлены в табл. 3.

Среди пациентов с признаками абдоминального ожирения нормальный ИМТ выявлен у 7 (23%), избыточная масса тела – у 11 (35%), ожирение – у 13 (42%) человек. Степень функциональной активности (стабилизации) С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента в исследуемых группах представлены в табл. 4.

Таблица 4

**Активность С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента в сыворотках крови пациентов с абдоминальным ожирением**

№ пробы	Активность С3-конвертазы	№ пробы	Активность С3-конвертазы	№ пробы	Активность С3-конвертазы
1	15	11	32	21	4
2	8	12	16	22	7
3	15	13	16	23	22
4	35	14	19	24	14
5	24	15	24	25	23
6	24	16	30	26	13
7	26	17	23	27	9
8	22	18	12	28	13
9	18	19	22	29	24
10	18	20	27	30	11
				31	22

Мы видим, что только в 4 пробах сыворотки пациентов с АО выявлена нормальная активность С3-конвертазы классического пути активации комплемента. В остальных же пробах обнаружена повышенная активность С3-конвертазы. Обращала на себя внимание высокая степень стабилизации С3-конвертазы в общей выборке. У большинства пациентов (87%) функциональная активность С3-конвертазы превысила пороговые значения в 10%. Среднее значение активности С3-конвертазы среди всех участников составило 19±7,5%.

При проведении корреляционного анализа не найдено взаимосвязи между показателями функциональной активности С3-конвертазы и параметрами липидного спектра, уровнем гликемии, возрастом и полом ( $p > 0.05$ ).

*Обсуждение.* Известно несколько способов определения активности С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента [15–17]. Однако при использовании существующих методик производят оценку активности С3-конвертазы не прямым путем, а опосредованным. Так, разработана диагностика стабилизации С3-конвертазы по наличию у каждого конкретного больного аутоантител к С3-конвертазе, сформированной из очищенных компонентов комплемента [15, 17]. Методика для рутинных исследований не востребована ввиду длительного многоэтапного выполнения и потребности в очищенных компонентах системы комплемента.

Другой подход определения функциональной активности С3-конвертазы основан на гемолизе сенсibilизированных эритроцитов барана с использованием двух сывороток разных людей в качестве источников компонентов системы комплемента [16]. Комплекс С3-конвертазы, С4bС2a, формируется на эритроцитах барана, сенсibilизированных кроличьими антителами, с использованием компонентов С1, С4 и С2 из 1-й сыворотки. На следующем этапе проводится вторая реакция с участием компонентов С3-С9 из 2-й сыворотки в присутствии ЭДТА, приводящей к гемолизу эритроцитов. Недостаток этого способа – длительность, трудоемкость, недостаточная точность (поскольку используют две разные сыворотки).

Разработанный нами метод определения стабилизации С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента в сыворотке крови человека основан на проведении реакции лизиса эритроцитов барана 0,8% сывороткой крови человека в два этапа. Показано, что только у 4 (13%) пациентов не выявлена стабилизация С3-конвертазы, в то время как у остальных 27 человек (87%) наблюдают стабилизацию С3-конвертазы. Методика может быть в дальнейшем модифицирована по двум направлениям: для определения аутоантител к С3-конвертазе и для выявления функционального дефицита регуляторов С3-конвертазы.

В нашей работе высокая активность С3-конвертазы свидетельствует о сниженном контроле функционирования ключевого фермента классического пути активации системы комплемента. Причиной выявленной стабилизации С3-конвертазы может быть как наличие аутоантител к С4b, так и дефицит регуляторов (например, фактор 1). Кроме этого, данный эффект стабилизации С3-конвертазы можно наблюдать при различных генетических мутациях ингибиторов С3-конвертазы [17].

Обнаруженный факт стабилизации С3-конвертазы, видимо, может служить прогностическим показателем липогенеза. Это предположение основывается на метаболических эффектах метаболита С3a–С3a-desArg, представляющего собой белок, стимулирующий ацилирование (ASP) и синтез триглицеридов клетками печени и адипоцитами [13, 18–20]. В последующем неконтролируемая активация и «потребление» компонента С3 через С3-конвертазу может приводить к

нарушению элиминации иммунных комплексов и развитию гломерулонефрита (obesity-related glomerulopathy) [21]. Взаимосвязь между адипогенезом и компонентами врожденного иммунитета требует дальнейшего изучения.

Способ определения функциональной активности С3-конвертазы позволяет выявлять скрытые нарушения регуляции иммунного ответа, которые могут быть как причиной ожирения, так и фактором, участвующим в патогенезе коморбидных патологий (дислипидемия, атеросклероз, гломерулонефрит).

**Заключение.** Таким образом, методика определения функциональной активности С3-конвертазы классического пути активации системы комплемента, описанная в данной работе, может служить альтернативным способом оценки активности системы комплемента. Поскольку для выполнения методики не нужны дополнительные затраты на очищенные компоненты комплемента, данный способ применим в рутинной лабораторно-клинической практике.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ricklin D., Lambris J. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J. Immunol.* 2013; 190 (8): 3839–47.
2. Carroll M., Isenman D. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012; 37 (2): 199–207.
3. Ricklin D., Reis E., Lambris J. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016; 12 (7): 383–401.
4. Rittirsch D., Redl H., Huber-Lang M. Role of complement in multiorgan failure. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 962–927.
5. Szeplaki G., Varga L., Füst G., Prohaszka Z. Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases. *Mol. Immunol.* 2009; 46 (14): 2784–93.
6. Nilsson B., Hamad A., Ahlström H., Kullberg J., Johansson L., Lindhagen L. et al. C3 and C4 are strongly related to adipose tissue variables and cardiovascular risk factors. *Eur. J. Clin. Invest.* 2014; 44 (6): 587–96.
7. Muscari A., Bozzoli C., Puddu G., Sangiorgi Z., Dormi A., Rovinetti C. et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am. J. Med.* 1995; 98 (4): 357–64.
8. Szeplaki G., Prohaszka Z., Dúba J., Rugonfalvi-Kiss S., Karádi I., Kókai M. et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis.* 2004; 177 (2): 383–9.
9. Engstrom G., Hedblad B., Janzon L., Lindgarde F. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2007; 14 (3): 392–7.
10. Nagaraj N., Matthews K., Shields K.J., Barinas-Mitchell E., Budoff M.J., El Khoudary S.R. Complement proteins and arterial calcification in middle aged women: Cross-sectional effect of cardiovascular fat. The SWAN Cardiovascular Fat Ancillary Study. *Atherosclerosis.* 2015; 243 (2): 533–9.
11. Speidl W., Katsaros K., Kastl S., Zorn G., Huber K., Maurer G. et al. Coronary late lumen loss of drug eluting stents is associated with increased serum levels of the complement components C3a and C5a. *Atherosclerosis.* 2009; 208 (1): 285–9.
12. Speidl W., Exner M., Amighi J., Mlekusch W., Sabeti S., Kastl S.P. et al. Complement component C5a predicts restenosis after superficial femoral artery balloon angioplasty. *J. Endovasc. Ther.* 2007; 14 (1): 62–9.
13. Cianflone K., Xia Z., Chen L. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1609 (2): 127–43.
14. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V., Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I. et al. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Mol. Immunol.* 2005; 42 (10): 1141–53.
15. Miller E.C., Chase N.M., Densen P., et al. Autoantibody stabilization of the classical pathway C3 convertase leading to C3 deficiency and Neisserial sepsis: C4 nephritic factor revisited. *Clin. Immunol.* 2012; 145 (3): 241–50.
16. Kobayashi E., Kitano E., Kitamura H. A novel assay for serum complement activity: C42 generation assay. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999; 120 (1): 71–7.
17. Blom M., Corvillo F., Magda M., Stasiłojć G., Nozal P., Pérez-Valdivia M.A. et al. Testing the Activity of Complement Convertases in Serum/Plasma for Diagnosis of C4NeF-Mediated C3 Glomerulonephritis. *J. Clin. Immunol.* 2016; 36 (5): 517–27.
18. Gupta A., Rezvani R., Lapointe M., Poursharifi P., Marceau P., Tiwari S. et al. Downregulation of complement C3 and C3aR expression in subcutaneous adipose tissue in obese women. *PLoS One.* 2014; 9 (4): e95478.
19. Liu Z., Tang Q., Wen J., Tang Y., Huang D., Huang Y. et al. Elevated serum complement factors 3 and 4 are strong inflammatory markers of the metabolic syndrome development: a longitudinal cohort study. *Sci. Rep.* 2016; 6: 18 713.
20. Saleh J., Wahab R.A., Farhan H., Al Amri I., Cianflone K. Plasma Levels of Acylation-Stimulating Protein Are Strongly Predicted by Waist/Hip Ratio and Correlate with Decreased LDL Size in Men. *ISRN Obes.* 2013; 2013: 342–802.
21. de Vries A.P., Ruggenenti P., Ruan X.Z., Praga M., Cruzado J.M., Bajema I.M. et al. Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2 (5): 417–26.

Поступила 05.08.16  
Принята к печати 20.08.16

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-2-002-022:578.825.11]-078:577.21.08

Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Львов Н.Д., Баринский И.Ф.

