

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

4 • 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

АПРЕЛЬ

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 06.03.2017.

Подписано в печать 05.04.2017.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 268.

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 издательства 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 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.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2017. № 4. 193—256.

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
4 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

APRIL

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.A. Zyukina*

E-mail: oao-medsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Кухарчук В.В.* Единая этиология и раздельный патогенез атеросклероза и атероматоза. Различия переноса жирных кислот в липопротеинах травоядных и плотоядных животных 196
- Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В., Монахова Н.Е., Григорьев С.Г.* Маркеры повреждения нейронов и глии в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей 204

ЦИТОЛОГИЯ

- Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю., Петров А.Н.* Трудности цитологической диагностики заболеваний молочной железы на материале трепанобиопсий 210

ИММУНОЛОГИЯ

- Просекова Е.В., Ситдикова Т.С., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабыныч В.А., Забелина Н.Р.* Мониторинг лабораторных показателей иммунного статуса здоровых детей, проживающих в условиях напряженной иммунотропной зоны индустриального города 216
- Курабекова Р.М., Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Можейко Н.П., Цирульникова И.Е., Олефиренко Г.А.* Связь уровня трансформирующего фактора роста бета 1 с фиброзом печени у детей с врожденными заболеваниями гепатобилиарной системы 221
- Сновская М.А., Намазова-Баранова Л.С., Малышев В.С., Кожевникова О.В., Батырова А.С., Вишнева Е.А.* Диагностическое определение sIgE к аллергенам пыльцы деревьев тест-системой «Алкор-Био» и методом Immunocap 225
- Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И.* Использование микрокультурального иммуноферментного анализа модифицированного метода иммунофлюоресценции для диагностики аденовирусной инфекции 230
- Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Иванова С.Н., Шутова А.С.* Закономерности изменения содержания в сыворотке крови ростстимулирующих и ростингибирующих факторов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе и их диагностическое значение 235
- Юдина Ю.В., Белая О.Ф., Паевская О.А., Зуевская С.Н.* Миграционная активность лейкоцитов как показатель гиперчувствительности замедленного типа у больных рожей . 240

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Кузнецова М.В., Чарушина И.П., Максимова А.В., Баландина С.Ю., Демаков В.А., Фельдблум И.В.* Эпидемиолого-микробиологическая характеристика культур *Candida albicans*, циркулирующих в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов 246
- Кунгурцева Е.А., Белкова Н.Л., Приставка А.А., Иванова Е.И., Даренская М.А., Сердюк Л.В., Лещенко О.Я.* Структура условно-патогенной микрофлоры носоглотки и вагинального тракта у женщин с репродуктивными нарушениями и хроническим эндометритом 252

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Kukharchuk V.V.* The integrated etiology and separate pathogenesis of atherosclerosis and atheromatosis. The differences of fatty acids transfer in lipoproteins of herbivorous and carnivorous animals 196
- Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V., Monakhova N.E., Grigoriev S.G.* The markers of damage of neurons and glia in cerebrospinal liquor under meningitis in children 204

CYTOLOGY

- Volchenko N.N., Borisova O.V., Ermolaeva A.G., Melnikova V.Yu., Petrov A.N.* The difficulties of cytological diagnostic of breast diseases based on trepanobiopsy samples 210

IMMUNOLOGY

- Prosekova E.V., Sitdikova T.S., Dolgoplov M.S., Turyanskaya A.I. Sabynych V.A., Zabelina N.R.* The monitoring of laboratory indices of immune status of healthy children residing in conditions of intensive immunotropic zone of industrial town 216
- Kurabekova R.M., Shevchenko O.P., Tzirulnikova O.M., Mozheiko N.P., Tzirulnikova I.E., Olefirenko G.A.* The relationship of level of transforming growth factor beta 1 with liver fibrosis in children with congenital diseases of hepatobiliary system 221
- Snovskaya M.A., Namazova-Baranova L.S., Malyshev V.S., Kozhevnikova O.V., Batyrova A.S., Vishneva E.A.* The diagnostic detection of sIgE to allergens of trees' pollen by rest-system "Alkor-Bio" and Immunocap technique 225
- Amosova I.V., Timoshycheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya J.V., Egorova A.A., Lvov N.I.* The application of micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay of modified immunofluorescence technique for diagnostic of adenovirus infection 230
- Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V., Ivanova S.N., Shutova A.S.* The patterns of alteration of content of growth-stimulating and growth-inhibiting factors in blood serum under β -cell chronic lymphatic leukemia and their diagnostic value 235
- Yudina Yu.V., Belaya O.F., Payevskaya O.A., Zuevskaya S.N.* The migration activity of leukocytes as indicator of hypersensitivity of delayed type in patients with erysipelas 240

MICROBIOLOGY

- Kuznetsova M.V., Charuchina I.P., Maksimova A.V., Balandina S.Yu., Demakov V.A., Feldblum I.V.* The epidemiological microbiological characteristics of cultures of *Candida albicans* circulating in hospital for HIV-infected patients 246
- Kungurtseva E.A., Belkova N.L., Pristavka A.A., Ivanova E.I., Darenskaya M.A., Serdyuk L.V., Leschenko O.Ya.* The structure of opportunistic microbiota of nasopharynx and vaginal tract in women with reproduction disorders and chronic endometritis 252

БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., КУХАРЧУК В.В., 2017

УДК 616.13-004.6-092

Титов В.Н., Кухарчук В.В.

ЕДИНАЯ ЭТИОЛОГИЯ И РАЗДЕЛЬНЫЙ ПАТОГЕНЕЗ АТЕРОСКЛЕРОЗА И АТЕРОМАТОЗА. РАЗЛИЧИЯ ПЕРЕНОСА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛИПОПРОТЕИНАХ ТРАВояДНЫХ И ПЛОТояДНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

Согласно филогенетической теории общей патологии, избыточное потребление травоядными животными мясной пищи всегда приводит к атеросклерозу и атероматозу интимы артерий. Этиологические факторы атеросклероза, атероматоза in vivo: а) поглощение клетками полиеновых жирных кислот ПНЖК в апоВ-100 липопротеинах низкой плотности; б) невозможность превратить экзогенную, пальмитиновую, насыщенную жирную кислоту (НЖК) в мононенасыщенную олеиновую (МЖК); в) моноциты → макрофаги в интиме неактивно гидролизуют полиеновые ЖК, этерифицированные спиртом холестерином. Патогенетическим фактором становится нарушение биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания); афизиологично высокое содержание в пище пальмитиновой НЖК и спирта холестерина (ХС). Ключевой этап патогенеза — формирование в крови безлигандных, пальмитиновых липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). При этом как: а) утилизировать in vivo безлигандные, пальмитиновые ЛПОНП; это возможно при активации биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления, формировании атероматоза интимы артерий и б) как продолжать функцию клеткам при невозможности поглощать из межклеточной среды полиеновые ЖК; это основа атеросклероза, нарушения биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации. Для первичной профилактики инфаркта миокарда надо устранить потребление избыточного количества животной пищи. При низком содержании в пище пальмитиновой НЖК инсулин формирует оптимальный олеиновый вариант метаболизма ЖК, обеспечивая высокие «кинетические параметры» организма и эффективный синтез АТФ. Согласно единому патогенезу атеросклероза и атероматоза, необходимо не допускать образование в крови безлигандных, пальмитиновых ЛПОНП. Не будет их — не будет формирования ни атеросклероза, ни атероматоза.

Ключевые слова: жирные кислоты; холестерин; атеросклероз; атероматоз; биологическая функция эндоэкологии.

Для цитирования: Титов В.Н., Кухарчук В.В. Единая этиология и раздельный патогенез атеросклероза и атероматоза. Различия переноса жирных кислот в липопротеинах травоядных и плотоядных животных. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(4): 196-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-196-204>

Titov V.N., Kukharchuk V.V.

THE INTEGRATED ETIOLOGY AND SEPARATE PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS AND ATHEROMATOSIS. THE DIFFERENCES OF FATTY ACIDS TRANSFER IN LIPOPROTEINS OF HERBIVOROUS AND CARNIVOROUS ANIMALS

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

According phylogenetic theory of general pathology, overconsumption of meat food by herbivorous animals always results in atherosclerosis and atheromatosis of intima of arteries. The etiological factors of atherosclerosis, atheromatosis in vivo: a) absorption by cells of polyene fatty acids in apoB-100 lipoproteins of low density; b) impossibility of converting exogenous palmitic saturated fatty acids into mono-unsaturated oleic fatty acid; c) monocytes-macrophages in intima inactively hydrolyze polyene fatty acids esterified by alcohol cholesterol. The disorder of biological function of trophology (nutrition), biological reaction of exotrophy (external nutrition) and aphysiologically high content of palmitic unsaturated fatty acids and alcohol cholesterol in food become a pathogenic factors. The key stage of pathogenesis is formation in blood of non-ligand palmitic lipoproteins of very low density. At that: a) how to utilize in vivo non-ligand palmitic lipoproteins of very low density; it is possible under activation of biological function of endoecology, biological reaction of inflammation, formation of atheromatosis of intima of arteries and b) how to prolong function of cells at impossibility of absorbing from inter-cellular medium polyene fatty acids; this is a foundation of atherosclerosis, disorders of biological function of adaptation, biological reaction of compensation. The primary prevention of myocardium infarction requires elimination of surplus amount of animal food. At low content of palmitic saturated fatty acids in food insulin forms optimal oleic alternative of metabolism of fatty acids supporting high "kinetic parameters" of organism and effective synthesis of ATP. According single pathogenesis of atherosclerosis and atheromatosis it is necessary to prevent development of non-ligand palmitic lipoproteins of very low density in blood. Without them no development of both atherosclerosis and atheromatosis is possible.

Key words: fatty acids; cholesterol; atherosclerosis; atheromatosis; biologic function of endoecology

For citation: Titov V.N., Kukharchuk V.V. The integrated etiology and separate pathogenesis of atherosclerosis and atheromatosis. The differences of fatty acids transfer in lipoproteins of herbivorous and carnivorous animals. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 196-204. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-196-204>

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

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.10.2016
Accepted 29.11.2016

Со времен Н.Н. Аничкова в медицинской науке доминирует холестериновая теория атеросклероза. Руководствуясь этой теорией, мы в течение XX века не смогли понять этиологию и патогенез атеросклероза и атероматоза, не отработали принципы эффективной профилактики [1, 2]. И все-таки, несмотря на сомнения в холестериновой теории атеросклероза, мы ежедневно измеряем содержание холестерина (ХС) в плазме крови и липопротеинах (ЛП) у многих тысяч пациентов. Почему же так?

В последнее время все с большим обоснованием исследователи оценивают значение в патогенезе атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) афизиологического содержания в пище и *in vivo* жирных кислот (ЖК). В первую очередь это относится к С16: 0 пальмитиновой насыщенной ЖК (НЖК). Однако это уже иная теория ЖК, иной патогенез атеросклероза и атероматоза. На ступенях филогенеза при жизни в водах мировых океанов, несмотря на то что каждая животная клетка синтезирует *in situ de novo* пальмитиновую НЖК quantum sates, содержание ее в пище и *in vivo* физиологично не превышает 20% концентрации всех ЖК *in vivo*.

Физиологично у вида *Homo sapiens* среди ЖК *in vivo* преобладает олеиновая МЖК. Роль ЖК в патогенезе атеросклероза, атероматоза и ИБС реализована в двух отдельных афизиологических нарушениях биологической функции трофологии (питания): а) избыточном количестве в пище пальмитиновой НЖК и б) алиментарном дефиците, низком содержании в пище и в клетках ω -3 и ω -6 полиеновых ЖК (ПНЖК) [3]. Избыточное содержание пальмитиновой НЖК в ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), в ЛП низкой плотности (ЛПНП) пальмитиновой НЖК служит основой патогенеза атероматоза. Низкое содержание в пище и в клетках *in vivo* ПНЖК — основа патогенеза атеросклероза. При единении факторов этиологии патогенез атеросклероза — это одно, а патогенез атероматоза интимы артерий — иное.

Экспериментаторы не дали ответа, почему на модели экзотической гиперхолестеринемии столь просто воспроизвести атероматоз аорты у кроликов и практически невозможно у мышей и крыс? Почему для столь же быстрого моделирования атероматоза аорты у мышей необходимо предварительно выбить у них (knock out) ген *anoE*?

Становление в филогенезе у травоядных животных переноса ПНЖК к клеткам последовательно в составе ЛПВП и в ЛПНП. Несколькими годами ранее, через полтора века после Р. Вирхова и его клеточной теории общей патологии, мы сформировали иную — филогенетическую теорию общей патологии [4]. Филогенетическая теория общей патологии позволила биологически, физико-химически: а) объединить афизиологичную роль ХС, избытка НЖК и недостатка ПНЖК в патогенезе атеросклероза; б) установить единые этиологические факторы и в) определить сочетанный, но раздельный патогенез атеросклероза и атероматоза. Обсуждая значение в патогенезе атеросклероза воздействия факторов внешней среды, мы на время оставим в стороне все генетические формы нарушения переноса ЖК в составе ЛП, все гиперлипидемии (ГЛП) [5], включая разные ее фенотипы [6].

Миллионы лет все ЖК к клеткам переносили (переносят у некоторых видов животных и сейчас) только ЛП высокой плотности (ЛПВП). Ранний в филогенезе белок связывающий липиды — аполипопротеин (апо) — апоА-I мало

специфичен и ассоциирует мало и только полярные липиды. В межклеточной среде апоА-I переносит: а) все ЖК — МЖК + НЖК, ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2—3 двойными связями (ДС) и б) ПНЖК с 4—6 ДС в форме фосфолипидов (ФЛ); в) МЖК и НЖК в форме ди-, моноглицеридов; г) полярный, неэтерифицированный спирт ХС.

Все клетки поглощают ЖК из ЛПВП только пассивно, путем обмена ЖК между ФЛ в составе ЛПВП и ФЛ плазматической мембраны; происходит это в течение миллионов лет до настоящего времени.

Со временем функция ЛПВП усложнилась; ЛПВП, вместе с переносом к клеткам ЖК стали отвозить от клеток и синтезированный ими полярный ХС. Чтобы перенос от клеток ХС стал более эффективным, в ЛПВП проходит этерификация ХС с олеиновой МЖК, образованные при этом моноеновые эфиры холестерина (моно-ЭХС), холестерололеат, упаковываться в ЛПВП стало проще.

Со временем пассивного поглощения клеткам ЖК стало недостаточно; на ступенях филогенеза сформировалось активное, рецепторное поглощение их клетками.

АпоВ-100 в гепатоцитах сформировал ЛП из неполярных липидов, из триглицеридов (ТГ); ЖК в форме неполярных ТГ клетки стали поглощать активно, путем рецепторного эндоцитоза. В отличие от более ранних ЛПВП, апоВ-100 в ЛПНП стал переносить МЖК + НЖК + ННЖК в форме неполярных ТГ; клетки стали поглощать ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. Для этого апоВ-100 формирует в ЛПНП одноименный домен-лиганд; клетки же выставляют на плазматическую мембрану апоВ-100-рецепторы. Путем апоВ-100-рецепторного эндоцитоза клетки начали активно поглощать МЖК + НЖК + ННЖК; ПНЖК же клетки еще долго продолжали поглощать пассивно.

На поздних ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции, когда количество переносимых к скелетным миоцитам ЖК существенно возросло, инсулин экспрессировал направленный (векторный) перенос только МЖК + НЖК ко всем инсулинозависимым клеткам в составе нового класса ЛП — ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП). Для этого инсулинозависимые клетки стали синтезировать и выставлять на мембрану апоЕ/В-100-рецепторы, а ЛПОНП в крови начали формировать апоЕ/В-100-лиганды. Все олеиновые и пальмитиновые ЛПОНП поглощают клетки путем апоЕ/В-100-эндоцитоза. Ни пальмитиновые, ни олеиновые апоВ-100 ЛПОНП в ЛПНП не превращаются; их все после формирования лиганда поглощают инсулинозависимые клетки.

Позже клетки сформировали и активное поглощение ПНЖК в составе апоВ-100 ЛПНП, подобно тому, как они поглощают МЖК + НЖК + ННЖК, путем апоВ-100-эндоцитоза. Для этого ЛПВП начали переэтерифицировать ПНЖК из полярных ФЛ в неполярные, более гидрофобные поли-ЭХС, этерифицированные спиртом холестерином ПНЖК. Клетки активно поглощают ПНЖК в несколько этапов: а) в ЛПВП при действии эстеразы (аминофосфолипид-холестерин ацил-трансфераза) происходит переэтерификация ПНЖК из полярных ФЛ в состав неполярных поли-ЭХС; далее б) вновь синтезированный протеин — белок переносящий поли-ЭХС (БППЭХС) стал формировать в крови тройственный ассоциат (ЛПВП + БППЭХ + ЛПНП); в нем неполярные поли-ЭХС из

ЛПВП переходят в ЛПНП; далее в) более гидрофобные липиды — поли-ЭХС, которые переходят из ЛПВП в ЛПОНП, вытесняют ТГ из ассоциации с апоВ-100, формируя ЛПНП с более низкой гидратированной плотностью и меньшими размерами; далее апоВ-100, в ассоциации с поли-ЭХС изменяет свою пространственную форму, конформацию, выставляя на поверхность ЛПНП апоВ-100 домен-лиганд; в финале г) клетки поглощают ПНЖК в форме поли-ЭХС в составе ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза.

Так у всех филогенетически ранних травоядных животных сформировался последовательный перенос к клеткам ЖК: вначале ЛПНП переносят к клеткам МЖК + НЖК + ННЖК в форме ТГ; далее ЛПНП же переносят к клеткам ПНЖК в форме поли-ЭХС. По отношению к количеству переносимых в составе ЛПНП МЖК + НЖК + ННЖК переносимые ПНЖК составляют всего-то несколько процентов!

Плотоядные животные сформировали параллельный перенос МЖК + НЖК + ННЖК в составе ЛПНП и ПНЖК в ЛПВП. На ступенях филогенеза у плотоядных животных, которые питаются главным образом животной пищей, особенности состава ЖК (высокое содержание НЖК и пальмитиновой НЖК), можно полагать, как-то способствовали формированию мутации БППЭХС-нуль. При этом 95% популяций животных вымерли; остальные, реализуя биологическую функцию адаптации, к мутации адаптировались. Произошло это путем формирования *in vivo* не последовательного, как у травоядных животных, а параллельного, раздельного переноса и поглощения клетками: а) МЖК + НЖК + ННЖК в форме ТГ в ЛПНП, а ПНЖК в форме поли-ЭХС в ЛПВП, в которых они и синтезированы. Так плотоядные животные (крысы, мыши, собаки) сформировали в филогенезе не последовательный, а параллельный перенос ПНЖК в ЛПВП путем нового, апоЕ/А-I-эндоцитоза.

В крови травоядных животных ЛПНП переносят к клеткам последовательно вначале МЖК + НЖК + ННЖК в форме ТГ, а затем ПНЖК в форме поли-ЭХС; все ЖК клетки поглощают путем апоВ-100-эндоцитоза. У плотоядных же животных ЛПНП переносят к клеткам МЖК + НЖК + ННЖК, и клетки поглощают их путем апоВ-100-эндоцитоза. ПНЖК же к клеткам переносят ЛПВП, и клетки поглощают их путем иного апоЕ/А-I-эндоцитоза.

Различие переноса к клеткам ЖК у плотоядных столь значительно, что сколь бы высоким в животной пище не было содержание пальмитиновой НЖК, оно не нарушит параллельное, независимое поглощение клетками ПНЖК. В то же время у травоядных животных при последовательном переносе ПНЖК избыточное содержание в пище пальмитиновой НЖК блокирует последующее поглощение клетками ПНЖК, уменьшая биодоступность их для клеток и инициируя клиническую картину атеросклероза.

И если плотоядные животные по разным причинам в условиях голода, потребляют углеводную пищу, свойственную травоядным животным, нарушений в переносе в составе ЛПВП и рецепторном поглощении клетками ПНЖК не происходит. Если же травоядные животные начинают поедать избыточное количество животной пищи, высокое содержание в ней пальмитиновой НЖК блокирует перенос НЖК + МЖК + ННЖК в ЛПОНП и поглощение клетками ПНЖК в ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза. За этим всегда следует развитие атеросклероза и атероматоза интимы артерий.

Характерные биохимические, физиологические тесты травоядных животных: а) преобладание в крови натошак апоВ-100 ЛПНП; б) доминирование в крови олеиновых ТГ и олеиновых ЛПОНП; в) низкое содержание апоЕ в ЛПВП; г) высокое содержание в плазме крови БППЭХС; д) олеиновый вариант метаболизма в клетках ЖК.

Плотоядных животных характеризуют противоположные

значения тестов: а) доминирование в плазме крови натошак ЛПВП; б) преобладание в плазме крови пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПОНП; в) высокое содержание апоЕ в ЛПВП; г) следовые количества в плазме крови БППЭХС и д) отчасти пальмитиновый вариант метаболизма в клетках ЖК. Напомним, что почти у 8% жителей японских островов в крови натошак доминируют ЛПВП (физиологическая гиперальфалипопротеинемия) за счет повышения содержания в ЛПВП поли-ЭХС и в крови снижено содержание БППЭХС.

У всех плотоядных животных, клетки которых поглощают ПНЖК в форме поли-ЭХС в составе ЛПВП путем апоЕ/А-I-эндоцитоза, атеросклероз и атероматоз на модели экзогенной гиперхолестеринемии не развивается. У всех травоядных животных, клетки которых поглощают ПНЖК в форме поли-ЭХС, в составе ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза на модели экзогенной гиперхолестеринемии формируется атеросклероз и атероматоз интимы артерий. В кровотоке формируется блокада биодоступности, возможность для клеток поглощать пальмитиновые ЛПОНП; это составляет основу патогенеза атероматоза интимы артерий. Блокада же избытком пальмитиновой НЖК пищи поглощения клетками ПНЖК — основа патогенеза атеросклероза. Перенос МЖК + НЖК + ННЖК и далее ПНЖК в одном классе ЛП, в ЛПНП и поглощение их клетками путем единого апоВ-100-эндоцитоза является этиологическим фактором атеросклероза и атероматоза и у вида *Homo sapiens*. У плотоядных животных МЖК + НЖК + ННЖК к клеткам переносят ЛПНП, а ПНЖК — ЛПВП.

Если атеросклероз, согласно филогенетической теории общей патологии, является синдромом дефицита в клетках ПНЖК, то, чтобы сформировать атеросклероз и атероматоз у крыс, мышей и собак, надо блокировать у них поглощение клетками ПНЖК. Это и происходит у животных при выбивании (knock out) гена *anoE* [7]. Выбивание гена *anoE* у крыс и мышей превращает их в травоядных животных, которыми они были на ранних ступенях филогенеза. И у мышей с выбитым геном *anoE*, как у травоядных животных, на модели экзогенной гиперхолестеринемии, как и у кроликов, формируется атероматоз интимы [8]. Иного способа активировать атеросклероз и атероматоз у крыс, мышей, собак на модели экзогенной гиперхолестеринемии нет. Вначале их надо превратить в травоядных животных, подобно кролику или *Homo sapiens*.

В филогенезе *Homo sapiens* сформировался как травоядный представитель животного мира. Если использовать критерии, которые характеризуют травоядных животных (доминирование в крови ЛПНП, преобладание олеиновых ТГ и одноименных ЛПОНП, высокое содержание БППЭХС в плазме крови), человек в филогенезе сформировался, как травоядный вид. Человек, как и все травоядные животные, имеет длинный кишечник; длина его в 12 раз больше длины тела; у плотоядных животных кишечник в 3—4 раза короче. Усвоение углеводов *in vivo* — более длительный процесс, чем всасывание белков. У травоядных животных в 10 раз ниже, чем у хищников, кислотность желудочного сока, активность позиционно специфичной панкреатической липазы (гидролазы ТГ) в тонком кишечнике. Слона плотоядных животных имеет кислую реакцию и содержит протеазы для гидролиза протеинов; в ней нет амилазы — начального этапа гидролиза полисахаридов. У человека слона имеет щелочную реакцию. У плотоядных животных на коже нет потовых желез.

Гепатоциты плотоядных животных синтезируют в 10—15 раз больше мочевой кислоты; происходит это с целью вывести большое количество азота, который содержат белки животной пищи. Моча плотоядных животных имеет выраженно кислую реакцию; физиологично у человека моча слабощелочная. И хотя антропологи утверждают, что человек «испокон века» всеяден; по отношению к продолжительно-

сти филогенеза «испокон века» оказывается на деле всего-то кратким эпизодом. К тому же, человек не питается сырым мясом; биологически это невозможно.

Безусловно, условия внешней среды временами, а то и постоянно заставляли *Homo sapiens* использовать животную пищу; однако это никогда не было поеданием сырого мяса, как у плотоядных животных. Оптимально для филогенетически травоядного человека стало поедание даже сырой рыбы и яиц (яйцеклеток) птиц; со временем это стало привычным. На суше только яйца птиц содержат оптимальное для человека количество ω -6 С20: 4 арахидоновой ПНЖК; растительные масла арахидоновой ПНЖК не содержат.

Анатомическое строение человека (зубы, челюсти, система пищеварения) не оптимально для всех видов растительной пищи: человек не может поедать молодую кору деревьев, корешки растений, молодые побеги и ветки, многие корнеплоды; человеку и их надо сварить. Карл Линней, основатель бинарной номенклатуры видов животных, говорил: «сравнительный анализ внешнего и внутреннего строения тела человека и животных доказывает, что естественной пищей для людей являются фрукты и сочные овощи». В филогенезе человек является **плодоядным** (от слова плод), но никак не **плотоядным** (от слова плоть). Рука человека, как показывают человекообразные обезьяны, предназначена в большей мере для лазания и срывания плодов с веток деревьев.

Locus minoris resistentia, патогенез атеросклероза и атероматоза у травоядных животных и Homo sapiens. Чтобы понять основные физико-химические и биохимические механизмы, которые формируют патогенез атеросклероза и атероматоза при поедании травоядными животными мясной пищи, мы полагаем, необходимо вначале выяснить, каковы: а) особенности усвоения человеком экзогенных ЖК, синтеза в гепатоцитах позиционно специфичных ТГ; б) секреция гепатоцитами в кровотоки функционально разных ЛПОНП; в) поглощение ЛПОНП в основном зависимыми от инсулина клетками и г) лишь незначительное превращение ЛПОНП в ЛПНП в крови при переносе и поглощении клетками ЖК.

В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована в молекуле ТГ во 2-й (средней) позиции (sn-2) трехатомного спирта глицерина, которую не могут гидролизовать внеклеточные липазы, ТГ делят на пальмитиновые, олеиновые, стеариновые, линолевые и линоленовые. Пальмитиновые + олеиновые — это более 80% всего количества ТГ *in vivo*.

Выраженно разная пространственная форма позиционных изоформ (ПИ), ТГ, особенно если в них этерифицированы ННЖК, служит основой того, что в гепатоцитах апоВ-100 разделяет структурирует ТГ в пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые ЛПОНП.

Чем больше липиды животной пищи содержат пальмитиновой НЖК, тем активнее гепатоциты синтезируют пальмитиновые ТГ, а апоВ-100 формируют из них больше пальмитиновых ЛПОНП.

Физиологично ни олеиновые, ни пальмитиновые ЛПОНП в крови в одноименные ЛПНП не превращаются. Олеиновые и пальмитиновые ЛПОНП формируют апоЕ/В-100-лиганд; связывая его своими рецепторами, зависимые от инсулина клетки поглощают все олеиновые и пальмитиновые ЛПОНП. В крови в ЛПНП физиологично превращаются только линолевые и линоленовые ЛПОНП. Именно в линолевые и в линоленовые ЛПОНП в физиологичных условиях при действии БППЭХС из ЛПВП переходят все ПНЖК в форме поли-ЭХС, превращая ЛПОНП в линолевые и линоленовые ЛПНП.

Эксперименты на разных лабораторных животных и наблюдения в клинике показывают, что если количество животной пищи у травоядных превышает оптимальное, физиологично допустимое количество, происходит следующее: а) в крови пальмитиновые ЛПОНП доминируют над физио-

логичными олеиновыми ЛПОНП; б) формируется ГЛП Пб типа с повышением в плазме крови содержания ТГ, ХС и в) ХС-ЛПНП. У травоядных животных и человека при избытке пальмитиновой НЖК *locus minoris resistentia* является единым. Это — блокада гидролиза пальмитиновых ТГ в составе пальмитиновых ЛПОНП; если ЛПОНП не сформируют и не выставят на поверхность апоЕ/В-100-лиганд, их не смогут поглотить клетки.

Клетки травоядных поглощают МЖК + НЖК + ННЖК в олеиновых, пальмитиновых ЛПОНП, а ПНЖК в линоленовых, линоленовых ЛПНП. ЛПОНП в филогенезе — самые поздние; сформировались они при становлении биологической функции локомоции — движения за счет сокращения скелетной мускулатуры. Синтез ЖК и формирование гепатоцитами ЛПОНП активирует инсулин. Биологическая роль гормона — обеспечение субстратами для наработки энергии клетками, которые реализуют биологическую функцию локомоции. ЛПОНП направленно переносят в крови ЖК для наработки клетками энергии, образования АТФ. У травоядных животных ЛПОНП в форме ТГ переносят к клеткам главным образом экзогенную + эндогенную С18: 1 олеиновую МЖК и много меньше экзогенной С16: 0 пальмитиновой НЖК. Вместе олеиновые + пальмитиновые ЛПОНП составляют более 80% всех ЛПОНП; переносят они МЖК + НЖК только к инсулинозависимым клеткам [9].

Зависимые от инсулина клетки: а) поперечнополосатые, скелетные миоциты; б) синцитий кардиомиоцитов; в) перипортальные гепатоциты, г) адипоциты подкожной жировой ткани и д) клетки Купфера — оседлые, макрофаги печени. Висцеральные жировые клетки (ВЖК) сальника рецепторов к инсулину на мембране не имеют; метаболизм ЖК в них не зависит от инсулина. На плазматической мембране инсулинозависимые подкожные адипоциты (ИПА) имеют: а) рецепторы к инсулину и б) поздние в филогенезе, инсулинозависимые глюкозные транспортеры, GLUT4. Перенос ЛПОНП к инсулинозависимым клеткам определен тем, что только они выставляют на мембрану апоЕ/В-100-рецепторы. Клетки рецепторами связывают лиганд ЛПОНП; у травоядных животных ЛПОНП переносят в основном олеиновые и меньше пальмитиновые ТГ [10].

Когда человек питается растительной пищей и морепродуктами, в которых преобладает олеиновая МЖК, гепатоциты секретируют в кровотоки главным образом олеиновые ЛПОНП. При афизиологичном преобладании животной пищи с высоким содержанием пальмитиновой НЖК гепатоциты секретируют в кровь преимущественно пальмитиновые ЛПОНП. Сколь же велико различие скорости гидролиза в крови позиционных изомеров ТГ в олеиновых и пальмитиновых ЛПОНП при действии постгепариновой ЛПЛ?

Позиционные изоформы ТГ — субстраты гидролиза в крови в составе ЛПОНП при действии постгепариновой ЛПЛ. Если мы все ПИ пальмитиновых и олеиновых ТГ представим в порядке возрастания константы скорости гидролиза их в крови при действии постгепариновой ЛПЛ, получится «спектр» ТГ:

ППП—ППО—ОПП—ПОП—ОПО—ООП—ПОО—ООО.
66,4 — — 35,2 22,0 18,2 — 5,5°C

Под ПИ триглицеридов мы поместили температуру плавления как основной физико-химический параметр ТГ. Мы не включили малые по количеству линолевые и линоленовые ТГ. При оценке диагностического значения ПИ триглицеридов мы используем такой прием, как «сдвиг» влево и вправо.

Функционально явно нежелателен сдвиг влево, в сторону пальмитиновых ПИ, происходит это при: а) поедании животной пищи, говядины и продуктов из жирного коровьего молока, сыров. Содержание в пище пальмитиновой НЖК может существенно превышать физиологичное количество (15—20%

всех ЖК пищи), составляя порой 40—60% всего количества ЖК. При формировании *in vivo* синдрома резистентности к инсулину (ИР) основное количество углеводов пищи гепатоциты превращают в эндогенную пальмитиновую НЖК, этерифицируя их далее в состав пальмитиновых ТГ и секретируя при этом избыточное количество пальмитиновых ЛПОНП.

Клетки травоядных животных и *Homo sapiens* не могут экзогенную пальмитиновую НЖК физиологично превратить эндогенно в олеиновую МЖК. Клетки *Homo sapiens* синтезируют только пальмитоил-КоА-десатуразу и могут экзогенную С16: 0 НЖК превратить в С16: 1 пальмитолеиновую НЖК. При поедании животной пищи в крови человека преобладают пальмитиновые ЛПОНП, высок ХС-ЛПНП и низко содержание ХС-ЛПВП; в плазме крови высока концентрация апоЕ и апоС-III. При сдвиге влево в спектре ПИ триглицеридов *in vivo* формируется малоэффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК; характеризует его постоянный дефицит АТФ для всех клеток; сдвиг ПИ триглицеридов влево всегда нежелателен.

Сдвиг вправо, в сторону олеиновых ПИ триглицеридов, патогенетически и профилактически всегда желаем. Происходит это при: а) средиземноморской диете, малом содержании в пище говядины и продуктов из жирного коровьего молока, при поедании рыбы, морепродуктов и оливкового масла, при оптимальном потреблении углеводов; б) физиологичном действии инсулина и в) высоком уровне физической активности, реализации биологической функции локомоции. Физиологичное содержание ТГ в ЛПОНП сопровождаются низкие значения ХС-ЛПНП, высокий уровень ХС-ЛПВП, физиологичное содержание в плазме апоЕ и апоС-III [11].

Температура плавления ПИ пальмитоил-пальмитоил-пальмитат глицерол, трипальмитата (ППП) составляет 49°C, а ПИ олеил-олеил-олеата, триолеата (ООО) — 15°C; различие физико-химического параметра >60°C. Точка плавления ТГ — физико-химический параметр каждого субстрата; она определяет скорость гидролиза индивидуальных ТГ при действии панкреатической липазы, постгепариновой ЛПЛ, печеночной глицеролгидролазы и даже гормонозависимой липазы. Происходит это в: а) филогенетически ранних, не чувствительных к инсулину висцеральных жировых клетках сальника и б) более поздних в филогенезе, зависимых от инсулина подкожных адипоцитах.

На поздних ступенях филогенеза формирование гуморального медиатора инсулина произошло с целью регуляции метаболизма МЖК + НЖК и снабжения скелетных миоцитов оптимальным количеством АТФ. Согласно выполненным нами ранее *in vitro* физико-химических экспериментов, окисление озоном ω -9 С18: 1 олеиновой МЖК происходит с константой скорости реакции на несколько порядков выше, чем при окислении пальмитиновой НЖК [12].

Митохондрии поглощают олеиновую МЖК со скоростью выше той, с которой они поглощают пальмитиновую НЖК. Происходит это, несмотря на наличие в мембране митохондрий специфического транспортера для пальмитиновой НЖК — карнитинпальмитоил ацилтрансферазы. В равной мере зависима от субстрата и производительность митохондрий; наработка АТФ происходит во много раз быстрее при окислении в митохондриях олеиновой МЖК, по сравнению с пальмитиновой НЖК. Биологическая роль инсулина — повышение кинетического потенциала организма. Инсулин экспрессирует синтез *in vivo* такой ЖК, окисляя которую, митохондрии нарабатывают максимальное количество АТФ в единицу времени.