### СПЕКТР МАРКЕРОВ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И АЛГОРИТМ ИХ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И ЛОР-ОРГАНОВ

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва

*Цель исследования — провести изучение маркеров персистирующих герпесвирусных инфекций у детей с воспалительными процессами верхних дыхательных путей (ВДП) и ЛОР-органов. Обследовано 118 пациентов в возрасте от 1 мес до 17 лет. Использован комплекс стандартизированных вирусологических, иммунологических, молекулярно-генетических методов для выявления (исключения) герпетической инфекции (ГИ): цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ), инфекции, вызываемой вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБИ), вирусом простого герпеса (ВПГ). Представлен диагностический алгоритм обследования детей с заболеваниями ВДП на ГИ. Отмечено доминирующее значение ВПГ и ВЭБ, а также Staphylococcus aureus и Streptococcus haemolyticus-β группы А при анализе микробного пейзажа. У 83,9% детей с заболеваниями ВДП выявлена хроническая ВПГИ, ВЭБИ, ЦМВИ, у 39,39% детей — микст-инфекция: у 41,03% — сочетание ВПГ—/ВЭБ-инфекции; у 33,33% детей — ВПГ—/ЦМВИ-инфекции; у 7,69% детей — ВПГ—/ВЭБ—/ЦМВИ-инфекции; у 17,94% детей — ВЭБ—/ЦМВИ-инфекции. Особенностью течения персистирующих ГИ у детей было отсутствие специфических симптомов нозологической формы в 59,2% случаев. По результатам исследования мазков со слизистой носоглотки детей, инфицированных вирусами герпеса: Staphylococcus aureus выявлен у 36,36%; Streptococcus haemolyticus-β — у 32,32%; Streptococcus haemolyticus-α — у 11,11%; Candida albicans слизистых оболочек — у 4,04% детей. Вирусно-бактериальная микст-инфекция установлена у 44,44%. Обнаружены лабораторные признаки активности иммунного воспаления: увеличение содержания TNFα и снижение уровня IFNγ. Результаты исследования обосновывают необходимость индивидуального подхода к терапии детей с заболеваниями ВДП и ЛОР-органов, ассоциированными с персистирующими ГИ, с проведением комплекса лечебно-реабилитационных мероприятий.*

**Ключевые слова:** заболевания респираторного тракта; герпесвирусная инфекция; условно-патогенная микрофлора; дети.

**Для цитирования:** Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Львов Н.Д., Баринский И.Ф. Спектр маркеров герпесвирусных инфекций и алгоритм их лабораторной диагностики у детей с воспалительными процессами верхних дыхательных путей. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 182-188

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-182-188>

Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Lvov N.D., Barinsky I.F.

#### THE SPECTRUM OF MARKERS OF HERPES VIRAL INFECTIONS AND ALGORITHM OF THEIR LABORATORY DIAGNOSTIC IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY PROCESSES OF UPPER RESPIRATORY WAYS AND ENT-ORGANS

*The purpose of study is to explore markers of persistent herpes viral infections in children with inflammatory processes of upper respiratory ways and ENT-organs. The sampling included 118 examined patients aged from 1 month to 17 years. The complex of standardized viral, immunological, molecular genetic methods was applied to detect (to exclude) herpes infection: cytomegalovirus infection, Epstein-Barre virus infection, simplex herpes virus infection. The diagnostic algorithm of examination of children with diseases of upper respiratory ways for herpes infection is presented. The dominating significance of simplex herpes virus and Epstein-Barre virus and also Staphylococcus aureus and Streptococcus haemolyticus-β group A at the analysis of microbial landscape. In 83.9% of children with diseases of upper respiratory ways chronic infections of simplex herpes virus, Epstein-Barre virus, cytomegalovirus; in 39.39% - mixed-infection; in 41.03% - combination of simplex herpes virus and Epstein-Barre virus infections; in 33.33% - combination of simplex herpes virus and cytomegalovirus infections; in 7.69% - combination of simplex herpes virus and Epstein-Barre virus and cytomegalovirus infections; in 17.94% - combination of Epstein-Barre virus and cytomegalovirus infections; The particularity of course of persistent herpes infection in children had to do with absence of specific symptoms of nosologic form in 59.2% of cases. The results of analysis of smears from nasopharynx of children infected with herpes viruses permitted to detect: Staphylococcus aureus in 36.36%; Streptococcus haemolyticus-β in 32.32%; Streptococcus haemolyticus-α in 11.11%; Candida albicans of mucous membranes in 4.04% of children. The viral bacterial mixed-infection was detected in 44.44%. The laboratory signs of activity of immune inflammation were detected: increasing of content of TNFα and decreasing of level of IFNγ. The results of study substantiate necessity of individual approach to therapy of children with diseases of upper respiratory ways and ENT-organs and with implementation of complex of curative rehabilitating activities.*

**Key words:** diseases of respiratory tract; herpes viral infection; opportunistic microflora; children.

**For citation:** Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Lvov N.D., Barinskiy I.F. The spectrum of markers of herpes viral infections and algorithm of their laboratory diagnostic in children with inflammatory processes of upper respiratory ways and ENT-organs. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 182-188. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-182-188>*

**For correspondence:** Alimbarova L.M., candidate of medical sciences, associate professor, leading researcher. e-mail: virology@mail.ru

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

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

Received 11.07.2016  
Accepted 01.08.2016

**Введение.** Проблема заболеваний верхних дыхательных путей (ЗВДП) и ЛОР-органов в детском и подростковом возрасте по-прежнему остается актуальной [1—3]. Это связано не только с ростом распространенности, но и с вариативностью течения, частотой осложнений, наличием нарушений иммунитета. Особенность иммунного реагирования у детей при ЗВДП — наличие переходящей функциональной нестабильности иммунитета (в том числе в фагоцитарном звене иммунитета, в системе интерферонотенеза), способствующей дисбиозу полости носа и ротоглотки, повышению восприимчивости к инфицированию, в случае повторяющихся ЗВДП — формированию хронической патологии респираторного тракта и развитию функциональных расстройств.

ЗВДП — мультифакторные заболевания, при которых наряду с генетической предрасположенностью важная роль принадлежит инфекционным «триггерам»: РНК- и ДНК-содержащим вирусам, бактериям (стрептококку, стафилококку и др.), простейшим (хламидии, микоплазмы и др.) [1—5]. Особый интерес представляют герпесвирусы (вирус простого герпеса (ВПГ), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ)), для которых характерны не только высокая частота распространения, но и способность вызывать заболевания, склонные к рецидивированию, хроническому течению, персистенции, способствующие развитию иммунодефицита [5—7]. Длительная персистенция герпесвирусов способствует развитию хронического воспаления, которое свидетельствует о несостоятельности иммунного ответа, повреждении собственных тканей, нарушении функций поврежденных органов и выступает триггерным и поддерживающим фактором в патогенезе соматических заболеваний [5]. На фоне персистенции герпесвирусов и при наличии нарушений иммунореактивности и микробиоценоза респираторного тракта ЗВДП могут принимать рецидивирующее течение — протекать с рецидивами гайморита, аденоидита, фронтита, тонзиллита, фарингита, тонзиллофарингита [1, 6, 8].

Цель исследования — изучить маркеры персистирующих герпесвирусных инфекций у детей с воспалительными процессами верхних дыхательных путей и ЛОР-органов.

**Материал и методы.** В исследование вошли 118 детей с заболеваниями верхних дыхательных путей и ЛОР-органов, отобранных сплошным методом, в возрасте от 1 мес до 17 лет, из них 68 мальчиков (57,6%) и 50 девочек (42,4%). Дети в возрасте до 5 лет составили 20,6% (n = 24), от 5 до 12 лет — 23,0% (n = 27), от 12 до 17 лет — 56,4% (n = 67). Контрольную группу составили 30 соматически здоровых детей (контроль). Исследование проводили на базе консультативно-диагностического центра по вирусным инфекциям при ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Критериями включения в исследование служило наличие у пациентов в анамнезе клинических проявлений заболеваний верхних дыхательных путей и ЛОР-органов (гаймориты, фронтиты, аденоидиты, тонзиллиты, фарингиты, тонзиллофарингиты), ОРВИ (4 и более раз в год), лимфаденопатии (первичный признак проявления инфекции и основной признак формирования группы), общинфекционного синдрома

(длительный субфебрилитет). Дети с тяжелой сопутствующей патологией (сахарный диабет, пороки сердца и др.) в исследование включены не были.

Методы исследования предварительно обсуждали с родителями пациентов, затем при наличии добровольного информированного согласия назначали лечебные мероприятия. Пациенты обследованы в соответствии с принятым протоколом.

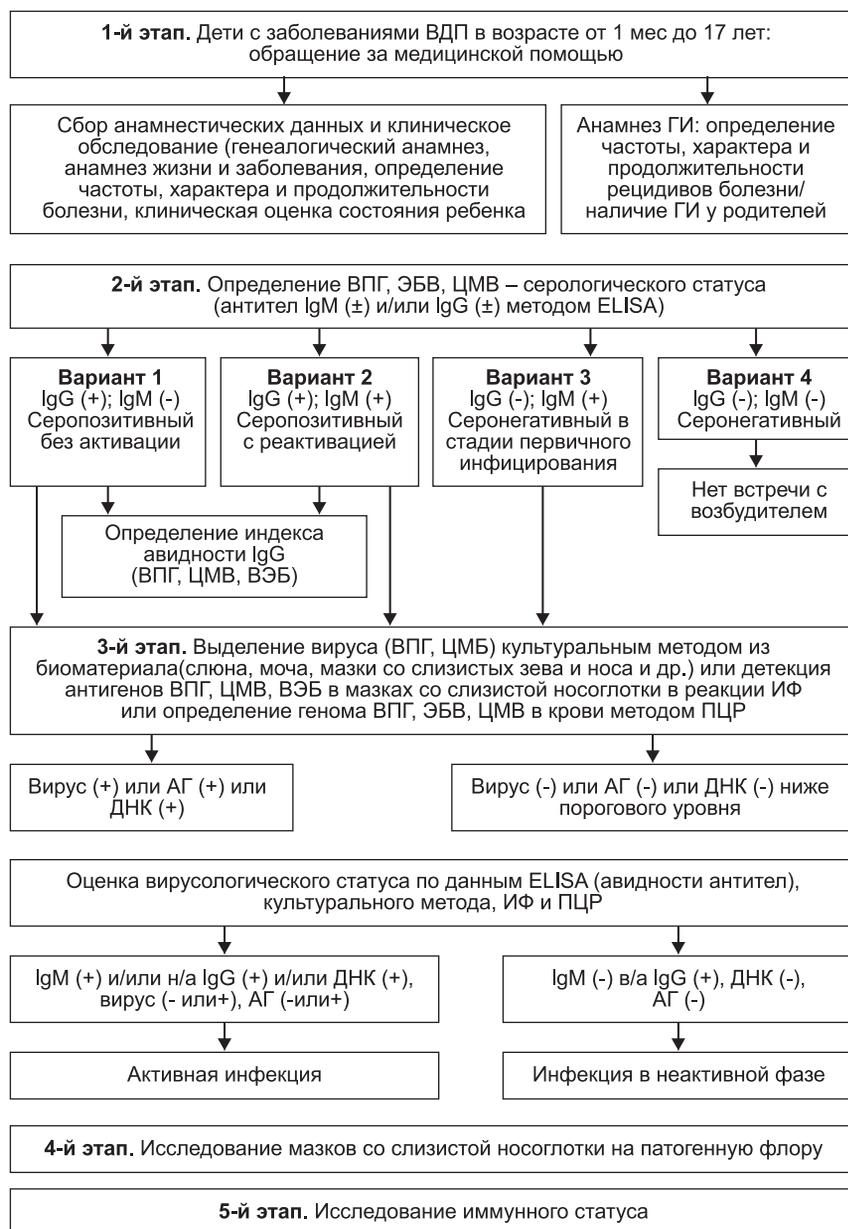
Всем детям для верификации диагноза наряду со сбором анамнестических данных и клиническим обследованием (генеалогический анамнез, анамнез жизни и заболевания, клиническая оценка состояния ребенка, определение частоты, характера, продолжительности рецидивов болезни) проведен комплекс лабораторных исследований с использованием стандартизированных методов для выявления (исключения) герпетической инфекции: ВПГ-инфекции (ВПГИ), ЦМВ-инфекции (ЦМВИ), инфекции, вызываемой вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБИ). Алгоритм обследования детей с ЗВДП представлен на рисунке.

Материалом для исследования служили кровь (сыворотка, лейкоцитарная взвесь), слюна, моча, мазки со слизистых оболочек зева и носа, при наличии высыпаний — соскобы из очага поражения (с кожи, со слизистой оболочки полости рта).

Диагностика ГИ основывалась на выделении вируса (ВПГ, ЦМВ) культуральным методом, детекции ДНК (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ) методом ПЦР (наборы фирмы «Литех», Москва) или антигенов ВПГ, ЦМВ, ВЭБ в мазках со слизистой оболочки носоглотки в реакции иммунофлюоресценции (РИФ), на выявлении методом иммуноферментного анализа (ИФА) специфических антител (IgG, IgM) к ВПГ, ЦМВ, ВЭБ с использованием коммерческих наборов для ИФА (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Авидность IgG-антител (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ) определяли с помощью тест-систем («НПО Диагностические системы», Россия). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200 (Awareness Technology, Inc, USA) при 450 нм.

Проводили исследование мазков со слизистой оболочки носоглотки на патогенную микрофлору, общий анализ периферической крови, анализ биохимических показателей, иммунологические исследования (определение субпопуляций лимфоцитов с помощью моноклональных антител, изучение состояния моноцитарно-макрофагального звена иммунитета, наличие циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержание в сыворотке крови провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли —  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и интерферона — IFN $\gamma$ ) с помощью иммуноферментных тест-систем для количественного определения цитокинов («Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Бактериологический анализ мазков со слизистой оболочки ротоглотки проводили по стандартной методике.

Вариант хронического течения ГИ (ВПГИ, ЭБВИ, ЦМВИ) устанавливали на основании сопоставления результатов общеклинического и функционального обследования,



Алгоритм амбулаторного обследования детей с заболеваниями верхних дыхательных путей и ЛОР-органов при подозрении на герпесвирусную инфекцию (ВПГИ, ВЭБИ, ЦМВИ).

выявления только антител класса IgG в динамике процесса и их avidности.

Диагноз активной ВПГИ или ЦМВИ устанавливали на основании одного из трех вариантов: 1) сочетанного обнаружения вируса в биоматериалах и/или антигена в мазках со слизистой оболочки носоглотки и/или ДНК вируса, и/или диагностических титров антител класса IgM к ВПГ, или ЦМВ в сыворотке крови; 2) определения специфических антител класса IgM в сыворотке крови в диагностических титрах; 3) нарастания титра антител класса IgG к ЦМВ в динамике заболевания.

Диагноз острой ЭВБИ основывался на обнаружении антигена вируса в мазках со слизистой оболочки носоглотки и антител класса IgM к капсидному антигену и/или антител класса IgG — к раннему антигену в диагностических титрах, или выявлении антител к ВЭБ в классе IgM к капсидному, и/или класса IgG — к раннему антигенам.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Excel 4.0 и Statistica-6.0 Windows XP. При статистической обработке результатов использован метод описательной статистики с определением среднего арифметического, дисперсии, вычисления 95% доверительного интервала. Достоверность разницы между двумя средними показателями оценивали по критерию *t*-Стьюдента. Значения считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты.** Специфические антитела класса IgG (к ВПГ, ВЭБ, ЦМВ) выявлены у 99 (83,9%) детей. У 19 детей серологические маркеры герпесвирусов не обнаружены (диагноз ГИ исключен); они в дальнейшем обследованы на наличие патогенной микрофлоры и изменений в иммунитете.

В структуре герпесвирусного инфицирования преобладал ВПГ. ВПГИ установлена у 81/99 ребенка (82%), в том числе у 46/68 (67,6%) мальчиков и у 35/50 девочек (70,0%). Острая форма инфекции выявлена у 10 (12,3%) детей, стадия реактивации — у 27 (33,3%), латентная форма — у 44 (54,3%) детей.

У мальчиков и девочек выявление ВПГИ оказалось примерно одинаковым, что указывает на высокую частоту инфицирования ВПГ детей и подростков, которое не зависит от гендерных особенностей. Распространенность инфицирования ВПГ в развитых странах составляет 60—85% у взрослых и 65% — у детей школьного возраста [5].

Первичную манифестацию заболевания наблюдали в любом возрасте, но наиболее часто у детей дошкольного возраста (до 5 лет) — у 45,8% (37/81) детей, она соответствовала началу возрастного физиологического снижения неспецифической резистентности организма [9, 10]. У 22,2% детей (18/81) дебют заболевания приходился на период от 5 до 12 лет, у 32,0% (26/81) — от 12 до 17 лет. До момента обследования у 24 пациентов (29,6%) заболевание длилось более двух лет.

ВЭБИ установлена у 61/99 (61,6%) детей. Острая форма инфекции выявлена у 16/61 (26,23%), латентная форма — у 45/61 (73,77%) детей.

ЦМВИ установлена у 37/99 (37,37%) детей. Стадия реактивации выявлена у 8/37 (21,62%), латентная форма — у 29/37 (78,38%) детей.

У 39/99 (39,39%) детей зарегистрирована микст-инфекция: у 16/39 (41,03%) — сочетание ВПГИ с ВЭБИ; у

#### Частота выявления герпесвирусов у детей с заболеваниями ВДП и ЛОР-органов

Группы детей, <i>n</i>	Частота выявления герпесвирусов, %		
	ВПГ	ВЭБ	ЦМВ
Заболевания ВДП и ЛОР-органов, <i>n</i> = 118	82,0	61,6	37,37
Здоровые дети, <i>n</i> = 30	20,0	40,0	23,3

13/39 (33,33%) — ВПГИ с ЦМВИ; у 3/39 (7,69%) — ВПГИ с ВЭБ- и ЦМВ-инфекцией; у 7/39 (17,94%) детей — сочетание ВЭБИ и ЦМВИ.

Особый интерес представляли данные о выявлении маркеров герпесвирусных инфекций в клиническом материале. По данным культурального метода, ВПГ наиболее часто выделяли из образцов слюны — в 77,6% (59), мочи — в 53,9% случаев (41). У 32,8% (25) пациентов ВПГ выделяли одновременно из 2 биологических материалов — из образцов слюны и мочи; у 5,2% (4) детей — из слюны и крови. ЦМВ наиболее часто выделяли из образцов слюны у 5/8 (62,5%), из образцов мочи — у 4/8 (50%) и из образцов крови — у 2/8 (25%). По данным ПЦР, ДНК ВЭБ наиболее часто определяли в образцах слюны и крови — у 10/16 (62,5%) детей и у 7/16 (43,75%) детей соответственно. Ни у одного ребенка не выявлено ДНК ВЭБ в образцах мочи. Репликативные формы вируса (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ) наиболее часто регистрировали у детей с низкими и средними значениями титров специфических IgG.

У детей с заболеваниями ВДП и ЛОР-органов маркеры GI детектировали достоверно чаще ( $p < 0,05$ ), чем у соматически здоровых детей (см. таблицу).

Известно, что грамположительная микрофлора (преимущественно стафилококки) играет ведущую роль при дисбиозах полости носа и ротоглотки, становится одной из основных причин бактерионосительства на слизистой оболочке ВДП и развития воспалительных заболеваний ВДП. Инфицированность вирусами герпеса способствует активизации условно-патогенной микрофлоры. В связи с этим представляло интерес изучить микробный пейзаж слизистых оболочек ВДП у детей. Выявлена вирус-бактериальная микст-инфекция у 44,44% (44/99) детей с заболеваниями ВДП, инфицированных герпесвирусами.