Согласно филогенетической теории общей патологии, биологическая роль инсулина состоит в первую очередь в том, чтобы всю синтезированную гепатоцитами из экзогенных углеводов, из глюкозы эндогенную пальмитиновую НЖК превратить в ω -9 С18:1 олеиновую МЖК. Инсулин экспрес-

сирует ферменты сопряженных, биохимических реакций: а) превращение только эндогенной С16: 0 пальмитиновой НЖК при действии пальмитоил-КоА-элонгазы в С18: 0 стеариновую НЖК; затем б) стеарил-КоА-десатураза превращает стеариновую НЖК в ω -9 С18:1 олеиновую МЖК. Именно ее митохондрии клеток окисляют с наиболее высокой константой скорости реакции, с высокой производительностью, нарабатывая максимальное количество АТФ [10].

Ключевой этап патогенеза атеросклероза, блокада переноса МЖК + НЖК в пальмитиновых ЛПОНП в форме ТГ. Согласно филогенетической теории общей патологии, формирование ЛПОНП, как и взаимодействие апоЕ/В-100 лиганд ↔ рецептор на ступенях филогенеза произошло поздно. Чем позже в филогенезе сформировались системы, тем в большей мере они функционально нестабильны. Поэтому мы не встречаем пациентов с первичной патологией ЛПВП. Среди первичной патологии ЛПНП мы знаем только семейную гиперхолестеринемию. Гипертриглицеридемию, которую мы столь часто видим при диагностике метаболических пандемий, — это патология переноса и поглощения только ЛПОНП. Основная причина высокой частоты атеросклероза, атероматоза в популяции филогенетически травоядного *Homo sapiens* — афизиологичное воздействие факторов внешней среды. Это нарушение биологической функции трофологии, функции питания, реакции экзотрофии — внешнего питания.

Основу патогенеза атеросклероза и атероматоза составляют: а) поедание большого количества мясной пищи, высокое содержание в ней пальмитиновой НЖК, в крови — пальмитиновых ТГ и ЛПОНП; б) повышенное содержание в пище транс-форм МЖК; по параметрам метаболизма они соответствуют НЖК; в) повышенное содержание в животной пище ХС и г) алиментарный дефицит ω -6 и ω -3 ПНЖК [13]. При питании физиологичной пищей количество олеиновых ТГ и олеиновых ЛПОНП в плазме крови выражено превышает количество пальмитиновых ТГ и пальмитиновых ЛПОНП.

Олеиновые, пальмитиновые, линолевые и линоленовые ЛПОНП, которые гепатоциты секретируют в кровотоки, лиганд не выставляют. Все ЛПОНП функционально перегружены ТГ; это и препятствует формированию активного положения апоЕ/В-100-лиганда. Физиологично в крови, в олеиновых ЛПОНП, при действии постгепариновой ЛПЛ + кофактор апоС-II быстро проходит гидролиз части олеиновых ТГ. Когда количество их, связанных с апоВ-100, становится оптимальным, апоВ-100 принимает активную конформацию (стерическую, пространственную форму) и выставляет на поверхность олеиновых ЛПОНП апоЕ/А-100-лиганд. Быстро связывая его одноименными рецепторами, инсулинозависимые клетки поглощают все олеиновые ЛПОНП.

Физиологично избыточное содержание ТГ в составе линолевых и линоленовых ЛПОНП, гидролизует иная, более ранняя в филогенезе печеночная глицеролгидролаза и кофактор апоС-III. Липолиз в линолевых и линоленовых ЛПОНП активируют поли-ЭХС; при действии БППЭХС они переходят из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПОНП. Более гидрофобные поли-ЭХС вытесняют ТГ из связи с апоВ-100, формируют линолевые и линоленовые ЛПНП, выставляя на поверхность апоВ-100-лиганд. Связывая его одноименными рецепторами, клетки активно поглощают линолевые и линоленовые ЛПНП с переносимыми ПНЖК.

Когда же гепатоциты секретируют в кровь преимущественно пальмитиновые ТГ в составе одноименных ЛПОНП, гидролиз ТГ происходит афизиологично медленно; связанным с апоВ-100 остается избыточное количество пальмитиновых ТГ. В пальмитиновых ЛПОНП апоЕ/В-100-лиганд практически не формируется. После приема пищи с высоким содержанием пальмитиновой НЖК, а далее и постоянно, в крови циркулируют безлигандные пальмитиновые ЛПОНП,

формируя ГЛП типа Пб. В крови пальмитиновые ЛПОИП медленно превращаются в пальмитиновые ЛПНП, формируя фракцию пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП [14].

Далее, ПНЖК в форме поли-ЭХС из ЛПВП, вместо небольшого пула линолевых и линоленовых ЛПОИП, оказываются в большом пуле безлигандных, пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП. В крови формирование линолевых и линоленовых ЛПНП практически не происходит; клеткам нечего поглощать путем апоВ-100-эндоцитоза. При низкой биодоступности для клеток линолевых и линоленовых ЛПНП поглощение клетками ПНЖК практически останавливается; в клетках формируется дефицит ПНЖК [15]. Когда мы измеряем содержание ХС-ЛПНП, реально мы определяем содержание ХС в афизиологичных, пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП.

Два следствия формирования в крови безлигандных, пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП. В результате образования в крови безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП *in vivo* формируются два нарушения; они требуют активации биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации и биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления.

Как далее продолжать функцию клеткам, которые лишены возможности поглощать незаменимые (эссенциальные) ω -6 и ω -3 ПНЖК; как синтезировать аминокислоты и обеспечить параметры плазматической мембраны; из чего синтезировать филогенетически ранние, гуморальные медиаторы эйкозаноиды: простаглицлины, простаглицлины, тромбоксаны и лейкотриены?

Как избавляться от большого количества в крови безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП, от эндогенного биологического «мусора» большой молекулярной массы? Поскольку эндогенные флогены большой молекулярной массы невозможно вывести из организма [16], утилизировать их приходится *in situ*. Сделать это можно только при реализации биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления. Удаление из внутрисосудистого, локального пула межклеточной среды катаболитов малой молекулярной массы (<70 кДа, массы альбумина) реализует биологическая реакция экскреции.

Утилизацию эндогенных флогенов большой молекулярной массы (>70 кДа) осуществляет *in vivo, in situ* биологическая реакция воспаления. Все последствия блокады поглощения клетками ПНЖК, образования в клетках дефицита ПНЖК сглаживает биологическая функция адаптации, биологическая реакция компенсации. Последствия афизиологичной блокады поглощения клетками ПНЖК, дефицит в клетках ПНЖК формируют клиническую картину атеросклероза. Нарушения же биологических функций и биологических реакций, которые формируются при утилизации *in vivo* безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП, образуют клиническую картину атероматоза интимы артерий эластического и смешанного типа. При единичном патогенезе не бывает атеросклероза без атероматоза и атероматоза без атеросклероза. И все-таки не стоит говорить «атеросклероз коронарных артерий», более правильно — «атероматоз коронарных артерий». Одновременно гиперагрегация тромбоцитов и повышение ригидности плазматической мембраны клеток *in vivo* — это симптомы атеросклероза.

Биологическая функция адаптации компенсирует дефицит ПНЖК в синтезе биологически активных эйкозаноидов. За миллионы лет жизни в водах трех мировых океанов, ω -3 С20:5 эйкозапентаеновая (эйкоза) и С22: 6 докозагексаеновая ПНЖК (докоза) стали субстратами, из которых клетки *in vivo* синтезируют филогенетически ранние, биологически активные гуморальные медиаторы — эйкозаноиды [17]. Это семейства простаглицлинов, простаглицлинов, тромбоксанов и лейкотриенов; они служат гуморальными регуляторами

метаболизма, в частности биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция (М ↔ М), локальные нарушения которой *in vivo* происходят наиболее часто. Синтезируют эйкозаноиды клетки РСТ, начиная с уровня паракринных сообществ (ПС) клеток, используя в качестве предшественник синтеза эйкоза ПНЖК. Докоза — форма депонирования ПНЖК в монослойных мембранах клеточных органелл [18].

Наиболее активные эйкозаноиды (эйкоза — по-гречески «двадцать») клетки синтезируют из эйкоза; молекулы таких простаглицлинов, простаглицлинов, тромбоксанов и лейкотриенов имеются три ДС; они формируют группу биологически активных эйкозаноидов-3. Ни одна животная клетка не может синтезировать ПНЖК; в океане эйкоза и докоза синтезируют сине-зеленые водоросли; их и поедают рыбы. В пермском периоде при выходе животных на сушу, где растения не синтезировали ни эйкоза, ни докоза, вымерло более 95% популяции животных. Малая же часть животных приспособилась поедать растения, которые синтезировали ω -6 С18:3 γ -линоленовую ПНЖК; из нее плотоядные животные стали синтезировать ω -6 С20:4 арахидоновую ПНЖК. Ее они использовали как субстрат для синтеза эйкозаноидов. Молекулы этих эйкозаноидов имели две ДС; это эйкозаноиды-2. Функционально активность их ниже, чем у эйкозаноидов-3; функционально же *in vivo* этого оказалось достаточно [19].

Когда же при атеросклерозе клетки не могут поглощать ни ω -3, ни ω -6 ПНЖК, клетки компенсаторно синтезируют эйкозаноиды из эндогенной ω -9 С20:3 дигомо- γ -линоленовой ПНЖК. Синтезированные из ПНЖК эйкозаноиды имеют в молекуле одну ДС; это эйкозаноиды-1. Если эйкозаноиды-2 являются лишь менее активными, чем эйкозаноиды-3, действие простаглицлина-1, простаглицлина-1, тромбоксана-1 и лейкотриена-1 афизиологично. Вместо релаксации артериол мышечного типа синхронно с действием вазодилатора NO простаглицлина-1 ингибируют биологическую реакцию эндотелий-зависимой вазодилатации, нарушая биологическую реакцию М ↔ М. Тромбоксан-1, вместо ингибирования, активирует агрегацию тромбоцитов, способствуя образованию тромбов. Лейкотриены-1 афизиологично активируют биологическую реакцию воспаления.

В плазматической мембране в окружении каждого из интегральных белков формируется зона из менее гидрофобных аминокислот; в sn-2 глицерина в них этерифицированы ПНЖК и часто ПНЖК. Аминокислоты формируют функциональное, менее гидрофобное окружение для каждого из рецепторов, транспортеров катионов и анионов, ГЛЮТ4 в гидрофобном бислое мембраны из фосфатидилхолинов [20]. Дефицит в клетке ПНЖК, нарушает все пути функционального общения ее с внешней средой и иными клетками.

Нарушения регуляции метаболизма, биологической реакции М ↔ М, которые невозможно устранить локально при действии эйкозаноидов на уровне клеток, ПС, органов и систем органов, приходится компенсаторно устранять с уровня нейросекреторных ядер гипоталамуса, продолговатого мозга, с уровня организма [21]. Атеросклероз — нарушение регуляции метаболизма в каждой из клеток *in vivo*, в каждом ПС, в органе и системе органов из-за дефицита в клетках ПНЖК.

Сбор и утилизация безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП в биологической реакции воспаления в интиме. Все безлигандные пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП, которые «замусоривают» внутрисосудистую и межклеточную среду *in vivo*, необходимо собрать и утилизировать, реализовать биологическую функцию эндоекологии, биологическую реакцию воспаления. Предназначение биологической реакции воспаления — поддержание «чистоты» межклеточной среды путем сбора и утилизации эндогенных флогенов (эндогенных инициаторов воспаления), сбора и утилизации ЛПОИП → ЛПНП [22]. Реализуют биологическую реакцию воспаления в основном клетки

рыхлой соединительной ткани (РСТ): а) монослой эндотелия и биологическая реакция трансцитоза; б) филогенетически ранние оседлые, региональные макрофаги; в) специализированные макрофаги Купфера в печени и г) филогенетически более поздние моноциты гематогенного происхождения; в тканях они становятся моноцитами → макрофагами [23].

В реализации биологической реакции воспаления *in vivo* задействовано много клеток: монослой эндотелия, нейтрофилы, гуморальная система опсонизации, оседлые макрофаги, моноциты костного мозга и образованные *in situ* моноциты → макрофаги. Клетки РСТ реализуют эти функции в тканях *in situ*, где часто нарушена биологическая реакция $M \leftrightarrow M$, гибнут клетки по типу апоптоза с накоплением эндогенных флогогенов в форме телец апоптоза [24].

Согласно филогенетической теории общей патологии, интима артерий эластического типа служит местом сбора и утилизации эндогенных флогогенов, экзогенных патогенов, ксенобиотиков, бактерий и вирусов из локального пула внутрисосудистой, межклеточной среды. Все их клетки монослоя эндотелия, реализуя биологическую реакцию трансцитоза, выводят в интиму, где связывают с гликозамингликанами матрикса. Освобождение флогогенов из матрикса происходит в реализации филогенетически ранними макрофагами столь же ранней биологической реакции внеклеточного пищеварения.

Безлигандные ЛПОИП → ЛПНП в крови, биологическая реакция трансцитоза, поглощение флогогенов оседлыми макрофагами интимы. Прежде чем вывести из кровотока безлигандные пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП, их надо физиологично денатурировать. Реализуют эту реакцию нейтрофилы; они в реакции «респираторного взрыва» нарабатывают активные формы кислорода. Предназначены они для физиологичной денатурации апоВ-100, для формирования на поверхности безлигандных ЛП антигенных детерминант. Далее Толл-подобные рецепторы-4, оценивая в крови молекулы белка по принципу «свой — не свой» и найдя денатурированный апоВ-100 (антигенную детерминанту), определяют ЛП как «не свой», подлежат удалению. При этом перекисное окисление ЖК (липидов) в составе ЛП, вероятно, просто побочный процесс.

Далее пальмитиновые ЛП подвергаются опсонизации — адсорбции на них опсонинов; они оптимизируют реакцию трансцитоза и далее реакцию фагоцитоза. Поглощают ЛП как филогенетически более ранние оседлые макрофаги интимы артерий, так и более поздно сформированные в филогенезе клетки Купфера в печени. Согласно филогенетической теории общей патологии, биологическую реакцию воспаления наиболее рано, еще в ПС клеток РСТ, стали реализовывать ранние в филогенезе оседлые макрофаги. Происходит это следующим образом.

Клетки монослоя эндотелия физиологично, путем биологической реакции трансцитоза выводят из сосудистого русла в матрикс интимы артерий эластического типа безлигандные ЛПОИП → ЛПНП, комплексы антиген:антитело, липополисахариды бактерий:липополисахариды связывающий белок, ферменты, иные макромолекулы белка [25].

Филогенетически ранние оседлые макрофаги, реализуя биологическую функцию эндоэкологии, утилизируют эндогенные флогогены путем биологической реакции воспаления. Для реализации этого оседлые макрофаги секретируют в интиму протеолитические ферменты — металлопротеиназы; в активном центре фермента они содержат ион Zn^{++} . Протеиназы гидролизуют гликозаминогликаны матрикса со связанными с ними пальмитиновыми ЛПОИП → ЛПНП; далее макрофаги поглощают флогогены вместе с протеогликами матрикса.

Для поглощения гидролизата макрофаги используют сквенджер-рецепторы, рецепторы-мусорщики. Клетки активно гидролизуют в лизосомах, пероксиосомах все липиды, включая ТГ, ФЛ, моно-ЭХС и поли-ЭХС, поддерживая «чи-

стоту» интимы артерий эластического типа и внутрисосудистого пула межклеточной среды. Затем гладкомышечные клетки меди изменяют свой фенотип; из сократительных они становятся секреторными и, нарабатывая компоненты матрикса, восстанавливают целостность интимы [26].

Резидентных макрофагов в интима артерий у травоядных животных немного; биодоступность для макрофагов эндогенных флогогенов физиологично ограничена. В филогенезе клетки эндотелия не формировали механизмы активации биологической реакции трансцитоза. Утилизация макрофагами безлигандных ЛПОИП требует больших затрат энергии. Ее в форме АТФ оседлые макрофаги нарабатывают, окисляя в митохондриях ЖК, которые освобождают при гидролизе ТГ в ЛП. Мы полагаем, что функционально С-реактивный белок служит вектором направленного переноса ЖК в форме ТГ в составе ЛПОИП для наработки энергии теми клетками, которые реализуют биологическую реакцию воспаления.

Активаторами биологической реакции трансцитоза через монослой эндотелия на поздних ступенях филогенеза, с уровня организма, являются: а) повышение артериального давления (АД) в проксимальном отделе артериального русла, в артериях эластического типа и б) гидравлическое продавливание везикул с переносимыми в них ЛП по пути эндоцитоз + экзоцитоз = трансцитоз [27]. При накоплении во внутрисосудистом русле флогогенов пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП с уровня организма происходит повышение АД в проксимальном отделе артерий с целью активации физическим способом биологической реакции трансцитоза.

Для реализации биологической функции эндоэкологии в печени сформировались функционально специализированные клетки Купфера [28]. Сколь активно задействованы они в сборе и утилизации из внутрисосудистого пула среды безлигандных пальмитиновых ЛП, предстоит еще выяснить.

Особенность клеток Купфера — в них анатомически и функционально преодолены те «преграды», которые обусловили низкую биодоступность эндогенных флогогенов для поглощения их оседлыми макрофагами интимы артерий. Для этого венозные сосуды портальной системы печени формируют широкие синусоиды [29]. В них, под монослоем фенестрированного эндотелия, сформировались пространства Диссе, в которых оседлые макрофаги, клетки Купфера, напрямую омывает кровь; и сквенджер-рецепторы клеток Купфера свободно связывают и поглощают пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП. Несмотря на большие потенциальные возможности клеток Купфера печени, на ступенях филогенеза формирование их, мы полагаем, произошло после замкнутой системы кровообращения и оседлых макрофагов в интима артерий. Поэтому, вероятно, оседлые макрофаги интимы продолжают быть основным местом сбора и утилизации ЛП, которые в крови не сформировали лиганд.

Безлигандными в крови могут стать не только пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП; ими могут быть и олеиновые ЛПОИП при наличии афизиологичного фенотипа апоЕ — Е2/Е2. При этом аффинность апоЕ2/В-100-лиганда и одноименно рецептора на мембране инсулинозависимых клеток составляет не более 2—3% активности физиологичного фенотипа Е3/Е3 [30].

Несмотря на то что монослой эндотелия и гладкомышечные клетки имеют разные фенотипы в аорте, в сонных и бедренных артериях, исходно, мы полагаем, все клетки мезотелия реализуют биологическую реакцию воспаления при сборе и утилизации эндогенных флогогенов по единому алгоритму. Если в крови безлигандными становятся олеиновые апоЕ2/апоВ-100, формируется воспалительное, деструктивное поражение интимы по типу атеротромбоза. При этом в интима оседлые макрофаги формируют из ТГ мягкие бляшки; они склонны к разрыву и формированию атеротром-

боза коронарных артерий. Безлигандные же пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП формируют в интима атероматоз [31].

Когда же на ступенях филогенеза при большем потреблении травоядными животной пищи оседлых макрофагов в интима стало недостаточно для утилизации безлигандных пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП? В этих условиях оседлые макрофаги стали синтезировать и секретировать гуморальные медиаторы — хемоаттрактанты. Хемокины (хемотаксические цитокины) — провоспалительные цитокины, инициируют перемещение моноцитов в тканях по градиенту концентрации. Секретируя хемоаттрактанты, оседлые макрофаги завлекают в интиму из сосудистого русла «рекрутов», моноцитов гематогенного происхождения.

Моноциты, привлеченные действием хемокинов, per diapedesis выходят из внутрисосудистого русла в межклеточную среду интимы. В течение нескольких дней они, проходя первоначальную специализацию, становятся моноцитами → макрофагами и начинают утилизировать *in situ* безлигандные пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП. Создается впечатление, что за столь краткий период первичной специализации *in situ* (несколько дней) моноциты → макрофаги овладевают не всеми специфичными функциями; в частности, они не экспрессируют в лизосомах гидролазу поли-ЭХС, не могут освободить ПНЖК из неполярной формы поли-ЭХС, гидролизовать поли-ЭХС [32]. В полной мере функциональная несостоятельность филогенетически поздних моноцитов → макрофагов по сравнению с филогенетически ранними оседлыми макрофагами — это 3-й этиологический фактор атероматоза — формирования пенных клеток (лаброцитов) [33]. Наполнены они главным образом поли-ЭХС; гибель их по типу некроза и формирует поражение интимы по типу атероматоза и атеротромбоза.

Согласно филогенетической теории общей патологии, афизиологичное влияние факторов внешней среды, избыточное содержание в пище травоядных животных плотоядных ХС и пальмитиновой НЖК — основные факторы в патогенезе атеросклероза и атероматоза. Действуют оба фактора односторонне и в одном месте, инициируя образование в крови безлигандных пальмитиновых ЛПОНП. При высоком содержании в пище ХС и пальмитиновой НЖК: а) монослой полярных липидов (фосфатидилхолин + ХС) с высоким содержанием ХС, который в ЛПОНП покрывает ТГ, по сути разобщает фермент в гидрофильной среде кровотока и субстрат — гидрофобные ТГ в ЛПОНП; б) наличие между ними малопроницаемого монослоя с высоким содержанием ХС блокирует биодоступность ТГ для гидролиза его липазой.

И даже при физиологичном содержании полярного ХС в монослое фосфатидилхолин + ХС в ЛПОНП пальмитиновые ТГ — явно не оптимальный субстрат для гидролиза при действии посепариновой ЛПЛ и кофактора апоС-II [34]. Результатом нарушения липолиза становится непринятие апоВ-100 специфичной конформации и невыставление на поверхность пальмитиновых ЛПОНП апоЕ/В-100-лиганда. Результатом нарушения утилизации пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП в биологической функции воспаления и становится атероматоз интимы артерий.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5—9, 11, 13—21, 25—34 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н., Осипов Г.А., Тарарак Э.М., Годков М.А. Жирные кислоты ткани сонных артерий в области атером и липидных пятен. Единение патогенеза синдрома атеросклероза и его симптома — атероматоза интимы артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(3): 4—17.

2. Домбровский А.Л., Сергиенко И.В., Рвачева А.В., Аншелес А.А., Семенова А.Е., Кухарчук В.В. Влияние терапии аторвастатином в различных дозах на эндотелиальные прогениторные клетки и факторы ангиогенеза у больных ишемической болезнью сердца. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2015; (2): 56—68.

3. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. *Атеросклероз*. М.: ИНФРА-М; 2014.

4. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. *Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014.

10. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А. *Жирные кислоты, триглицериды, гипертриглицеридемия, гипергликемия и инсулин*. М.: ИНФРА-М; 2016.

12. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. *Физическая химия, биология и медицина*. Москва—Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2006.

22. Абрамов В.В., Ершов О.В., Филатенков Е.В. Закономерности миграции и циркуляции иммунокомпетентных клеток: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи современной биологии*. 2007; 127(3): 257—66.

23. Душкин М.И. Макрофаг/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль. *Биохимия*. 2012; 77(4): 419—32.

24. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Колпакова Т.А., Меньщикова Е.Б. Макрофаг и микобактерия: война без начала и конца. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(6): 554—74.

REFERENCES

1. Titov V.N., Osipov G.A., Tararak E.M., Godkov M.A. Fatty acids tissue in the carotid arteries and atheroma lipid stains. Unity of the pathogenesis of atherosclerosis syndrome and its symptoms — atheromatosis of the intima of the arteries. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(3): 4—17. (in Russian)

2. Dombrovskiy A.L., Sergienko I.V., Rvacheva A.V., Anshel's A.A., Semenova A.E., Kukharchuk V.V. Effect of atorvastatin therapy at different doses on endothelial progenitor cells and angiogenesis factors in patients with coronary heart disease. *Ateroskleroz i dislipidemii*. 2015; (2): 56—68. (in Russian)

3. 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)

4. Titov V.N. Phylogenetic Theory of General Pathology. *The Pathogenesis of Metabolic Pandemics. Diabetes [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Sakharnyy diabet]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)

5. Musunuru K., Kathiresan S. Surprises from genetic analyses of lipid risk factors for atherosclerosis. *Circ. Res*. 2016; 118(4): 579—85.

6. Nurnberg S.T., Zhang H., Hand N.J., Bauer R.C., Saleheen D., Reilly M.P. et al. From loci to biology: functional genomics of genome-wide association for coronary disease. *Circ. Res*. 2016; 118(4): 586—606.

7. Whitman S.C., Hazen S.L., Miller D.B., Hegele R.A., Heinecke J.W., Huff M.W. Modification of type III VLDL, their remnants, and VLDL from ApoE-knockout mice by p-hydroxyphenylacetaldehyde, a product of myeloperoxidase activity, causes marked cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1999; 19(5): 1238—49.

8. Stachowicz A., Olszanecki R., Suski M., Wiśniewska A., Totoń-Zurańska J., Madej J. et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activation by Alda-1 inhibits atherosclerosis and attenuates hepatic steatosis in apolipoprotein E-knockout mice. *J. Am. Heart Assoc*. 2014; 3(6): e001329.

9. Lopez S., Bermudez B., Pacheco Y.M., López-Lluch G., Moreda W., Villar J. et al. Dietary oleic and palmitic acids modulate the ratio of triacylglycerols to cholesterol in postprandial triacylglycerol-rich lipoproteins in men and cell viability and cycling in human monocytes. *J. Nutr*. 2007; 137(9): 1999—2005.

10. Titov V.N., Rozhkova T.A., Amelyushkina V.A. *Fatty acids, triglycerides, hypertriglyceridemia, hyperglycemia, and insulin [Zhirnye kisloty, gipertriglitseridyy, gipertriglitseridemiya, giperгликемия i insulin]*. Moscow: INFRA-M; 2016. (in Russian)

11. Sanders T., Berry S., Miller G.J. Influence of triacylglycerol structure on the postprandial response of factor VII to stearic acid-rich fats. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77(4): 777—82.
12. Titov V.N., Lisitsyn D.M. *Fatty Acid. Physical Chemistry, Biology and Medicine [Zhirmye kisloty. Fizicheskaya khimiya, biologiya i meditsina]*. Moscow—Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2006. (in Russian)
13. Anand S.S., Hawkes C., de Souza R.J., Mente A., Dehghan M., Nugent R. et al. Food consumption and its impact on cardiovascular disease: importance of solutions focused on the globalized food system: a report from the workshop convened by the world heart federation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66(14): 1590—614.
14. Nielsen S., Karpe F. Determinants of VLDL-triglycerides production. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012; 23(4): 321—6.
15. Wildgruber M., Swirski F.K., Zernecke A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics.* 2013; 3(11): 865—84.
16. Gentek R., Molawi K., Sieweke M.H. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol. Rev.* 2014; 262(1): 56—73.
17. Riccioni G., Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *J. Geriatr. Cardiol.* 2012; 9(3): 305—17.
18. Goode G.K., Garcia S., Heagerty A.M. Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients: a double-blind placebo-controlled study. *Circulation.* 1997; 96(9): 2802—7.
19. Libby P., Bornfeldt K.E., Tall A.R. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 531—4.
20. Shaikh S.R., Kinnun J.J., Leng X., Williams J.A., Wassall S.R. How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: insight from NMR studies of model systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1848(1 Pt. B): 211—9.
21. Qi K., Seo T., Jiang Z., Carpentier Y.A., Deckelbaum R.J. Triglycerides in fish oil affect the blood clearance of lipid emulsions containing long- and medium-chain triglycerides in mice. *J. Nutr.* 2006; 136(11): 2766—72.
22. Abramov V.V., Ershov O.V., Filatenkov E.V. Patterns of migration and recirculation of immunocompetent cells: fundamental and applied aspects. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2007; 127(3): 257—66. (in Russian)
23. Dushkin M.I. Macrophage/foam cells as an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biokhimiya.* 2012; 77(4): 419—32. (in Russian)
24. Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kolpakova T.A., Men'shchikova E.B. Macrophage and mycobacterium: war without beginning or end. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2015; 135(6): 554—74. (in Russian)
25. Shapiro M.D., Fazio S. From lipids to inflammation: new approaches to reducing atherosclerotic risk. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 732—49.
26. Tabas I., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 653—67.
27. Nordestgaard B.G. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 547—63.
28. Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A. Kupffer cell metabolism and function. *J. Enzymol. Metab.* 2015; 1(1): 101—15.
29. Knolle P.A., Wöhlleber D. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell. Mol. Immunol.* 2016; 13(3): 347—53.
30. Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 679—91.
31. Maeda S., Nakanishi S., Yoneda M., Awaya T., Yamane K., Hirano T. et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012; 19(5): 444—52.
32. Bie J., Zhao B., Marqueen K.E., Wang J., Szomju B., Ghosh S. Macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase attenuates hepatic lipid accumulation and also improves glucose tolerance in ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012; 302(10): E1283—91.
33. Yuan Q., Bie J., Wang J., Ghosh S.S., Ghosh S. Cooperation between hepatic cholesteryl ester hydrolase and scavenger receptor BI for hydrolysis of HDL-CE. *J. Lipid. Res.* 2013; 54(11): 3078—84.
34. Pedersen T.R. The success story of LDL cholesterol lowering. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 721—31.

Поступила 15.10.16

Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2017

УДК 616.831.9-002-053.2-07:616.831.9-008.8

Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В., Монахова Н.Е., Григорьев С.Г.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ И ГЛИИ В ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ

ФГБУ «НИИ детских инфекций» ФМБА России, 197022, Санкт-Петербург

Актуальность изучения цереброспинальной жидкости при менингитах у детей обусловлена тяжестью течения заболевания с формированием резидуальных последствий у части пациентов. Появление в ликворе и сыворотке крови белков, характерных для нейронов, астро- и олигодендроглии, может служить маркером тяжести повреждения мозговой паренхимы и предиктором формирования неврологического дефицита. Исследованы образцы ликвора, полученные при диагностической люмбальной пункции у 44 детей (33 — с вирусным серозным менингитом, 11 — с бактериальным гнойным менингитом). Определение белка S-100, глиального фибриллярного кислого белка и нейронспецифичной енолазы проведено твердофазным иммуноферментным методом. Максимальное увеличение концентраций белка S-100 и глиального фибриллярного кислого белка обнаружено в начальной стадии бактериального гнойного менингита с последующим снижением в стадии реконвалесценции. При серозном менингите в остром периоде максимально высоким оказалось среднее значение концентрации нейронспецифичной енолазы с тенденцией к его увеличению в стадии реконвалесценции. Установлены разнонаправленные корреляционные взаимосвязи уровней нейронспецифичной енолазы, глиального фибриллярного кислого белка и белка S-100 со стандартными ликворологическими показателями и их прямые взаимосвязи между собой. Выявлена вариабельность уровней нейроспецифичных белков в ликворе, ассоциирующаяся с клиническими особенностями течения менингитов у детей, что свидетельствует о возможности их использования для уточнения вовлеченности в патологический процесс различных структур мозга и необходимости дальнейшего изучения взаимосвязи инфекционного поражения мозга с формированием неврологических последствий в резидуальном периоде.

Ключевые слова: цереброспинальная жидкость; менингит; дети; белок S-100; нейронспецифичная енолаза; глиальный фибриллярный кислый белок.

Для корреспонденции: Алексеева Лидия Аркадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., рук. отдела клин. лаб. диагностики; e-mail: kldidi@mail.ru

Для цитирования: Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В., Монахова Н.Е., Григорьев С.Г. Маркеры повреждения нейронов и глии в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 204-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-204-210>

Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V., Monakhova N.E., Grigoriev S.G.

THE MARKERS OF DAMAGE OF NEURONS AND GLIA IN CEREBROSPINAL LIQUOR UNDER MENINGITIS IN CHILDREN

The research institute of children infections of the Federal medical biological agency of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

The actuality of analysis of cerebrospinal fluid under meningitis in children is conditioned by severity of course of disease with development of residual aftermaths in part of patients. The appearance of proteins specific for neurons, astro- and oligodendroglia in liquor and blood serum can serve as a marker of severity of damage of cerebral parenchyma and as a predictor of development of neurological deficiency. The analysis was applied to samples of liquor obtained during diagnostic lumbar puncture in 44 children (33 with viral serous meningitis, 11 with bacterial purulent meningitis). The detection of protein S-100, glial fibrillar acid protein and neuron-specific enolase was implemented using solid-phase immune enzyme technique. The maximal increasing of concentrations of protein S-100 and glial fibrillar acid protein was detected at initial stage of bacterial purulent meningitis with consequent decreasing of at the stage of re-convalescence. Under serous meningitis at acute stage maximal high proved to be average value of concentration of neuron-specific enolase with tendency to its increasing at the stage of re-convalescence. The multi-directional correlation relationships are established concerning levels of neuron-specific enolase, glial fibrillar acid protein and protein S-100 with standard liquorologic indices and their direct mutual relationships. The variability of levels of neuron-specific proteins in liquor is established associated with clinical characteristics of course of meningitis in children that testifies possibility of their application for specifying involvement into pathological process of different brain structures and necessity of further studying of relationship of infection affection of brain with development of neurological aftermaths at the residual period.

Key words: cerebrospinal liquor; meningitis; children; protein S-100; neuron-specific enolase; glial fibrillar acid protein

For citation: *Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V., Monakhova N.E., Grigoriev S.G. The markers of damage of neurons and glia in cerebrospinal liquor under meningitis in children. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 204-210. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-204-210>*

For correspondence: *Alekseeva L.A.*, doctor of biological sciences, leading researcher, the head of the department of clinical laboratory diagnostic. e-mail: kldidi@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.11.2016
Accepted 29.11.2016

Актуальность изучения цереброспинальной жидкости (синоним: ликвор) при бактериальных гнойных и вирусных серозных менингитах у детей обусловлена тяжестью течения и возможным формированием резидуальных последствий вследствие функционального или органического повреждения нервной ткани. Течение менингитов может осложниться отеком головного мозга, вовлечением в инфекционный процесс мозговой паренхимы (менингоэнцефалиты), нарушением когнитивных функций в стадии реконвалесценции. В диагностике менингитов решающее значение имеет исследование цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), состав которой объективно отражает нарушения внутричерепного гомеостаза, изменения метаболизма и повреждение ткани мозга, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера [1—3]. Максимальные изменения клеточного и белкового состава ЦСЖ установлены при бактериальных гнойных менингитах по сравнению с вирусным серозным менингитом, хотя стандартные ликворологические показатели (общий белок и цитоз ликвора) не всегда соответствуют этиологии заболевания, тяжести повреждения мозга и не прогнозируют формирование резидуальных последствий [4, 5]. Это обуславливает актуальность поиска дополнительных лабораторных критериев, одним из которых может быть определение в ЦСЖ концентрации белков, специфичных для ткани мозга.