В мазках со слизистой оболочки носоглотки детей, инфицированных вирусами герпеса, *Staphylococcus aureus* выявлен у 36 (36,36%) детей;  $\beta$ -гемолитический *Streptococcus pyogenes* — у 32 детей (32,32%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк — у 11 детей (11,11%), *Candida albicans* — у 4-х детей (4,04%).

Инфицирование герпесвирусами способствовало развитию дисбиоза носо- и ротоглотки с достоверным преобладанием *S. aureus* (36,36%) и  $\beta$ -гемолитического *S. pyogenes* (32,32%) по сравнению с детьми контрольной группы (23,33% (7/30) и 20% (6/30) соответственно), ( $p < 0,05$ ).

При оценке иммунного статуса детей у 56,6% выявлены достоверно низкие уровни IFN $\gamma$  — 0,1—1,1 пг/мл (норма 1,5—2,6 пг/мл), повышение уровня TNF $\alpha$  — 62,4—68,1 пг/мл (норма 0—3 пг/мл); изменения в моноцитарно-макрофагальной системе (снижение показателей клеточного иммунитета — снижение средних значений содержания лимфоцитов и моноцитов в периферической крови, относительного содержания CD $_{4+}$  лимфоцитов 15—24% (контроль 28,8—33,6%), инверсия иммунорегуляторного индекса CD $_{4+}$ /CD $_{8+}$  — 0,75—1,2 (контроль 1,43)), снижение функциональной активности фагоцитирующих клеток, увеличение уровня ЦИК (в сравнении с контрольной группой детей). У 1/3 детей выявлены специфические иммуноглобулины IgM, специфические иммунные комплексы, вирусные антигены или ДНК герпесвирусов, свидетельствующие об активной фазе инфекционного процесса.

Особенностью течения персистирующих GI у детей с заболеваниями ВДП стало отсутствие специфических симптомов нозологической формы у 58,6% детей. Основными клиническими проявлениями у них были признаки иммунной недостаточности (в том числе инфекционный синдром, аллергический, иммунопролиферативный синдром), которые встречались независимо от вида и сочетания персистирующих GI. Лимфаденопатию достоверно чаще отмечали у 57,6% детей, инфицированных ВЭБ, ЦМВ, ВПГ, у здоровых

детей — у 6,7% ( $p < 0,05$ ). У 40,4% детей с герпесвирусным инфицированием (по сравнению с группой контроля) установлены изменения со стороны зева — наличие увеличенных фолликулов (18,2% и 3,3% соответственно, ( $p < 0,05$ )), тонзиллит (28,3 и 9,9%, ( $p < 0,05$ )), аденоидит (15,2 и 10%). Увеличенные фолликулы на задней стенке глотки чаще выявлялись у детей с ВЭБИ. На фоне инфицирования герпесвирусами увеличивается активность бактерий и как следствие отмечают достоверное преобладание в 2,6 раза воспалительных заболеваний ротоглотки (тонзиллиты, аденоидиты — 43,5%) и ОРВИ, в то время как их частота у детей в группе сравнения не превышает 19,9%.

Моноинфицирование преобладало у детей до 3 лет в связи с отсутствием специфического иммунитета, а микст-инфицирование — у детей предпубертатного и пубертатного возрастов. Частота микст-инфицирования составляет 28,5—88,9% [5—7, 11, 12].

Анализ анамнеза у детей с ВДП, инфицированных вирусами герпеса, показал, что у родителей обследуемых детей в большинстве случаев на первом месте по частоте выявления также был ВПГ (83,9%): 35,6% матерей и 48,3% отцов указывали на активное проявление GI с обострением не реже одного раза в месяц. На втором месте по частоте выявления у родителей был ВЭБ (14,9%); реже регистрировали ЦМВ (5,7%). Диагноз GI у родителей подтверждали лабораторно. У матерей детей с заболеваниями ВДП патологическое течение беременности (30 и 9%) и течение беременности на фоне реактивации ВПГ или ЦМВ (15,7 и 3%) отмечали значительно чаще, чем в группе контроля. Внутрисемейное инфицирование (как фактор риска развития GI) установлено у 67,7% детей.

*Обсуждение.* В последнее десятилетие воспалительные заболевания ВДП представляют серьезную проблему и оказываются одной из частых причин обращений к врачам [1, 8]. Заболевания ВДП — мультифакторные, вызываемые бактериями, вирусами, особый интерес из которых вызывают представители эндогенной микрофлоры ротоглотки (*Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Candida spp.* и др.), вирусы-оппортунисты, в том числе вирусы герпеса (ВПГ, ЭБВ, ЦМВ) [6, 8, 13].

Нами представлены данные о частоте выделения вирусов герпеса и их ассоциациях с бактериями у детей с заболеваниями ВДП и ЛОР-органов с разной степенью тяжести и выраженности симптоматики. Изучение распространенности инфицирования вирусами герпеса на основании обследования 118 детей с заболеваниями ВДП позволило констатировать их наличие у 99 (83,9%). У большинства детей с респираторной патологией выявлена ВПГИ (82%), в том числе у 67,6% мальчиков и у 70,0% девочек. Чаще всего у детей диагностировали латентную форму инфекции (54,3%). У мальчиков и девочек выявление ВПГИ оказалось примерно одинаковым, что указывало на высокую частоту инфицирования вирусами простого герпеса детей и подростков и не зависело от гендерных особенностей. Первичную манифестацию заболевания наблюдали в любом возрасте, но наиболее часто у 45,8% детей до 5 лет. Она соответствовала началу возрастного физиологического снижения неспецифической резистентности организма [9, 10].

ВЭБИ установлена у 61,6% детей, в том числе острая форма инфекции — у 26,23% и латентная форма — у 73,77% детей. ЦМВИ установлена у 37,37% детей: стадия реактивации выявлена у 21,62% и латентная форма — у 78,38% детей. Особенностью течения персистирующих GI у детей с заболеваниями ВДП стало отсутствие специфических симптомов нозологической формы GI в 59,2% случаев.

У обследованных детей (39,39%) выявлена высокая частота вирусной микст-инфекции: ВПГ—/ВЭБ-инфекции (41,03%), ВПГ—/ЦМВ-инфекции (33,33%), ВЭБ—/ЦМВ-

инфекции (17,94%). Наиболее часто встречалась смешанная ВПГ—/ВЭБ инфекция, в то время как, по данным других авторов [14], для детей характерно смешанное инфицирование ВЭБ—/ЦМВ (43%). Микст-инфицирование может встречаться у детей любого возраста с частотой 28,5—88,9% и протекать без типичного синдрома в виде заболеваний ВДП [5—7, 12, 14]. Имеет место и вирус-бактериальное инфицирование, которое встречается у 23—51,4% детей [6, 12].

Результаты, полученные нами, служат отражением общей тенденции к повышению инфицированности вирусами герпеса детей с заболеваниями ВДП. Подтверждением наших данных стали работы других исследователей, показавших наличие персистирующей ГИ у 75,6—80,4% детей с заболеваниями ВДП [6, 7, 11, 12, 14—16]. ЦМВИ встречалась у 46—73,1%, ВЭБИ — у 55,8—79%, их сочетание — у 27—40,1%; ВПГИ — у 19,8—64% детей.

Обсуждается необходимость комплексного обследования детей с использованием различных методик [5, 14, 15]. Мы использовали вирусологический метод и молекулярно-генетические методы детекции вирусов герпеса, которые позволили наиболее часто выявить ВПГ из образцов: слюны — в 77,6%, мочи — в 53,9% случаев; ЦМВ из образцов: слюны в 62,5% случаев, мочи — в 50%, крови — в 25% случаев. Два или три патогена выделены у 32,8% детей. ДНК ВЭБ наиболее часто определяли в образцах слюны и крови — в 62,5 и в 43,75% случаев соответственно. Репликативные формы вирусов герпеса (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ) наиболее часто регистрировали у детей с низкими и средними значениями титров специфических IgG.

Высокую частоту выявления ВПГ и ВЭБ можно объяснить свойствами герпесвирусов (их преимущественной тропностью к эпителиальной и лимфоидной ткани лимфоаденоидного кольца Пирогова—Валдейера, асимптоматической персистенцией или длительным назофарингеальным выделением, способностью угнетать иммунный ответ на любой инфекционный патоген), высоким уровнем внутрисемейного инфицирования (67,7%), повышением социализации детей. Анализ анамнеза у детей с ВДП показал, что у их родителей в большинстве случаев на первом месте по частоте выявления был ВПГ (83,9%): 35,6% матерей и 48,3% отцов указывали на активное проявление ГИ с обострением не реже одного раза в месяц. На втором месте по частоте выявления у родителей был ВЭБ (14,9%); реже регистрировался ЦМВ (5,7%). У матерей детей с заболеваниями ВДП достоверно чаще регистрировали патологическое течение беременности (30%) и течение беременности на фоне реактивации ВПГ или ЦМВ (15,7%), чем в группе контроля.

Отмечают способность вирусов герпеса (в особенности ВЭБ, ВПГ) к персистенции в лимфоидной ткани лимфоаденоидного кольца Пирогова—Валдейера, осуществляющего местную противоинфекционную защиту респираторного тракта [8, 17—19]. Длительная персистенция герпесвирусов в тканях небной и носоглоточной миндалин способствует их выраженной гипертрофии, развитию хронического воспаления, приводящего к стойкой обструкции ВДП, к затяжному течению и хронизации воспалительного процесса в носо- и ротоглотке, свидетельствует о несостоятельности иммунного ответа, повреждении собственных тканей, нарушении функций поврежденных органов и выступает триггерным и поддерживающим фактором в патогенезе заболеваний ВДП [8, 17—21]. Бактерии могут быть причиной длительной гиперплазии лимфоидной ткани лимфоаденоидного кольца, формируя биопленку, которая защищает их от факторов иммунной системы [6, 22, 23]. Обсуждают важность вирусиндуцированной иммуносупрессии, ведущей к изменению функционирования естественных барьеров организма (слизистых оболочек) и атипичному, затяжному течению бактериальных инфекций, в особенности характерному для ви-

русных и вирус-бактериальных ассоциаций, и особенности микробиоценоза ВДП у детей (нестабильность и полиморфность микробного пейзажа) [6, 23].

Известно, что микробный пейзаж может быть представлен разными патогенами и их ассоциациями. Установлено, что у детей с 7 лет преобладают: *Klebsiella pneumoniae* (70%), *Candida albicans* (66,6%), *Haemophilus influenzae* (57,14%), *Streptococcus haemolyticus-β* (30,23%), *Staphylococcus haemolyticus* (23,26%), что связано с увеличением контактов [16]. Персистирующая инфекция в ротоглотке может быть представлена *S. aureus* (88%), *S. pneumoniae* (75%), *Neisseria spp.* (33%) [6]. В ряде других работ наиболее часто у детей высевались *S. aureus* (35%), *Candida albicans* (10—19,7%), *Streptococcus haemolyticus-β* группы А (9%), *S. pneumoniae* (6%), *Haemophilus influenzae* (6—10,6%), *S. viridans* (3%), *B. catarrhalis* (3%), *Klebsiella pneumoniae* (3—15,5%). Ассоциации двух или трех патогенов выявлены в 18—19,7 и 12% случаев соответственно. Повышенную обсемененность слизистых оболочек бактериями (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) и грибами (*Candida albicans*) отмечали после перенесенной ОРВИ [7, 12, 16].

Результаты нашего исследования свидетельствуют о высокой частоте носительства *S. aureus* (36,36 vs 23,33%) и β-гемолитического стрептококка (32,32 vs 20%) у детей, инфицированных вирусами герпеса, с заболеваниями ВДП (по сравнению с детьми контрольной группы). Высказано предположение, что длительное носительство и персистенция патогенов способствуют хроническому иммунному воспалению, активации эндогенной микрофлоры или инфицированию другими возбудителями, что имеет большое значение в патогенезе дисфункции ВДП. Вирус-бактериальная ассоциация установлена у 44,44% детей.

У детей с заболеваниями ВДП показана функциональная нестабильность иммунитета, повышающая восприимчивость к инфекциям, в отсутствие выраженного иммунодефицита, что характерно и для персистирующих герпесвирусных инфекций [4, 6]. Подтверждением этому служат данные, что изменения в фагоцитарном и клеточном звеньях иммунитета (снижение уровня  $CD_{4+}$  лимфоцитов, дисбаланс числа иммунорегуляторных клеток, угнетение интерфероногенеза, повышение активности ИЛ-2, дисиммуноглобулинемия) оказываются определяющими факторами риска развития рекуррентных и осложненных заболеваний ВДП у детей разного возраста [12, 24]. Возможным объяснением повышенной заболеваемости у детей, инфицированных вирусами герпеса, может быть дефицит НК-клеток, обусловленный способностью вирусов герпеса блокировать рецепторы моноцитов, экспрессирующих молекулы активации киллерной фракции лимфоцитов, повышение уровня супрессорноцитотоксической фракции лимфоцитов, наблюдаемое при активной репликации вирусов. Поскольку вирусы герпеса могут реплицироваться в лимфоцитах, не исключается их роль в инициации иммунного дисбаланса.

Выявлены особенности ответной реакции организма детей с заболеваниями ВДП на воздействие различных вирусов герпеса. У 56,6% детей с заболеваниями ВДП и инфицированных вирусами герпеса выявлены достоверно низкие уровни  $IFN\gamma$  — 0,1—1,1 пг/мл, повышение уровня  $TNF\alpha$  — 62,4—68,1 пг/мл; изменения моноцитарно-макрофагальной системы (снижение показателей клеточного иммунитета — снижение средних значений содержания лимфоцитов и моноцитов в периферической крови, относительного содержания  $CD_{4+}$  лимфоцитов 15—24%, инверсия иммунорегуляторного индекса  $CD_{4+}/CD_{8+}$  — 0,75—1,2), снижение функциональной активности фагоцитирующих клеток, увеличение уровня ЦИК. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, выявивших выраженные признаки снижения противоинфекционной

защиты у данной группы детей, в том числе изменения цитокинетического статуса: снижение уровня ИФН $\gamma$  до  $8,20 \pm 1,26$  пг/мл vs  $13,20 \pm 3,21$  пг/мл у неинфицированных детей [6, 12].

#### Выводы

1. У 83,9% детей с заболеваниями ВДП выявлена высокая частота инфицирования герпесвирусами. У большинства детей отмечено наличие хронического носительства ВПГ, ВЭБ, ЦМВ.

2. Установлено наличие хронической инфекции носоглотки с преобладанием в структуре микрофлоры зева *S. aureus* (36,36%) и  $\beta$ -гемолитического *Streptococcus pyogenes* группы А (32,32%).

3. Вирусные микст-инфекции выявлены у 39,39% детей, вирус-бактериальные микст-инфекции — у 44,44% детей. Моноинфицирование преобладало у детей до трех лет, смешанное инфицирование — у детей предпубертатного и пубертатного возрастов (73,4%). В структуре микст-инфекций установлена этиологическая роль 2—5 патогенов.

4. У большинства детей установлены лабораторные признаки активности иммунного воспаления: увеличение содержания TNF $\alpha$  и снижение уровня ИФН $\gamma$ .

**Заключение.** Получены данные о характере и направленности воздействия герпесвирусов на организм детей, об их влиянии на развитие патологических процессов в ВДП. Определены варианты смешанных ассоциаций различных герпесвирусов и бактерий. Хотя мультифакторные заболевания, к которым относятся заболевания ВДП, вызывает взаимодействие нескольких факторов среды и полигенных комплексов, результаты нашего исследования обосновывают необходимость индивидуального подхода к терапии детей с заболеваниями ВДП (независимо от нозологической формы), ассоциированными с персистирующими герпесвирусными инфекциями с включением курсов специфической противовирусной, антибактериальной, иммунореабилитационной терапии. Данная тактика позволит повысить эффективность терапии и качество жизни данной категории детей и улучшить прогноз заболевания.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 8, 17—23  
см. REFERENCES)

- Баранов А.А., ред. *Руководство по амбулаторно-поликлинической педиатрии*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
- Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Хоперскова А.П., Малиновская В.В., Кольцов В.Д., Брагина Г.С. Рекуррентные инфекции органов дыхания у детей и программы иммунореабилитации. *Детские инфекции*. 2014; 13(3): 61—5.
- Зубков М.Н. Алгоритм терапии острых и хронических инфекций верхних и нижних дыхательных путей. *Русский медицинский журнал*. 2009; (2): 123—31.
- Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В., ред. *Герпесвирусные инфекции человека*. Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит; 2013.
- Савенкова М.С. Многоликая острая респираторная инфекция: от основных возбудителей к выбору препарата. *Лечащий врач*. 2011; (3): 58—64.
- Галкина Л.А., Целипанова Е.Е. Маркеры герпесвирусных инфекций у детей с острыми респираторными заболеваниями и персонала инфекционного отделения. *Лечение и профилактика*. 2015; (4): 77—80.
- Вельтишев Ю.Е. Онтогенез иммунной системы и факторы, влияющие на иммунобиологическую реактивность детского организма. Вопросы охраны материнства и детства. 1989; (10): 3—12.
- Кравченко Л.В. Состояние иммунной системы у детей первых месяцев жизни с герпесвирусной инфекцией. *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского*. 2008; 87(1): 52—8.

- Канкасова М.Н., Мохова О.Г., Поздеева О.С. Часто болеющие дети: взгляд инфекциониста. *Практическая медицина*. 2014; (9): 67—71.
- Юлиш Е.И., Галецкая С.Г., Баличенцева И.В., Ярошенко С.Я. *Этиопатогенетическая терапия рекуррентных респираторных заболеваний у детей раннего возраста при различном течении герпесвирусных инфекций*. Донецк; 2010.
- Карпова К.П., Тулупов Д.А. О роли различных этиологических факторов в развитии хронической патологии носоглотки у детей. *Лечащий врач*. 2013; (1): 26—30.
- Бабаченко И.В., Левина А.С., Седенко О.В., Шарипова Е.В., Власюк В.В., Мурина Е.А. и др. Эффективность различных методов этиологической диагностики у часто болеющих детей с хронической Эпштейна-Барр и цитомегаловирусной инфекциями. *Здоровье. Медицинская экология*. Наука. 2009; 37(2): 13—5.
- Бруснигина Н.Ф., Сперанская Е.В., Черневская О.М., Махова М.А., Орлова К.А., Кленина Н.Н. Анализ распространенности вирусов семейства Herpesviridae среди детей Нижнего Новгорода. *Медицинский альманах*. 2013; (2): 99—103.
- Маложинская Н.В., Полякова О.В. Клинические особенности часто болеющих детей с хроническими заболеваниями дыхательных путей Волгограда. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2014; (1): 39—42.
- Котлуков В.К., Кузьменко Л.Г., Блохин Б.М., Антипова Н.В., Кодолова Т.С. Особенности иммунного статуса у часто и длительно болеющих детей раннего возраста с бронхиальной астмой. *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского*. 2007; 86(4): 25—8.