К настоящему времени открыта целая группа белков, характерных для нейронов, астро- и олигодендроглии, обеспечивающих функции нервной системы и постоянство внутренней среды мозга [6]. Наиболее изученные белки астроцитарной глии — белок S-100 и глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ), нейронов нейронспецифическая енолаза (НСЕ). Белки семейства S-100 — внутриклеточные кальций связывающие белки, которые регулируют кальциевый гомеостаз,

активность ферментов энергетического обмена клеток мозга, структурную организацию биомембран [7—9]. Часть белков семейства S-100 может секретироваться внеклеточно и взаимодействовать с рецепторами, экспрессируемыми клетками мозга и сосудистой стенки, оказывая воздействие на пролиферацию астроцитов, модуляцию пластичности синапсов, трофику нейронов [10]. Глиальный фибриллярный кислый белок — структурный компонент дифференцированных клеток астроцитарной глии. Он обеспечивает оптимальную среду вокруг нейронов. Его появление в сыворотке крови свидетельствует о нарушении целостности астроцитарных клеток, формирующих гематоэнцефалический барьер, и возможной гибели нейрональных клеток. В то же время основным маркером повреждения нейронов служит НСЕ — единственный общий маркер всех дифференцированных нейронов, внутриклеточный фермент, обеспечивающий энергетический метаболизм в нейронах головного мозга и периферической нервной ткани. Данные литературы указывают на полезность определения специфичных для нервной ткани белков в ЦСЖ и сыворотке крови у пациентов с разным характером течения того или иного острого заболевания центральной нервной системы (ЦНС) (черепно-мозговая травма различной степени тяжести, инсульт, гипоксия новорожденных и т. д.). Показано, что при черепно-мозговой травме, инсульте определение их концентрации в цереброспинальной жидкости или сыворотке крови позволяет оценить степень повреждения мозга и может быть использовано для уточнения глубины его поражения, определения нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера, прогноза течения и исхода заболевания [11—13]. Имеются сведения о более значительном увеличении специфичных для ткани мозга белков в биологических жидкостях при вирусных и клещевых энцефалитах по сравнению с бак-

Показатели состава цереброспинальной жидкости при менингитах у детей

Группа больных	Показатели ЦСЖ ($M \pm m$)				
	общий белок, г/л	цитоз, $\cdot 10^6/\text{л}$	НСЕ, нг/мл	белок S-100, нг/мл	ГФКБ, нг/мл
1 (БГМ, острый период), $n = 11$	$1,42 \pm 0,26^{*xo}$	$4655,4 \pm 1475,9^{*xo}$	$1,16 \pm 0,33$	$0,84 \pm 0,25^{*xo}$	$6,49 \pm 3,22$
2 (БГМ, реконвалесценция), $n = 6$	$0,32 \pm 0,06$	$66,9 \pm 17,1^{*o}$	$1,05 \pm 0,24$	$0,20 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,27$
3 (ВМ, острый период), $n = 33$	$0,5 \pm 0,04^{*x}$	$236,3 \pm 37,8^{*x}$	$0,62 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,07$
4 (ВМ, реконвалесценция), $n = 16$	$0,32 \pm 0,02^*$	$14,1 \pm 2,2^*$	$0,87 \pm 0,19$	$0,21 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,07$
Контрольная, $n = 15$	$0,23 \pm 0,02$	$3,54 \pm 0,76$	—	—	—

Примечание: * — достоверное отличие от контрольной группы; x — достоверное отличие острого периода от периода реконвалесценции при БГМ и СМ; o — достоверное отличие БГМ от СМ в соответствующем периоде заболевания.

териальными гнойными менингитами [14—16]. Также установлено, что при бактериальных менингитах их концентрация ниже, чем при дегенеративных заболеваниях ЦНС, остром церебральном инфаркте, полиневропатии [17]. В доступной литературе отсутствуют сведения о сравнительных измерениях концентрации специфических для нейронов и глии белков при серозных и гнойных менингитах у детей.

Цель настоящей работы — измерение концентрации НСЕ, белка S-100 и глиального фибриллярного кислого белка в цереброспинальной жидкости детей с гнойными и серозными менингитами в динамике заболевания и определение их патогенетического и диагностического значения.

Материал и методы. Исследованы образцы ЦСЖ, полученные при диагностической люмбальной пункции у 44 детей, из них 33 ребенка с серозным менингитом (СМ), 11 — с бактериальным гнойным менингитом (БГМ). Этиологический диагноз верифицирован с использованием стандартных микробиологических исследований, полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа. При БГМ пневмококковая этиология менингита установлена у 1 ребенка, менингококковая — у 5 детей, гемофильная — у 4, у 1 ребенка этиология осталась невыясненной. Среди детей с серозным менингитом у 18 диагностирован энтеровирусный менингит (преимущественно серотип 68 и 70), у остальных детей этиология заболевания не установлена. Люмбальная пункция у большинства детей проведена дважды — в остром периоде (1—2-е сутки после поступления в стационар) и в стадии ранней реконвалесценции (7—10-е сутки после поступления). После проведения стандартного ликворологического исследования (определения общего содержания белка с использованием пирогаллолового красного и цитоза после окраски реактивом Самсона) образцы ЦСЖ центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин, надосадок отбирали и аликвотировали в пробирки типа Эппендорф. Образцы замораживали и хранили при -34°C до определения уровня МСБ. Определение концентрации специфических для нейронов и глии белков проводили твердофазным иммуноферментным методом. Для определения уровня НСЕ и белка S-100 использовали наборы фирмы FUJIREBIO Diagnostics (Швеция), для определения концентрации ГФКБ — набор фирмы BioVendor (Чехия). Измерение концентрации проведено на иммуноферментном анализаторе Sunrise (TECAN, Австрия). Проводили статистическую обработку данных в 4 группах: 1-я группа — БГМ, острый период, 2-я — БГМ, период реконвалесценции, 3-я — СМ, острый период, 4-я группа — СМ, стадия реконвалесценции. Оценивали среднее значение, стандартную ошибку, медиану, межквартильный размах, минимальное и максимальное значение в указанных группах. Достоверность различий между показателями в группах оценивали методами параметрической (t -критерий Стьюдента) и непараметрической (U -критерий Манна—Уитни) статистики

с помощью стандартных программ Microsoft Office Excel 2003—2007, Statistica 7. Стандартные ликворологические показатели (общий белок, цитоз) сравнивали с показателями контрольной группы (ОРВИ с менингеальными явлениями). Оценивали корреляционные взаимосвязи НСЕ, ГФКБ, белка S-100 и связи со стандартными показателями ликвора — общим белком и цитозом.

Результаты и обсуждение. В острой стадии заболевания в ЦСЖ детей выявлены характерные для менингитов изменения — увеличение общего содержания белка и цитоза (табл. 1).

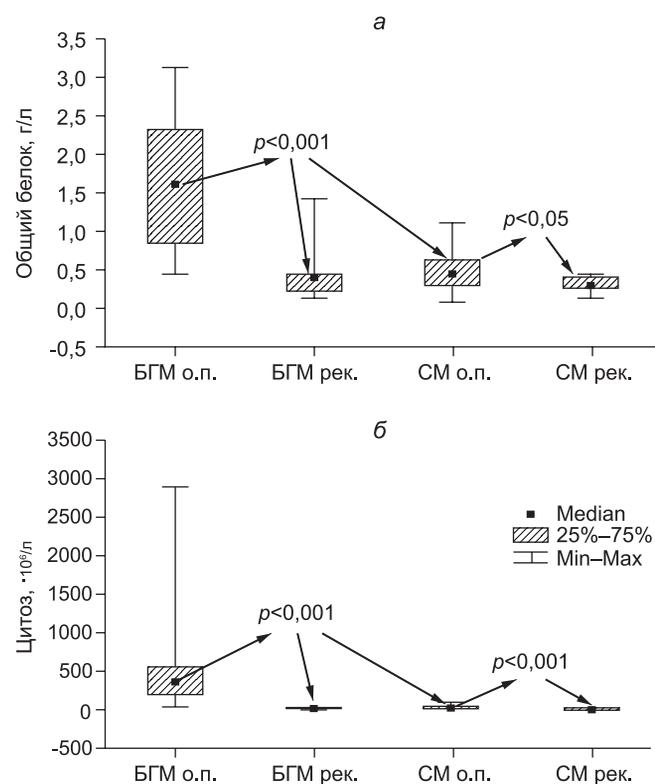


Рис. 1. Динамика общего содержания белка (а) и цитоза (б) в цереброспинальной жидкости детей с бактериальными гнойными и серозными менингитами.

По оси абсцисс — группы больных в разные периоды заболевания; по оси ординат — а — содержание общего белка в г/л, б — цитоз (число клеток $\cdot 10^6/\text{л}$).

Здесь и на рис. 2: о.п. — острый период; рек. — реконвалесценция.

Стрелками указаны достоверные отличия между группами в разные периоды болезни.

Таблица 2

Коэффициенты линейной корреляции между концентрацией специфических для нейронов и глии белков и стандартными ликворологическими показателями при бактериальных и серозных менингитах у детей

Сопоставляемые показатели	<i>r</i> в группах больных, уровень достоверности			
	1 (БГМ, острый период)	2 (БГМ, реконвалесценция)	3 (СМ, острый период)	4 (СМ, реконвалесценция)
НСЕ — общий белок	0,16	0,30	0,01	0,40 (<i>p</i> < 0,05)
НСЕ — цитоз	-0,02	0,37	0,06	0,07
S-100 — общий белок	-0,07	0,03	0,49, <i>p</i> < 0,01	10
S-100 — цитоз	-0,32	-0,38	0,29, <i>p</i> < 0,05	-0,07
ГФКБ — общий белок	-0,02	0,72, <i>p</i> < 0,01	0,31, <i>p</i> < 0,05	0,11
ГФКБ — цитоз	-0,26	0,03	0,55, <i>p</i> < 0,01	-0,07

Примечание: Здесь и в табл. 3: *r* — коэффициент линейной корреляции показателей.

При этом обнаружен значительный разброс стандартных ликворологических показателей (рис. 1). При БГМ общее содержание белка находилось в пределах 0,44—3,14 г/л, при СМ — в пределах 0,09—1,09 г/л. Плеоцитоз в остром периоде БГМ варьировал в широком диапазоне — от $186 \cdot 10^6/л$ до $29\,000 \cdot 10^6/л$ с преимущественным увеличением полинуклеарных клеток, при СМ — в пределах от $20 \cdot 10^6/л$ до $980 \cdot 10^6/л$, с преобладанием мононуклеаров. Выявлена достоверность отличий средних значений общего белка и цитоза при БГМ и СМ в остром периоде заболевания (см. табл. 1). В стадии реконвалесценции обнаружено снижение средних значений общего белка и цитоза в обеих группах при сохранении разброса показателей (см. табл. 1, рис. 1). При БГМ колебания общего белка в ликворе находились в пределах 0,126—1,44 г/л, плеоцитоза — $17 \cdot 10^6/л$ — $115 \cdot 10^6/л$, тогда как при серозном менингите — в пределах 0,126—0,46 г/л для общего содержания белка и $4 \cdot 10^6/л$ — $106,7 \cdot 10^6/л$ — для плеоцитоза. Полученные результаты подтверждают известные данные о возможном перекрытии общепринятых ликворологических показателей при бактериальной или вирусной природе менингита как в острой стадии, так и в периоде реконвалесценции.

Таблица 3

Коэффициенты линейной корреляции между уровнями специфических для нейронов и глии белков в цереброспинальной жидкости при бактериальных гнойных и серозных менингитах у детей

Сопоставляемые показатели	<i>r</i> между МСБ в группах больных, уровень достоверности			
	1 (БГМ, острый период)	2 (БГМ, реконвалесценция)	3 (СМ, острый период)	4 (СМ, реконвалесценция)
НСЕ — S-100	0,47 (<i>p</i> < 0,05)	0,69 (<i>p</i> < 0,01)	0,24	0,44 (<i>p</i> < 0,05)
НСЕ — ГФКБ	0,37	0,86 (<i>p</i> < 0,01)	0,25 (<i>p</i> < 0,05)	0,26
S-100 — ГФКБ	0,92 (<i>p</i> < 0,01)	0,78 (<i>p</i> < 0,01)	0,42 (<i>p</i> < 0,01)	0,63 (<i>p</i> < 0,01)

При сравнении концентраций специфических для нейронов и глии белков в ЦСЖ в начальной стадии заболевания максимальное увеличение их уровня обнаружено у пациентов с БГМ (см. табл. 1). В стадии ранней реконвалесценции концентрации белков S-100 и ГФКБ при БГМ существенно снижались (в 4 и 10 раз соответственно), тогда как среднее значение уровня ЕСН оставалось на прежнем уровне. Напротив, при серозном менингите в остром периоде максимально высокой в ЦСЖ оказалась концентрация НСЕ, причем в стадии реконвалесценции она имела тенденцию к увеличению (0,62 и 0,87 нг/мл соответственно). Достоверных отличий в концентрации глиальных белков в динамике СМ не обнаружено (см. табл. 1). Можно предположить, что увеличение в ликворе уровня белков, специфических для астроцитарной глии, свидетельствует о более выраженном при БГМ воспалении мозговых оболочек с повреждением астроцитарных структур, формирующих гематоэнцефалический барьер, что сопровождается значительным увеличением в ликворе общего белка и цитоза. Однако данные корреляционного анализа трактуются неоднозначно (табл. 2).

Так, при БГМ прямая достоверная взаимосвязь установлена между концентрацией ГФКБ и общим содержанием белка в ликворе только в стадии реконвалесценции. В остром периоде БГМ отмечена тенденция к наличию обратной зависимости между белком S-100 и плеоцитозом (*r* = -0,32), в стадии ранней реконвалесценции прямая связь между уровнем НСЕ и общим белком (*r* = 0,30), уровнем НСЕ и цитозом (*r* = 0,37). Недостоверность этих взаимосвязей, возможно, обусловлена незначительным количеством детей в этой группе. При серозном менингите достоверные прямые взаимосвязи слабой и средней силы установлены между уровнем глиальных белков и стандартными ликворологическими показателями в остром периоде заболевания и между концентрацией НСЕ и общим содержанием белка — в стадии реконвалесценции. Оценка взаимосвязи уровня специфических для нейронов и глии белков в ЦСЖ показала наличие прямых достоверных коэффициентов корреляции между ними различной силы (табл. 3). Прямая зависимость установлена между уровнем НСЕ и белка S-100 в разные стадии БГМ, а также в периоде реконвалесценции у больных СМ, а также между уровнем НСЕ и ГФКБ в периоде реконвалесценции БГМ и слабая взаимосвязь между этими белками в остром периоде серозного менингита. Во все стадии заболевания выявлены достоверные взаимосвязи концентрации белка S-100 и ГФКБ. Полученные данные указывают на участие специфических для нейронов и глии белков в развитии интратекального воспаления, их влиянии на повреждение и метаболизм нейронов, свидетельствуют о пролонгированном нарушении проницаемости структур гематоэнцефалического барьера и его селективную проницаемость для клеток и белков крови и мозга.

Анализ данных выявил вариабельность уровней специфических для нейронов и глии белков в ликворе у больных менингитами детей, особенно в остром периоде заболевания (рис. 2). Концентрация белка S-100 колебалась в пределах 0,14—2,25 и 0,01—0,48 нг/мл при БГМ и СМ соответственно. Уровень ГФКБ находился в пределах 0,1—28 нг/мл и 0—1,4 нг/л, концентрация НСЕ в пределах 0—3,7 и 0,1—4 нг/мл при БГМ и СМ соответственно. Несколько меньший разброс значений обнаружен в стадии реконвалесценции. Концентрации белков находились в следующих диапазонах: белок S-100 — 0,071—1,152 и 0,02—0,74 нг/мл, ГФКБ — 0—1,4 нг/мл и 0,1—0,9 нг/л, НСЕ — 0—1,7 и 0—2,6 нг/мл при БГМ и СМ соответственно. Установлена разнонаправленность изменений уровня НСЕ в динамике заболевания в зависимости от гнойного или серозного характера воспаления мозговых оболочек (см. рис. 2, а, табл. 1). В остром периоде концентрации НСЕ колебались в близких пределах при БГМ

БИОХИМИЯ

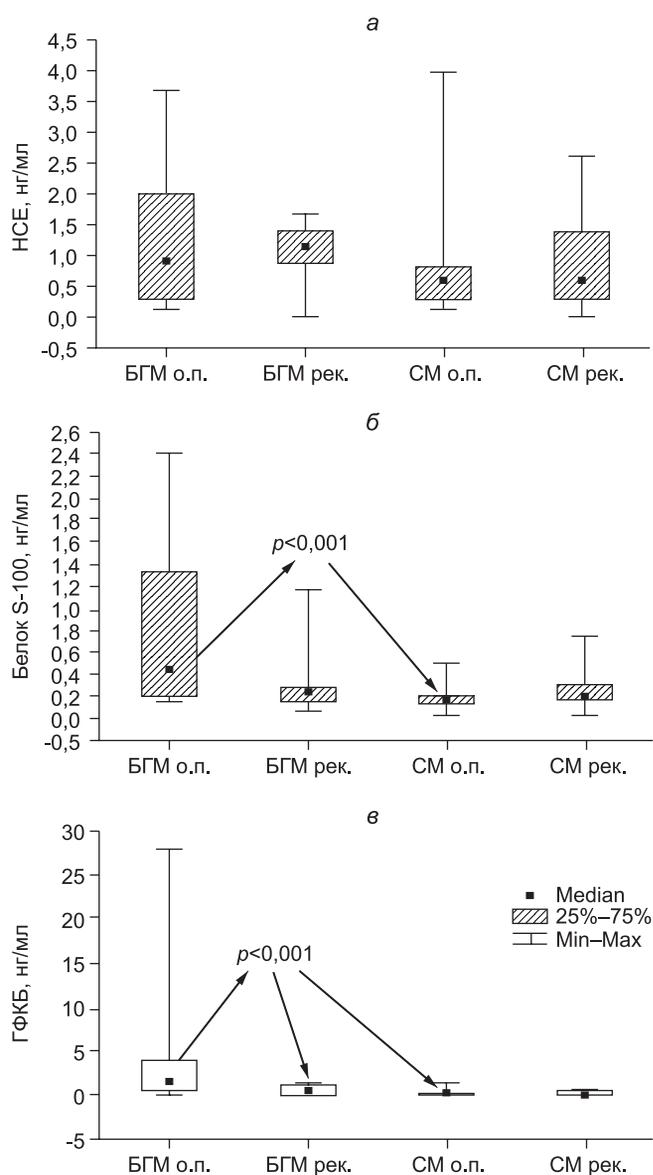


Рис. 2. Содержание мозгоспецифических белков в цереброспинальной жидкости в динамике бактериальных гнойных и серозных менингитов у детей:

а — нейронспецифическая енолаза; *б* — белок S-100; *в* — глиальный фибриллярный кислый белок.

По оси абсцисс — группы больных в разные периоды заболевания; по оси ординат — *а* — концентрация НСЕ (нг/мл); *б* — концентрация белка S-100 (нг/мл); *в* — концентрация ГФКБ (нг/мл).

и СМ, что привело к отсутствию достоверных различий в 1-й и 3-й группах, тогда как в стадии реконвалесценции при БГМ отмечена тенденция к снижению среднего значения уровня НСЕ при его увеличении в группе с СМ (см. табл. 1). Полученные результаты свидетельствовали о многофакторности патогенетических механизмов, влияющих на мозг при нейроинфекциях, индивидуальных реакциях мозга на внедрение возбудителя, что определило необходимость сопоставления уровня характерных для нейронов и глии белков в ликворе с клиническими особенностями течения менингитов у детей. В обследованной группе пациентов течение БГМ у всех детей было тяжелым, СМ — среднетяжелым, без значительных отклонений в состоянии здоровья при выписке.

У 27% детей в остром периоде БГМ и чуть меньшего

количества детей с СМ (по 21% для белков S-100 и ГФКБ и 24% для НСЕ) установлено превышение 75% процентиля концентраций этих белков в ЦСЖ. В стадии ранней реконвалесценции отмечено нарастание количества детей с превышением 75% процентиля в выборке (для каждого белка до 33 и 25% при БГМ и СМ соответственно). Вероятно, это ассоциируется с клиническими особенностями течения этих заболеваний. Отмечено, что у детей с максимально увеличенными концентрациями в ликворе нейроспецифических белков имелись неврологические признаки, указывающие на тяжесть поражения мозговой паренхимы (длительная и выраженная внутричерепная гипертензия, нарушение сознания, заторможенность). В случае превалирования общинфекционного синдрома у детей с БГМ без признаков церебральной недостаточности уровень белков, специфичных для нейронов и астроглии, в ЦСЖ в остром периоде болезни был существенно ниже. Установленное в настоящем исследовании нарастание концентрации НСЕ у детей с СМ в стадии реконвалесценции может свидетельствовать о пролонгированных воспалительных процессах в мозговой паренхиме при относительно легком течении острого периода заболевания. Наши наблюдения отчасти ассоциируются с данными о нарастании уровня нейроспецифических белков при легкой черепно-мозговой травме в отличие от тяжелой травмы [18]. По мнению авторов, это — следствие медленного нарастания деструктивно-воспалительных реакций при легком повреждении мозга. Можно предположить, что увеличение концентрации НСЕ в стадии реконвалесценции — одна из причин формирования когнитивных нарушений при серозном менингите у детей. Так, снижение кратковременной и оперативной памяти в остром периоде СМ выявлено у 86% детей при сохранении когнитивных нарушений спустя 3 и 6 мес после перенесенного заболевания у 46 и 32% детей соответственно. Это согласуется с общепринятыми клиническими наблюдениями, свидетельствующими о доброкачественном течении острого периода СМ, приводящего, однако, в 40—50% случаев к развитию функциональных нарушений ЦНС (церебрастенический, гипертензионный синдромы, невроподобные и невротические состояния).

Участие специфических для нейронов и глии белков в патогенезе острых нейроинфекционных заболеваний подтверждают литературные данные. Установлено, что их избыточный синтез с выходом в интратекальное пространство может как усиливать воспалительные реакции, повреждая ткань мозга, так и быть триггером аутоиммунных реакций с пролонгированием иммунопатологического процесса [19, 20]. Учитывая полифункциональность нейроспецифических белков, их участие в синаптогенезе, регуляции иммунного ответа, выполнении трофических функций, обеспечивающих метаболизм и координированное действие нейронной сети мозга, их появление в ЦСЖ может иметь самостоятельное патогенетическое значение. Так, установлена способность некоторых белков семейства S-100 проявлять свойства цитокинов, участвовать в модуляции экспрессии ряда генов, ответственных за синтез биологически активных молекул, в организации глиально-нейрональных и глиально-глиальных взаимодействий [21, 22]. Показано, что при значительном увеличении концентрации секретируемого белка S-100 он может оказывать нейротоксическое действие на нейроны и глию, индуцируя апоптоз и некроз клеток путем индукции синтеза провоспалительных цитокинов и ферментов оксидативного стресса [19, 23]. Совокупное действие увеличенных концентраций S-100 может способствовать генерализации воспаления и нейродегенерации и высвобождению других нейротоксичных молекул, что доказано экспериментально [24, 25]. С другой стороны, не исключено, что усиление экспрессии S-100 при повреждении может способствовать саногенезу, восстановлению по-

врежденных нейронов, повышению устойчивости к возможным последующим повреждениям. В.П. Молочный и соавт. [26] установили наличие прямой корреляции уровня НСЕ и ГФКБ в ликворе и крови с выраженностью общемозгового, менингеального и энцефалического синдромов при БГМ. Это позволило авторам рекомендовать использование данных показателей в качестве критерия тяжести поражения мозга при осложненном течении БГМ [26]. Аналогичные результаты получены Л. Кера [27, 28], показавшим достоверное нарастание уровня НСЕ и белка S-100 в ликворе больных с очень тяжелым течением менингоэнцефалита по сравнению с умеренным и легким течением болезни. В то же время имеются сведения о более значительном увеличении содержания белка S-100 в ЦСЖ при вирусных энцефалитах по сравнению с БГМ, что позволило авторам рекомендовать его определение для дифференциальной диагностики [15]. По данным О.Н. Сумлиной и соавт. [29], уровень НСЕ в ликворе коррелирует с более значительным повреждением нейронов при клещевых энцефалитах и может служить ранним прогностическим маркером формирования очаговой формы этого заболевания. Аналогичные результаты получены и J.W. Park и соавт. [30], указавшими на увеличение уровня белка S-100 в ликворе пациентов с повреждением нейронов по данным магнитно-резонансной терапии при нейроинфекционной патологии.

Таким образом, результаты проведенного исследования и данные современной литературы указывают на участие специфических для нейронов и глии белков в патогенезе вирусных и бактериальных менингитов у детей. Увеличение концентрации этих белков в ЦСЖ при менингитах у детей свидетельствует о возможности их использования в качестве маркеров тяжести повреждения нейронов и глии для уточнения вовлеченности в патологический процесс различных структур мозга и должны учитываться при дальнейшем наблюдении за здоровьем и развитием ребенка. Представляется перспективным и необходимым дальнейшее изучение взаимосвязи инфекционного поражения мозга с формированием неврологических последствий в резидуальном периоде, поиск эффективных лабораторных критериев для прогноза нарушений деятельности ЦНС вследствие перенесенного детьми нейроинфекционного заболевания.

Выводы

1. Обнаружено максимальное увеличение концентрации белка S-100, глиального фибриллярного кислого белка и НСЕ в ликворе в остром периоде БГМ по сравнению с СМ у детей, что может свидетельствовать о более значительном повреждении астроглиальных клеток, формирующих гематоэнцефалический барьер, при внедрении бактериального возбудителя в оболочки мозга. В стадии реконвалесценции выявлено снижение концентрации астроглиальных белков по сравнению с острым периодом при отсутствии динамики в содержании НСЕ.

2. При СМ выявлено увеличение уровня НСЕ в ликворе в стадии реконвалесценции по сравнению с острым периодом заболевания, что может свидетельствовать о пролонгированных нарушениях внутриклеточного метаболизма нейронов.

3. Необходимы дальнейшие исследования и наблюдения за развитием детей и формированием их когнитивных функций после перенесенного гнойного или серозного менингита с целью разработки дифференцированного подхода к их реабилитации в стадии реконвалесценции.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководителям отделов вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования и медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ НИИДИ ФМБА России д-ру биол. наук Е.А. Муриной и проф. серозного менингита. Сидоренко за предоставление данных по этиологической диагностике менингитов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7—8, 10—17, 19—25, 27—28, 30 см. REFERENCES)

1. Алексеева Л.А., Сорокина М.Н. Диагностическое значение белкового спектра ЦСЖ при бактериальных и вирусных менингитах у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2001; (7): 215—9.
2. Скрипченко Н.В., Алексеева Л.А., Ивашенко И.А., Кривошеенко Е.М. Цереброспинальная жидкость и перспективы ее изучения. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2011; 56(6): 88—97.
3. Железничкова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Алексеева Л.А. Иммунологические факторы в цереброспинальной жидкости при бактериальных, грибковых или паразитарных нейроинфекциях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (11): 43—7.
4. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. *Бактериальные гнойные менингиты у детей*. М.: Медицина; 2003.
5. Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В. Полиморфизм интраклеточного ответа при нейроинфекционных заболеваниях у детей. *Нейрохирургия и неврология детского возраста*. 2010; (1): 39—46.
6. Штарк М.Б. *Мозгоспецифические белки (антигены) и функции нейрона*. М.: Медицина; 1985.
7. Трайлин А.В., Левада О.А. Белок S100B: нейробиология, значение при неврологической и психиатрической патологии. *Международный неврологический журнал*. 2009; (1): 166—75.
8. Лисянский Н.И., Черенько Т.М., Комиссаренко С.В. Определение нейроспецифических белков в крови больных с закрытой черепно-мозговой травмой и их диагностическое значение. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 1993; 93(2): 50—3.
9. Молочный В.П., Макарова Т.Е., Головкова Н.Ф., Обухова Г.Г. Нейроспецифическая енолаза и глиофибрилярный кислый протеин крови и цереброспинальной жидкости как маркер повреждения ткани мозга при бактериальных гнойных менингитах у детей. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012; (2): 48—51.
10. Сумливая О.Н., Воробьева Н.Н., Каракулова Ю.В. Оценка информативности определения нейроспецифической енолазы в сыворотке крови и ликворе у больных в остром периоде клещевого энцефалита. *Здоровье семьи — 21 век*. 2012; 3(3): 19-26. Available at: <http://fh-21.perm.ru/download/2012-3-19.pdf>.

REFERENCES

1. Alekseeva L.A., Sorokina M.N. Diagnostic value of protein spectrum of the CSF in bacterial and viral meningitis in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001; (7): 215—9. (in Russian)
2. Skripchenko N.V., Alekseeva L.A., Ivashchenko I.A., Krivosheenko E.M. Cerebrospinal fluid and prospects of its study. *Rossiyskiy Vestnik perinatologii i pediatrii*. 2011; 56(6): 88—97. (in Russian)
3. Zhelezniczkova G.F., Skripchenko N.V., Alekseeva L.A. Immune factors in cerebrospinal fluid during bacterial, fungal or parasitic neuroinfections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (11): 43—7. (in Russian)
4. Sorokina M.N., Ivanova V.V., Skripchenko N.V. *Bacterial Purulent Meningitis in Children [Bakterial'nye gnoynnye meningity u detej]*. Moscow: Meditsina; 2003. (in Russian)
5. Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V. Polymorphism intrathecal response in neuroinfectious diseases in children. *Nevrokhirurgiya i neurologiya detskogo vozrasta*. 2010; (1): 39—46. (in Russian)
6. Shtark M.B. *Brain-Specific Proteins (antigens) and the Function of the Neuron [Mozgospetsificheskie belki (antigeny) i funktsii neyronaj]*. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)
7. Barger S.W., Van Eldik L.J. S100b stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(14): 9689—94.
8. Heizmann C.W. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol. Biol.* 2002; 172: 69—80.

9. Trailin A.V., Levada O.A. Protein S100V: neuroscience, value for neurological and psychiatric diseases. *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal*. 2009; (1): 166—75. (in Russian)
10. Arumugam T., Simeone D.M., Schmidt A.M., Logsdon C.D. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J. Biol. Chem.* 2004; 279(7): 5059—65.
11. Kanner A.A., Marchi N., Fazio V., Mayberg M.R., Koltz M.T., Siomin V. et al. Serum S100p. A noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer*. 2003; 97(11): 2806—13.
12. Lima J.E., Takayanagui O.M., Garcia L.V., Leite J.P. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37(1): 19—26.
13. Hamed S.A., Hamed E.A., Zakary M.M. Oxidative stress and S-100B protein in children with bacterial meningitis. *BMC Neurol.* 2009; 9: 51.
14. Unden J., Christensson B., Bellner J., Ailing C., Romner B. Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36(1): 10—3.
15. Zhang L.Y., Li Y., Jin M.F. Diagnostic values of neopterin and S100b for central nervous system infections in children. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2014; 16(4): 380—3.
16. Shihara T., Miyake T., Izumi S., Sugihara S., Watanabe M., Takashi J. et al. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev.* 2014; 36(6): 489—95.
17. Infante J.R., Martinez A., Ochoa J., Canadillas F., Torres-Avisbal M., Vallejo J.A. et al. Level of S-100 and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid from subjects with neurological pathologies. *Rev. Esp. Med. Nucl.* 2003; 22(4): 238—43.
18. Lisiany N.I., Cheren'ko T.M., Komissarenko S.V. Determination neurospecific proteins in the blood of patients with closed craniocerebral injury and their diagnostic value. *Zhurnal neurologii i psikhatrii imeni S.S. Korsakova*. 1993; 93(2): 50—3. (in Russian)
19. Hu J., Ferreira A., Van Eldik L.J. S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J. Neurochem.* 1997; 69(6): 2294—301.
20. Barger S.W., Basile A.S. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J. Neurochem.* 2001; 76(3): 846—54.
21. Adami C., Sorci G., Blasi E. et al. S100B Expression in and effects on microglia. *Glia*. 2001; 33(2): 131—42.
22. Nishiyama H., Knopfel T., Endo S., Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(6): 4037—42.
23. Lam A.G., Koppal T., Akama K.T., Guo L., Craft J.M., Samy B. et al. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFκB. *Neurobiol. Aging*. 2001; 22(5): 765—72.
24. Li Y., Barger S.W., Liu L., Mrak R.E., Griffin W.S. S100p induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. *J. Neurochem.* 2000; 74(1): 143—50.
25. Liu L., Li Y., Van Eldik L.J., Griffin W.S., Barger S.W. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J. Neurochem.* 2005; 92(3): 546—53.
26. Molochnyy V.P., Makarova T.E., Golovkova N.F., Obukhova G.G. Neuron specific enolase and protein gliofibrillary acidic blood and cerebrospinal fluid as a marker of tissue damage in the brain bacterial purulent meningitis in children. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2012; (2): 48—51. (in Russian)
27. Kapa L. Evaluation of cerebrospinal fluid and plasma neuron-specific enolase (NSE) concentration in patients with purulent, bacterial meningitis. *Przegl. Epidemiol.* 2009; 63(1): 23—8.
28. Kapa L., Oczko-Grzesik B. Evaluation of cerebrospinal fluid S100B protein concentration in patients with purulent, bacterial meningitis — own observations. *Przegl. Epidemiol.* 2013; 67(3): 415—9, 525—8.
29. Sumlivaya O.N., Vorob'eva N.N., Karakulova Yu.V. Evaluation of informativity determining neuron specific enolase in serum and cerebrospinal fluid in patients with acute encephalitis. *Zdorov'e sem'i — 21 vek*. 2012; 3(3): 19—26. Available at: <http://th-21.perm.ru/download/2012-3-19.pdf>. (in Russian)
30. Park J.W., Suh G.I., Shin H.E. Association between cerebrospinal fluid S100B protein and neuronal damage in patients with central nervous system infections. *Yonsei. Med. J.* 2013; 54(3): 567—71.

Поступила 15.11.16

Принята к печати 29.11.16

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.19-076.5

Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю., Петров А.Н.

ТРУДНОСТИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА МАТЕРИАЛЕ ТРЕПАНОБИПСИЙ

Московский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 125284, Москва

В статье на основании литературы и собственных данных проанализированы причины ошибочных цитологических заключений на материале трепанобиопсий молочной железы. Наиболее распространенные доброкачественные поражения, при которых наиболее часто отмечают цитологическую гипердиагностику рака, — фиброаденома с пролиферацией эпителия и склерозирующий аденоз. В то же время некоторые варианты долькового рака молочной железы, тубулярный, папиллярный рак, а также высокодифференцированную инвазивную карциному неспецифического типа из клеток с невыраженной ядерной атипией иногда крайне сложно диагностировать на клеточном уровне. Чувствительность цитологической диагностики патологии молочной железы по материалу трепанобиопсий, по данным нашего института, составляет 97,5%, специфичность — 98,5%. Число ложноположительных цитологических заключений о наличии злокачественной опухоли составляет 0,6%, ложноотрицательных — 1,5%. Достоверность цитологического исследования составляет 97,4%, эффективность — 96,3%.

Ключевые слова: CNB-биопсия; молочная железа; цитологическое исследование.

Для корреспонденции: Борисова Олеся Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела онкоморфологии, e-mail: borisova07@bk.ru

Для цитирования: Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю., Петров А.Н. Трудности цитологической диагностики заболеваний молочной железы на материале трепанобиопсий. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 210-215. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-210-215>

Volchenko N.N., Borisova O.V., Ermolaeva A.G., Melnikova V.Yu., Petrov A.N.

THE DIFFICULTIES OF CYTOLOGIC DIAGNOSTIC OF BREAST DISEASES BASED ON TREPANOBIOPSY SAMPLES

The P.A. Herzen Moskovskii` oncological institute-the branch of the National medical research radiologic center of Minzdrav of Russia, 125284 Moscow, Russia

The article analyses, on the basis of scientific publications and original data, the causes of erroneous cytological conclusion concerning samples of trepanobiopsies of mammary gland. The most prevalent benign affections that are characterized by most frequent hyper diagnostic of cancer are fibro-adenoma with proliferation of epithelium and sclerosing adenosis. At the same time, certain modifications of lobular carcinoma of mammary gland, tubular, papillary cancer as well as highly differentiated invasive carcinoma of nonspecific type from cells with ulterior nuclear atypism sometimes it is difficult to diagnose at the cellular level. The sensitivity of cytological diagnostic of pathology of mammary gland using samples of trepanobiopsies makes up 97.5%, specificity - 98.5%. The number of false positive cytological conclusions about presence of malignant tumor makes up to 0.6%, false negative - 1.5%. The reliability of cytological analysis makes up to 97.4%, efficiency - 96.3%.

Key words: CNB-biopsy; mammary gland; cytological analysis.

For citation: Volchenko N.N., Borisova O.V., Ermolaeva A.G., Melnikova V.Yu., Petrov A.N. The difficulties of cytologic diagnostic of breast diseases based on trepanobiopsy samples. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 210-215. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-210-215>

For correspondence: Borisova O.V., candidate of medical sciences, senior researcher of the department of oncomorphology. e-mail: borisova07@bk.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.10.2016
Accepted 29.11.2016

Благодаря широкому внедрению маммографического скрининга и трепанобиопсий (CNB-core needle biopsy) образований молочной железы (МЖ) значительно возросла диагностика рака на ранних стадиях, а также различных патологических процессов, в том числе атипической протоковой и дольковой гиперплазии, протоковой и дольковой карциномы *in situ*, аденоза и пр. Все эти поражения связаны с повышенным риском рака МЖ (РМЖ) и значительно повышают риск нахождения рака в операционном материале.