#### REFERENCES

- Palange P., Simonds A., eds. *Respiratory Medicine (ERS/Handbook)*. UK: Latimer Trend and Co, LTD; 2010.
- Baranov A.A., ed. *Guide Outpatient Pediatrics* [Руководство по амбулаторно-поликлинической педиатрии]. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
- Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Khoperskova A.P., Malinovskaya V.V., Kol'tsov V.D., Bragina G.S. Recurrent respiratory infections in children and immunorehabilitation program. *Detskie infektsii*. 2014; 13(3): 61—5. (in Russian)
- Zubkov M.N. Algorithm for the treatment of acute and chronic infections of the upper and lower respiratory tract. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; (2): 123—31. (in Russian)
- Isakov V.A., Arkhipova E.I., Isakov D.V., eds. *Human Herpesvirus Infection. Guidelines for Doctors* [Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей]. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
- Savenkova M.S. The Many Faces of acute respiratory infection: from the main agents to the choice of the drug. *Lechashchiy vrach*. 2011; (3): 58—64. (in Russian)
- Galkina L.A., Tselipanova E.E. Markers of herpesvirus infections in children with acute respiratory infections and infectious department personnel. *Lechenie i profilaktika*. 2015; (4): 77—80. (in Russian)
- Borhan W.M., Dababo M.A., Thompson L.D., Saleem M., Pashley N. Acute necrotizing herpetic tonsillitis: a report of two cases. *Head Neck Pathol*. 2015; 9(1): 119—22.
- Vel'tishchev Yu.E. The ontogeny of the immune system and the factors influencing the immunobiological reactivity of the child's body. *Voprosy okhrany materinstva i detstva*. 1989; (10): 3—12. (in Russian)
- Kravchenko L.V. Status of the immune system in children during the first months of life with herpes infection. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2008; 87(1): 52—8. (in Russian)
- Kankasova M.N., Mokhova O.G., Pozdeeva O.S. Often ill children: look of infectionist. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; (9): 67—71. (in Russian)
- Yulish E.I., Galetskaya S.G., Balichentseva I.V., Yaroshenko S.Ya. *Etiopathogenetic Therapy of Recurrent Respiratory Infections in Infants at Different Current Herpesvirus Infection* [Etiopatogенетическая терапия рекуррентных респираторных заболеваний у детей раннего возраста при различном течении герпесвирусных инфекций]. Donetsk; 2010. (in Russian)
- Karpova K.P., Tulupov D.A. On the role of the various etiological

- factors in chronic diseases of the nasopharynx of children development. *Lechashchiy vrach*. 2013; (1): 26—30. (in Russian)
14. Babachenko I.V., Levina A.S., Sedenko O.V., Sharipova E.V., Vlasyuk V.V., Murina E.A. et al. The effectiveness of different methods of etiologic diagnosis in sickly children with chronic Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya*. Nauka. 2009; 37(2): 13—5. (in Russian)
  15. Brusnigina N.F., Speranskaya E.V., Chernevskaya O.M., Makhova M.A., Orlova K.A., Klenina N.N. Analysis Nerpesviridae family of viruses spread sredi Nizhny Novgorod children. *Meditsinskiy al'manakh*. 2013; (2): 99—103. (in Russian)
  16. Malyuzhinskaya N.V., Polyakova O.V. Clinical features frequently ill children with chronic diseases of the respiratory tract of Volgograd. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2014; (1): 39—42. (in Russian)
  17. Chen T., Hudnall S.D. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod. Pathol*. 2006; 19(5): 726—37.
  18. Karlidag T., Bulut Y., Keles E., Alpay H.C., Seyrek A., Orhan I. et al. Presence of herpesviruses in adenoid tissues of children with adenoid hypertrophy and chronic adenoiditis. *Kulak Burun Bogaz Ihtis. Derg.* 2012; 22(1): 32—7.
  19. Brandtzaeg P. Immune functions of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Adv. Otorhinolaryngol*. 2011; 72: 20—4.
  20. Al-Salam S., Dhaheri S.A., Awwad A., Daoud S., Shams A., Ashari M.A. Prevalence of Epstein-Barr virus in tonsils and adenoids of United Arab Emirates nationals. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2011; 75(9): 1160—6.
  21. Sahin F., Gerceker D., Karasartova D., Ozsan T.M. Detection of herpes simplex virus type 1 in addition to Epstein-Bar virus in tonsils using a new multiplex polymerase chain reaction assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2007; 57: 47—51.
  22. Ren T., Glatt D.U., Nguyen T.N., Allen E.K., Early S.V., Sale M. et al. 16S rRNA survey revealed complex bacterial communities and evidence of bacterial interference on human adenoids. *Environ. Microbiol*. 2013; 15(2): 535—47.
  23. Calo L., Passali G.C., Galli J., Fadda G., Paludetti G. Role of biofilms in chronic inflammatory diseases of the upper airways. *Adv. Otorhinolaryngol*. 2011; 72: 93—6.
  24. Kotlukov V.K., Kuz'menko L.G., Blokhin B.M., Antipova N.V., Kodolova T.S. Pediatrya. Features of the immune status and often chronically ill young children with asthma. *Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2007; 86(4): 25—8. (in Russian)

Поступила 11.07.16

Принята к печати 01.08.16

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2017

УДК 579.842.21: 579.253.083.1

Шипицына И.В., Осипова Е.В.

## БИОПЛЕНКООБРАЗОВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ *SERRATIA SPP.*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В МОНОКУЛЬТУРАХ И В СОСТАВЕ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПОЛУЧЕННЫХ *IN VITRO*

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», 640014, Курган

*Изучены адгезивные свойства 7 клинических штаммов Serratia marcescens, выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операций в 2013–2015 гг. у 7 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.*

*Бактерии S. marcescens выделены у одного пациента в монокультуре и у 6 в составе ассоциаций: S. marcescens + S. warneri + P. aeruginosa (n = 1); S. marcescens + S. aureus (n = 4); S. marcescens + M. morgani (n = 1).*

*По данным фотометрического анализа, штаммы S. marcescens характеризовались средней способностью к биопленкообразованию на поверхностях полистироловых планшетов и покровного стекла, что подтверждается значениями оптической плотности и согласуется с данными их адгезивной активности.*

*Биопленкообразующая способность ассоциаций микроорганизмов (S. marcescens + P. aeruginosa, S. marcescens + M. morgani) уже через 24 ч эксперимента в 1,4 и 1,2 раза соответственно была выше уровней биопленкообразования монокультур. Активность биопленкообразования ассоциации (S. marcescens + S. aureus) на 1-е сутки эксперимента была низкой, однако через 48 ч наблюдали значительный рост биопленки, что подтверждается значениями оптической плотности.*

*Результаты нашего исследования показали способность всех клинических штаммов S. marcescens, выделенных из остеомиелитического очага, к адгезии на поверхности эритроцитов и к биопленкообразованию на абиотических поверхностях (полистирол и стекло) как в монокультуре, так и в ассоциациях с другими микроорганизмами.*

*Учитывая, что микробные биопленки играют ведущую роль в хронизации инфекционных заболеваний, необходимо осознавать серьезность этиологической роли S. marcescens в развитии остеомиелита как патогена.*

**Ключевые слова:** хронический остеомиелит; биопленкообразующая способность; адгезия.

**Для цитирования:** Шипицына И.В., Осипова Е.В. Биопленкообразующая способность штаммов *Serratia spp.*, выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом в монокультурах и в составе ассоциации микроорганизмов, полученных *in vitro*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (3): 188–192. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-188-192>

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.

THE BIOFILM FORMATION ABILITY OF STRAINS *SERRATIA SPP.*, SEPARATED FROM WOUNDS OF PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS IN MONO-CULTURES AND IN COMPOSITION OF ASSOCIATION OF MICROORGANISMS HARVESTED IN VITRO

The academician G.A. Ilizarov Russian research center «Restorative traumatology and orthopedics» of Minzdrav of Russia, 640014 Kurgan, Russia

The article presents analysis of characteristics of 7 clinical strains of *Serratia marcescens* separated from fistulas in pre-operational period and from nidus of inflammation during operations in 2013-2015. In 7 patients with chronic osteomyelitis of long tubular bones. The bacteria *S.marcescens* are separated in one patient in monoculture and in 6 patients in composition of associations: *S.marcescens* + *S.warneri* + *Paeruginosa* (n=1); *S.marcescens* + *S.aureus* (n=4); *S.marcescens* + *M.morganii* (n=1). According phometric analysis, strains of *S.marcescens* were characterized by average ability for biofilm formation on the surfaces of polystyrene dishes and cover glass that is substantiated by values of optic density and is conformed to data of their adhesion activity.

The biofilm formation ability of association of microorganisms (*S.marcescens* + *Paeruginosa*, *S.marcescens* + *M.morganii*) already after 24 hours of experiment were correspondingly higher in 1.4 and 1.2 times of levels of biofilm formation in monocultures. The activity of biofilm formation of association (*S.marcescens* + *S.aureus*) on the first day of experiment was low. However, after 48 hours a significant growth of biofilm was observed that is substantiated by values of optical density. The results of study demonstrated ability of all clinical strains of *S.marcescens* separated from osteomyelitis nidus to adhesion on surface of erythrocytes and to biofilm formation on abiotic surfaces (polystyrene and glass) both in monoculture and associations with other microorganisms.

In consideration that microbial films play leading role in chronization of infectious diseases it is necessary to be aware of seriousness of etiologic role of *S.marcescens* in development of osteomyelitis as a pathogen.

**Key words:** chronic osteomyelitis; biofilm formation; ability; adhesion

**For citation:** Shipitsyna I.V., Osipova E.V. The biofilm-forming capacity of strains *Serratia* spp., separated from wounds of patients with chronic osteomyelitis in mono-cultures and in composition of association of microorganisms harvested in vivo. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (3): 188-192. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-188-192>*

**For correspondence:** Shipitsyna I.V., candidate of biological sciences, research worker of laboratory of microbiology and immunology. e-mail: [IVSchimik@mail.ru](mailto:IVSchimik@mail.ru)

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

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

Received 10.06.2016  
Accepted 01.07.2016

**Введение.** Хронический остеомиелит остается одной из актуальных проблем гнойной ортопедии [1]. При анализе данных бактериологического обследования пациентов с хроническим остеомиелитом установлено, что у 43% больных инфекционный процесс протекает с участием различных видов грамотрицательных микроорганизмов [2]. Один из них, *Serratia marcescens*, выделяется, по разным данным, в единичных случаях и не превышает 3,9% [2, 3].