За последнее десятилетие CNB образований МЖ постепенно заменяет тонкоигольную аспирационную биопсию. Вместе с тем одновременное исследование мазков-отпечатков и CNB повышает эффективность морфологической диагностики.

Наиболее распространенные доброкачественные поражения, при которых часто отмечают цитологическую гипердиагностику рака, — фиброаденома (ФА) с пролиферацией эпителия и склерозирующий аденоз. В то же время некоторые варианты долькового РМЖ, тубулярный, папиллярный рак, а также высокодифференцированную инвазивную карциному неспецифического типа, т. е. опухоли из клеток с невыраженной ядерной атипией, иногда крайне сложно диагностировать.

В данной работе на основании нашего опыта и данных литературы мы рассмотрим трудности при цитологическом исследовании мазков-отпечатков CNB МЖ, характерные морфологические особенности различных поражений, что позволит повысить точность цитологических заключений.

Цель исследования — повышение точности цитологической диагностики путем анализа ошибочных цитологических заключений на материале мазков-отпечатков CNB при различной патологии МЖ.

Материал и методы. Исследован материал мазков-отпечатков CNB МЖ у 1799 женщин с различной патологией МЖ, оперированных в МНИОИ им. П.А. Герцена с 2013 по 2016 г. Мазки для цитологического исследования окрашивали азур-эозином по Паппенгейму. Гистологические препараты готовили стандартной гистологической техникой с приготовлением парафиновых блоков с последующей окраской гематоксилин-эозином. Сравнивали цитологическое и

гистологическое заключения биопсийного материала, а также данные планового операционного морфологического исследования.

Результаты и обсуждение. Мазки-отпечатки с CNB МЖ отличаются от материала тонкоигольной аспирационной биопсии наличием в препаратах большого количества клеточного материала с образованием разнообразных структур. Опухолевые клетки сочетаются с неопухолевыми, полученными из окружающей ткани. Как правило, в большой степени представлен неэпителиальный компонент, о котором всегда сложно судить, является ли он компонентом опухоли или также получен из окружающей ткани.

Морфологическая диагностика образований МЖ многогранна и таит много подводных камней, особенно при сложных поражениях, таких как многокомпонентные образования, пролиферативные поражения, тубулярные, папиллярные, муцинозные и карциномы из клеток с невыраженной ядерной атипией.

Двухфазные опухоли (ФА, филоидная опухоль и аденомиоэпителиома). ФА с выраженной, в некоторых случаях атипической пролиферацией эпителия — наиболее частая причина ложнопозитивных цитологических заключений о высокодифференцированном РМЖ неспецифического типа. Классическая ФА представлена тремя компонентами: кораллоподобными ветвящимися однослойными пластами клеток эпителия протоков, среди которых находятся миоэпителиальные клетки, большим количеством рассыпанных в виде «голых» ядер биполярных клеток и стромальных клеток, расположенных в миксоидной соединительнотканной строме (фибромиксоидная строма). Эпителиальные клетки протоков могут быть с различной степенью пролиферации, встречаются ядрышки. Иногда при ФА имеется атипическая пролиферация эпителия. Необходимо обращать внимание, что полярность ядер в эпителиальных пластах сохраняется в ФА, в то время как при раке теряется. Миоэпителиальные клетки — признак доброкачественного процесса, поэтому важно их наличие в виде голых ядер и в ассоциации с клетками эпителия протоков. Миоэпителиальные клетки — мелкие, овальные и темнее окрашиваются. В эпителиальных пластах они находятся в

ЦИТОЛОГИЯ

несколько иной плоскости по сравнению с протоковым эпителием, перемежаются с ним. «Голые» ядра клеток ФА мноморфны, овальные, при карциноме они крупнее, более полиморфны и напоминают ядра окружающих опухолевых клеток. Стромальный компонент ФА может изменяться от миксоидной (миксоидная ФА) до плотной фиброзной или гиалинизированной ткани. Чаще у молодых пациентов ФА миксоидная, и в цитологические препараты попадает стромальный компонент, у пожилых пациентов чаще гиалинизированные, с минимальными фрагментами плотной волокнистой ткани, которые могут полностью отсутствовать в цитологических препаратах. В редких случаях обширная миксоидная дегенерация стромы может имитировать внеклеточный муцин [1—4].

В нашей работе в 4 наблюдениях имелась гипердиагностика рака при ФА вследствие выраженной пролиферации эпителиального компонента, не было классических однослойных пластов, а клетки в скоплениях располагались более плотно, отдельно лежащие миепителиальные клетки были с признаками атипии, стромальный компонент отсутствовал.

Увеличение количества стромального компонента, наличие кровеносных сосудов в стромальных фрагментах характерно для филоидной опухоли, но встречается и в ФА. Наличие отдельных стромальных клеток с длинными вытянутыми ядрами более характерно для филоидной опухоли. Если таких клеток более 10%, то вероятность филоидной опухоли высока. Для филоидной опухоли также характерны небольшие монослойные пласты клеток типа фибробластов. Значительное увеличение стромального компонента, ядерная атипия стромальных клеток — признаки филоидной саркомы. В некоторых случаях, пролиферация эпителия в филоидной опухоли может быть настолько выраженной, что также имитирует рак, что было причиной цитологической ошибки в одном наблюдении при нашем исследовании. Цитологически диагностирован умереннодифференцированный РМЖ неспецифического типа, а гистологически — филоидная ФА. При пересмотре цитологических препаратов имелась атипичная пролиферация эпителия на отдельных участках, неотличимая от рака, при этом был достаточно выражен стромальный компонент в опухоли (рис. 1 а, б, см. обложку). Следует быть осторожным при диагностике рака в присутствии большого количества элементов стромы. В двух наблюдениях цитологически выставлен диагноз «филоидная опухоль», а гистологически — «листовидные саркомы». При пересмотре цитопрепаратов материал представлен преимущественно неэпителиальным компонентом — в одном препарате с признаками атипии на отдельных участках (рис. 2, см. обложку), в другом признаки атипии выражены не были, и поставить цитологически листовидную саркому было невозможно.

CNB также имеет ограничения при двухфазных опухолях, особенно при диагностике филоидных опухолей, которые характеризуются неоднородностью структуры. На разных участках может быть разная пролиферация эпителиального и стромального компонентов, на отдельных участках с озлокачествлением, что может быть диагностировано только при плановом гистологическом исследовании.

В некоторых наблюдениях фиброзно-кистозные изменения цитологически сложно дифференцировать с ФА, особенно гиалинизированной, где стромальный компонент в цитологических препаратах может отсутствовать.

При внутрипротоковом раке и инвазивной высокодифференцированной карциноме неспецифического типа могут присутствовать элементы стромы и «голые» ядра опухолевых клеток, что имитирует ФА.

Аденомиоэпителиома — редкое доброкачественное новообразование МЖ с двухфазной пролиферацией эпителиальных и миепителиальных клеток. Клетки миепителия иногда трудно распознать в цитологических препаратах. Они могут быть

веретеновидной, эпителиоидной формы, иметь вакуолизированную цитоплазму, с характерными внутриядерными цитоплазматическими включениями, а также быть по типу плазмочитов. Умеренная ядерная атипия не редкость, поэтому часто цитологически диагностируется как филоидная опухоль. Для подтверждения миепителиальной природы клеток проводят иммуноцитохимическое исследование с антителом р63 и гладкомышечным актином, экспрессия которых положительная [5].

Фиброзно-кистозные изменения определяют как совокупность дистрофических изменений ткани МЖ, фиброза, кистозных, метапластических и гиперпластических процессов. Фиброзно-кистозные изменения — широкая категория, которая включает в себя спектр неопролиферирующих (простых кист, апокринные метаплазии, эктазия протоков) и пролиферативных поражений (склерозирующий аденоз, столбчатая метаплазия клеток, простая и атипичная протоковая гиперплазия, протоковая *carcinoma in situ* (DCIS)). Непролиферирующие поражения составляют более 60% наблюдений, пролиферативные без атипии — 30%, с атипией — 4% [6].

Внутрипротоковые пролиферативные поражения — вторая наиболее распространенная причина гипердиагностики рака. Простая внутрипротоковая гиперплазия увеличивает риск рака минимально — в 1,5 раза, тогда как атипичная гиперплазия — в 3—5, DCIS — в 8—10 раз [7].

Простая внутрипротоковая гиперплазия характеризуется наличием скоплений клеток эпителия протоков по типу пластов и отсутствием ядерной атипии. Клетки могут различаться по размеру и форме, с нежным рисунком хроматина. Цитолог, как правило, дает описательный ответ. Внутрипротоковую гиперплазию с атипией трудно установить по цитологическим препаратам, тем более ее сложно дифференцировать с раком. Это отражает те же трудности, которые возникают и при гистологическом исследовании [8].

Столбчатые поражения гистологически представляют собой увеличенные расширенные ацинусы, выстланные столбчатыми клетками. Чаще они оказываются случайной находкой и сочетаются с микрокальцинатами. В цитологических препаратах они напоминают апокринную метаплазию. Столбчатые клетки — с крупными округлыми или овальными ядрами, умеренно выраженной мелкозернистой цитоплазмой в отличие от обильной цитоплазмы при апокринной метаплазии. Клеточные элементы располагаются в пластах с небольшим количеством миепителиальных клеток. Цитологическая атипия может быть от минимальной до выраженной [9, 10].

Диагноз DCIS проблематичен при цитологическом исследовании, так как цитологически невозможно определить инвазию опухоли. Для DCIS характерна умеренная или высокая клеточность, мноморфная картина, опухолевые клетки образуют солидные или микропапиллярные структуры. При умеренно- и низкодифференцированной DCIS цитологически дают заключение о наличии РМЖ неспецифического типа. Дифференциальная диагностика между высокодифференцированной инвазивной карциномой и DCIS на цитологическом материале невозможна. Можно использовать термин «атипичное внутрипротоковое пролиферативное поражение» в качестве альтернативы, и окончательный диагноз может быть выставлен только после оценки хирургического образца. CNB — точный метод диагностики так называемых внутрипротоковых пролиферативных поражений. Около 20% пациентов с диагнозом «DCIS» на материале CNB в операционном материале оказываются больными инвазивными раками [11].

В нашей работе в одном наблюдении цитологически выставлен диагноз «рак неспецифического типа», а гистологически имела место пролиферативная мастопатия с очагами тяжелой дисплазии; в трех наблюдениях цитологически дан описательный ответ с указанием выраженной пролиферации эпителия, а гистологически — внутрипротоковый рак.

Доброкачественные пролиферации эпителия. Склерозирующий аденоз (СА) и радиальный рубец — как правило, небольшие участки уплотнений, выявляемые при маммографии. Сочетание аномальной архитектоники и пролиферативных процессов клеток эпителия долек можно принять за инвазивный рак как цитологически, так и гистологически. Отмечено, что РМЖ иногда сочетается с СА, который служит предсказателем мультицентричного роста. Цитологические особенности СА характеризуются различной клеточностью, могут быть мелкие и более крупные группы эпителиальных клеток с различной степенью пролиферации. Эпителиальные клетки могут лежать в виде пластов или ацинарных структур. Плотные, шарообразные группы пролиферирующих клеток смешиваются с обрывками плотной соединительной ткани. Эпителиальные клетки могут проявлять умеренную цитологическую атипичию, но наличие многочисленных миоэпителиальных клеток указывает на доброкачественный характер процесса. Стромальный компонент состоит из небольших плотных, гиалинизированных, волокнистых фрагментов, которые иногда тесно связаны с эпителиальными пластами. Некоторые клетки образуют структуры по типу трубочек, имитируя тубулярную карциному. Трудности диагностики возникают при ядерной атипичии клеток эпителия. Иммуноморфологическое исследование демонстрирует наличие миоэпителиальных клеток среди клеток эпителия протоков, в гистологических препаратах имеется наружный слой миоэпителиальных клеток, что помогает в дифференциальной диагностике.

Цитологическая картина радиального рубца характеризуется смешанной клеточной популяцией: биполярные клетки, «голые» ядра, эпителиальные пласты разных размеров, апокриновые клетки, пенистые клетки и стромальные фрагменты с эластическими волокнами. Могут быть папиллярные скопления, тубулярные структуры. Цитологические особенности неспецифичны и диагноз «радиальный рубец» можно лишь предполагать с учетом рентгенологической картины [12, 13]. У нас имеется одно наблюдение цитологической гипердиагностики рака у пациентки с радиальным рубцом (рис. 3, см. обложку). При пересмотре препарата клеточный состав был достаточно разнообразным, что должно было насторожить при первичном просмотре, имелась выраженная пролиферация эпителия, участки миксоматоза. При плановом гистологическом исследовании операционного материала выявлен склерозирующий аденоз с формированием радиального рубца и протоковой гиперплазией, частью папиллярной.

Муцинозные опухоли и поражения. Мазки с наличием муцинозных масс могут присутствовать как при доброкачественных, так и злокачественных поражениях МЖ. Муцин присутствует при ФА, мукоцеле, атипичной протоковой гиперплазии, DCIS и коллоидном раке. Мазки при муцинозной (коллоидной) карциноме, как правило, представлены скоплениями, состоящими из мноморфных клеток на фоне обильного внеклеточного муцина. Опухолевые клетки могут быть расположены в трехмерных группах с гладкими, закругленными контурами, однослойными пластами или в виде многочисленных изолированных клеток. Ядра эксцентричны с равномерным везикулярным хроматином. Ядерный полиморфизм минимален. Ядрышки маленькие и незаметные. Обнаружение значительного полиморфизма и некроза указывает на наличие карциномы комбинированного строения. Муцин в препарате имеет розовый цвет, волокнистый внешний вид, располагается в виде озер слизи или шаровидных скоплений. Фибробласты и ветвящиеся тонкостенные кровеносные сосуды часто располагаются среди слизистых масс.

При мукоцелоподобных поражениях также присутствует обильный внеклеточный муцин. Эти поражения гипоцеллюлярные, могут присутствовать небольшие скопления по типу плоских листов эпителия и несколько разбросанных гистио-

цитов и фибробластов. В отличие от муцинозной карциномы отдельные эпителиальные клетки встречаются редко или вообще отсутствуют. Если в препарате при муцинозной карциноме клеточных элементов мало и отсутствуют признаки цитологической атипичии, то их невозможно отличить от других мукоцелоподобных поражений [14].

Коллоидный рак часто имитирует миксоидную ФА клинически и цитологически. В отличие от коллоидной карциномы в ФА присутствует строма, группы эпителия протоков и миоэпителиальные клетки.

Мы располагаем одним наблюдением цитологической гипердиагностики коллоидного рака у пациентки с миксоидной ФА. Препараты характеризовались тем, что в них было много изолированно лежащих клеток во внеклеточном муцине, что имитировало коллоидный рак, элементы стромы присутствовали в минимальном количестве. В другом наблюдении имела место гиподиагностика коллоидного рака, расцененного как ФА, препарат отличался слабой атипичией клеточных элементов.

Внеклеточной муцин — всегда ненормальная находка, которая должна настораживать и заставлять думать о возможном наличии коллоидного рака, но важно помнить: он может встречаться при доброкачественных мукоцелоподобных поражениях и папиллярных новообразованиях, поэтому необходима гистологическая оценка материала эксцизионной биопсии.

Папиллярные поражения. К папиллярным поражениям МЖ относят внутрипротоковую папиллому и папиллярную карциному. Папиллярные новообразования составляют менее 3% всех поражений МЖ. Это сложная область в цитологии, особенно на материале мазков-отпечатков CNB.

Характерная черта внутрипротоковой папилломы и цитологически и гистологически — древовидная папиллярная структура из эпителиальных клеток, окружающих фиброваскулярный стержень. Несмотря на это определение, возникает ряд потенциальных проблем. Папиллярные структуры можно увидеть в ряде доброкачественных и злокачественных непапиллярных пролифераций — от ФА до DCIS и инвазивной карциномы неспецифического типа. Отличить истинные папиллярные структуры от папиллярноподобных возможно при наличии истинного фиброваскулярного стержня, покрытого столбчатыми клетками, образующими большие пласты. Имеется относительное обилие миоэпителиальных клеток, голые ядра. При папиллярных поражениях в цитологическом и гистологическом материале трепанобиопсий необходимо рекомендовать хирургическое иссечение.

Отличить внутрипротоковую папиллому от атипичной папиллярной пролиферации и папиллярного рака иногда сложно, учитывая значительное перекрытие цитологических признаков. Наиболее значимые дифференциальные признаки в пользу злокачественности: высокая клеточность, тонкие одиночные фиброваскулярные структуры и сложные схемы ветвления, нарушение клеточных структур с различной степенью цитологической атипичии и отсутствие биполярных и апокринных клеток в фоновом режиме. При папиллярной карциноме встречаются некротические изменения и плоскоклеточная метаплазия. Папиллярные новообразования часто растут в кистозной полости и, как правило, ассоциированы с кровоизлияниями, в препаратах могут быть многочисленные макрофаги с гемосидерином. Трехмерные папиллярные структуры с наличием фиброваскулярного стержня на фоне многочисленных гемосидерофагов — классические признаки папиллярных новообразований. С другой стороны, дегенеративные изменения могут также вызвать выраженную цитологическую атипичию с увеличением и полиморфизмом ядер, выраженными ядрышками. Количество миоэпителиальных клеток часто уменьшается или отсутствует в папиллярных новообразованиях [15].

В нашем исследовании имелись два наблюдения неправильной интерпретации цитологической картины при папиллярных новообразованиях. В двух наблюдениях выставлен диагноз «высокодифференцированный рак молочной железы неспецифического типа», и гистологически — «внутрипротоковая папиллома». В препарате истинные сосочковые структуры отсутствовали, а имелись сосочкоподобные структуры из клеток со слабо выраженным полиморфизмом, что было неправильно расценено. В другом наблюдении диагноз «высокодифференцированная внутрикистозная папиллярная аденокарцинома» не был поставлен ни цитологически, ни гистологически по материалу CNB, а только при плановом гистологическом исследовании. В цитопрепарате имелись скопления из очень мелких гиперхромных несколько вытянутых клеток, плотно прилежащих друг к другу и образующих сосочкоподобные структуры, что цитологически расценено как доброкачественный пролиферативный процесс, а гистологически — как внутрипротоковая папиллома.

Трудности в гистологической диагностике папиллярных поражений в CNB МЖ также известны. Сложно дифференцировать папиллярную карциному *in situ* и папиллomu, особенно если последняя характеризуется выраженной гиперплазией. Можно использовать термин «внутрипротоковая папиллома с атипической пролиферацией», включающий в себя атипические эпителиальные разрастания и протоковую карциному *in situ*, особенно при периферическом расположении внутрипротоковой папилломы. Гистологически внутрипротоковые пролиферативные поражения и DCIS различаются размерами: атипичные эпителиальные пролиферации менее 3 мм относят к внутрипротоковым папилломам, в то время как более крупные атипичные эпителиальные разрастания в пределах папилломы отвечают критериям в внутрипротоковой высокодифференцированной DCIS [16—19].

Воспалительные процессы в МЖ также могут вызывать выраженные реактивные изменения, что приводит к гипердиагностике рака, как и было в одном нашем исследовании (рис. 4, см. обложку).

РМЖ из клеток с невыраженной ядерной атипией. К ним относят некоторые формы долькового РМЖ, тубулярный рак, высокодифференцированную карциному неспецифического типа.

Наибольшие трудности при цитологическом исследовании представляет дольковый РМЖ, который составляет до 15% всех наблюдений. Инвазивный дольковый рак представлен следующими вариантами: солидный, альвеолярный, плеоморфный, тубулобулярный и смешанный. По клеточному составу среди них встречаются плеоморфные, гистиоцитарные и перстневидноклеточные подтипы. Наиболее часто определяют инвазивный дольковый рак II степени злокачественности, представленный в основном солидным и плеоморфным подтипами. Классический дольковый рак связан с самым высоким уровнем ложнонегативных цитологических заключений среди всех видов РМЖ. Это обусловлено либо малочисленностью опухолевых клеток вследствие развитой десмопластической стромы, или ошибками интерпретации из-за небольшого размера клеток и невыраженной цитологической атипии. Клетки, как правило, небольшого размера с округлыми или овальными ядрами, располагаются по отдельности или образуют небольшие скопления, иногда по типу дорожек. Характерно эксцентричное расположение ядер и наличие внутриклеточного муцина в некоторых клетках — перстневидные клетки (рис. 5, см. обложку). Наличие внутриклеточного муцина тесно связано с неопластическим процессом. Крайне важно дифференцировать муцин и пустую цитоплазматическую вакуоль. Внутриклеточный муцин выявляют в 20% наблюдений долькового РМЖ. При доброкачественных процессах он встречается редко, менее 1% на-

блюдений, таких как апокринная метаплазия и атипическая дольковая гиперплазия. В дольковом раке цитологическая атипия незначительна, клетки мономорфные. Отсутствие миоэпителиальных клеток позволяет с большей уверенностью высказаться о наличии долькового рака. Имеется ряд морфологических вариантов долькового РМЖ, отличающихся цитологическими или архитектурными особенностями. В плеоморфном подтипе долькового РМЖ более выражен клеточный и ядерный полиморфизм, поэтому цитолог, как правило, делает заключение о наличии РМЖ неспецифического типа. Сольный вариант характеризуется классическими клетками долькового рака, которые расположены в пластах и разрозненно; при альвеолярном варианте клетки расположены в скоплениях по типу шаровидных из не менее 20 клеток. Иногда возникает необходимость проведения дифференциальной диагностики с лимфомами. Беспорядочная скученность клеток в скоплениях и наличие клеток педжетоидного типа характерна для карциномы.

В нашей работе дольковый РМЖ не был диагностирован в 5 наблюдениях из-за отсутствия описанной цитологической атипии. В некоторых наблюдениях долькового рака в эпителиальных пластах присутствуют клетки по типу миоэпителиальных, кроме того, могут быть структуры по типу окошек в эпителиальном пласте, а также попадает стромальный компонент, поэтому его цитологически отличить от ФА практически невозможно (рис. 6, см. обложку).

Отсутствие экспрессии Е-кадгерина в дольковом раке может помочь в уточнении дольковой карциномы и карциномы неспецифического типа, однако надо учитывать, что около 15% дольковых карцином может экспрессировать Е-кадгерин.

Цитологически дифференцировать дольковую CIS (LCIS) и инвазивную дольковую карциному невозможно. Можно использовать термин «дольковая неоплазия», который включает в себя атипичную дольковую гиперплазию и LCIS, которые гистологически характеризуются различным уровнем участия отдельных долек. Атипичная дольковая гиперплазия и LCIS определяют различные относительные риски развития инвазивного рака — от 4 до 5 раз и от 8 до 10 раз соответственно. LCIS состоит из мономорфной популяции клеток обычно мелких, округлых, многоугольных или кубических, с ободком цитоплазмы и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Клетки могут содержать четкие вакуоли с внутриклеточным муцином. Клетки плеоморфного типа LCIS демонстрируют выраженный ядерный полиморфизм, сродни тому, что наблюдают в полноценном DCIS. Атипичная дольковая гиперплазия, дольковая CIS и плеоморфная дольковая CIS часто встречаются совместно в одном образце наряду с другими необлигатными предшественниками, такими как столбчатые поражения, атипичная протоковая гиперплазия и DCIS [20—22].

Диагноз «тубулярный рак молочной железы» сложно диагностировать при цитологическом исследовании. Гистологически для тубулярного рака характерны наличие тубулярных структур с угловой конфигурацией и заостренными концами и невыраженная клеточная атипия. Цитологически тубулярные структуры практически отсутствуют или их сохраняется минимальное количество. Клеточная атипия слабо выражена или отсутствует. Миоэпителиальные клетки могут быть многочисленными. Именно наличие многочисленных миоэпителиальных клеток и отсутствие значительной цитологической атипии в некоторых случаях приводит к диагностике ФА, а не тубулярного рака.

В двух наших наблюдениях диагноз «тубулярный рак» не был поставлен цитологически, а картина расценена, как аденоз и ФА соответственно. В одном из этих наблюдений диагноз рака подтвержден только при срочном интраоперационном гистологическом исследовании. В нашей текущей

Морфологическая гипер- и гиподиагностика рака молочной железы, 2013—2016 гг.

Диагностика	2013	2014	2015	2016	Всего
Цитологическая гиподиагностика	2	9	6	10	27
Цитологическая гипердиагностика	1	1	4	5	11
Неадекватный цитологический материал	3	2	16	8	29
Гистологическая гиподиагностика	1	2	6	2	11
Гистологическая гипердиагностика	1	1	—	—	2
Неадекватный гистологический материал	3	9	2	—	14

работе тубулярный рак встречается и в большинстве случаев цитологически расценивается как высокодифференцированный рак неспецифического типа или дольковый рак (рис. 7, см. обложку).

Высокодифференцированный инвазивный РМЖ неспецифического типа также часто становится причиной ложнонегативных цитологических заключений. Высокодифференцированная карцинома неспецифического типа характеризуется мноморфной популяцией клеток, расположенных отдельно и в группах. Клеточные скопления, как правило, трехмерные, с папиллярными или солидными структурами. Цитологическая картина чаще клеточная. Увеличение размера ядер и атипия клеток минимальны. В отдельных клетках имеются мелкие ядрышки. Наиболее важным признаком, позволяющим отличить высокодифференцированный рак от ФА, служит отсутствие миоэпителиальных клеток и наличие клеточных скоплений в виде беспорядочного расположения клеток.

Наибольшее количество наших ошибок (15) связано с гиподиагностикой РМЖ неспецифического типа высокой степени дифференцировки. Чаще всего это высокодифференцированный РМЖ неспецифического типа тубулярно-трабекулярного строения. Из-за невыраженных признаков атипии клеток эпителия, наличия стромального компонента, структур по типу пластов эпителия, наличия рассыпанных клеток наиболее часто диагностируют ФА. При пересмотре препаратов в некоторых наблюдениях цитологически поставить рак бывает невозможно (рис. 8, см. обложку).

В 13 наблюдениях цитологически диагностирован рак, на материале же CNB рак диагностирован не был. Из них при пересмотре гистологических препаратов CNB в 2 наблюдениях поставлен диагноз «DCIS», в остальных 11 наблюдениях РМЖ установлен при повторных CNB или при срочном интраоперационном гистологическом исследовании.

Заключение. Чувствительность цитологической диагностики патологии МЖ по материалу трепанобиопсий, по данным нашего института, составляет 97,5%, специфичность — 98,5%. Число ложноположительных цитологических заключений о наличии злокачественной опухоли — 0,6%, ложноотрицательных — 1,5%. Достоверность цитологического исследования — 97,4%, эффективность — 96,3%. Неинформативный материал при цитологическом исследовании составляет 1,6% (см. таблицу).

Чувствительность цитологического и гистологического методов исследования на материале трепанобиопсий достаточно высока, но CNB имеет и более высокую чувствительность, и специфичность в диагностике доброкачественных и злокачественных новообразований МЖ. Исследование мазков-отпечатков CNB — дополнительный быстрый и до-

статочно надежный метод морфологической диагностики. Комбинируя CNB и мазок-отпечаток для цитологического исследования, повышают качество и точность морфологической диагностики различных поражений МЖ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Atkins A.K., Kong C.S. *Practical Breast Pathology: a Diagnostic Approach*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
- Coutant C., Canlorbe G., Bendifallah S., Beltjens F. Benign proliferative breast disease with and without atypia. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 2015; 44(10): 980—95.
- Dabbs D.J. *Breast Pathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
- Sanders M.E., Simpson J.F. *Breast Pathology*. New York: Demos Medical Publishing; 2014.
- Shabb N.S., Boulos F.I., Abdul-Karim F.W. Indeterminate and erroneous fine-needle aspirates of breast with focus on the 'true gray zone': a review. *Acta Cytol.* 2013; 57(4): 316—31.
- Dyrstad S.W., Yan Y., Fowler A.M., Colditz G.A. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2015; 149(3): 569—75.
- Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P., van de Vijver M.J., eds. *WHO Classification of Tumors of the Breast*. Lyon, France: WHO Press; 2012.
- Said S.M., Visscher D.W., Nassar A., Frank R.D., Vierkant R.A., Frost M.H. et al. Flat epithelial atypia and risk of breast cancer: A Mayo cohort study. *Cancer.* 2015; 121(10): 1548—55.
- Verkooyen H.M., Peterse J.L., Schipper M.E., Buskens E., Hendriks J.H., Pijnappel R.M. et al. Interobserver variability between general and expert pathologists during the histopathological assessment of large-core needle and open biopsies of non-palpable breast lesions. *Eur. J. Cancer.* 2003; 39(15): 2187—91.
- Mitra S., Dey P. Fine-needle aspiration and core biopsy in the diagnosis of breast lesions: A comparison and review of the literature. *Cytojournal.* 2016; 13: 18.
- Socolov D., Anghelache L., Plea C., Socolov R., Carauleanu A. Benign breast disease and the risk of breast cancer in the next 15 years. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2015; 119(1): 135—40.
- Oiwa M., Endo T., Ichihara S., Moritani S., Iwakoshi A., Sato Y. et al. Sclerosing adenosis as a predictor of breast cancer bilaterality and multicentricity. *Virchows Arch. Epub.* 2015; 467(1): 71—8.
- Santen R.J. *Benign Breast Disease in Women*. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000—2014 Feb 22. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278994/>.
- Shield P.W., Ribu D.L., Cominos D. The significance of extracellular mucin in breast fine needle aspiration specimens. *Cytopathology.* 2016; 27(3): 185—92. Epub 2015 Jun 24.
- Spruill L. Benign mimickers of malignant breast lesions. *Semin. Diagn. Pathol.* 2016; 33(1): 2—12. Epub 2015 Sep 5.
- Elmore J.G., Longton G.M., Carney P.A., Geller B.M., Onega T., Tosteson A.N. et al. Diagnostic concordance among pathologists interpreting breast biopsy specimens. *JAMA.* 2015; 313(11): 1122—32.
- Davidson M.D., Rimm M.D. Expertise vs evidence in assessment of breast biopsies: an atypical science. *JAMA.* 2015; 313(11): 1109—10.
- Reis-Filho J.S., Lakhani S.R. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res.* 2003; 5(6): 313—9. Epub 2003 Oct 9.
- Wang L., Zhang W., Lyu S., Liu X., Zhang T., Liu S. et al. Clinicopathologic characteristics and molecular subtypes of microinvasive carcinoma of the breast. *Tumour Biol.* 2015; 36(4): 2241—8.
- Diviani S.N., Kardasis N.D. Analysis of the cytological features supporting the diagnosis of lobular breast cancer. Factors associated with equivocal diagnoses. *J. Buon.* 2015; 20(1): 40—4.
- McCart Reed A.E., Kutasovic J.R., Lakhani S.R., Simpson P.T. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 12.
- Mucha Duffloth R., Xavier-Júnior J.C., Moraes Neto F.A., Janot dos Santos K., Schmitt F. Fine needle aspiration cytology of lobular breast carcinoma and its variants. *Acta Cytol.* 2015; 59(1): 37—42.

Поступила 21.10.16

Принята к печати 29.11.16

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 612.017.1064:614.7-053.2

Просекова Е.В.¹, Ситдикова Т.С.², Долгополов М.С.¹, Турянская А.И.¹, Сабыныч В.А.¹, Забелина Н.Р.¹

МОНИТОРИНГ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ НАПРЯЖЕННОЙ ИММУНОТРОПНОЙ ЗОНЫ ИНДУСТРИАЛЬНОГО ГОРОДА

¹ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690002, Владивосток;

²КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр», 690001, Владивосток

Проведена комплексная оценка количественных и функциональных показателей иммунокомпетентных клеток периферической крови, цитокинового и иммуноглобулинового профиля сыворотки крови с определением доверительных интервалов иммунологических параметров здоровых детей в возрасте 3–11 лет (n = 98), проживающих в напряженной иммунотропной зоне с наибольшим экологическим риском. Анализ лейкоцитов, субпопуляционного состава лимфоцитов и процессов активации клеток периферической крови проводили с помощью многопараметрового проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL фирмы «Beckman Coulter Inc.» с подбором панелей моноклональных антител с многоцветной комбинацией флуорохромов. Уровни цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием реактивов фирмы «R & D Diagnostics Inc.» (США), спонтанную и митогениндуцированную продукцию цитокинов клетками цельной крови с применением набора реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). В сыворотке крови содержание иммуноглобулинов определяли методом иммунотурбидиметрии, общего и специфического IgE — методом твердофазного иммуноферментного анализа с наборами реагентов ООО «Компания Алкор Био» (Санкт-Петербург), статистическую обработку данных выполняли по программе Statistica 10 с достоверностью 95–99%. У младших школьников по сравнению с детьми 3–6 лет выявлено статистически значимо большее количество лейкоцитов с сохранением высокого удельного веса нейтрофилов, преобладанием желтой субпопуляции Т-лимфоцитов, выраженная активация В-лимфоцитов, более высокие уровни сывороточных IgA, IgG, общего и специфического IgE (латентная сенсibilизация бытовыми аллергенами), преобладание интенсивности продукции интерлейкинов ИЛ-13 над ИЛ-4 и значимо большая обеспеченность натуральными киллерами.

Ключевые слова: иммунный статус; проточная цитометрия; клеточные субпопуляции; цитокиновый профиль; здоровые дети.

Для цитирования: Просекова Е.В., Ситдикова Т.С., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабыныч В.А., Забелина Н.Р. Мониторинг лабораторных показателей иммунного статуса здоровых детей, проживающих в условиях напряженной иммунотропной зоны индустриального города. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 216-221

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-216-221>

Prosekova E.V.¹, Sitdikova T.S.², Dolgopolov M.S.¹, Turyanskaya A.I.¹, Sabynych V.A.¹, Zabelina N.R.¹

THE MONITORING OF LABORATORY INDICES OF IMMUNE STATUS OF HEALTHY CHILDREN RESIDING IN CONDITIONS OF INTENSIVE IMMUNOTROPIC ZONE OF INDUSTRIAL TOWN

¹The Tikhookeanskii state medical university of Minzdrav of Russia, 690002 Vladivostok, Russia

²The Vladivostokskii clinical diagnostic center, 690001 Vladivostok, Russia

The complex evaluation was implemented concerning to quantitative and functional indices of immune-competent cells of peripheral blood, cytokine and immunoglobulin profile of blood serum with detection of confidence ranges of immunologic parameters of healthy children aged 3-11 years (n=98) residing in intensive immunotropic zone with the highest ecological risk. The multi-parametric flow cytofluorimeter COULTER EPICS XL (Beckman Coulter Inc.) with selection of panels of monoclonal antibodies with multi-color combination of fluorochromes was applied to analyze leukocytes, sub-population composition of lymphocytes and processes of activation of cells of peripheral blood. The levels of cytokines were detected using immunoenzyme technique applying reagents by «R&D Diagnostics Inc.» (USA). The reagents' kit of «Vektor-Best» (Novosibirsk) was applied to detect spontaneous and mitogen-induced production of cytokines by cells of total blood. The immuneturbidimetry technique was applied to detect content of immunoglobulins in blood serum. The total and specific IgE was detected using solid-phase immune enzyme analysis with reagents' kits by «Alkor Bio Company» (St. Petersburg). The statistical data processing was implemented using software Statistica 10 with data verification 95%-99%. In junior school children as compared with children aged 3-6 years, statistically reliable greater number of leukocytes were detected with preservation of high ratio of neutrophils, prevalence of helper sub-population of T-lymphocytes, expressed activation of B-lymphocytes, higher levels of serum IgA, IgG, common and specific IgE (latent sensibilization by domestic allergens), prevalence of intensity of production of interleukins IL-13 over IL-4 and significantly higher provision with natural killers.

Key words: immune status; flow cytometry; cell populations; cytokine profile; healthy children.

For citation: Prosekova E.V., Sitdikova T.S., Dolgoplov M.S., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A., Zabelina N.R. The monitoring of laboratory indices of immune status of healthy children residing in conditions of intensive immunotropic zone of industrial town. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 216-221. (in Russ.)*. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-4-216-221

For correspondence: Prosekova E.V., doctor of medical sciences, professor, the head of the chair of clinical laboratory diagnostic, general and clinical immunology. e-mail: pros.ev@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 14.06.2016
Accepted 28.06.2016

Введение. Иммунограмма практически здоровых людей визуализирует индивидуальность реакции на воздействие комплекса факторов окружающей среды, влияние биологических ритмов, возрастные изменения и адаптационные резервы организма относительно нагрузочных факторов [1—5]. В последние десятилетия фиксируется снижение уровня здоровья и развитие экологически обусловленных иммунодефицитных состояний, формирующихся у людей, проживающих в городах с высоким уровнем загрязнения окружающей среды [6—12]. Иммунологические показатели отражают реакции организма на воздействие физиологических или патологических факторов, активацию или истощение иммунной системы. Индикаторами действия антропогенных факторов являются основные клеточные популяции иммунной системы человека, высокочувствительные к негативному влиянию различных средовых факторов [4, 6—8, 13, 14]. Одной из актуальных задач лаборатории клинической иммунологии является определение нормативных значений показателей иммунного статуса населения и мониторинг иммунного статуса в регионе.

Внедрение современных технологий в клинической лабораторной диагностике позволяет с большей чувствительностью определить колебания количественных и функциональных характеристик компонентов системы врожденного и адаптивного иммунитета и обосновывает необходимость определения региональных особенностей доверительных интервалов диагностической информативности используемых в клинической практике методов иммунодиагностики [1, 3, 13, 15—17].

В Приморском крае по показателю интегрального индекса воздействия (числовой показатель, являющийся результатом сжатия многокомпонентной информации и учитывающий функциональный ответ организма на воздействие факторов внешней среды) среда обитания человека является нагрузочной, ее создают климат, неблагоприятный для освоения, горный рельеф, экологические проблемы лесопользования, повышенное техногенное загрязнение с высоким классом вредности промышленных предприятий и острота проблем, связанных с быстрым увеличением автомобильного парка в регионе [7—9, 18]. Т.И. Виткиной [8, 9] и Л.В. Веремчук [7] определены экологическая обусловленность иммунопатологии и иммуноотропные зоны (зоны экологического неблагополучия с негативным комплексным влиянием экологических факторов на заболеваемость иммунопатологиями населения и зависимостью выраженности иммунологических изменений от состояния окружающей среды) в Приморском крае. В напряженной иммуноотропной зоне с наибольшим экологическим риском, индуцированными ксенобиотическими факторами и нарушениями иммунного гомеостаза находится Владивосток, имеющий значительный автомобильный парк (выброс от промышленных источников — 1—3-й классы вредности предприятий, риск от автотранспорта значительно выше ($fV = 65,2—89,9$), чем от выбросов в воздух промышленных предприятий (нормированный показатель здоровья $Wi = 18,2—22,1$)). Воздействие неблагоприятных экологических условий в промышленных центрах приводит к

постепенному истощению резервных возможностей организма и формированию у здоровых жителей иммунного дисбаланса, стадийность которого соответствует общебиологическим закономерностям адаптогенеза организма к изменению условий окружающей среды [7—9].

Цель исследования — выявление особенностей функционирования иммунокомпетентных клеток здоровых детей в индустриальном городе на основе клинико-лабораторного мониторинга цитокинового профиля и иммунного статуса.

Исследование включало оценку факторов врожденного и адаптивного иммунитета путем получения и анализа комплекса количественных и функциональных показателей иммунокомпетентных клеток, цитокинового профиля и иммуноглобулинового спектра, отражающих эффективность работы иммунной системы, определение референсных интервалов иммунологических параметров периферической крови здоровых детей, проживающих в условиях напряженной иммуноотропной зоны индустриального города.

Задачи исследования:

— анализ цитокинового профиля сыворотки крови: интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17), интерферона гамма (ИФН γ), фактора некроза опухоли альфа (ФНО α)), спонтанной и митогениндуцированной продукции ИЛ-4 и ИФН γ клетками цельной крови;

— мониторинг уровня иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM и специфический IgE к смеси бытовых аллергенов) в сыворотке крови;

— оценка методом проточной цитометрии количественных и функциональных показателей процессов клеточной активации иммунокомпетентных клеток (лейкоциты, субпопуляционный состав лимфоцитов, идентификация поверхностных молекул активации, маркеров пролиферативной активности, апоптоза, межклеточной кооперации) у здоровых детей;

— определение доверительных интервалов (ДИ) иммунологических показателей здоровых детей, проживающих в условиях напряженной иммуноотропной зоны.

Материал и методы. Исследование проводили среди здоровых детей Владивостока в возрасте 3—11 лет ($n = 98$), не имевших в течение предшествующего обследованию месяца острых заболеваний и не получавших фармакологического лечения, с консультативным приемом в центре здоровья КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр». Клинико-лабораторные исследования выполняли в текущем году трехкратно в различные временные периоды (сентябрь—октябрь, декабрь—январь, март—апрель) на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ГБОУ ВПО «ТГМУ» Минздрава России и в иммунологической лаборатории краевого клинического центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями ГБУЗ «ККБ № 2». Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ГБОУ ВПО «ТГМУ» Минздрава России 23.06.2014, протокол № 7 и 24.04.2015, протокол № 8.

Учитывая возрастные особенности становления иммун-

Клеточные факторы иммунного статуса здоровых детей, проживающих во Владивостоке

Показатели, единицы измерения удельного веса и абсолютного числа	Дети 3—6 лет (<i>n</i> = 49), 145 исследований		Дети 7—11 лет (<i>n</i> = 49), 147 исследований		Критерий Стьюдента <i>t</i>
	<i>M</i> ± <i>m</i>	ДИ	<i>M</i> ± <i>m</i>	ДИ	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,75 ± 0,30	6,25—7,26	8,07 ± 0,42	7,37—8,78	2,522
Лимфоциты, %	44,32 ± 0,84	42,93—45,72	40,47 ± 1,56	37,87—43,08	2,163
Т-лимфоциты CD3 ⁺ /CD19 ⁻ , 10 ⁹ /л	3,01 ± 0,13	2,79—3,22	3,19 ± 0,11	3,01—3,38	1,091
Т-лимфоциты CD3 ⁺ /CD19 ⁻ , кл/мкл	2361,50 ± 97,78	2199,19—2523,82	2119,30 ± 79,02	1988,13—2250,47	1,926
В-лимфоциты CD3 ⁻ /CD19 ⁺ , %	14,32 ± 0,38	13,69—14,95	14,95 ± 1,06	13,20—16,70	0,560
В-лимфоциты CD3 ⁻ /CD19 ⁺ , кл/мкл	439,80 ± 27,96	393,39—486,21	464,25 ± 36,13	404,27—524,23	0,535
Т-хелперы CD3 ⁺ /CD4 ⁺ , %	38,46 ± 0,58	37,50—39,41	37,41 ± 1,08	35,61—39,20	0,855
Т-хелперы CD3 ⁺ /CD4 ⁺ , кл/мкл	1149,35 ± 39,47	1083,97—1215,03	1143,20 ± 43,86	1070,42—1215,98	0,106
Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ /CD8 ⁺ , %	31,42 ± 1,52	28,89—33,95	27,07 ± 1,19	25,09—29,04	2,253
Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ /CD8 ⁺ , кл/мкл	1041,45 ± 40,47	974,27—1108,63	859,10 ± 49,84	776,36—941,84	2,840
Активированные Т-клетки CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺ , %	3,05 ± 0,21	2,70—3,39	2,90 ± 0,39	2,25—3,55	0,339
Активированные Т-клетки CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺ , кл/мкл	92,7 ± 7,51	80,23—105,16	89,00 ± 10,14	72,17—105,83	0,293
Активированные клетки CD3 ⁻ /HLA-DR ⁺ , %	13,19 ± 0,52	12,33—14,06	16,55 ± 1,21	14,54—18,56	2,547
Активированные клетки CD3 ⁻ /HLA-DR ⁺ , кл/мкл	427,50 ± 33,56	371,80—483,20	527,35 ± 38,90	462,78—591,92	1,943
Активированные Т-клетки CD3 ⁺ /CD25 ⁺ , %	5,58 ± 0,24	5,18—5,98	6,79 ± 0,29	6,30—7,27	3,181
Активированные Т-клетки CD3 ⁺ /CD25 ⁺ , кл/мкл	157,45 ± 3,82	151,11—163,79	218,45 ± 12,17	198,25—238,65	4,782
Цитолитические NKT — клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	8,40 ± 0,47	7,64—9,16	8,35 ± 0,48	7,55—9,15	0,075
Цитолитические NKT — клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺ , кл/мкл	245,35 ± 9,53	229,53—261,17	266,00 ± 19,43	233,74—298,25	0,954
Цитолитические NK-клетки CD3 ⁻ /CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	6,33 ± 0,64	5,27—7,39	15,42 ± 0,93	13,61—16,87	7,599
Цитолитические NK-клетки CD3 ⁻ /CD16 ⁺ CD56 ⁺ , кл/мкл	225,30 ± 24,39	184,81—265,78	485,65 ± 40,82	417,90—553,40	5,475

* П р и м е ч а н и е . Здесь и в табл. 2: *t* — коэффициент достоверности различий показателей в разных возрастных группах.

ной системы, выделили 2 подгруппы: дети дошкольного возраста (3—6 лет (*n* = 49)) и дети младшего школьного возраста (7—11 лет (*n* = 49)).

Материалом для исследования иммунологических параметров являлась венозная кровь. Анализ лейкоцитов, характеристики субпопуляционного состава лимфоцитов, процессов активации клеток периферической крови проводили с помощью многопараметрового проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL фирмы «Beckman Coulter Inc.», станции для подготовки проб CoulterPrepPlus и Coulter TO-prep с подбором панелей моноклональных антител с многоцвет-

ной комбинацией флюорохромоов. Для иммунофенотипирования использовали флюоресцентные частицы Flow-Count. Определяли Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические клетки, регуляторный индекс, В-клетки, натуральные киллеры (NK-клетки), цитолитические Т-клетки (NKT-клетки) и активированные Т- и В-клетки (CD3⁺/CD19⁻, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD3⁻/CD19⁺, CD3⁻/CD16⁺CD56⁺, CD3⁺/CD16⁺CD56⁺, CD3⁺/HLA-DR⁺, CD3⁻/HLA-DR⁺).

Уровни цитокинов в сыворотке крови определяли в сэндвич-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с реактивами фирмы «R & D Diagnostics Inc.» (США)

Спонтанная и митогениндуцированная продукция ИЛ-4 и ИФН_γ клетками цельной крови здоровых детей, проживающих во Владивостоке

Показатель	Дети 3—6 лет (<i>n</i> = 49)		Дети 7—11 лет (<i>n</i> = 49)		Критерий Стьюдента <i>t</i>
	<i>M</i> ± <i>m</i>	ДИ	<i>M</i> ± <i>m</i>	ДИ	
Спонтанная продукция ИФН _γ , пг/мл	11,70 ± 0,09	11,55—12,93	15,67 ± 0,81	14,33—17,01	3,662
Митогениндуцированная продукция ИФН _γ , пг/мл	269,52 ± 77,85	140,29—398,75	31,78 ± 10,43	13,46—49,11	3,038
Плазма, пг/мл	8,71 ± 0,25	8,29—9,12	16,37 ± 1,87	11,59—21,12	2,304
Спонтанная продукция ИЛ-4, пг/мл	2,19 ± 0,04	2,12—2,26	1,72 ± 0,07	1,60—1,83	5,756
Митогениндуцированная продукция ИЛ-4, пг/мл	2,97 ± 0,45	2,23—3,70	1,76 ± 0,08	1,65—1,88	2,67
Плазма, пг/мл	2,09 ± 0,37	1,47—2,71	1,95 ± 0,48	1,16—2,74	0,236

Цитокиновый профиль и регуляторные цитокиновые индексы $K_{\text{ИФН}\gamma/\text{ИЛ-4}}$, $K_{\text{ИФН}\gamma/\text{ИЛ-13}}$ сыворотки крови здоровых детей 3—11 лет, проживающих во Владивостоке

Уровень цитокинов	Цитокиновый профиль сыворотки крови, пг/мл									
	ИЛ-1 β	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-13	ИЛ-17	ИФН γ	ФНО α	КИФН γ /ИЛ-4	КИФН γ /ИЛ-13
$M \pm m$	2,32 \pm 0,25	3,043 \pm 0,65	4,60 \pm 0,80	8,02 \pm 1,6	10,08 \pm 2,85	4,30 \pm 1,20	28,60 \pm 3,46	9,68 \pm 1,28	5,20 \pm 1,30	4,05 \pm 0,86
$M - tm$	1,98—3,65	2,01—4,90	3,05—5,80	7,26—10,58	7,80—14,90	2,90—6,10	17,31—34,35	7,56—11,81	4,66—9,98	3,35—6,15
$M + tm$										

согласно прилагаемой инструкции с учетом результатов на иммуноферментном анализаторе. Расчеты количества цитокинов производили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы и выражали в пг/мл. Спонтанную и митогениндуцированную продукцию ИЛ-4 и ИФН γ клетками цельной крови исследовали с применением набора реагентов «Цитокин-Стимул-Бест» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Уровни иммуноглобулинов М, G, A в сыворотке крови определяли методом иммунотурбидиметрии. Содержание общего и специфического IgE (к смеси бытовых аллергенов) исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ООО «Компания Алкор Био» (Санкт-Петербург) и выражали в МЕ/мл.

Для статистической обработки всех цифровых данных использовали методы описательной, параметрической и непараметрической статистики программы Statistica 10 с подсчетом средней арифметической (M), медианы, среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$), доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (t и p), проводили корреляционный анализ (критерий χ^2) и однофакторный дисперсионный анализ (критерий Фишера F), (r — коэффициент корреляции). Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95—99%.

Результаты. Вариации гематологических показателей периферической крови и показателей иммунограммы здоровых детей в течение года не превышали 3% от исходных, становились значимыми в зависимости от возраста, что определило сравнительный анализ полученных данных в группах детей дошкольного и младшего школьного возраста. В ходе исследований зафиксированы ДИ абсолютного числа лейкоцитов в периферической крови здоровых детей 3—11 лет от 6,85 до 8,22 $\cdot 10^9$ /л при значимо меньшем количестве у дошкольников (3—6 лет) по сравнению с младшими школьниками (7—11 лет) (6,25—7,26 $\cdot 10^9$ /л против 7,37—8,78 $\cdot 10^9$ /л соответственно, при $p < 0,02$ (табл. 1).

Среди лейкоцитов преобладали гранулоциты со средним уровнем относительного содержания нейтрофилов 50,23 \pm 1,49% (ДИ 7,75—52,71%) и прямой корреляционной зависимостью от общего числа лейкоцитов ($r = +0,707$). Абсолютное число нейтрофилов у детей 7—11 лет было выше, чем у дошкольников — 4,13 \pm 0,39 $\cdot 10^9$ /л (ДИ 3,48—4,78 $\cdot 10^9$ /л) против 3,39 \pm 0,17 $\cdot 10^9$ /л (ДИ 3,10—3,68 $\cdot 10^9$ /л) при $p < 0,1$. Относительный показатель моноцитов составил 7,58 \pm 0,38% (ДИ 6,94—8,21%) при отсутствии значимой корреляции с общим числом лейкоцитов ($r = -0,145$) и различий абсолютного числа клеток в возрастных подгруппах (0,55 \pm 0,03 $\cdot 10^9$ /л и 0,59 \pm 0,04 $\cdot 10^9$ /л соответственно при $p > 0,2$). Удельный вес лимфоцитов варьировал от 39,65 до 44,43% с обратной корреляционной зависимостью средней силы ($r = -0,64$) с уровнем лейкоцитов в периферической крови. Процентное содержание лимфоцитов у детей 3—6 лет было незначительно выше, чем у младших школьников ($p > 0,2$), в абсолютных показателях это различие нивелировалось (см. табл. 1).

У детей 3—6 лет в периферической крови средние показатели удельного веса и абсолютного числа Т-лимфоцитов составили соответственно 75,70 \pm 0,94% и 2361,50 \pm 97,78 кл/мкл, среди них цитотоксических Т-лимфоцитов — 1041,45 \pm 40,47 кл/мкл, с маркерами ранней активации CD3 $^+$ /CD25 $^+$ — 157,45 \pm 3,82 кл/мкл и поздней активации CD3 $^+$ /HLA-DR $^+$ — 92,7 \pm 7,51 кл/мкл, цитолитических НКТ-клеток (CD3 $^+$ /CD16 $^+$ /CD56 $^+$) — 245,35 \pm 9,53 кл/мкл (см. табл. 1). Регуляторный индекс CD4 $^+$ /CD8 $^+$ у детей 3—6 лет составил 1,21 \pm 0,06 (ДИ 1,102—1,318), у детей 7—11 лет — 1,44 \pm 0,07 (ДИ 1,31—1,57) при достоверности различий $t = 2,28$ ($p < 0,05$). У дошкольников в периферической крови абсолютное число В-лимфоцитов составило 439,80 \pm 27,96 кл/мкл и практически не отличалось от такового у младших школьников (464,25 \pm 36,13 кл/мкл). В последнем случае доля клеток с экспрессией маркеров активации CD3 $^+$ /HLA-DR $^+$ была значимо выше (13,19 \pm 0,52 и 16,55 \pm 1,21% при $p < 0,02$) и зафиксированы различия в синтезе сывороточных иммуноглобулинов здоровых детей в зависимости от возраста. Так, в сыворотке крови здоровых детей 3—6 лет уровень IgA составил 1,02 \pm 0,10 г/л, IgG — 7,8 \pm 0,43 г/л, IgM — 0,94 \pm 0,08 г/л, IgE — 20,9 \pm 6,6 МЕ/мл, специфический IgE к бытовым аллергенам у 61,2% детей не определялся и у 38,2% не превышал 0,02 МЕ/мл. У детей 7—11 лет определенные следующие уровни сывороточных иммуноглобулинов: IgA — 2,04 \pm 0,15 г/л, IgG — 10,08 \pm 0,63 г/л, IgM — 1,07 \pm 0,03 г/л, IgE — 72,19 \pm 8,75 МЕ/мл, специфического IgE — 0,09 \pm 0,02 МЕ/мл. В подгруппе детей младшего школьного возраста у 2 (4,09%) уровень общего IgE превышал 200 МЕ/мл (204 и 295 МЕ/мл), у 71,43% (35) детей уровни специфического IgE к бытовым аллергенам превышали 0,02 МЕ/мл и в 2 случаях фиксировались высокие уровни специфического IgE (12 и 38,3 МЕ/мл соответственно) при отсутствии клинических проявлений аллергической патологии.

Цитолитические НК-клетки CD3 $^+$ /CD16 $^+$ CD56 $^+$ определялись при удельном весе 6,33 \pm 0,64% и 225,30 \pm 24,39 кл/мкл у детей 3—6 лет и значимо больше у детей 7—11 лет (15,42 \pm 0,93% и 485,65 \pm 40,82 кл/мкл при $p < 0,001$) (см. табл. 1).

При анализе цитокинового профиля сыворотки крови у детей 3—6 лет зафиксировано содержание ИФН γ в диапазоне от 7,6 до 12,9 пг/мл, что достоверно ниже, чем у детей —11 лет, — 12,3—53,6 пг/мл ($p < 0,005$). Спонтанная продукция ИФН γ клетками крови у дошкольников была достоверно ниже, чем у младших школьников (11,70 \pm 0,09 и 15,67 \pm 0,81 пг/мл соответственно при $p < 0,005$), с зеркальными различиями в продукции ИЛ-4 (2,19 \pm 0,04 и 1,72 \pm 0,07 пг/мл соответственно при $p < 0,001$). При этом адекватный ответ на митоген и индукция секреции ИФН γ зафиксирована у 61,2% (30), ИЛ-4 — у 50,6% (15) детей в возрасте 3—6 лет, а в подгруппе детей 7—11 лет продукция ИФН γ в ответ на митоген отмечена только у 22,2% (10), ИЛ-4 — у 12,05% (5) детей ($p < 0,005$) (табл. 2).

Показатели сывороточного спектра провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α у здоровых детей не превышали 10 пг/мл (табл. 3).

В сывороточном спектре противовоспалительных цитокинов преобладал ИЛ-13 (ДИ 7,80—14,90 пг/мл). Цитокиновые регуляторные индексы оппозиционных цитокинов $K_{ИФН\gamma}$ и $K_{ИЛ-4}$ составили $5,20 \pm 1,30$ (ДИ 4,66—9,98) и $4,05 \pm 0,86$ (ДИ 3,35—6,15) соответственно (см. табл. 3).

Обсуждение. Полученные результаты позволили определить возрастную динамику показателей клеточного и гуморального иммунитета: у младших школьников по сравнению с показателями у детей дошкольного возраста отмечена более высокая обеспеченность лейкоцитами (с преобладанием гранулоцитов), лимфоцитами, активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами, меньшая численность Т-цитотоксических лимфоцитов при отсутствии значимых различий в обеспеченности В-лимфоцитами при достоверно большем синтезе иммуноглобулинов и снижении митогениндуцированной продукции ИФН γ (см. табл. 1—3). ДИ исследованных показателей не выходят за пределы общепринятых референсных интервалов, но имеют особенности [6, 10, 11, 14]. В исследованиях В.Я. Розенберга и соавт. [6] в Чите у здоровых детей в возрасте до 6 лет отмечена активация специфического звена противовирусной защиты, у детей в возрасте 7—10 лет по сравнению с группой 3—6 лет выявлено меньшее число лейкоцитов и лимфоцитов, снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов и количественных характеристик субпопуляции при увеличении популяции CD25⁺, уменьшение субпопуляции CD19⁺ на фоне роста синтеза IgG. Т.И. Виткиной и соавт. [9] при изучении воздействия факторов окружающей среды на иммунометаболический статус жителей промышленных центров Приморского края определены фенотипы, отражающие формирование иммунометаболической резистентности. Выявленная у младших школьников динамика иммунологических показателей — возрастание количества лейкоцитов, лимфоцитов при снижении пула зрелых Т-лимфоцитов, увеличение числа активированных Т-лимфоцитов, сохранение уровня Т-хелперов и снижение количества Т-цитотоксических клеток, нарушение соотношений регуляторных субпопуляций, нарастание численности активированных В-лимфоцитов и синтеза иммуноглобулинов — позволяет говорить о формировании компенсаторного иммунного дисбаланса первого фенотипа, базирующегося на активации иммунной системы в клеточном звене. Компенсированный фенотип соответствует первой фазе процесса приспособления организма к действию факторов, дестабилизирующих иммунный гомеостаз.

Заключение. Проведенные исследования состояния иммунного ответа здоровых детей, проживающих в напряженной иммунотропной зоне индустриального города, определили особенности функциональной активности и цитокиновой регуляции иммунокомпетентных клеток, процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Возрастные особенности, динамика и митогениндуцированная продукция исследуемых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов позволяют использовать данные показатели как эффективные для мониторинга реализации иммунного ответа и состояний, связанных с нарушением адаптационных механизмов. У младших школьников по сравнению с детьми 3—6 лет выявлено статистически значимо большее количество лейкоцитов с сохранением высокого удельного веса нейтрофилов, преобладанием Т-хелперной субпопуляции, выраженной активацией В-лимфоцитов, более высокие уровни сывороточных IgA, IgG, значимо большая обеспеченность натуральными киллерами и латентная сенсibilизация бытовыми аллергенами. Отмечено преобладание интенсивности продукции ИЛ-13 перед ИЛ-4. Оба эти цитокина являются стимуляторами пролиферации преактивированных В-лимфоцитов, активаторами гуморального иммунитета и участвуют в регуляции синтеза IgE, потребность в ИЛ-13 у здорового человека без аллергических реакций минималь-

на. Сочетание снижения секреции ИФН γ и нарушения IgG-антительного ответа определяют предрасположенность детей, проживающих в условиях напряженной иммунотропной зоны индустриального города, к реализации аллергических заболеваний органов дыхания и частым ОРЗ.

Исследование проводилось в рамках единого научного направления ГБОУ ВПО «ГГМУ» Минздрава России «Медико-биологические закономерности патогенеза социально значимых заболеваний и разработка современных технологий их диагностики, лечения, профилактики в условиях экологического разнообразия Дальнего Востока России».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. *Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
2. Черешнев В.А., Гусев В.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления. *Медицинская иммунология.* 2012; 14(1-2): 9—20.
3. Ярилин А.А. *Иммунология.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
4. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В. и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология.* 2014; 16(1): 7—26.
5. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. *Проточная цитометрия в медицине и биологии.* Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2013.
6. Розенберг В.Я., Бутыльский А.Н., Кузник Б.И. Возрастная динамика показателей гемограммы и иммунного статуса у детей различного возраста. *Медицинская иммунология.* 2011; 13(2-3): 61—6.
7. Веремчук Л.В., Янькова В.И., Виткина Т.И., Голохваст К.С., Барскова Л.С. Загрязнение атмосферы урбанизированной территории как системный процесс взаимодействия факторов окружающей среды. *Здоровье. Медицинская экология.* Наука. 2015; 61(3): 35—42.
8. Виткина Т.И., Веремчук Л.В., Кики П.Ф. Выделение факторов риска развития хронического бронхита в промышленных центрах Приморского края. *Здоровье населения и среда обитания.* 2005; (2): 22—7.
9. Виткина Т.И., Веремчук Л.В., Кики П.Ф. Воздействие факторов окружающей среды на иммунометаболический статус жителей промышленных центров Приморского края. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2013; (3-2): 44—7.
10. Добродеева Л.К. Иммунологическая реактивность, состояние здоровья населения *Архангельской области.* Монография. Екатеринбург: Издательство ИФПА; 2004.
11. Малиновская В.В., Паршина О.В., Гусева Т.С., Чеботарева Т.А., Каряева С.К. Особенности иммунного и микроэлементного статуса детей, проживающих в условиях техногенного воздействия промышленного города. *Детские инфекции.* 2010; 9(1): 23—7.
12. Троценко А.А., Журавлева Н.Г., Будилова Е.В., Терехин А.Т. Факторы изменчивости неспецифического иммунитета жителей Северо-Запада европейской части России. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: *Экология и безопасность жизнедеятельности.* 2010; (1): 59—67.
13. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2015; (2): 30—5.
14. Троценко А.А. Особенности формирования иммунитета на разных этапах жизненного цикла человека. *Международный научно-исследовательский журнал.* 2015; (6-2). Available at: www.cyberleninka.ru.
15. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология.* 2012; 14(3): 55—68.

16. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине. *Медицинская иммунология*. 2007; 9(4-5): 73—8.
17. Новиков П.Д., Коневалова Н.Ю., Титова Н.Д. Принципы оценки иммунного статуса и диагностики иммунодефицитных болезней. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2005; (2): 8—22.
18. Юдин С.В., Маслов Д.В. Влияние антропогенных факторов на онкологическую заболеваемость населения Приморского края. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2004; (3): 46—9.
9. Vitkina T.I., Veremchuk L.V., Kiku P.F. The effect of environmental factors on the immune-metabolic status of people living in industrial areas of Primorsky region. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2013; (3-2): 44—7. (in Russian)
10. Dobrodeeva L.K. *Immunological Reactivity, State of Health of the Population of the Arkhangelsk Region: Monograph [Immunologicheskaya reaktivnost', sostoyanie zdorov'ya naseleniya Arkhangel'skoy oblasti*. Monografiya]. Ekaterinburg: Izdatel'stvo IFPA; 2004. (in Russian)
11. Malinovskaya V.V., Parshina O.V., Guseva T.S., Chebotareva T.A., Karyayeva S.K. Peculiarities of immune and microelement status of children living in conditions of technogenic influence of industrial city. *Detskii infektsii*. 2010; 9(1): 23—7. (in Russian)
12. Trotsenko A.A., Zhuravleva N.G., Budilova E.V., Terekhin A.T. Variability of factors of nonspecific immunity inhabitants of the North-West European part of Russia. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2010; (1): 59—67. (in Russian)
13. Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; (2): 30—5. (in Russian)
14. Trotsenko A.A. Peculiarities of immunity formation at different stages of human life-cycle. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2015; (6-2). Available at: www.cyberleninka.ru. (in Russian)
15. Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., TotolyanAreg A. The standardized technology «Research subpopulation of peripheral blood lymphocytes using flow cytometry analyzers (projekt)». *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 14(3): 55—68. (in Russian)
16. Khaydukov S.V., Zurochka A.V. Flow cytometry as a modern analytical tool in biology and medicine. *Meditsinskaya immunologiya*. 2007; 9(4-5): 73—8. (in Russian)
17. Novikov P.D., Konevalova N.Yu., Titova N.D. The principles of evaluation of immune status and diagnostic of immunodeficiency diseases. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2005; (2): 8—22. (in Russian)
18. Yudin S.V., Maslov D.V. Anthropogenic factors and oncological morbidity in primorsky region. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2004; (3): 46—9. (in Russian)

REFERENCES

1. Khaïtov R.M., Pinegin B.V., Yarilin A.A. *Manual of Clinical Immunology. Diagnosis of Diseases of the Immune System: Guidelines for Physicians [Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii. Diagnostika zabolevaniy immunnnoy sistemy: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
2. Chereshnev V.A., Gusev V.Yu. Immunological and pathophysiological mechanisms of systemic inflammation. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 14(1-2): 9—20. (in Russian)
3. Yarilin A.A. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
4. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya*. 2014; 16(1): 7—26. (in Russian)
5. Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshnev V.A. *Flow Cytometry in Biology and Medicine [Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii]*. Ekaterinburg: RIO UrO RAN; 2013. (in Russian)
6. Rozenberg V.Ya., Butyl'skiy A.N., Kuznik B.I. Age-related dynamics of hemogram and immune profile in children at different ages. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(2-3): 61—6. (in Russian)
7. Veremchuk L.V., Yan'kova V.I., Vitkina T.I., Golokhvast K.S., Barskova L.S. Air pollution urban area as a systemic process of interaction between environmental factors. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya*. Nauka. 2015; 61(3): 35—42. (in Russian)
8. Vitkina T.I., Veremchuk L.V., Kiku P.F. Allocation of risk factors in the development of chronic bronchitis in the industrial centers of Primorye Territory. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2005; (2): 22—7. (in Russian)

Поступила 14.06.16

Принята к печати 28.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.36-053.1-092:612.017.1

Курабекова Р.М.¹, Шевченко О.П.^{1,2}, Цирульникова О.М.^{1,2}, Можейко Н.П.¹, Цирульникова И.Е.¹, Олефиренко Г.А.¹

СВЯЗЬ УРОВНЯ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА 1 С ФИБРОЗОМ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

¹ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва;

²Кафедра трансплантологии и искусственных органов ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва

Исследован уровень трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) в плазме крови детей с терминальной стадией печеночной недостаточности до и после трансплантации печени, проанализирована связь уровня цитокина со степенью фиброза печени. Показано, что уровень TGF-β1 в плазме крови детей с печеночной недостаточностью ниже такового у здоровых детей и зависит от степени тяжести фиброза печени. Так, уровень цитокина в крови пациентов выше при фиброзе 2-й и 3-й степени тяжести, чем при фиброзе 1-й и 4-й степени. После родственной трансплантации доли печени уровень TGF-β1 в плазме крови пациентов повышается независимо от исходной степени тяжести фиброза.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста бета 1; биомаркер; цитокин; заболевания печени; трансплантация печени.

Для корреспонденции: Шевченко Ольга Павловна, д-р мед. наук, проф. ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова»; e-mail: transplant2009@mail.ru

Для цитирования: Курабекова Р.М., Шевченко О.П., Цирульников О.М., Можейко Н.П., Цирульникова И.Е., Олефиренко Г.А. Связь уровня трансформирующего фактора роста бета 1 с фиброзом печени у детей с врожденными заболеваниями гепатобилиарной системы. Клиническая лабораторная диагностика; 2017; 62(4): 221-225. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-221-225>

Kurabekova R.M.¹, Shevchenko O.P.^{1,2}, Tsirulnikova O.M.^{1,2}, Mozheiko N.P.¹, Tsirulnikova I.E.¹, Olefirenko G.A.¹

THE RELATIONSHIP OF LEVEL OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 WITH LIVER FIBROSIS IN CHILDREN WITH CONGENITAL DISEASES OF HEPATOBILIARY SYSTEM

¹The V.I. Shumakov Federal research center of transplantology and artificial organs of Minzdrav of Russia, 123182 Moscow, Russia

²The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992 Moscow, Russia

The article considers results of studying level of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) in blood plasma of children with terminal stage of hepatic failure before and after transplantation of liver. The relationship of level of cytokine with degree of liver fibrosis is analyzed. It is demonstrated that level of TGF-β1 in blood plasma of children with hepatic failure is lower in comparison with healthy children and depends on degree of severity of liver fibrosis. Thus, level of cytokine in blood of patients is higher under fibrosis severity stage II and III, than under fibrosis of severity stage I and IV. After kindred transplantation of hepatic lobe, level of TGF-β1 in blood plasma of patients increases independently of initial degree of severity of fibrosis.

Key words: transforming growth factor beta 1; biomarker; cytokine; liver diseases; transplantation of liver.

For citation: Kurabekova R.M., Shevchenko O.P., Tsirulnikova O.M., Mozheiko N.P., Tsirulnikova I.E., Olefirenko G.A. The relationship of level of transforming growth factor beta 1 with liver fibrosis in children with congenital diseases of hepatobiliary system. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 221-225. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-221-225>

For correspondence: Shevchenko O.P., doctor of medical sciences, professor. e-mail: 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 29.11.2016

Введение. Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF-β1) продуцируется во многих тканях и является плейотропным цитокином аутокринного и паракринного действия, участвующим в регуляции фиброгенеза, иммунного ответа, апоптоза и других процессов [1]. В печени TGF-β1 синтезируется практически всеми клетками, но главный его источник — активированные звездчатые клетки [2]. TGF-β1 действует на гепатоциты как профиброгенный цитокин, стимулируя продукцию различных белков экстрацеллюлярного матрикса. При заболеваниях печени концентрация TGF-β1 может быть различной в ткани печени и плазме крови: при фиброзе уровень TGF-β1 в ткани печени повышен [3, 4], а его уровень в плазме крови детей с билиарной атрезией, фульминантным гепатитом и циррозом ниже, чем у здоровых детей того же возраста [5]. Изменение уровня цитокина в крови может отражать состояние печени и иметь прогностическое и диагностическое значение при различных заболеваниях печени.

В то же время TGF-β1 синтезируется лимфоцитами крови и регулирует иммунный ответ путем супрессивного действия на лимфоциты и клетки печени, что также может оказывать влияние на функции печени [6]. При трансплантации печени уровень цитокина в крови может отражать как иммунный статус реципиента, так и состояние печеночного трансплантата. Клинические исследования пациентов после трансплантации печени выявили тенденцию к повышению уровня TGF-β1 в крови реципиентов с хорошей функцией трансплантата [7]. В нашей работе по изучению динамики содержания TGF-β1 в крови детей-реципиентов печени получены данные о связи низкого уровня цитокина в крови с риском развития дисфункции трансплантата [8]. Другие авторы сообщают о риске развития фиброза трансплантата у реципиентов печени с высоким уровнем TGF-β1 в крови [9, 10]. В связи с плейотропным действием цитокина вопрос о связи его уровня в крови с развитием фиброза печени и иммунным гомеостазом требует дальнейшего исследования.