*Serratia marcescens* (семейство *Enterobacteriaceae*) – относится к условно-патогенным микроорганизмам, способным вызывать гнойно-воспалительные процессы различной локализации, в тех случаях, когда создаются условия для их интенсивного размножения, обусловленные наличием таких факторов патогенности, как фимбрии, гемолизины, сидерофорная система, протеазы и термолabileный цитотоксин, а также резко снижена естественная сопротивляемость макроорганизма [4– 6]. Хорошо изучена этиологическая роль штаммов *S. marcescens* в развитии госпитальных бактериемий и пневмоний, инфекций мочевыводящих путей, хирургических ран и гнойно-септических поражений кожи [7]. Бактерии *Serratia* spp. принадлежат к группе мультирезистентных энтеробактерий, некоторые из штаммов способны продуцировать фермент ESBL (бета-лактамазы расширенного спектра) [8, 9].

Как и другие бактерии, *S. marcescens* может формировать биопленки, однако в литературе отсутствуют работы, посвященные исследованию способности к биопленкообразованию данного возбудителя, выделенного из остеомиелитического очага, что свидетельствует об актуальности исследования.

Цель исследования – изучить биопленкообразующую способность клинических штаммов бактерий рода *Serratia*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом.

**Материал и методы.** В исследование, которое проводилось с 2013 по 2015 г., включены 7 клинических штаммов *Serratia marcescens*, выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления, во время операции у 7 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.

Изучена биопленкообразующая способность монокультур

*S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *M. morganii*, *S. aureus*, *S. warneri* в сравнении с ассоциациями, полученными *in vitro*: *S. marcescens* + *S. warneri* + *P. aeruginosa* (n = 1); *S. marcescens* + *S. aureus* (n = 4); *S. marcescens* + *M. morganii* (n = 1).

Идентификацию исследуемых штаммов выполняла науч. сотр. Л.В. Розова на бактериологическом анализаторе WalkAway-40 Plus (Siemens, США).

Адгезивную активность штаммов изучали на модели эритроцитов человека А (II) Rh+ по методике В.И. Бриллиса [10]. При оценке адгезивных свойств использовали индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ). Исследование проводили под световым микроскопом, учитывая не менее 50 эритроцитов. Микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ до 1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0; высокоадгезивными – при ИАМ  $\geq 4,1$ .

Биопленку на поверхностях полистироловых планшетов и покровного стекла получали по описанным ранее методикам [11]. В качестве контроля использовали стерильный мясосопелтонный бульон (МПБ).

Активность формирования биопленки на поверхности полистирола оценивали по уровню адсорбции красителя этанолом, измеренному в единицах оптической плотности ( $OD_{630}$ ) на фотометре ELx808 (BioTek, США) при длине волны 630 нм. В зависимости от величины оптической плотности ( $OD_{630}$ ) считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки при значениях  $OD_{630} < 0,090$ ; при  $0,090 < OD_{630} \leq 0,180$  – штаммы обладали слабой; при  $0,180 < OD_{630} \leq 0,360$  – средней; при  $OD_{630} > 0,360$  – высокой способностью к образованию биопленки.

Биопленку, выращенную на поверхности покровного стекла, исследовали под микроскопом при увеличении в 640 раз (об. 40; ок. 16). Цифровые изображения полей зрения получали с помощью цифровой камеры-окуляра DCM-300 (Китай), установленной на бинокулярном микроскопе XSP107E.

Для определения количественных характеристик использовали программу ImageJ (США). На цифровых изображениях препаратов измеряли площадь поля зрения, количество и площадь, занимаемую единичными адгезированными клетками и микроколониями.

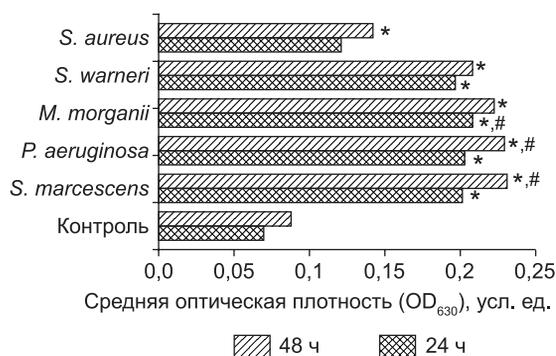


Рис. 1. Биопленкообразующая способность клинических штаммов через 24 и 48 ч эксперимента.

Здесь и на рис. 2: \* –  $p < 0,05$  – различия значимы по сравнению с контролем; # –  $p < 0,05$  – различия значимы по сравнению с данными, полученными через 24 ч эксперимента.

Рассчитывали количество единичных адгезированных клеток и микроколоний на единицу площади ( $1\text{мм}^2$ ) и доли, занимаемые ими в площади поля зрения. При этом учитывали размер микроколоний: до  $10\text{ мкм}^2$ ; от  $10$  до  $100\text{ мкм}^2$ ; от  $100$  до  $1000\text{ мкм}^2$ ; от  $1000$  до  $10000\text{ мкм}^2$ ;  $> 10000\text{ мкм}^2$ . С каждого препарата вводили не менее 20 случайных полей зрения, полученные результаты усредняли.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения анализа данных AtteStat, версия 13.0 [12]. Значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна–Уитни. Различия между группами наблюдений считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** По результатам микробиологического исследования штаммы *S. marcescens* были выделены у одного пациента в монокультуре и у 6 в составе ассоциаций: *S. marcescens* + *S. warneri* + *P. aeruginosa* ( $n = 1$ ); *S. marcescens* + *S. aureus* ( $n = 4$ ); *S. marcescens* + *M. morgani* ( $n = 1$ ).

ИАМ штаммов *S. marcescens* составил  $3,45 \pm 0,28$  ед., что соответствовало среднеадгезивной активности. Штаммы *S. aureus* обладали низкоадгезивными свойствами (ИАМ –  $1,85 \pm 0,13$  у. е.), штаммы *P. aeruginosa*, *M. morgani*, *S. warneri* – среднеадгезивными свойствами:  $2,74 \pm 0,12$ ;  $2,71 \pm 0,10$ ;  $2,60 \pm 0,15$  у. е. соответственно.

По данным фотометрического анализа, штаммы *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *M. morgani*, *S. warneri* характеризовались средней биопленкообразующей способностью, штаммы *S. aureus* – низкой, что согласуется с результатами адгезивной активности (рис. 1).

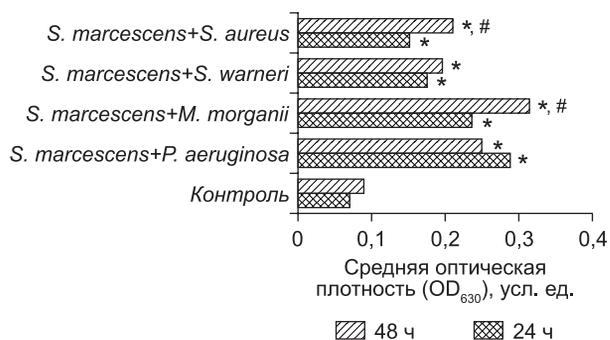


Рис. 2. Биопленкообразующая способность ассоциаций, полученных *in vitro* через 24 и 48 ч эксперимента.



Рис. 3. Соотношение количества единичных адгезированных клеток и микроколоний, формируемых штаммами *S. marcescens* в монокультуре на поверхности покровного стекла через 24 и 48 ч.

Через 24 ч эксперимента значения биопленкообразующей способности ассоциаций микроорганизмов (*S. marcescens* + *P. aeruginosa*, *S. marcescens* + *M. morgani*) в 1,4 и 1,2 раза соответственно превышали уровни биопленкообразования монокультур. Ассоциация штаммов (*S. marcescens* + *S. warneri*) характеризовалась слабой биопленкообразующей способностью, несмотря на средние показатели интенсивности биопленкообразования их монокультур (рис. 2). Уровень биопленкообразования ассоциации (*S. marcescens* + *S. aureus*) составил  $0,153 \pm 0,022$  ед. опт. пл., что в 1,3 раза выше биопленкообразующей способности штаммов *S. aureus* и в 1,3 ниже по сравнению с  $OD_{630}$  штаммов *S. marcescens*.

Через 48 ч наблюдали рост биопленок, что подтверждается значениями оптической плотности (см. рис. 1, 2). Интенсивность биопленкообразования ассоциации микроорганизмов (*S. marcescens* + *M. morgani*) была в 1,4 раза выше по сравнению с  $OD_{630}$  монокультур исследуемых клинических штаммов (см. рис. 2).  $OD_{630}$  ассоциации микроорганизмов *S. marcescens* + *S. aureus* и *S. marcescens* + *S. warneri* составила  $0,212 \pm 0,011$  и  $0,197 \pm 0,012$  ед. опт. пл. соответственно, что указывало на средний уровень биопленкообразования.

Все клинические штаммы обладали способностью к биопленкообразованию на поверхности покровного стекла как в монокультуре, так и в ассоциации.