Цель настоящей работы — анализ взаимосвязи уровня TGF-β1 в крови со степенью фиброза печени у детей с вро-

жденными заболеваниями гепатобилиарной системы до и после трансплантации печени.

Материал и методы. Обследованы 128 детей в возрасте 2—73 мес (медиана — 8 мес, средний возраст — 12 ± 12 мес), из них 58 мальчиков (45%) с терминальной стадией печеночной недостаточности, развившейся в исходе врожденных заболеваний гепатобилиарной системы.

По нозологии заболевания были распределены следующим образом:

- атрезия желчевыводящих путей (АЖВП) ($n = 71$);
- гипоплазия желчевыводящих путей ($n = 10$);
- болезнь Байлера ($n = 10$);
- синдром Алажилля ($n = 9$);
- болезнь Кароли ($n = 7$);

— в число других ($n = 21$) вошли по 1—3 случая таких заболеваний, как криптогенный цирроз, фульминантный и аутоиммунный гепатит, синдромы Криглера—Найра и Бада—Кияри, дефицит α-1 антитрипсина, гликогеноз и гепатобластома.

Группами сравнения стали здоровые дети ($n = 12$) в возрасте 10 ± 6 мес, из них 7 мальчиков (58%), и здоровые взрослые ($n = 12$) — доноры печени в возрасте 30 ± 6 лет, из них 5 мужчин (42%).

Всем детям с терминальной стадией печеночной недостаточности была проведена операция трансплантации левого латерального сектора печени от живого родственного донора. После трансплантации фрагмента печени пациенты получали двух- или трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию, включающую такролимус. Донорам печени проводили резекцию левого латерального сектора печени.

Обследование пациентов включало сбор анамнеза, физикальное и лабораторное обследования (биохимический и клинический анализы крови, коагулограмма, вирусологическое и иммунологическое обследования), инструментальные (УЗИ, ЭКГ и др.) и по показаниям — дополнительные исследования (МРТ головного мозга и др.).

В качестве материала для исследования использовали цитратную плазму крови, которую получали до и через месяц

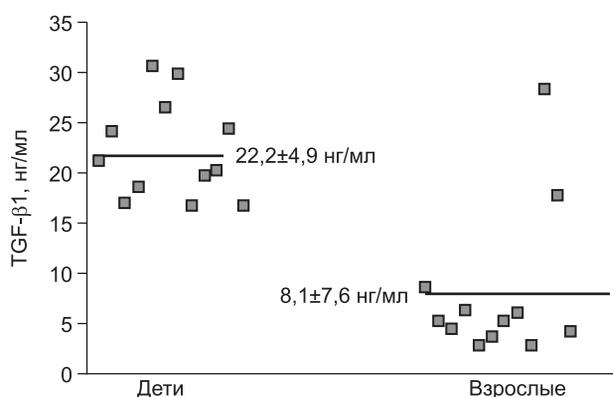


Рис. 1. Уровень TGF-β1 в плазме крови здоровых детей и взрослых.

По оси абсцисс — дети, взрослые; по оси ординат — уровень TGF-β1 (в нг/мл).

после трансплантации печени. Концентрацию TGF-β1 измеряли с помощью иммуноферментного метода, используя специфический набор реагентов (Bender MedSystems, Австрия).

Морфологическое исследование проводили в патологоанатомическом отделении Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова (зав. — проф. И.М. Ильинский), оно включало макроскопическое описание и гистологическое исследование образцов печени детей, удаленной перед трансплантацией.

Стадию фиброза печени определяли по критериям шкалы METAVIR [11]:

- F0 — фиброз отсутствует;
- F1 — звездчатое расширение портальных трактов без образования септ;
- F2 — расширение портальных трактов с единичными портопортальными септами;
- F3 — многочисленные портоцентральные септы без цирроза;
- F4 — цирроз.

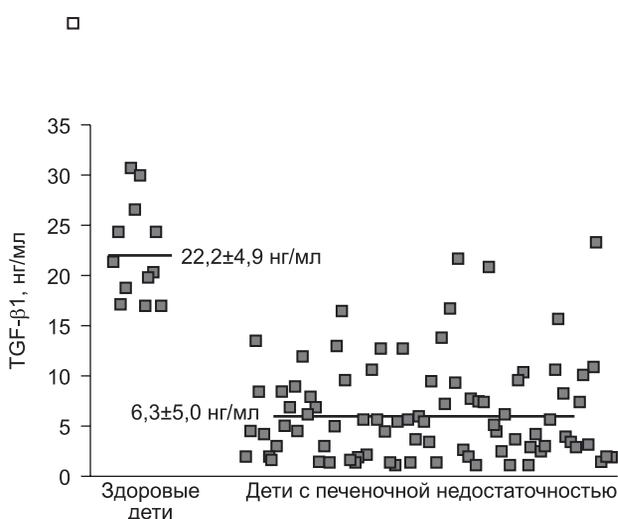


Рис. 2. Уровень TGF-β1 в плазме крови здоровых детей и детей с печеночной недостаточностью.

По оси абсцисс — здоровые дети, дети с печеночной недостаточностью; по оси ординат — уровень TGF-β1 (в нг/мл).

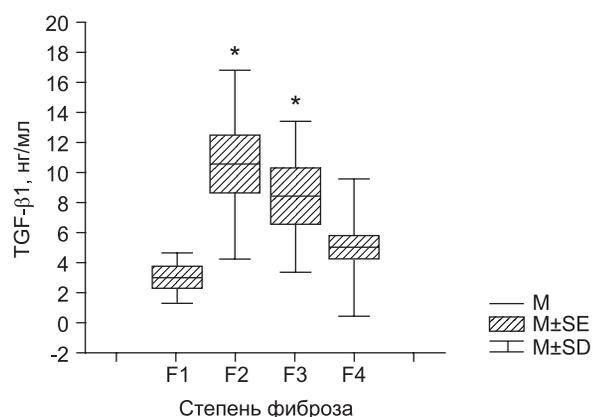


Рис. 3. Уровень TGF-β1 в плазме крови пациентов с фиброзом печени различной степени.

По оси абсцисс — степень фиброза (F1, F2, F3, F4); по оси ординат — уровень TGF-β1 (в нг/мл).

* $p < 0,05$ в сравнении с уровнем при F1.

Полученные данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение ($M \pm S.D.$). Статистическую обработку данных проводили методами непараметрической статистики: коэффициент корреляции определяли по Спирмену, при сравнении независимых выборок рассчитывали U -критерий Манна—Уитни, для сравнения зависимых переменных применяли парный критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считали различия, при которых вероятность ошибки составляла менее 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Содержание TGF-β1 в плазме крови здоровых детей составляло $22,2 \pm 4,9$ нг/мл и превышало уровень здоровых взрослых — $8,1 \pm 7,6$ нг/мл ($p = 0,001$) (рис. 1). Полученный результат согласуется с данными других авторов [12], которые показали, что уровень TGF-β1 в плазме крови здоровых детей до 14 лет выше, чем

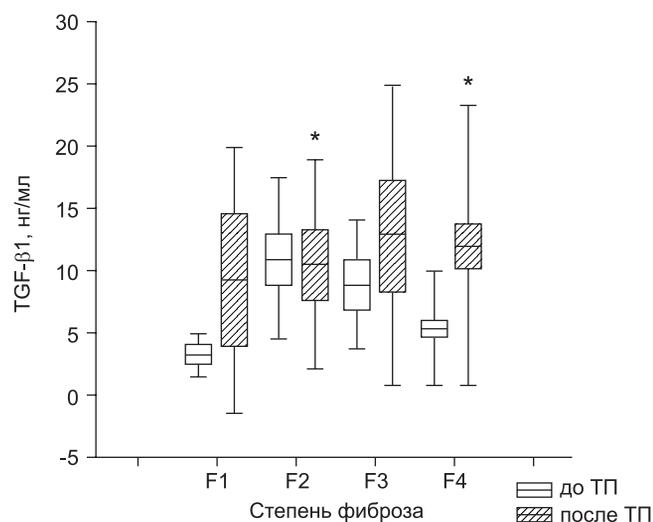


Рис. 4. Динамика уровня TGF-β1 после трансплантации печени (ТП) у пациентов с исходно различной степенью фиброза печени.

По оси абсцисс — степень фиброза (F1, F2, F3, F4); по оси ординат — TGF-β1 (в нг/мл).

* $p < 0,05$ в сравнении с уровнем до ТП.

у здоровых взрослых. Следует отметить, что, по данным разных авторов, концентрация цитокина в крови здоровых лиц значительно варьирует. Это может быть связано как с индивидуальной вариабельностью показателя, так и с видом биологического материала, в котором определяли TGF- β 1: более высокие концентрации определяются в сыворотке и цитратной плазме, нежели в плазме с ЭДТА и гепарином [13].

У здоровых детей, как и у взрослых, уровень биомаркера не коррелировал с полом ($r_s = -0,03$, $p = 0,93$, $r_s = 0,54$, $p = 0,07$ соответственно) или возрастом в пределах возрастного диапазона в каждой группе ($r_s = -0,23$, $p = 0,53$, $r_s = -0,09$, $p = 0,78$ соответственно).

Уровень TGF- β 1 в плазме крови детей, страдающих терминальной печеночной недостаточностью, развившейся в исходе врожденных заболеваний гепатобилиарной системы, составлял $6,3 \pm 5,0$ нг/мл и был значительно ниже, чем у здоровых детей того же возраста ($p = 0,001$) (рис. 2).

Уровень TGF- β 1 в плазме крови пациентов не зависел от пола ($r_s = 0,11$, $p = 0,34$), возраста ($r_s = -0,16$, $p = 0,16$) и в слабой степени коррелировал с диагнозом ($r_s = 0,23$, $p = 0,04$) и тяжестью фиброза печени ($r_s = 0,33$, $p = 0,01$).

Морфологическое исследование удаленной перед трансплантацией печени было проведено у 73 пациентов, из них: у 6 (8%) был обнаружен фиброз первой степени — F1, у 12 (16%) — F2, у 10 (14%) — F3 и у 45 (62%) — F4. Степень фиброза слабо коррелировала с диагнозом ($r_s = 0,39$, $p = 0,003$): у пациентов с АЖВП чаще обнаруживали фиброз 4-й степени (цирроз). Однако следует отметить, что у пациентов практически со всеми видами заболеваний встречали фиброз всех четырех степеней тяжести.

Уровень TGF- β 1 в плазме крови пациентов с фиброзом различной степени тяжести был достоверно ниже, чем у здоровых детей того же возраста ($p = 0,001$ для всех степеней фиброза). Концентрация TGF- β 1 в плазме крови различалась при фиброзе различной степени: у пациентов с минимальной степенью фиброза (F1) уровень TGF- β 1 в плазме крови составлял $3,1 \pm 1,7$ нг/мл; у пациентов с F2 и F3 уровень цитокина был достоверно выше, чем при F1 ($10,9 \pm 6,5$ нг/мл, $p = 0,02$ и $8,7 \pm 5,2$ нг/мл, $p = 0,04$, соответственно). У пациентов с циррозом печени (F4) уровень TGF- β 1 был ниже, чем при F2 и F3 ($p = 0,03$ и $p = 0,047$ соответственно) и не отличался от такового у детей с F1 ($5,2 \pm 4,7$ нг/мл, $p = 0,33$) (рис. 3). Таким образом, уровень исследуемого биомаркера в плазме крови при F1 и F4, когда фиброгенеза практически еще или уже нет, отличается от такового при F2 и F3, когда идет активный процесс фиброгенеза. Можно полагать, что увеличение уровня TGF- β 1 крови отражает процесс активного фиброгенеза в печени, что согласуется с результатами других авторов, показавшими связь уровня TGF- β 1 крови со средними, но не крайними степенями фиброза у пациентов с гепатитом C [14].

Трансплантация печени приводила к повышению уровня TGF- β 1 в плазме крови у подавляющего большинства детей-реципиентов: через месяц после операции он в среднем составлял $11,5 \pm 10,8$ нг/мл ($p = 0,001$ по сравнению с уровнем до трансплантации), хотя и оставался достоверно ниже, чем у здоровых детей ($p = 0,001$). После трансплантации печени уровень TGF- β 1 в плазме крови детей не зависел от пола ($r_s = -0,12$, $p = 0,26$), возраста ($r_s = 0,04$, $p = 0,71$), исходного заболевания ($r_s = 0,08$, $p = 0,43$) или исходной степени фиброза ($r_s = -0,01$, $p = 0,95$). Уровень TGF- β 1 в плазме крови детей увеличивался в различной степени, но не отличался у пациентов с исходно различной степенью фиброза печени (рис. 4).

Удаление доли печени у здоровых взрослых родственных доноров не оказывало заметного эффекта на средний уровень TGF- β 1 в плазме крови доноров через месяц после операции, который составлял $12,9 \pm 11,7$ нг/мл и статистически не отличался от такового до операции ($8,1 \pm 7,6$ нг/мл, $p = 0,20$). Сле-

дует, однако, отметить, что изменения уровня биомаркера в крови индивидуальных доноров были различны. Полученный результат позволяет полагать, что сама хирургическая операция по резекции доли печени не оказывает значимого влияния на уровень TGF- β 1 в плазме крови через месяц после операции, а увеличение уровня биомаркера после трансплантации печени у детей связано с функционированием донорской печени.

Выводы. Уровень TGF- β 1 в плазме крови здоровых детей выше, чем у здоровых взрослых.

У детей с терминальной стадией печеночной недостаточности в исходе врожденных заболеваний печени и желчевыводящих путей уровень TGF- β 1 в плазме крови ниже, чем у здоровых детей того же возраста.

Уровень TGF- β 1 в плазме крови детей с терминальной стадией печеночной недостаточности связан со степенью фиброза печени: при фиброзе 2-й и 3-й степени его уровень выше, чем при фиброзе 1-й и 4-й степени.

После трансплантации печени уровень TGF- β 1 в плазме крови детей увеличивается независимо от исходной степени фиброза печени.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—7, 9—10, 12—14 см. REFERENCES)

8. 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.
11. Ирышкин О.Е., Ильинский И.М., Цирульникова О.М., Готье С.В. Патоморфология билиарной атрезии у детей — реципиентов донорской печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2013; XV(4): 47—54.

REFERENCES

1. Blobe 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.
2. Charles R., Chou H.S., Wang L., Fung J.J., Lu L., Qian S. Human hepatic stellate cells inhibit T-cell response through B7-H1 pathway. *Transplantation*. 2013; 96(1): 17—24.
3. Annoni G., Weiner F.R., Zern M.A. Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease. *J. Hepatol.* 1992; 14(2-3): 259—64.
4. 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.
5. Rosensweig J.N., Omori M., Page K., Potter C.J., Perlman E.J., Thorgerisson S.S. et al. Transforming growth factor-beta 1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr. Res.* 1998; 44(3): 402—9.
6. 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.
7. Briem-Richter A., Leuschner A., Krieger T., Grabhorn E., Fischer L., Nshan B. et al. Peripheral blood biomarkers for the characterization of alloimmune reactivity after pediatric liver transplantation. *Pediatr. Transplant.* 2013; 17(8): 757—64.
8. 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)
9. 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.
10. 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.
11. Iryshkin O.E., Il'inskiy I.M., Tsurul'nikova O.M., Got'e S.V. Pathomorphology of biliary atresia in children — recipient of liver. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2013; XV(4): 47—54. (in Russian)
 12. 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.
 13. Fredericks S., Holt D.W. TGF-beta quantitation can be tricky. *Transplantation.* 1999; 68(4): 468—9.
 14. Valva P., Casciato P., Diaz Carrasco J.M., Gadano A., 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.

Поступила 17.10.16
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-056.43-078.33

Сновская М.А.¹, Намазова-Баранова Л.С.^{1,2,3}, Малышев В.С.⁴, Кожевникова О.В.¹, Батырова А.С.¹, Вишнева Е.А.¹

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ sIgE К АЛЛЕРГЕНАМ ПЫЛЬЦЫ ДЕРЕВЬЕВ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ «АЛКОР-БИО» И МЕТОДОМ IMMUNOCAP

¹ ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, 119991, Москва;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119991, Москва;

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва;

⁴ ООО «Фидес Лаб», 127106, Москва, Российская Федерация

Проведен сравнительный анализ 320 парных результатов тестирования детей с бронхиальной астмой и/или аллергическим ринитом, обусловленными пыльцой деревьев, с помощью импортной и отечественной тест-систем ImmunoCAP и «Алкор-Био» соответственно. Детальный анализ результатов исследования указанных тест-систем продемонстрировал, что определение уровней аллергенспецифических IgE у пациентов с помощью тест-систем «Алкор-Био» и ImmunoCAP показывает высокую степень совпадения данных в отношении ряда аллергенов деревьев. Применение отечественной тест-системы «Алкор-Био» может служить альтернативой импортным методикам при оценке уровней sIgE к аллергенам ольхи, березы, лещины, ивы, тополя, сосны.

Ключевые слова: диагностика аллергии; аллергены пыльцы деревьев; сравнение методов диагностики; ImmunoCAP; «Алкор-Био».

Для цитирования: Сновская М.А., Намазова-Баранова Л.С., Малышев В.С., Кожевникова О.В., Батырова А.С., Вишнева Е.А. Диагностическое определение sIgE к аллергенам пыльцы деревьев тест-системой «Алкор-Био» и методом ImmunoCAP. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (4): 225-229. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-225-229>

Snovskaya M.A.¹, Namazova-Baranova L.S.^{1,2,3}, Malyshev V.S.⁴, Kozhevnikova O.V.¹, Batyrova A.S.¹, Vishneva E.A.¹

THE DIAGNOSTIC DETECTION OF sIgE TO ALLERGENS OF TREES' POLLEN BY REST-SYSTEM «ALKOR-BIO» AND IMMUNOCAP TECHNIQUE

¹The research center of children health of Minzdrav of Russia, 119991 Moscow, Russia

²The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992 Moscow, Russia

³The N.I. Pirogov Russian national research medical university Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia

⁴«Fides Lab», 127106 Moscow, Russia

The article presents the results of preliminary analysis of 320 pair results of testing of children with bronchial asthma and/or allergic rhinitis conditioned by tree pollen. The imported and national test-systems ImmunoCAP and Alkor-Bio were applied. The detailed analysis of study results of the mentioned tests demonstrated that detection of levels of allergen-specific IgE in patients using test-systems Alkor-Bio and ImmunoCAP shows high degree of data matching related to a number of tree allergens. The application of national test-system Alkor-Bio can be considered as an alternative to import methods in evaluation of levels of sIgE to allergens of alder tree, birch, hazel, willow, poplar, pine.

Key words: diagnostic of allergy; allergens of tree pollen; comparison of diagnostic methods; ImmunoCAP; Alkor-Bio

For citation: Snovskaya M.A., Namazova-Baranova L.S., Malyshev V.S., Kozhevnikova O.V., Batyrova A.S., Vishneva E.A. The diagnostic detection of sIgE to allergens of trees' pollen by rest-system «Alkor-Bio» and Immunocap technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 225-229. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-225-229>

For correspondence: Snovskaya M.A., candidate of medical sciences, physician of clinical laboratory diagnostic of the department of instrumental diagnostic. e-mail: snows@inbox.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Financing: The work performed within the agreement № 14.607.21.0017 with Ministry of Education and Science of Russia (unique identifier RFMEFI60714X0017)

Received 02.11.2016
Accepted 29.11.2016

Для корреспонденции: Сновская Марина Андреевна, канд. мед. наук, врач клин. лаб. диагностики отдела инструментальной диагностики ФГАУ НЦЗД Минздрава РФ; e-mail: snows@inbox.ru

Введение. Аллергия на пыльцу злаковых трав представляет одну из наиболее распространенных форм, с которыми аллергологи сталкиваются не только среди взрослого населения, но и в педиатрической практике. В зависимости от климатогеографического региона России распространенность поллиноза у детей составляет до 26% [1], бронхиальной астмы — 4—10% [2]. У многих пациентов ингаляционная форма аллергии дебютирует в возрасте старше 3—4 лет, а число аллергенов, служащих триггерными факторами образования иммуноглобулинов класса E (IgE), увеличивается по мере взросления [3]. В большинстве случаев наличие аллерген-специфических IgE предшествует началу симптомов, развивающихся через несколько лет [4, 5].

Для определения концентрации IgE применяют иммуноферментные, иммунофлуоресцентные и иммунохемилюминесцентные методы, из которых за рубежом наиболее распространены следующие (по данным Американской Академии аллергологии, астмы и иммунологии [6]): колориметрический (анализатор HYTEC-288), флуориметрический (анализатор ImmunoCAP), хемилюминесцентный метод (анализатор Immulite). Данные тест-системы обладают высокой чувствительностью, в то же время являются «закрытыми», т. е. в них допускается применение исключительно реагентов, произведенных той же компанией, что может усложнить бесперебойное обеспечение диагностического процесса.

Одна из наиболее крупных компаний — производителей наборов для *in vitro*-диагностики, в том числе аллергодиагностики, на отечественном рынке — Алкор Био (Санкт-Петербург, Россия) [7].

Пациенты часто вынуждены обращаться для проведения серологических тестов в различные лаборатории, где в большинстве случаев результаты тестирования получают с помощью различных аналитических систем. При этом показано, что значения, полученные с применением различных тест-систем, не взаимозаменяемы [8]. Кроме того, представленные на рынке аналитические системы для определения концентрации аллергенспецифических IgE как зарубежного, так и отечественного производства, значительно отличаются по методу выполнения исследования, по стоимости оборудования, реагентов и расходных материалов. При этом критерием выбора у пациентов часто служит стоимость исследования, которую определяет стоимость реактивов. В связи с этим целью нашего исследования — проведение сравнительной оценки результатов анализа sIgE, выполняемого с помощью отечественной (производство Алкор-Био) и зарубежной тест-системы (ImmunoCAP).

Материал и методы. Работа основана на анализе клинико-лабораторных данных 40 детей в возрасте от 4 до 17 лет, наблюдающихся в НЦЗД Минздрава России по поводу бронхиальной астмы и/или аллергического ринита. У всех пациентов установлена сезонность обострения заболевания (преимущественно в весенний период), отсутствие других хронических тяжелых заболеваний. Для выполнения сравнительного анализа тест систем ImmunoCAP и «Алкор-Био» было отобрано 8 наиболее клинически значимых в средней полосе России пыльцевых аллергенов деревьев: клена (t1), ольхи (t2), березы (t3), лещины (t4), дуба (t7), ивы (t12), тополя (t14), сосны (t16). В сыворотках пациентов определяли уровень sIgE одновременно с использованием двух различных тест-систем: отечественной — «АллергоИФА-специфические sIgE», основанной на реверсивном иммуноферментном анализе («Алкор-Био», Санкт-Петербург, Россия) и зарубежной — ImmunoCAP 250, — применяющей метод непрямой иммунофлуоресценции (Fisher Thermo Scientific).

Для обеих тест-систем также использована система интерпретации получаемых результатов в полуколичественной шкале: разделение на классы сенсибилизации. Согласно

данной шкале концентрация sIgE, равная $0 \div 0,34$ кЕ/л соответствует классу 0 и считается диагностически незначимой. Концентрация sIgE, равная $0,35—0,69$ кЕ/л, характеризуется как слабая сенсибилизация (I класс). При sIgE, равном $0,70 \div 3,49$ кЕ/л, сенсибилизация пациента считается умеренной (II класс), при $3,5 \div 17,49$ кЕ/л — соответствует среднему уровню (III класс), при $17,5 \div 49,9$ кЕ/л — высокому уровню (IV класс), при $50 \div 100$ кЕ/л — очень высокому уровню сенсибилизации (V класс). Значения sIgE свыше 100 кЕ/л считаются предельно высоким уровнем сенсибилизации (VI класс).

Взаимосвязь значений концентрации sIgE, полученных двумя методами, и связь между классами сенсибилизации была оценена с помощью корреляционного анализа (коэффициента ранговой корреляции Спирмена). Для выявления различий между полученными двумя методами концентрациями sIgE был применен критерий Уилкоксона. Взаимосвязь и взаимное влияние между изучаемыми параметрами оценили с помощью регрессионного анализа. Для оценки сходимости результатов был рассчитан процент совпадений позитивных, негативных результатов, процент расхождений результатов, а также общее число совпадений.

Результаты. По общепринятой практике за точку cut-off принимали концентрацию sIgE равную 0,35 кЕ/л [9]. Относительно данной величины были разделены положительные и отрицательные результаты анализов, рассчитаны числа совпадения позитивных и негативных результатов двух методик, а также число совпадений количественных результатов как для всей совокупности всех полученных данных, так и для каждого аллергена по отдельности. Всего было проанализировано 320 показателей для 40 пациентов.

Сравнение суммарных результатов тестирования, выполненного двумя методами. Оценена совокупность всех выполненных тестов и установлена статистически значимая сильная корреляция между результатами, полученными с помощью ImmunoCAP и набора «Алкор-Био» (коэффициент ранговой корреляции Спирмена — 0,95 при уровне значимости $p < 0,01$). В 94,4% случаев наблюдали совпадение результатов «качественного ответа» тестирования («да—нет») — выявление диагностически значимого уровня sIgE, в противном случае концентрацию sIgE принимали как диагностически незначимую, если она не достигала величины 0,35 кЕ/л). Данные представлены на рис. 1.

Несовпадение «качественного» ответа двух методов наблюдали лишь в 5,6% случаев. При этом в 3,4% случаев тестирование пациентов с помощью ImmunoCAP обнаружива-

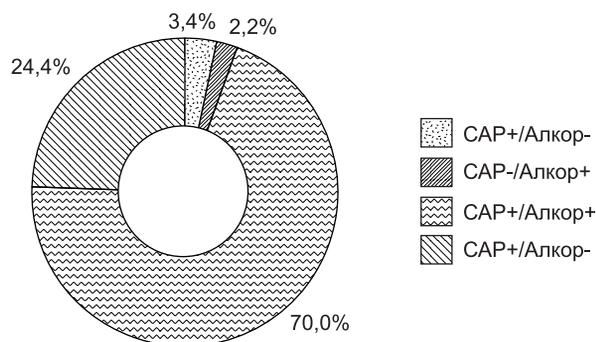


Рис. 1. Сравнение «качественных» результатов определения уровня sIgE к аллергенам пыльцы деревьев у пациентов с поллинозом тест-системами ImmunoCAP и «Алкор-Био».

CAP + или CAP- — соответственно выявление или отсутствие sIgE, определенное с помощью системы ImmunoCAP; Алкор + или Алкор- — выявление или отсутствие sIgE, установленное с помощью системы «Алкор-Био».

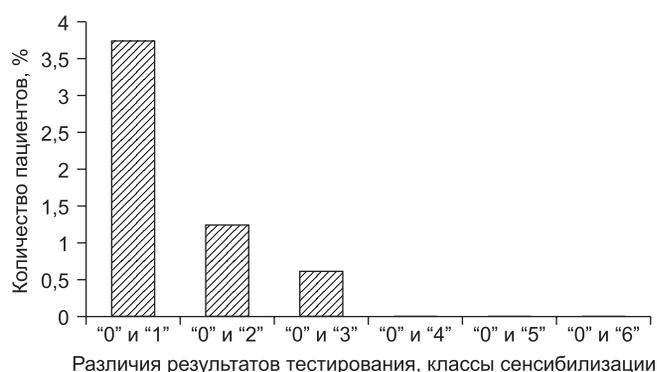


Рис. 2. Несовпадение результатов тестирования, полученных разными тест-системами.

Наблюдается для результатов, имеющих пограничное клиническое значение: от 0 до III класса сенсibilизации.

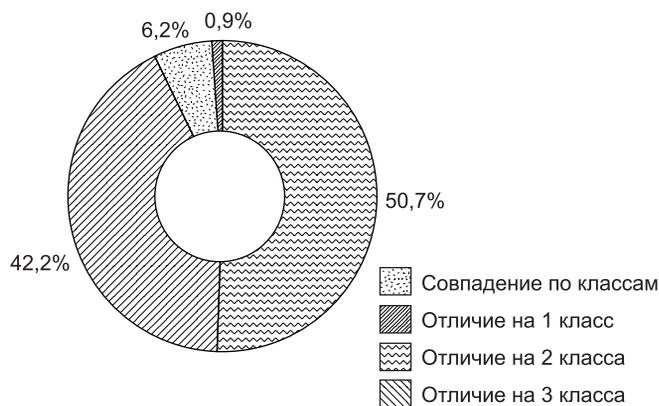


Рис. 3. Сравнение количественных результатов определения уровня sIgE тест-системами ImmunoCAP и «Аллерго-ИФА—Алкор» с учетом классов сенсibilизации.

ло наличие антител при отрицательном результате в тестовой системе «Алкор-Био», а в 2,2% случаев имела место обратная ситуация (выявление антител системой «Алкор-Био» и негативный результат теста ImmunoCAP). Как правило, расхождение результатов наблюдали для низких концентраций антител, не имеющих четкого клинического значения. Данные представлены на рис. 2.

Отсутствие антител (0 класс сенсibilизации) по результатам тест-системы «Алкор-Био» сочеталось с низкой концентрацией антител, полученной с помощью тестирования на ImmunoCAP (что соответствовало I—II классу сенсibilизации). В то же время отсутствие антител по данным тестирования на ImmunoCAP сочеталось с наличием невысокой концентрации антител по данным «Алкор-Био» (I класс сенсibilизации).

Для полуколичественной оценки значений концентрации sIgE, полученных на двух тест-системах, использовали разделение результатов на группы в зависимости от классов сенсibilизации, отражающих связь концентрации sIgE у пациентов с клинической картиной. Данные представлены на рис. 3.

Выявлено, что в 50,7% случаев (162 тестов) результаты обоих тестов по классу сенсibilизации совпадали, а в 42,5% случаев (135 тестов) — отличались, но не более чем на один класс. В остальных 6,2% (20 тестов)

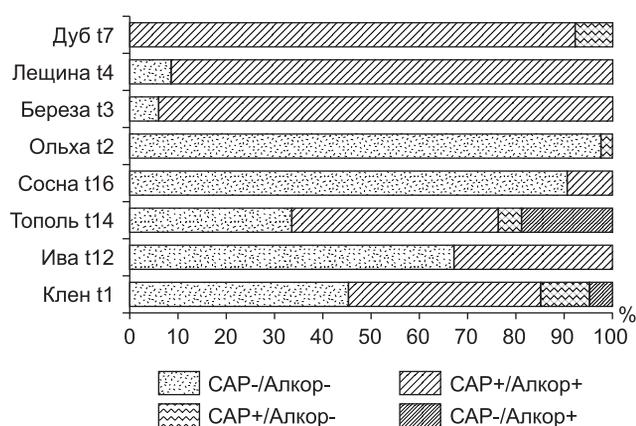


Рис. 4. Соотношение качественных результатов тестирования сывороток пациентов с поллинозом, проведенных с помощью ImmunoCAP и «Алкор-Био».

и 0,9% случаев (3 теста) результаты различались на 2 и 3 класса, соответственно.

Всего в 93% случаев значения концентраций sIgE, полученные с помощью методик ImmunoCAP и «Алкор-Био», оставались в пределах одного или двух соседних классов сенсibilизации (см. рис. 3). Таким образом, не выявлено значимого количества случаев принципиального расхождения качественных результатов двух методик с аллергенами пыльцы деревьев. Уровень значимости коэффициента корреляции для всех изучаемых параметров составил $p < 0,01$.

Сравнение результатов тестирования на отдельные аллергены, выполненного двумя методами. При сравнении результатов тестирования пациентов была также оценена корреляция полученных результатов по каждому из исследованных аллергенов пыльцы деревьев в отдельности. Результаты определения ранговой корреляции Спирмена представлены в табл. 1. При попарном сравнении количественных результатов на отдельные аллергены деревьев с применением двух тест-систем установлена статистически значимая высокая корреляция между результатами, полученными двумя методами.

Статистически значимая сильная взаимосвязь концентраций sIgE к одному и тому же аллергену, определенных двумя разными методами, отмечена для всех изучаемых аллергенов.

При анализе качественных результатов, полученных двумя методами для отдельных аллергенов, установлено, что для всех аллергенспецифических IgE совпадение качественных результатов наблюдалось не менее чем в 85% случаев (кроме аллергена тополя). Данные представлены на рис. 4.

При анализе количественных результатов, полученных двумя методами для отдельных аллергенов, показано, что наиболее близкие значения концентраций sIgE для двух

Таблица 1

Ранговая корреляция Спирмена между результатами, полученными с помощью двух методов *in vitro*-диагностики аллергии в отношении различных типов аллергенов деревьев

Тест-системы	АллергоИФА-специфические sIgE («Алкор-Био») — ImmunoCAP							
Аллергены	Клен	Ольха	Береза	Лещина	Дуб	Ива	Тополь	Сосна
Коэффициент корреляции	0,965	0,919	0,785	0,938	0,927	0,811	0,901	0,916

Примечание. Уровень значимости $p < 0,01$.

ИММУНОЛОГИЯ

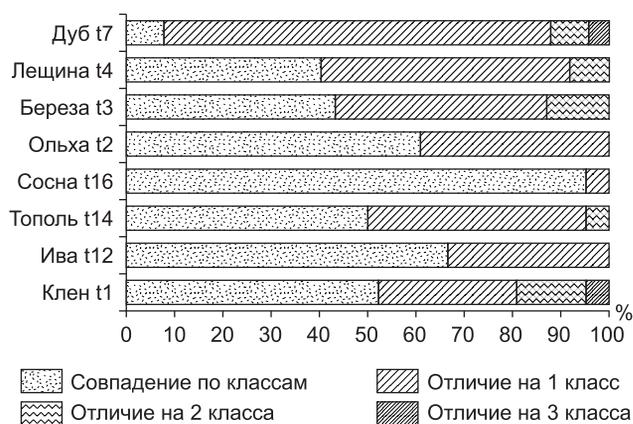


Рис. 5. Соотношение количественных результатов тестирования сывороток пациентов с поллинозом, проведенных с помощью ImmunoCAP и Алкор-Био с учетом классов сенсibilизации.

методик были для аллергенов ольхи, сосны и ивы. Данные представлены на рис. 5.

Сравнение классов сенсibilизации показало, что статистически значимые различия отсутствовали для групп сравнения: концентрации sIgE к аллергенам тополя, сосны, ольхи, березы, лещины, ивы. В то же время статистически значимые отличия выявлены в группах сравнения: концентрации sIgE к аллергенам клена и дуба (критерий Уилкоксона, $p = 0,013$, $p = 0,005$ соответственно).

Также проведено сравнение результатов тестирования, выраженных в единицах концентрации (кЕ/л). Рассчитаны критерии Уилкоксона и оценена вероятность отсутствия различий между изучаемыми выборками (концентрации sIgE определенные с помощью ImmunoCAP и с помощью «Алкор-Био»). Данные представлены в табл. 2.

Представленные данные свидетельствуют о том, что для концентрации sIgE к аллергенам ольхи, березы, лещины, тополя, сосны, ивы отсутствовали статистически значимые различия между группами результатов, полученных с помощью двух рассматриваемых методов (критерий Уилкоксона, $p = 0,01$). В то же время в отношении концентрации IgE к аллергенам клена и дуба показано статистически значимое различие результатов (критерий Уилкоксона, $p = 0,002$ и $p = 0,0005$ соответственно).

Таким образом, сравнение качественных результатов (наличие или отсутствие антител к изучаемым аллергенам), полуколичественных результатов, выраженных в классах сенсibilизации, а также количественных результатов, выраженных в единицах концентрации кЕ/л, показали различную чувствительность тестов к различным аллергенам. Несмотря на сильную корреляцию между сравниваемыми группами аллергенов, совпадение результатов наблюдали для 6 аллергенов из 8 рассматриваемых.

Обсуждение. Хотя показано, что диагностическая эффективность *in vivo*-тестирования при аллергических за-

болеваниях несколько превосходит на сегодняшний момент возможности *in vitro*-диагностики, целый ряд факторов (безопасность, общедоступность и т. д.) делает метод определения концентрации аллергенспецифических IgE наиболее массовым и перспективным для диагностирования аллергических заболеваний [10]. Взаимосвязь развития клинических симптомов аллергии и выявления аллергенспецифических антител, а также зависимость тяжести клинических проявлений от уровней sIgE в крови пациентов продемонстрирована ранее для ряда аллергенов [11, 12].

Тест-систему ImmunoCAP специалисты большинства стран рассматривают в качестве одной из лучших по диагностическим показателям среди остальных рутинных тест-систем определения sIgE у человека [13]. Ее высокая диагностическая точность (специфичность и чувствительность) позволила использовать данную тест-систему в качестве золотого стандарта *in vitro*-диагностики. В то же время наличие на рынке более дешевых тестовых систем, применяемых в том числе в педиатрической практике, требует оценить их сопоставимость.

Известно, что крупные производители реагентов применяют обычно собственные аллергенные препараты, получаемые по оригинальным методикам [14]. В связи с этим выявленное нами несовпадение результатов анализов (5,6% случаев, см. рис. 1), полученных двумя рассматриваемыми тестовыми системами, наиболее вероятно связано с отличиями в аллергенном составе препаратов, используемых производителями для связывания соответствующих IgE-антител. При анализе отдельных видов аллергенов пыльцы деревьев по качественному результату «да—нет» разнонаправленные отличия более чем в 5% случаев были отмечены для относительно второстепенных аллергенов тополя, дуба и клена (см. рис. 3). В то же время для таких важных аллергенов, которые наиболее часто служат причинно-значимыми факторами развития поллиноза или астмы (березы, ольхи и орешника), совпадение качественных результатов, полученных двумя различными тестовыми системами, было почти полным. Различия в методиках получения и очистки нативных аллергенов у производителей разных тест-систем, так же как методические различия тестов, несомненно, накладывают определенные ограничения на возможности объективного сопоставления результатов. В то же время альтернативные методики диагностики *in vivo* обладают еще большей вариабельностью условий постановки и учета [15]. Следовательно, можно констатировать диагностическую значимость двух рассматриваемых методик по данным аллергенам как сопоставимую.

Полуколичественные показатели в виде классов сенсibilизации (см. рис. 2) в 50,7% показали совпадение результатов двух методик, а в 42,2% — относились к соседним классам. Только в 7,1% случаев отличия достигали двух или трех классов. При этом максимальные отличия на три класса были отмечены только для относительно редких аллергенов — дуба и клена (см. рис. 4) либо при значениях IgE, имеющих пороговое клиническое значение.

Суммарные и данные для отдельных пациентов, полученные в исследовании, подтверждают существование отличий результатов двух исследованных методик для ряда аллергенов

Таблица 2

Оценка статистических различий между изучаемыми группами результатов, полученных с помощью двух разных методик

Статистические критерии знаковых рангов Уилкоксона для пар сравнения: «Алкор-Био» — ImmunoCAP, $p < 0,01$								
Аллергены	Клен	Ива	Тополь	Сосна	Ольха	Береза	Лещина	Дуб
Z-статистика	-3,107	-3,296	-1,477	-2,320	-0,597	-0,317	-0,740	-4,373
Асимптотическая значимость (двусторонняя)	0,002	0,100	0,140	0,120	0,551	0,751	0,459	0,0005

(дуб, клен). При этом не отмечено кардинальных расхождений в результатах, полученных двумя методами для исследованных аллергенов других деревьев, вошедших в исследование. Статистический анализ подтвердил хорошую сопоставимость тестов и возможность их взаимозаменяемости в отношении ряда аллергенов.

Заключение. Приведенные результаты определения sIgE к пыльце деревьев показали различную чувствительность тестов к различным аллергенам. В отношении аллергенов ольхи, березы, лещины, тополя, сосны подтверждены совпадения данных, полученных в тест-системе «Алкор-Био», с данными, полученными методом ImmunoCAP. Применение отечественной ИФА тест-системы «Алкор-Био» в этих случаях может служить альтернативой импортным методикам.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения № 14.607.21.0017 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0017).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4—6, 8—11, 13—15)
см. REFERENCES)

1. Балаболкин И.И. *Поллинозы у детей*. М.: Конгресс; 1996.
2. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. *Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
3. Баранов А.А., Хаитов Р.М., ред. *Аллергология и иммунология*. М.: Союз педиатров России; 2010.
7. Кочиш Л.Т. Высокотехнологичная компания «Алкор Био»: современный подход к разработке и производству иммуноферментных тест-систем для аллергодиагностики. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; (4): 33—6.
12. Балаболкин И.И. Пищевая аллергия у детей: современные аспекты патогенеза и подходы к терапии и профилактике. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2013; (3): 36—46.

REFERENCES

1. Balabolkin I.I. Pollinosis in Children [Pollinozy u detey]. Moscow: Kongress; 1996. (in Russian)
2. Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical Immunology and Allergology with Basics of Immunology [Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshchey immunologii] Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)

3. Baranov A.A., Khaitov R.M., eds. *Allergology and Immunology [Allergologiya i immunologiya]*. Moscow: Soyuz peditrov Rossi; 2010. (in Russian)
4. Settupane R.J., Hagi G.W., Settupane G.A. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc.* 1994; 15(1): 21—5.
5. Bousquet J., Gern J.E., Martinez F.D., Anto J.M., Johnson C.C., Holt P.G. et al. Birth cohorts in asthma and allergic diseases: report of a NIAID/NHLBI/MeDALL joint workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 133(6): 1535—46.
6. Hamilton R.G., Williams P.B.; Specific IgE Testing Task Force of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology. Human IgE antibody serology: a primer for the practicing North American allergist/immunologist. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126(1): 33—8.
7. Kochish L.T. The high technology company «Alkor Bio»: a modern approach in the development and production of immunoassays test systems for allergodiagnostic. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2011; (4): 33—6. (in Russian)
8. Wang J., Godbold J.H., Sampson H.A. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121(5): 1219—24.
9. Diaz-Vazquez C., Torregrosa-Bertet M.J., Carvajal-Urueña I., Cano-Garcinuño A., Fos-Escrivà E., García-Gallego A. et al. Accuracy of ImmunoCAP. Rapid in the diagnosis of allergic sensitization in children between 1 and 14 years with recurrent wheezing: the IReNE study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2009; 20(6): 601—9.
10. Pablos I., Wildner S., Asam C., Wallner M., Gadermaier G. Pollen Allergens for Molecular Diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2016; 16(4): 31.
11. Rodríguez-Capote K., Schnabl K.L., Maries O.R., Janzen P., Higgins T.N. Stability of specific IgE antibodies to common food and inhalant allergens. *Clin. Biochem.* 2016; 49(18): 1387—9.
12. Balabolkin I.I. Food allergy in children: modern aspects of pathogenesis and approaches to therapy and prevention. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2013; (3): 36—46. (in Russian)
13. Williams B., Barnes J.H., Szeinbach S.L., Sullivan T.J. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105(6 Pt.1): 1221—30.
14. Goikoetxea M.J., Sanz M.L., García B.E., Mayorga C., Longo N., Gamboa P.M. et al. Recommendations for the use of in vitro methods to detect specific immunoglobulin E: are they comparable? *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2013; 23(7): 448—54.
15. Klimek L., Hoffmann H.J., Renz H., Demoly P., Werfel T., Matricardi P.M. et al. Diagnostic test allergens used for in vivo diagnosis of allergic diseases are at risk: a European Perspective. *Allergy*. 2015; 70(10): 1329—31.

Поступила 02.11.16
Принята к печати 29.11.16

Амосова И.В.¹, Тимошичева Т.А.¹, Сверлова М.В.¹, Бузицкая Ж.В.¹, Егорова А.А.¹, Львов Н.И.²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОКУЛЬТУРАЛЬНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург;

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

Особые условия профессиональной деятельности военнослужащих срочной службы определяют широкое распространение респираторных вирусов среди личного состава Вооруженных Сил. Частое перемешивание воинских коллективов обуславливает занос инфекционных агентов, в том числе аденовирусов (АВ). Известно, что до 60% ОРВИ в новых сформированных коллективах имеют АВ-этиологию. Наиболее часто в таких случаях выделяют серотипы 4 и 7 АВ. Изучены диагностические возможности моноклональных иммунологических тестов непрямого иммунофлуоресцентного (НИФЛ) и микрокультурального иммуноферментного анализа (мКИФА) для диагностики АВ-инфекции. Были исследованы 40 клинических образцов от пациентов с диагнозом ОРВИ, находившихся на лечении с апреля по июль 2014 г. в военно-медицинских организациях. Для исследования методами НИФЛ и мКИФА использовали культуру клеток А-549, зараженную материалами от больных. Оценку репродукции АВ в инфицированной культуре клеток при обоих методах осуществляли с использованием в стадии детекции моноклональных антител к гексону АВ. Наличие АВ было подтверждено при использовании ПЦР в 20 образцах, выделения АВ в культуре клеток в 19 образцах: НИФЛ — в 14 образцах, мКИФА — в 14 образцах. Для определения серотипов АВ проведено выделение ДНК и секвенирование 10 из исследованных образцов, положительных на АВ по результатам ПЦР. Результаты филогенетического анализа по участку гена нити показали принадлежность АВ из всех образцов к серотипу 4 (подгруппа Е). Чувствительность мКИФА и НИФЛ при детекции АВ в культуре клеток, зараженной материалами от больных, в сравнении с ПЦР составила 85 и 87% соответственно, специфичность обоих методов достигала 100%.

Ключевые слова: аденовирус; диагностика; секвенирование.

Для цитирования: Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 230-235. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235>

Amosova I.V.¹, Timoshycheva T.A.¹, Sverlova M.V.¹, Buzitskaya J.V.¹, Egorova A.A.¹, Lvov N.I.²

THE APPLICATION OF MICRO-CULTURAL ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF MODIFIED IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE FOR DIAGNOSTIC OF ADENOVIRUS INFECTION

¹The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, 197376 St. Petersburg, Russia

²The S.M. Kirov бшдшефкн medical academy of Ministry of Defense of Russia, 194044 St. Petersburg, Russia

The particular conditions of professional activities of drafty military personnel determine wide-spread of of respiratory viruses in crew of Armed Forces. The frequent mixing of military staff conditions of carrying of infection agents , including adenoviruses. It is known, that up to 60% of acute respiratory viral disease in newly formed staff have adenovirus etiology. In these cases, the most frequently are isolated serotonins 4 and 7 of adenovirus. The diagnostic possibilities of monoclonal immunologic tests of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic of adenovirus infection are investigated. The analysis was applied to 40 clinical samples from patients with diagnosis of acute respiratory viral disease residing for treatment in military medical organizations during April-June 2014. The culture of cells A-549 infected with materials from patients was used for analysis. The evaluation of reproduction of adenovirus in infected culture of cells using both techniques was implemented by application of monoclonal antibodies to hexon of adenovirus on stage of detection. The availability of adenovirus was proved applying polymerase chain reaction in 20 samples; isolation of cell culture in 19 samples; indirect enzyme-linked immunosorbent assay - in 14 samples; micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay - in 14 samples. For detection of serotypes of adenovirus isolation of DNA and sequencing of 10 of analyzed samples positive for adenovirus according results of polymerase chain reaction were implemented. The results of phylogenetic analysis on site of gene string demonstrated belonging of adenovirus out of all samples to serotype 4 (subgroup E). The sensitivity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay in detection of adenovirus in cell cultures infected with materials from patients, in comparison with polymerase chain reaction, made up to 85% and 87% correspondingly. The specificity of both techniques reached 100%.

Key words: adenovirus; diagnostic; sequencing

For citation: Amosova I.V., Timoshycheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya J.V., Egorova A.A., Lvov N.I. The application of micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay of modified immunofluorescence technique for diagnostic of adenovirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 230-235. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235>

For correspondence: Timoshycheva T.A., junior researcher of the laboratory of biotechnology of diagnostic preparations. e-mail: tatianatim@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.10.2016
Accepted 29.11.2016

Специфическая профилактика гриппозными вакцинами приводит к снижению заболеваемости гриппом. Однако заболеваемость другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) сохраняется на прежнем уровне. Вспышки ОРВИ в организованных коллективах новобранцев, проходящих военную службу по призыву, остаются серьезной проблемой гражданского и военного здравоохранения. Во вновь сформированные коллективы военнослужащих, прибывших из разных регионов страны, происходит периодический занос респираторных вирусов. Характер профессиональной деятельности и условия совместной жизнедеятельности военнослужащих определяют особую восприимчивость к респираторным инфекциям и являются дополнительными факторами риска развития вспышек ОРВИ.

Во время эпидемических вспышек гриппа и других острых респираторных заболеваний (ОРЗ) переболевает более 30% военнослужащих, а сезонные подъемы заболеваемости растягиваются на 3—4 мес, что оказывает отрицательное влияние на поддержание боеспособности Вооруженных Сил (ВС). Помимо вирусов гриппа А и В, значительный уровень заболеваемости обусловлен аденовирусами (АВ) (до 50% всех этиологически расшифрованных ОРЗ) [1, 2]. В целом 80% призывников инфицируются АВ, около 20% из которых нуждаются в госпитализации. Показано, что около 90% госпитализированных больных пневмониями приходится на АВ-инфекцию [3]. По данным литературы, большинство этих заболеваний вызваны АВ 4 типов 4 и 7, реже — 3, 14 и 21 [4].

Типичными клиническими проявлениями АВ-инфекции являются лихорадка, проявления общей инфекционной интоксикации, фарингит, ринит, бронхит, тонзиллит, шейная лимфаденопатия, а также склонность к затяжному и рецидивирующему течению [5]. Высокий уровень заболеваемости личного состава ВС, затяжное и рецидивирующее течение болезни, осложнения в виде АВ и АВ-бактериальных пневмоний (до 18% всех верифицированных случаев АВ-инфекции), в том числе тяжелого течения с летальными исходами, определяют актуальность специфической диагностики с целью своевременного назначения средств этиотропной терапии, иммуно- и экстренной профилактики в очагах таких вспышек.

Проведено исследование материалов от больных ОРВИ АВ-этиологии, находившихся на лечении в ВМО Санкт-Петербурга в период с апреля по июль 2014 г. с целью определения этиологии заболевания у военнослужащих, выделения АВ в клеточной культуре, определения их генотипа, а также оценки эффективности непрямого иммунофлуоресцентного (НИФЛ) и микрокультурального иммуноферментного анализа (мКИФА) для диагностики АВ-инфекции.

Материал и методы. В работе исследованы 40 клинических образцов (мазки из носа) от пациентов, госпитализированных с диагнозом ОРВИ с апреля по июль 2014 г. Наличие генома АВ в 20 образцах было подтверждено ПЦР в реальном времени. Все материалы были получены из лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, где они хранились в транспортной среде при -20°C в течение 3 мес.

Выделение аденовирусов в культуре клеток А-549. Суспензию клеток А-549 в концентрации 100—150 тыс. кл/мл вносили по 1,5 мл в пробирки и помещали в CO_2 -инкубатор при 37°C до формирования клеточного монослоя, после чего ростовую среду удаляли, клетки однократно отмывали ФСБ (рН 7,2—7,4) и вносили материалы от больных из расчета по 0,2 мл каждого из материалов в 2—3 пробирки. Инфицированные культуры помещали в термостат на 30—40 мин (для адсорбции вируса), после чего в них вносили по 0,9—1,5 мл среды. В контрольные культуры добавляли по 1,5 мл среды.

Инфицированные и контрольные культуры инкубировали при 37°C . Состояние монослоя ежедневно контролировали с целью обнаружения признаков цитопатогенного действия (ЦПД) вируса. Для накопления вируса проводили 1—2 пассажа на культуре клеток А-549. Вирусосодержащую культуральную жидкость (ВКЖ) хранили при -70°C .

Выделение ДНК АВ из клинических материалов осуществлялось с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit («Qiagen») согласно инструкции производителя.

ПЦР выполняли с применением праймеров на участок гена нити по методу Kcsy [6]. Амплификацию проводили в термоциклере MJ Mini («BioRad»).

Анализ продуктов амплификации фрагментов генома АВ выполняли посредством гель-электрофореза в 1,7% агарозном геле.

Секвенирование проводили методом Сенгера с помощью коммерческого набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems»). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для ПЦР. Реакцию секвенирования выполняли в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler («BioRad»). Нуклеотидные последовательности определяли с помощью 4-канальной автоматизированной системы капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов с помощью ABI 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Капиллярный электрофорез проводили в полимере ABI 3130 POP-7.

Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ. Сборку, хранение и обработку секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе Vector NTI 10 Advance («Invitrogen»). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W [7]. Филогенетические деревья строили с помощью программ MEGA 6.

Выявление АВ-антигенов в клинических образцах методом мКИФА. Суспензию клеток А-549 в концентрации 100—150 тыс. кл/мл вносили по 150 мкл в лунки культурального планшета Nunc и помещали в CO_2 -инкубатор при 37°C до формирования клеточного монослоя, после чего ростовую среду удаляли, клетки однократно отмывали по 200 мкл ФСБ (рН 7,2—7,4) и вносили по 150 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных в 10 и 100 раз поддерживающей средой.

Через 24—48 ч инкубации в CO_2 -инкубаторе при 37°C зараженные клеточные культуры исследовали под световым микроскопом. В случае обнаружения слабого ЦПД, выражающегося в виде появления круглых клеток и незначительного разрежения монослоя, из планшета удаляли среду и фиксировали клетки в течение 10 мин 80% охлажденным ацетоном. Наличие АВ-антигенов определяли в реакции с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител (МКА) к гексону аденовирусов (ПХК-МКА-АВ, получен в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). ПХК-МКА-АВ инкубировали с инфицированными клетками в течение 45 мин при 37°C . Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси. После остановки реакции с помощью 2н H_2SO_4 измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Отрицательным контролем служила незараженная культура клеток А-549, положительным — культура, зараженная АВ типа 6, штамм Tonsill-99 (получен из музея ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). Положительными по содержанию АВ-антигена были признаны пробы, ОП450 которых превышала в 2 и более раз ОП450 отрицательного контроля.

Выявление АВ-антигенов в клинических образцах методом НИФЛ. В качестве тест-объектов (ТО) использовали клеточные культуры А-549, выращенные на поверхности

Таблица 1

Коды доступа для полногеномных нуклеотидных последовательностей АВ человека различных типов

Human adenovirus A	9	AJ854486	39	JN226760	
12	AC_000005	10	JN226746	42	JN226761
18	GU191019	13	JN226747	43	JN226761
31	AM749299	15	AB562586	44	JN226763
Human adenovirus B	17	AC_000006	45	JN226764	
3	NC_011203	19	EF121005	46	AY875648
7	AC_000018	20	JN226749	47	JN226757
16	AY601636	22	FJ404771	48	EF153473
21	AY601633	23	JN226750	49	DQ393829
11	AY163756	24	JN226751	51	JN226765
14	AY803294	25	JN226752	53	FJ169625
34	AY737797	26	EF153474	54	AB333801
35	AY128640	27	JN226753		Human adenovirus E
50	AY737798	28	FJ824826	4	AY487947
Human adenovirus C	29	AB562587			Human adenovirus F
1	AF534906	30	JN226755	40	L19443
2	ADRCG	32	JN226756	41	DQ315364
5	AC_000008	33	JN226758		Human adenovirus G
6	FJ349096	36	GQ384080	52	DQ923122
Human adenovirus D	37	DQ900900			Вак- цинный штамм аденови- руса серо- типа 7
8	AB448767	38	JN226759		AY594256

покровных стекол в пробирках и зараженные ВКЖ положительными по результатам выделения на культуре клеток клинических образцов. Через 24—48 ч инкубации при 37°C зараженные клеточные культуры исследовали под световым микроскопом, в случае обнаружения слабого ЦПД полоски покровных стекол извлекали из пробирок, высушивали при комнатной температуре и фиксировали в 80% охлажденном ацетоне. Далее ТО инкубировали с МКА к гексону АВ (получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России) в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре, дважды промывали ФСБ по 10 мин, споласкивали дистил-

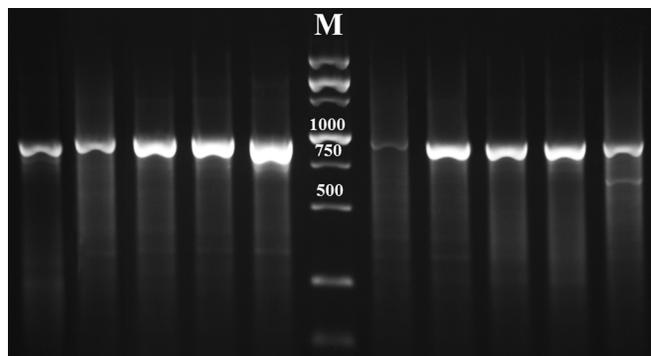


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР по Ксу [6]. Размер продукта 960 пар нуклеотидов соответствует АВ подгруппы E. М — маркеры.

лированной водой и высушивали. Связавшиеся антитела выявляли с помощью ФИТЦ-конъюгата антимышиных антител («Sigma»). После повторной инкубации в течение 30 мин при тех же условиях ТО анализировали под люминесцентным микроскопом Axiovert («Karl Zeiss»).

Результаты. Методом ПЦР в реальном времени было исследовано 40 клинических образцов (мазки из носа) на всю группу наиболее значимых возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа типов А и В, парагриппа типов 1, 2 и 3, АВ, риновирус и бокавирус. Для дальнейших исследований были отобраны 20 образцов, положительных на АВ в 7—15 циклах. При выделении в культуре клеток А-549 АВ были обнаружены в 19 образцах.

Из образцов, положительных по результатам ПЦР в реальном времени и выделения вируса в культуре клеток, были отобраны 10 образцов для выделения ДНК и секвенирования. С целью определения серотипов полученных образцов были амплифицированы фрагменты гена нити. Продукты амплификации детектировали посредством электрофореза в агарозном геле (рис. 1).

Оценив размеры продуктов ПЦР, можно предположить, что все исследованные образцы содержали АВ типа E, т. е. генотип 4 АВ. Для подтверждения этого вирусная ДНК была выделена и секвенирована с прямого и обратного праймеров. Секвенированные последовательности были обработаны и выровнены с последовательностями участков фибриллы референс-штаммов, депонированных из базы данных GenBank (коды доступа указаны в табл. 1).

Филогенетическое дерево было построено с использованием двухпараметрической модели Кимуры [8] методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) [9]. Результаты филогенетического анализа по участку гена нити подтвердили принадлежность АВ из всех образцов к подгруппе E, и их серотип определен как 4. Филогенетическое дерево по фрагменту гена нити представлено на рис. 2.

Выделенные образцы секвенированы в лаборатории молекулярной вирусологии и геной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в ходе исследования, остальные последовательности получены из базы данных GenBank.

При исследовании клинических образцов методом мКИФА клеточная культура А-549 была заражена материалами от больных, взятыми в разведениях 10^{-1} и 10^{-2} . Детекцию АВ антигена осуществляли с помощью ПХК-МКА-АВ.

По результатам анализа положительными на АВ-антиген были признаны 14 материалов, ОП 450 которых отличалась от контрольной пробы более чем в 2 раза. При этом положительные пробы можно разделить на 3 группы: к первой группе относились 7 образцов, положительных по результатам мКИФА в обоих разведениях. Ко второй группе отнесены 4 материала, давшие положительный сигнал в разведении 10^{-1} , но оказавшиеся отрицательными в разведении 10^{-2} , что может быть объяснено недостаточным количеством возбудителя в клиническом образце, которым инфицировали клеточную культуру. К третьей группе отнесли 3 материала, которые были отрицательными при разведении 10^{-1} , но положительными в разведении 10^{-2} . В этих образцах наблюдалось ярко выраженное ЦПД (что, вероятно, можно объяснить значительным количеством возбудителя в исходном материале), которое привело к элиминации антигена во время удаления ростовой среды из планшета.

Для исследования методом нИФЛ клеточные культуры А-549, выращенные на поверхности покровных стекол в пробирках, были заражены 19 ПЦР-положительными и 20 отрицательными материалами (ВКЖ, полученная после 2 пассажей в культуре клеток). Через 48 ч инкубации при 37°C ТО извлекали из пробирок, высушивали при комнатной температуре и фиксировали 80% охлажденным ацетонем.

Таблица 2

Результаты исследования клинических образцов с использованием различных методов диагностики

Количество проб	ПЦР в реальном времени	Выделение АВ в культуре клеток	мКИФА	НИФЛ
Положительных по результатам теста	20	19	14	14
Отрицательных по результатам теста	20	20	26	26

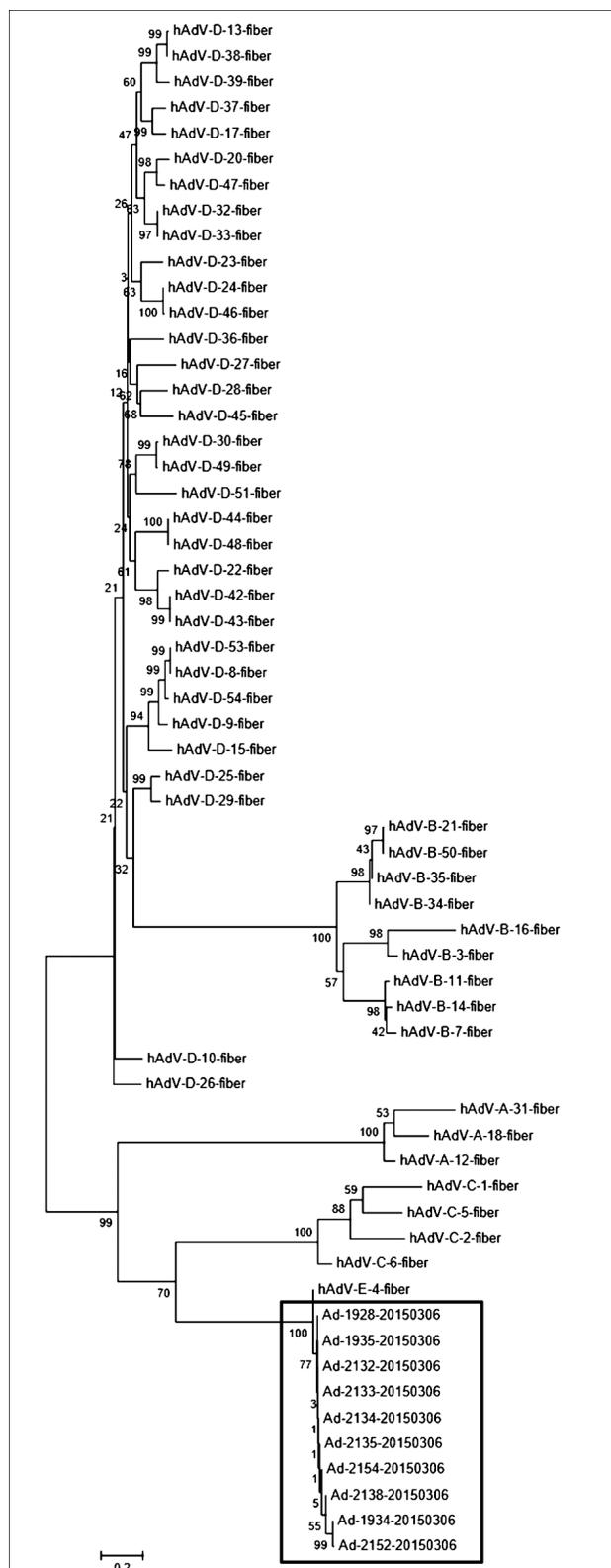


Рис. 2. Филогенетическое дерево АД, построенное на основании нуклеотидных последовательностей области гена, кодирующего нить.

Выделенные образцы секвенированы в лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в ходе исследования, остальные последовательности получены из базы данных GenBank.

В первой стадии анализа исследуемые образцы инкубировали со специфическими МКА к гексону АВ, во второй осуществляли детекцию связавшихся с антигеном МКА при помощи ФИТЦ-конъюгата антивидовых антител («Sigma»). Окрашенные ТО анализировали под люминесцентным микроскопом и оценивали специфичность и яркость флуоресценции. В результате исследования положительными на АВ-антиген были признаны 14 из 19 ПЦР-положительных образцов, яркость и интенсивность флуоресценции при этом была достаточно отчетливой и варьировала в зависимости от степени поражения клеток АВ, в отрицательных образцах флуоресценция не наблюдалась (рис. 3).

Таким образом, из 40 материалов, поступивших в лабораторию для исследования, в 20 по результатам ПЦР в реальном времени были обнаружены АВ. Из 19 материалов АВ были выделены в культуре клеток А-549. Результаты ПЦР в реальном времени и выделения АВ в культуре клеток совпали в 97,5% случаев. При исследовании в мКИФА и НИФЛ АВ были обнаружены в 14 материалах. Однако 2 материала были положительными в мКИФА и отрицательными в НИФЛ, 4 материала отрицательными в мКИФА и положительными в НИФЛ, 2 материала отрицательными при использовании обоих методов, 1 положительный в мКИФА материал не представлялся в НИФЛ. Результаты исследования клинических образцов с использованием различных методов диагностики представлены в табл. 2.

Совпадение результатов мКИФА и НИФЛ с ПЦР в реальном времени составило 85 и 87% соответственно, чувствительность и специфичность мКИФА составила 70 и 100%, НИФЛ — 74 и 100% соответственно (табл. 3).

Обсуждение. АВ человека принадлежит к числу патогенных возбудителей респираторных заболеваний с поражением не только верхних, но и нижних отделов дыхательного тракта в виде бронхитов, бронхиолитов и пневмоний [5]. В ВС в эпидемический сезон более 30% военнослужащих переболевает ОРВИ, из них на долю аденовирусной инфекции приходится до 50% [1, 2].

Для лабораторной диагностики респираторных вирус-

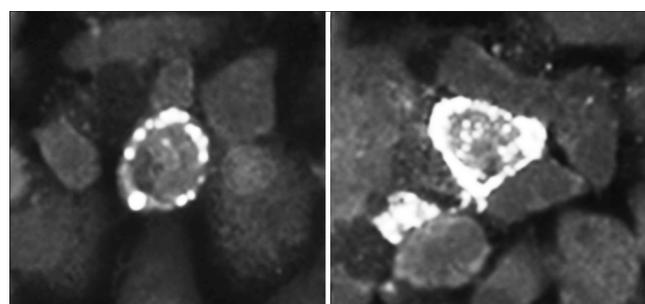


Рис. 3. Специфическое свечение в культуре клеток А-549, зараженной материалами от больных. Окрашено ФИТЦ, ув. 1000.

Таблица 3

Совпадение и расхождение результатов различных тестов в сравнении с ПЦР

Метод исследования	Количество проб	Результат анализа	ПЦР		Чувствительность, %	Специфичность, %	Общее совпадение, %
			+	—			
Выделение вируса	39	+	19	0	100	100	97,5
		—	0	20			
мКИФА	40	+	14	0	70	100	85
		—	6	20			
нИФЛ	39	+	14	0	74	100	87
		—	5	20			

ных инфекций используют следующие методы: непосредственное выявление антигена в клиническом образце (ИФА, ИФЛ, выделение в культуре клеток), молекулярные (ПЦР) и серологические методы. По данным литературы, чувствительность ИФА составляет 50—70%, ИФЛ — 55—75%, культурального исследования — 60—80%, а ПЦР — 90—100%.

Материалы от больных ОРВИ были исследованы на наличие АВ-антигена методами выделения вирусов в культуре клеток, ПЦР в реальном времени, мКИФА и нИФЛ. Выделение вируса в культуре клеток является трудоемким, дорогостоящим процессом, продолжительность анализа может занимать до 2 нед, результаты анализа подвержены влиянию многих факторов (срок взятия материала, содержание в нем вируса, чувствительность клеточных культур, состав сред и другие). Метод ПЦР в реальном времени при высоких показателях чувствительности и специфичности и достаточно коротком времени анализа, не всегда может быть проведен в медицинском учреждении, где находится пациент, материалы требуется доставлять в специализированные лаборатории, что может увеличивать срок получения результатов на несколько дней. Методы ИФА и ИФЛ широко используются в клинико-лабораторной практике, так как имеют показатели чувствительности и специфичности, сопоставимые с молекулярными методами. Использование модификации этих методов (детекция АВ-антигена в культуре клеток, зараженной материалами от больных) позволяет хранить, транспортировать образцы перед исследованием, результаты можно получить через 1—2 дня после заражения культуры клеток, кроме того, существенно облегчается интерпретация результатов нИФЛ. Общее совпадение результатов нашего исследования с данными ПЦР составило для мКИФА и нИФЛ 85 и 87% соответственно. Использование высокоспецифичных МКА позволило добиться высоких показателей специфичности обоих методов (см. табл. 3). С целью определения целесообразности выделения АВ в культуре клеток мКИФА может быть рекомендован для первичного скрининга материалов от больных.

Систематическое серотипирование АВ, циркулирующих на территории России, в настоящее время не проводится. Однако отдельные исследования посвящены этой проблеме. По данным С.Б. Яцышиной и соавт. [11], в период с 2010 по 2014 г. среди населения в г. Москве циркулировали АВ серотипов 1, 2, 3, 4, 6 и 7. АВ серотипа 7 явился причиной четырех вспышек среди военнослужащих. В США АВ серотипов 4 и 7 также являются основными этиологическими агентами, вызывающими ОРЗ среди военнослужащих [12]. Филогенетический анализ АВ, вызвавших подъем заболеваемости ОРВИ среди военнослужащих гарнизона г. Санкт-Петербурга,

также показал принадлежность этих АВ к подгруппе E, и их серотип определен как 4.

В отличие от других ОРВИ (гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальной инфекции) манифестные формы АВ-инфекции характеризуется полиморфизмом проявлений, что делает ее одной из самых интересных для изучения и в то же время одной из самых сложных для клинической диагностики. Применение быстрых, чувствительных и специфичных тестов, сконструированных на основе МКА, является актуальным для рутинной клинической лабораторной практики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 4, 6—10, 12 см. REFERENCES)

1. Львов Н.И., Писарева М.М., Мальцев О.В., Бузитская Ж.В., Афанасьева В.С., Михайлова М.А. и др. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013—2014 гг. *Журнал инфектологии*. 2014; 6(3): 62—70.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В. Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН об итогах эпидемического сезона 2009—2010 гг. по гриппу и ОРВИ (с 40-й недели 2009 г. по 22 неделю 2010 г.) в мире и в России. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(1): 44—8.
5. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., ред. Руководство по инфекционным болезням. В 2-х книгах. Книга 2. 4-е издание. СПб.: ООО «Издательство Фолиант»; 2011: 70—89.
11. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В. и др. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004—2014 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 50—7.