Количество адгезированных клеток и микроколоний бактерий рода *Serratia* в монокультуре на этапах

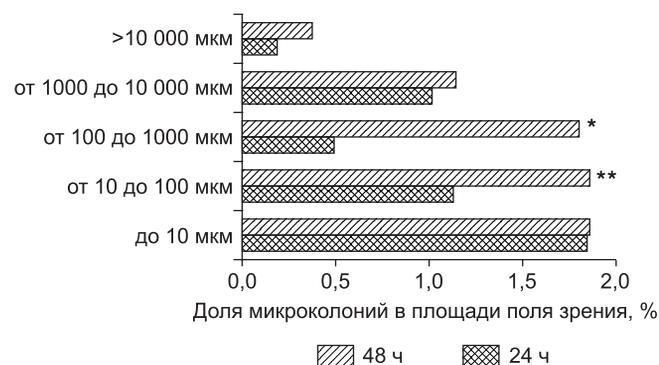


Рис. 4. Соотношение долей микроколоний, формируемых на поверхности покровного стекла штаммами *S. marcescens* в монокультуре через 24 и 48 ч.

Различия значимы по сравнению со сроком эксперимента 24 ч: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

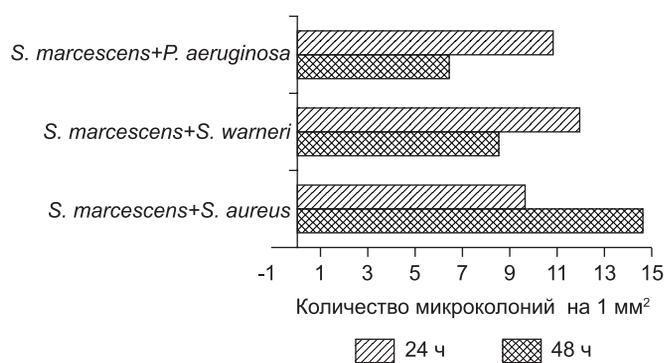


Рис. 5. Соотношение количества микроколоний ассоциаций клинических штаммов, полученных *in vitro* на поверхности покровного стекла через 24 и 48 ч.

эксперимента представлено на рис. 3. Даже их незначительное увеличение приводило к изменению соотношения долей микроколоний различного размера (рис. 4).

При сокультивировании *S. marcescens* с клиническими изолятами *S. aureus*, *S. warneri*, *P. aeruginosa* в ассоциациях, полученных *in vitro*, в 1,7 (*S. aureus*)–19,6 (*P. aeruginosa*) раза увеличивалось количество единичных адгезированных клеток по сравнению с монокультурами штаммов.

Количество микроколоний в ассоциациях по сравнению с монокультурами не всегда увеличивалось (*S. marcescens* + *S. aureus*; *S. marcescens* + *P. aeruginosa*): иногда и уменьшалось (*S. marcescens* + *S. warneri*).

Сравнение активности биопленкообразования на поверхности покровного стекла *S. marcescens* в ассоциациях с *S. aureus*, *S. warneri*, *P. aeruginosa* представлено на рис. 5 и 6. Через 48 ч эксперимента происходит уменьшение количества и доли микроколоний в ассоциации *S. marcescens* с *P. aeruginosa*, увеличение этих же показателей в ассоциации *S. marcescens* с *S. aureus* и уменьшение количества при одновременном увеличении доли микроколоний в ассоциации *S. marcescens* с *S. warneri*. Данные изменения зависели от структуры формирующейся биопленки.

Так, в ассоциации *S. marcescens* + *S. aureus* изменение анализируемых показателей происходило за счет увеличения количества и долей микроколоний размером до 10 000 мкм² и появлением микроколоний размером >10 000 мкм².

В ассоциации *S. marcescens* + *S. warneri* отмечено снижение количества микроколоний размером до 10 000 мкм², при этом наблюдали образование единичных микроколоний раз-

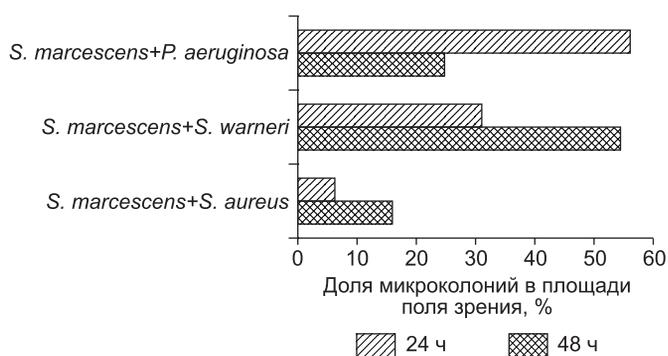


Рис. 6. Соотношение долей микроколоний ассоциаций клинических штаммов, полученных *in vitro* на поверхности покровного стекла через 24 и 48 ч.

мером >10 000 мкм², что приводило к увеличению суммарной доли микроколоний в площади поля зрения в 1,7 раза.

В ассоциации *S. marcescens* + *P. aeruginosa* через 48 ч происходило уменьшение количества и доли микроколоний, размер которых не превышал 1000 мкм². Одновременно в 2 раза увеличивалось количество микроколоний размером от 1000 до 10 000 мкм², соответственно их доля в площади поля зрения возрастала в 7,3 раза. Уменьшение суммарной доли микроколоний на данном сроке эксперимента было связано с отсутствием микроколоний размером > 10 000 мкм.

**Обсуждение.** Бактерии *S. marcescens* относятся к редким возбудителям хронического остеомиелита. Обычно они ассоциируются с внутрибольничными инфекциями [13].

Способность бактерий *S. marcescens* вызывать инфекционный процесс и размножаться в макроорганизме обусловлена наличием у них ряда факторов, определяющих их адгезивную, колонизирующую, цитотоксическую и энтеротоксическую активность [14–16].

С адгезией к различным субстратам связана способность бактерий к формированию биопленок, в составе которых клетки защищены от неблагоприятных воздействий физических, химических и биологических факторов [17]. Адгезия бактерий *S. marcescens* инициируется за счет ассоциации с поверхностью пилей I типа и основных белков наружной мембраны [14]. Известно, что степень адгезии и способность к пленкообразованию среди микроорганизмов одного вида, выделенных из разных источников, коррелирует со степенью вирулентности [18].

Вирулентные свойства, в том числе и способность к биопленкообразованию, *S. marcescens* в условиях ослабленного иммунитета, способствует длительной персистенции возбудителя и прогрессированию гнойного процесса [19, 20]. Это подтверждается тем, что хронический остеомиелит, вызванный бактериями рода *Serratia*, чаще развивается у лиц с иммунодефицитом; наркоманов, вводящих наркотики внутривенно, а также может быть следствием открытой травмы или внутрисуставных инъекций [6]. Вероятность развития остеомиелита увеличивается при наличии сопутствующих заболеваний (сахарный диабет, алкоголизм, онкология, последействие терапии кортикостероидами) [19].

**Заключение.** Результаты нашего исследования показали способность всех клинических штаммов *S. marcescens*, выделенных из остеомиелитического очага, к адгезии на поверхности эритроцитов и к биопленкообразованию на абиотических поверхностях (полистирол и стекло) как в монокультуре, так и в ассоциациях с другими микроорганизмами.

Учитывая, что микробные биопленки играют ведущую роль в хронизации инфекционных заболеваний, необходимо осознавать серьезность этиологической роли *S. marcescens* в развитии остеомиелита как патогена.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 6–9, 13–20 см. REFERENCES)

1. Ключин Н.М., Аронович А.М., Шляхов В.И., Злобин А.В. Новые технологии лечения больных хроническим остеомиелитом – итог сорокалетнего опыта применения метода чрескостного остеосинтеза. *Гений ортопедии*. 2011; (2): 27–33.
2. Яковлев С.В. Имипенем. Оценка роли препарата при антибактериальной терапии тяжелых госпитальных инфекций. *Антибиотики и химиотерапия*. 1999; 44 (5): 33–8.
3. Розова Л.В. Изменение видового состава микрофлоры у больных хроническим остеомиелитом в процессе лечения. *Гений ортопедии*. 2008; (2): 92–5.
4. Воробьев А.А., ред. *Микробиология и иммунология: учебник*. М.: Медицина; 1999.

5. Апрелев А.Е., Яковлева Н.А., Вальшев А.В. Случай язвы роговицы, вызванной *Serratia marcescens*. *Вестник офтальмологии*. 2013; 129 (1): 53–5.
10. Бриллис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*. 1986; (4): 210–2.
11. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Исследование адгезивных характеристик уропатогенных штаммов *Escherichia coli* у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой. *Урология*. 2014; (2): 20–4.
12. Гайдышев И.П. *Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++: учебник*. СПб.: ВХВ Петербург; 2004.
10. Brillis V.I., Brilene T.A., Lentsner Kh.P., Lentsner A.A. A technique of studying the adhesive process of microorganisms. *Laboratornoe delo*. 1986; (4): 210–2. (in Russian)
11. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Evaluation of the adhesive characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains in patients with spinal cord injuries. *Urologiya*. 2014; (2): 20–4. (in Russian)
12. Gaydyshev I.P. *Solution of Scientific and Engineering Problems by Excel VBA and C/C++ Means: A Textbook [Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++: uchebnik]*. St. Petersburg: VKhV Peterburg; 2004. (in Russian)
13. Sader H.S., Farrell D.J., Flamm R.K., Jones R.N. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 78 (4): 443–8.
14. Hornsey M., Ellington M.J., Doumith M., Hudson S., Livermore D.M., Woodford N. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65 (3): 479–82.
15. Hertle R. The family of *Serratia* type pore forming toxins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005; 6 (4): 313–25.
16. Kurz C.L., Chauvet S., Andrès E., Aurouze M., Vallet I., Michel G.P. et al. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J.* 2003; 22 (7): 1451–60.
17. Kaplan J.B. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 2010; 89 (3): 205–18.
18. Zhu J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 3129–34.
19. Hornsey M., Ellington M.J., Doumith M., Hudson S., Livermore D.M., Woodford N. et al. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65 (3): 479–82.
20. Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y., Labbate M., Lam K.W., Kjelleberg S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (10): 3477–85.

Поступила 10.06.16

Принята к печати 01.07.16