REFERENCES

1. L'vov N.I., Pisareva M.M., Mal'tsev O.V., Buzitskaya Zh.V., Afanas'eva V.S., Mikhaylova M.A. et al. The features of ARVD etiological structure in different age and professional population groups in Saint-Petersburg during 2013—2014 epidemic season. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(3): 62—70. (in Russian)
2. Zdanov K.V., Lvov N.I., Maltsev O.V., Peredelsky E.V., Pisareva M.M. Main Aetiological Features of Acute Respiratory Viral Diseases in Young People of Draft Age and Conscripts During the 2013—2014 Epidemic Season. *International Review of the Armed Forces Medical Services*. 2016; 89(2): 58—63.
3. L'vov D.K., Burtseva E.I., Lavrishcheva V.V. Information of the Center for Ecology and Epidemiology of Influenza, D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, on the results of the 2009—2010 influenza and acute respiratory viral infection epidemic season (at week 40 of 2009 to week 22 of 2010) in the world and Russia. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(1): 44—8. (in Russian)
4. Lin Y.C., Lu P.L., Lin K.H., Chu P.Y., Wang C.F., Lin J.H. et al. Molecular Epidemiology and Phylogenetic Analysis of Human Adenovirus Caused an Outbreak in Taiwan during 2011. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127377.
5. Lobzin Yu.V., Zhdanov K.V., eds. *Communicable Diseases Manual*. In 2 books. Book 2 [Rukovodstvo po infektsionnym boleznyam. V 2-kh knigakh. Kniga 2]. 4th ed. St.Petersburg: ООО «Izdatel'stvo Foliant»; 2011: 70—89. (in Russian)
6. Xu W., McDonough M.C., Erdman D.D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(11): 4114—20.
7. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving

- the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673—80.
8. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111—20.
 9. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406—25.
 10. Pavia A.T. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52(4): S284—9.
 11. Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorob'eva N.S., Valdokhina A.V., El'kina M.A., Gorelov A.V. et al. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infections in Moscow in 2004—2014 years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2015; (5): 50—7. (in Russian)
 12. Kuschner R.A., Russell K.L., Abuja M., Bauer K.M., Faix D.J., Hait H. et al. A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine.* 2013; 31(28): 2963—71.

Поступила 12.10.16
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155.392.2-036.12-092:612.017.11-078.33

Жевак Т.Н.¹, Чеснокова Н.П.², Шелехова Т.В.², Иванова С.Н.², Шутова А.С.¹

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ И РОСТИНГИБИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

¹ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва;

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов

В работе оценен баланс ростстимулирующих и ростингибирующих факторов в сыворотке крови у больных с различными стадиями В-клеточного хронического лимфолейкоза, находящихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии Саратова с 2007 по 2016 г. Показатели содержания в сыворотке крови VEGF165, PDGF-AB, pRb, p53 и p73 определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Характерной особенностью В-клеточного хронического лимфолейкоза стало стабильно высокое содержание ростстимулирующих цитокинов (VEGF165, PDGF-AB) в динамике развития заболевания, что позволило сделать вывод об их важной роли в механизмах онкогенной трансформации и стимуляции пролиферативной активности неопластических клеток на различных стадиях патологии.

В то же время нарушение антипролиферативных сигналов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе характеризовалось одномоментным снижением контроля клеточного цикла со стороны нескольких механизмов регуляции перехода G₁-фазы в S-фазу, обусловленных низким уровнем ингибиторов циклинзависимых киназ (p53, p73) и недостаточной экспрессией регулятора клеточного цикла белка pRb.

Ключевые слова: В-клеточный хронический лимфолейкоз; пролиферация; апоптоз.

Для цитирования: Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Иванова С.Н., Шутова А.С. Закономерности изменения содержания в сыворотке крови ростстимулирующих и ростингибирующих факторов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе и их диагностическое значение. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 235-239. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-235-239>

Zhevak T.N.¹, Chesnokova N.P.², Shelekhova T.V.², Ivanova S.N.², Shutova A.S.¹

THE PATTERNS OF ALTERATION OF CONTENT OF GROWTH-STIMULATING AND GROWTH-INHIBITING FACTORS IN BLOOD SERUM UNDER B-CELL CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA AND THEIR DIAGNOSTIC VALUE

¹The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992 Moscow, Russia

²The V.I. Razumovskii Saratovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 410012 Saratov, Russia

The article evaluates balance of growth-stimulating and growth-inhibiting factors in blood serum of patients with different stages of B-cell chronic lymphatic leukemia residing on examination and hospital treatment in Saratov clinic of occupational pathology and hematology in 2007-2016. The indices of content of VEGF165, PDGF-AB, pRb, p53 and p73 in blood serum was detected using solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. The specific characteristic of B-cell chronic lymphatic leukemia became stably higher content of growth-stimulating cytokines of development of disease that permitted to conclude about (VEGF165, PDGF-AB) in dynamics of development of disease that permitted to conclude about their important role in mechanisms of oncogene transformation and stimulation of proliferation activity of neoplastic cells at various stages of pathology.

At the same time, disturbance of anti-proliferation signals under B-cell chronic lymphatic leukemia was characterized by single-at-once decreasing of controlling cell cycle of several mechanisms of regulation of changing G₁-phase to S-phase conditioned by low level of inhibitors of cyclin-dependent kinases (p53 and p73) and inadequate expression of regulator of cellular cycle of protein pRb.

Key words: B-cell chronic lymphatic leukemia; proliferation; apoptosis.

For citation: Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V., Ivanova S.N., Shutova A.S. The patterns of alteration of content of growth-stimulating and growth-inhibiting factors in blood serum under β -cell chronic lymphatic leukemia and their diagnostic value. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 235-239. (in Russ.)*. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-235-239>

For correspondence: Zhevak T.N., associate professor of the chair of pathophysiology of the medical faculty.
e-mail: zhevakt@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.12.2016
Accepted 15.01.2017

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — самый частый вид лейкоза среди взрослого населения; заболеваемость указанной патологией колеблется в пределах 25—30% всех лейкозов [1—3], а по некоторым данным, достигает 40% [4]. Медиана возраста составляет 65—69 лет [5], однако 30% всех случаев лейкоза приходится на возрастной промежуток 45—64 года [3]. ХЛЛ — лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся клональной пролиферацией В-лимфоцитов с иммунофенотипом CD19⁺, CD5⁺, CD23^{bright or intermed}, CD79b^{dim}, CD20^{dim}, CD22^{dim} и sIg^{dim} и рестрикцией легких цепей иммуноглобулинов (к или λ); пороговое количество зрелых опухолевых лимфоцитов в периферической крови при ХЛЛ равно $5 \cdot 10^9/\text{л}$, в костном мозге — 30% [4, 6, 7].

Достигнуты большие успехи в развитии онкогенетики, сформированы четкие представления об этиологических факторах онкогенной трансформации клеток и молекулярно-клеточных механизмах опухолевой прогрессии при неоплазиях различной локализации. Известно, что канцерогены представляют собой гетерогенную группу физических, химических и биологических факторов, воздействующих на геном клетки или вызывающих эпигенетические механизмы индукции канцерогенеза [8, 9]. Установлено, что в основе онкогенной трансформации клеток различной морфофункциональной организации в громадном большинстве случаев лежит дерепрессия протоонкогенов с последующей активацией синтеза мембранных цитоплазматических и ядерных онкобелков, имитирующих разнообразие факторы роста и обеспечивающих аутокринную стимуляцию пролиферации клеток. Очевидна также важная роль ингибирования супрессорных генов и генов апоптоза, которое приводит к нарушению элиминации малигнизированных клеток на этапе онкогенной трансформации [10]. Однако, как это ни парадоксально звучит, остаются в значительной мере не установленными этиологические факторы и факторы роста, инициирующие опухолевую трансформацию при В-ХЛЛ и развитие последующих стадий промоции и опухолевой прогрессии. В ряде наблюдений имеются указания на важную роль наследственной предрасположенности и/или многократной антигенной стимуляции лимфоидных клеток, в частности бактериальных антигенов и аутоантигенов, образованных в процессе апоптоза, как инициирующих факторов малигнизации опухолевых клеток при В-ХЛЛ [2, 3, 11].

На поздних стадиях В-ХЛЛ лейкоэмический клон неоднороден, этому способствует абберрантная дифференцировка лейкоэмических стволовых клеток, а также постоянный мутагенез и эпигенетические изменения [12]. При В-ХЛЛ установлен ряд мутаций, возникающих в процессе опухолевой прогрессии. Между тем не обнаружено специфической мутации, инициирующей онкогенную трансформацию клеток [3]. Как известно, в результате мутаций могут изменяться регуляция клеточного цикла и соответственно пролиферативная активность неопластических клеток, а также их реакция на ростстимулирующие, ростингибирующие, про- и антиапоптотические влияния [10]. Изменения характера и ансамбля фенотипических проявлений мутаций и связанных с ними

локальных и системных расстройств при В-ХЛЛ остаются недостаточно изученными [13]. Установление динамики изменений аутокринных и паракринных функциональных и метаболических влияний в значительной степени расширит возможности диагностики и прогнозирования его течения.

Цель исследования — расширить современные представления о молекулярно-клеточных механизмах опухолевой прогрессии на различных стадиях В-ХЛЛ на основе мониторинга показателей содержания в крови ростстимулирующих (VEGF165, PDGF-AB), и ростингибирующих (pRb, p53, p73) факторов, оказывающих влияние на лимфоидную систему.

Материал и методы. В группы наблюдения были включены пациенты ($n = 97$, 49 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 48 до 85 лет, находившиеся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии (Саратов) с 2011 по 2016 г. Для решения поставленных в работе цели и задач были сформированы 3 группы пациентов в соответствии с общепринятой классификацией, основанной на особенностях клинических проявлений патологии (0—I, II и III—IV стадии В-ХЛЛ, по классификации Rai K.R., 1975). 1-я группа наблюдения включала пациентов с 0—I стадиями патологии, 2-я группа — со II стадией, 3-я группа — с III—IV стадиями. В группу контроля вошли 30 доноров без клинических проявлений патологии.

Для верификации диагноза и распределения больных по группам наблюдения использованы следующие методы. Клеточный состав периферической крови определяли с помощью гематологического автоматического анализатора Micros-60 (ABX, Франция). Иммунофенотип В-лимфоцитов устанавливали на проточном цитометре Facs-Calibur (BD, США, 2006). Степень выраженности пролиферации периферической лимфоидной ткани оценивали при помощи компьютерной томографии групп лимфатических узлов различной локализации, а также паго- и спленомегалии.

Показатели содержания в крови факторов роста (VEGF165, PDGF-AB), регулятора клеточного цикла pRb, проапоптотических факторов (p53, p73) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием иммуноферментных тест-систем («Вектор-Бест», Санкт-Петербург) на иммуноферментном анализаторе «MD-600» фирмы Meredith Diagnostics (Англия, 2011). Детекция вышеуказанных показателей проведена в сыворотке крови пациентов В-ХЛЛ на различных стадиях заболевания однократно до применения комплексной полихимиотерапии.

Математическая обработка данных выполнена с применением современных статистических прикладных программ Microsoft Office: пакеты Excel и Microsoft Graf, Statistica 6.0 (Stat Soft Inc.). Данные в тексте представлены в виде медиан с указанием интерквартильного диапазона (25—75-й процентиля). Для межгруппового сравнения использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни, точный Z-критерий Фишера и показатель достоверности p ; оценку различий проводили по общепринятому порогу значимости ($p \leq 0,05$).

Результаты. Первым этапом исследования было определение уровня факторов роста VEGF165 и PDGF-AB в сыво-

Характер изменения цитокинового профиля крови и уровня продукции белков, регулирующих клеточный цикл и апоптоз, в группе контроля и у больных на различных стадиях В-ХЛЛ

Показатель	Группы			
	Контрольная	1-я (0—I стадии)	2-я (II стадия)	3-я (III—IV стадии)
VEGF165, pg/ml	5,45 (4,67; 5,93)	57,22 (46,12; 75,21) $Z = -6,41;$ $p < 0,000001$	64,43 (51,90; 68,65) $Z = -6,81;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = -0,357;$ $p_1 = 0,720483$	63,005 (54,77; 67,69) $Z = -6,86;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 0,067;$ $p_1 = 0,946369;$ $Z_2 = 0,601;$ $p_2 = 0,547$
PDGF-AB, pg/ml	1,41 (1,23; 1,68)	16,40 (14,90; 21,30) $Z = -6,68;$ $p < 0,000001$	19,60 (16,70; 22,60) $Z = -6,65;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = -1,28;$ $p_1 = 0,200592$	19,45 (17,10; 22,10) $Z = 6,86;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = -1,41;$ $p_1 = 0,159759;$ $Z_2 = 0,02;$ $p_2 = 0,984991$
pRb, ng/ml	6,08 (5,81; 6,91)	1,945 (1,69; 2,49) $Z = 6,65;$ $p < 0,000001$	1,73 (1,48; 1,90) $Z = 6,81;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 2,61;$ $p_1 = 0,009110$	1,69 (1,39; 1,87) $Z = 6,86;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 3,01;$ $p_1 = 0,00264;$ $Z_2 = 0,66;$ $p_2 = 0,506253$
p53, E/ml	1,86 (1,71; 1,93)	1,165 (0,842; 1,34) $Z = 5,68;$ $p < 0,000001$	0,82 (0,55; 1,14) $Z = 6,74;$ $p < 0,000001;$ $p_1 = 0,000766$	0,667 (0,42; 0,94) $Z = 6,70;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 3,86;$ $p_1 = 0,000113;$ $Z_2 = 0,78;$ $p_2 = 0,433143$
p73, mlU/ml	1,725 (1,56; 1,85)	1,265 (0,78; 1,52) $Z = 4,47;$ $p = 0,000008$	1,11 (0,697; 1,18) $Z = 6,34;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 1,95;$ $p_1 = 0,050677$	1,015 (0,61; 1,44) $Z = 5,73;$ $p < 0,000001;$ $Z_1 = 1,33;$ $p_1 = 0,182897;$ $Z_2 = -0,38;$ $p_2 = 0,706741$

Примечание. p, Z — по сравнению с показателями группы контроля; p_1, Z_1 — по сравнению с показателями 1-й группы наблюдения; p_2, Z_2 — по сравнению с показателями 2-й группы наблюдения.

ротке крови пациентов с 0—I стадией В-ХЛЛ, поскольку указанные факторы служат наиболее мощными стимуляторами размножения для большинства типов клеток, в том числе и гемопозитических [9, 13].

Как оказалось, на 0—I стадии В-ХЛЛ уровень VEGF165 значительно превысил аналогичный показатель контрольной группы наблюдения (см. таблицу). Содержание PDGF-AB в сыворотке крови на 0—I стадии патологии также было увеличенным по сравнению с соответствующим показателем группы контроля.

При последующем динамическом наблюдении за этими показателями был выявлен стабильно высокий уровень этих белков в крови у пациентов 2-й и 3-й группы наблюдения (см. таблицу).

Следующим этапом исследования стало выявление роли в патогенезе В-ХЛЛ ряда белков крови, обладающих полиморфизмом биологических эффектов и, в частности, влиянием на баланс пролиферативной активности и процессов апоптоза в лимфоидной ткани. Определение уровня белка pRb в сыворотке крови пациентов с В-ХЛЛ

на различных стадиях заболевания позволило установить следующие факты. Для 0—I стадии опухолевого процесса при В-ХЛЛ характерно снижение содержания белка pRb в сыворотке крови. Уровень этого фактора в сыворотке крови у больных 2-й группы наблюдения прогрессирующе снижался, отличаясь от контрольных цифр и значения изучаемого показателя на 0—I стадии патологии. В 3-й группе наблюдения содержание белка pRb оставалось стабильно низким (см. таблицу).

Определение уровня проапоптотических белков p53 и p73 в сыворотке крови пациентов с 0—I стадией В-ХЛЛ, проведенное далее, позволило обнаружить снижение их продукции по сравнению с таковыми показателями контрольной группы наблюдения (см. таблицу). Как оказалось в последующих наблюдениях, уровень проапоптотического фактора p53 в сыворотке крови у больных 2-й группы наблюдения прогрессирующе снижался, отличаясь от контрольных цифр и значения аналогичного показателя на 0—I стадии заболевания. Содержание белка p73 у этих больных было достоверно ниже контрольного значения, но не отличалось от такового 0—I стадии заболевания. Показатель p53 у пациентов 3-й группы наблюдения был по-прежнему сниженным по сравнению с показателями группы контроля и пациентов с 0—I стадией заболевания. Уровень экспрессии белка p73 был стабильно низким (см. таблицу).

Обсуждение. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что резкое нарастание ростстимулирующих цитокинов (VEGF165 и PDGF-AB) у пациентов с начальными стадиями В-ХЛЛ, безусловно, играет важную роль в механизмах малигнизации клеток и инициации В-ХЛЛ. Прогрессирующее развитие заболевания у пациентов 2-й и 3-й групп наблюдения сочетается со стабильно высоким уровнем этих белков, необходимым для поддержания опухолевой прогрессии при указанной патологии.

Касаясь биологической значимости выявленного нами увеличения содержания в крови факторов роста, остановимся на анализе следующих данных литературы. Известно, что указанные цитокины, воздействуя на рецепторные тирозинкиназы, могут активировать несколько путей сигнальной трансдукции в клетках, в частности MAP (Mitogen Activated Protein)-киназные каскады. При этом повышается активность циклинзависимых киназ, инициируются синтез ДНК и деление клеток. Другой путь передачи митогенных сигналов, используемый факторами роста, — Jak-STAT, в то же время возможна и взаиморегуляция сигнальных путей [10, 12, 14].

Выявленный факт экспрессии факторов роста VEGF165, PDGF-AB уже на I стадии заболевания свидетельствует не только об усилении стимулирующих влияний на пролиферативную активность клеток неопластического клона, высокочувствительных к ростстимулирующим воздействиям, но и на процессы ангиогенеза [10]. Что касается лейкозов, то в конце 90-х годов прошлого столетия были получены данные, подтверждающие значение неоангиогенеза в их патогенезе: в костном мозге больных лейкозами была обнаружена высокая плотность новых образованных сосудов. Как известно, пролиферирующие эндотелиальные клетки могут быть и источником различных факторов роста, в частности VEGF [10, 12].

Касаясь патогенетической роли выявленного нами феномена резкого снижения содержания белка pRb, отметим, что активация циклинзависимых киназ ростовыми факторами происходит путем соединения их с белками — циклинами, описано 9 циклинзависимых киназ (серин-треониновых киназ) и 15 типов циклинов (A, B, D, E и др.). Переходу клеток из фазы G₁ в фазу S способствует образование комплексов циклина D (1—3) и циклина E с соответствующими ци-

клинзависимыми киназами (CDK4/6 и CDK2). Кроме того, в конце G₁ фазы под влиянием активированного комплекса циклин D/CDK4/6 происходит гиперфосфорилирование pRb, что сопровождается высвобождением факторов E2F, которые связываются с определенными генами и запускают синтез ДНК. Однако при отсутствии активирующих влияний pRb, будучи так называемым rocket-протеином (наряду с p130 и p107), прочно удерживает в гипофосфорилированном состоянии транскрипционный фактор E2F, выполняя тем самым супрессорную роль. pRb может также связываться с промоторами E2F-чувствительных генов, блокируя их; он может способствовать моделированию структуры хроматина, рекрутируя соответствующие факторы. Нефосфорилированная форма pRb в комплексе с транскрипционным фактором E2F индуцирует апоптоз. При фосфорилировании и потере транскрипционного фактора pRb превращается в супрессор апоптоза, и такую роль играет до стадии митоза, когда в анафазе дефосфорилируется и вновь осуществляет проапоптотическую функцию [10, 12].

Малое количество названного фактора сопровождается соответственно и уменьшением его супрессорной функции, что, согласно литературным данным, может привести к высвобождению E2F-транскрипционных факторов, увеличению пролиферативной активности клеток, в первую очередь опухолевых [12].

Говоря о биологических эффектах белков p53 и p73, обратим внимание на то, что доминирующей функцией белка p53 служит регулирующее влияние на образование белка p21, относящегося к семье KIP/CIP ингибиторов циклинзависимых киназ и способного арестовывать клетки в G₁-фазе митоза. Кроме того, p53 регулирует активность систем репарации поврежденной ДНК и индуцирует апоптоз при возникновении нерепарируемых повреждений. Уменьшение синтеза и дисфункция белка p53 в результате различных генетических нарушений приводят к накоплению повреждений ДНК, передаче их дочерним клеткам и способствуют развитию иммортализации клеток [15—17]. Белок p73, гомологичный белку p53, недостаточно изучен, но предполагается, что оба белка функционально взаимосвязаны и могут оказывать взаимомодулирующее действие на процессы апоптоза [15, 18].

Выводы

1. В динамике развития В-ХЛЛ выявлено стабильно высокое содержание ростстимулирующих цитокинов (VEGF165 и PDGF-AB), которые играют безусловно важную роль в механизмах онкогенной трансформации клеток и стимуляции пролиферативной активности на различных стадиях патологии.

2. Нарушение антипролиферативных сигналов при В-ХЛЛ характеризуется одномоментным снижением контроля клеточного цикла со стороны нескольких механизмов регуляции перехода G₁-фазы в S-фазу, обусловленных низким уровнем ингибиторов циклинзависимых киназ (p53, p73) и недостаточной экспрессией регулятора клеточного цикла белка pRb.

3. Мониторинг показателей содержания в крови белков p53, p73, pRb, ростстимулирующих цитокинов (VEGF165 и PDGF-AB) в комплексе с оценкой количества и субпопуляционного состава лимфоцитов может быть использован для прогнозирования течения заболевания В-ХЛЛ, поскольку в динамике развития патологии обнаруживается выраженная патогенетическая взаимосвязь между стадией заболевания и закономерным изменением уровней этих белков в сыворотке крови пациентов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—7, 16—18 см.
REFERENCES)

1. Воробьев А.И., ред. *Руководство по гематологии*. Том 3. 4-е издание. М.: Ньюдиамед; 2007.
2. Волкова М.А., ред. *Клиническая онкогематология: руководство для врачей*. 2-е издание. М.: Медицина; 2007.
3. Рукавицын О.А., ред. *Гематология: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
4. Луговская С.А., Почтарь М.Е. *Гематологический атлас*. 4-е издание. Москва—Тверь: Триада; 2016.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2016.
6. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., ред. *Канцерогенез: патофизиологические и клинические аспекты*. Саратов: СГМУ; 2011.
7. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., ред. *Современная онкология: проблемы и возможности их решения*. Саратов: СГМУ; 2012.
8. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов. *Клиническая онкогематология*. 2012; 5(3): 165—83.
9. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. Хронический лимфолейкоз: современные концепции этиологии, патогенеза и особенностей клинического течения. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2011; 7(2): 377—85.
10. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкомогенеза. М.: Династия; 2007.
11. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Бизенкова М.Н. Патогенетическое обоснование оптимизации традиционных принципов классификации стадийности развития хронического лимфолейкоза и повышения их диагностического значения. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5. Available at: <https://www.science-education.ru/128-21532> (доступно 18 ноября 2016).
12. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб.: Фолиант; 2008.
13. Копнин Б.П. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухолевосупрессирующих и онкогенных активностей. *Клиническая онкогематология*. 2008; 1(1): 2—9.
14. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *Malignant Neoplasms in Russia in 2012 Year (morbidity and mortality) [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 godu (zabolevaemost' i smertnost')]*. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena — filial FGBU «NMIRTs» Minzdrava Rossii; 2016. (in Russian)
15. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111(12): 5446—56.
16. Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A., Harris N.L., Stein H., Siebert R. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375—90.
17. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., eds. *Cancerogenesis: Pathophysiological and Clinical Aspects [Kantserogenez: patofiziologicheskie i klinicheskie aspekty]*. Saratov: SGMU; 2011. (in Russian)
18. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., eds. *Modern Oncology: Problems and Their Solution [Sovremennaya onkologiya: problemy i vozmozhnosti ikh resheniya]*. Saratov: SGMU; 2012. (in Russian)
19. Koptin B.P. Modern concepts of the mechanisms of tumor growth: similarities and differences between solid tumors and leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 5(3): 165—83. (in Russian)
20. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V. Regularities of cytokine status changes in chronic lymphocytic leukaemia and their role in pathogenesis of progressive forms of disease. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2011; 7(2): 377—85. (in Russian)
21. Vladimirskaia E.B. *Mechanisms of Hemopoiesis and Leukemogenesis [Mekhanizmy krovetvoreniya i leykomogeneza]*. Moscow: Dinastiya; 2007. (in Russian)
22. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V., Bizenkova M.N. Pathogenetic substantiation of optimization of traditional principles of stadial development classification of chronic lymphocytic leukemia and increase of their diagnostic significance. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 5. Available at: <https://www.science-education.ru/128-21532>. (accessed 18 November 2016). (in Russian)
23. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines [Tsitokiny]*. St.Petersburg: Foliant; 2008. (in Russian)
24. Koptin B.P. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2008; 1(1): 2—9. (in Russian)
25. Lazarian G., Tausch E., Eclache V., Sebaa A., Bianchi V., Letestu R. et al. TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int. J. Cancer*. 2016; 139(8): 1759—63.
26. Cramer P., Hallek M., Eichhorst B. State-of-the-art treatment and novel agents in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol. Res. Treat.* 2016; 39(1-2): 25—32.
27. Tonino S.H., Mulkens C.E., van Laar J., Derks I.A., Suo G., Croonde Boer F. et al. Induction of TAp73 by platinum-based compounds to overcome drug resistance in p53 dysfunctional chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2015; 56(8): 2439—47.

Поступила 19.12.16
Принята к печати 15.01.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:579.862.1]-078/33

Юдина Ю.В., Белая О.Ф., Паевская О.А., Зуевская С.Н.

МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА У БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ,
119991, Москва

Гиперчувствительность замедленного типа представляет собой одно из важных проявлений клеточного иммунитета, успешное изучение которого может способствовать решению актуальных вопросов патогенеза, диагностики и лечения бактериальных инфекций.

В данном обзоре рассмотрена гиперчувствительность замедленного типа в качестве важной области клеточного иммунитета при инфекционной патологии, а макрофаг-ингибирующий фактор — в качестве важного лимфоцитарного медиатора: цитокина и гормона.

На модели кишечных инфекций и рожи показана важная диагностическая и прогностическая ценность скринингового теста клеточной миграции (СТКМ) в качестве простого, удобного в постановке и чтении результатов, относительно нового метода, позволяющего оценить как ускорение миграции лейкоцитов в разгар заболевания, так и торможение миграции в реконвалесценции болезни.

*Определение характера и динамики миграционной активности лейкоцитов на парциальные антигены *S. pyogenes* в СТКМ можно использовать в диагностике различных форм рожи, оценке выраженности интоксикации, прогнозе осложнений и рецидивов. Нарушение динамики миграционной активности лейкоцитов свидетельствует о нарушении иммунного ответа к возбудителю.*

Ключевые слова: инфекция; иммунитет; рожа; гиперчувствительность замедленного типа; скрининговый тест клеточной миграции; макрофаг-ингибирующий фактор; антигены *S. pyogenes*.

Для цитирования: Юдина Ю.В., Белая О.Ф., Паевская О.А., Зуевская С.Н. Миграционная активность лейкоцитов как показатель гиперчувствительности замедленного типа у больных рожей. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 240-245. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-240-245>

Yudina Yu.V., Belaya O.F., Paevskaya O.A., Zuevskaya S.N.

THE MIGRATION ACTIVITY OF LEUKOCYTES AS INDICATOR OF HYPER-SENSITIVITY OF DELAYED TYPE IN PATIENTS WITH ERYSIPELAS

The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992 Moscow, Russia

The hyper-sensitivity of delayed type is one of important manifestations of cellular immunity. The successful studying of this phenomenon can favor solution of actual issues of pathogenesis, diagnostics and treatment of bacterial infections.

The present review considers hyper-sensitivity of delayed type as an important area of cellular immunity under infectious pathology and macrophage-inhibiting factor as an important lymphocyte mediator: cytokine and hormone.

The model of intestinal infections and erysipelas was used to demonstrate an important diagnostic and prognostic value of screening test of cellular migration as a simple, handy in application and reading of results, relatively new technique permitting to evaluate both acceleration of migration of leukocytes at height of disease and inhibition of migration in re-convalescence of disease.

*The establishment of character and dynamics of migration activity of leukocytes on partial genes antigens *S.pyogenes* in screening test of cellular migration can be used in diagnostics of various forms of erysipelas, evaluation of expression of intoxication, prognosis of complications and relapses. The disturbance of dynamics of migration activity of leukocytes testifies failure of immune response to agent.*

Key words: infection; immunity; erysipelas; hyper-sensitivity of delayed type; screening test of cellular migration; macrophage-inhibiting factor; antigens *S.pyogenes*

For citation: Yudina Yu.V., Belaya O.F., Paevskaya O.A., Zuevskaya S.N. The migration activity of leukocytes as indicator of hyper-sensitivity of delayed type in patients with erysipelas. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 240-245. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-240-245>

For correspondence: Yudina Yu.V., doctor of medical sciences, senior researcher of the laboratory of studies of toxic and septic conditions. e-mail: jul175@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.09.2016

Accepted 15.09.2016

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) — одна из важных областей проявлений клеточного иммунитета, успешное изучение которой может способствовать

Для корреспонденции: Юдина Юлия Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. по изучению токсических и септических состояний; e-mail: jul175@mail.ru

решению актуальных вопросов патогенеза, диагностики и лечения бактериальных инфекций [1—4]. ГЗТ — особый способ элиминации разнообразных внутриклеточных микроорганизмов, который относится к проявлениям клеточного антиинфекционного иммунитета, в отличие от гуморального иммунитета опосредуемого антителами.

Формирование ГЗТ определяется воздействием антигена

на сенсibilизированные лимфоциты, в результате чего они выделяют большое количество медиаторов (интерлейкины, макрофаг-ингибирующий фактор (МИФ), фактор активации макрофагов, хемотаксический фактор, фактор проницаемости, фактор ингибирования миграции лейкоцитов (ЛИФ), фактор некроза опухоли (лимфотоксин). Наиболее важный среди них — МИФ [5, 6].

МИФ первоначально (в 1966 г.) был идентифицирован как лимфокин, который контролирует различные макрофагальные функции, включая фагоцитоз, привлекает и концентрирует макрофаги в местах воспаления, служит мощным активатором макрофагов *in vivo* и, как полагают, участвует в формировании гиперчувствительности замедленного типа, что играет важную роль в клеточном иммунитете. МИФ поддерживает выживание и функцию макрофагов, ингибируя в макрофагах р53 аутокринным путем. Ингибирование р53 совпадает с повышением глютаинового уровня в клетке, индукцией метаболизма арахидоновой кислоты и экспрессией циклооксигеназы-2 (Cox-2), которая требуется для МИФ-регуляции р53 [7].

Недавно МИФ был вновь оценен как плейотропный (многофункциональный) провоспалительный цитокин и гормон гипофиза, связанный с глюкокортикоидами иммуномодулятор, который стимулирует иммунные реакции в ответ на наличие в крови эндотоксинов [8—11].

Последние данные доказывают, что МИФ играет центральную роль в регулировании врожденного и адаптивного иммунного ответа и при управлении выраженностью воспалительной реакции совместно с действием глюкокортикоидов в пределах каскада цитокинов. При этом увеличение продукции МИФ за счет изменения гена-промотора МИФ вызывает развитие чрезмерного иммунного воспалительного ответа, способствующего прогрессированию хронических воспалительных заболеваний [12].

МИФ секретируется прежде всего Т-лимфоцитами и макрофагами, однако этот белок обнаруживают фактически во всех клетках, включая клетки мозга, почек, кожи [8, 9, 13—15]. До сих пор его точная функция в большинстве клеток неизвестна. Доказаны выработка МИФ в больших количествах иммунными, эндокринными и эпителиальными клетками и быстрое его высвобождение вследствие действия различных стимулов — воспаления, хирургического стресса или ишемии и реперфузии [8, 16], а также после воздействия микробных продуктов и провоспалительных цитокинов при воспалении [17—21].

Показано его участие в ряде патологических и физиологических состояний, таких как ревматоидный артрит [7], цитомегаловирусная инфекция [21], малярия, сепсис [22], сальмонеллез [23], протозойные инфекции [24], воспалительные заболевания кишечника [25], рассеянный склероз [26], посттравматическая реабилитация и возникновение нейропатической боли при травме спинного мозга [27], подострое воспаление при метаболических нарушениях (ожирение, сахарный диабет, неалкогольная жировая дистрофия печени) [28], инфаркт миокарда [29], депрессивные расстройства [30], онкологические процессы [31] и др.

МИФ одновременно обладает свойствами цитокина и гормона [8, 11, 12, 17, 27]. Хотя МИФ выделяется в ничтожном количестве, он подавляет иммуносупрессивные функции глюкокортикоидов. Несмотря на то, что МИФ и глюкокортикоиды противодействуют друг другу, они обеспечивают связь между эндокринной, нервной и иммунной системами [7, 8, 11, 12, 17, 18, 27, 32].

Установленное противодействие МИФ противовоспалительному действию глюкокортикостероидов (ГКС) помогает понять важность воздействия эндогенных и экзогенных ГКС на организм, в частности после травматического повреждения спинного мозга [27].

Появляется все больше свидетельств того, что МИФ может способствовать метаболическому воспалению: он может вырабатываться жировой тканью при ожирении, участвует в метаболических и воспалительных процессах, которые лежат в основе развития ожирения и связанных с ним патологий [28].

Иммуномодулирующая роль МИФ изучена на различных моделях [8, 17, 19, 20]. В пределах иммунной системы функции МИФ уникальны и разнообразны [6]. В дополнение к макрофагам МИФ воздействует на активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, НК-клеток, фибробластов и эндотелиальных клеток [10—12, 17, 19—21]. Эти данные объясняют важную роль МИФ при воспалительных и онкологических заболеваниях [8, 18, 23, 31]. Молекулярное исследование показало прямое взаимодействие МИФ с несколькими внутриклеточными регуляторными белками (Jab1, PAG и р53), которые контролируют клеточный рост и пролиферацию [20].

Через 24 ч после аллоиммунизации мышей аллогенными лимфоидными клетками в лимфатических узлах, селезенке и тимусе появляются Т-лимфоциты, способные продуцировать МИФ при повторном контакте с антигенами. Эти «ранние» Т-МИФ-продуценты (Р-Т-МИФ) локализуются преимущественно в лимфатических узлах, где регистрируются очень рано (уже через 4 ч после иммунизации), резистентны к действию тимэктомии [33].

Как «ранние» Т-МИФ (Р-Т-МИФ), так и «поздние» Т-МИФ-продуценты (П-Т-МИФ) — иммунологически специфичны. Тонкая иммунологическая специфичность существенно различается у Р-Т-МИФ и П-Т-МИФ: на ответ Р-Т-МИФ наложены более жесткие ограничения, чем на ответ П-Т-МИФ. Р-Т-МИФ реагирует на продукты иммунизирующего комплекса Н-2 избирательно. П-Т-МИФ, тестируемые на 14 день после аллоиммунизации, выявляются в селезенке, но не в лимфоузлах, высокочувствительны к тимэктомии. Р-Т-МИФ, по-видимому, представляет собой особую субпопуляцию Т-клеток, функционально специализированных для опосредованной иммуномедиаторами регуляции миграции макрофагов в начальной фазе иммунного ответа. Эта независимая от пролиферации антигенспецифическая иммунорегуляция может быть направлена на оптимизацию взаимодействия клеток в так называемых кластерах, образующихся в период индукции иммунного ответа и необходимых для развития пролиферативного ответа Т- и В-лимфоцитов [32—34].

Показано, что пик усиления миграции обнаруживали уже на 2-м часу инкубации. Он характеризовался резким скачком площади миграции. Стимуляция миграции макрофагов имеет характер острого пика, появляющегося регулярно с интервалом в 5 ч и уменьшающегося по амплитуде в течение 1-х суток. Острые пики сохраняются в течение двух суток, причем к окончанию 2-х суток их появление становится более частым. Периодичность появления пиков стимуляции миграции указывает на существование временного механизма, регулирующего появление импульсов стимуляции подвижности макрофагов, не связанного, вероятно, с клеточным делением. По-видимому, факторы, усиливающие миграцию макрофагов, преобладают в клетках и высвобождаются при контакте с аллоантигеном. Существование оптимальных разведений для стимуляции и подавления миграции, а также быстрая смена активности факторов свидетельствуют в пользу наличия баланса факторов с альтернативными активностями — МИФ и макрофаг-стимулирующего фактора (МСФ) [32, 33].

При попадании стрептококков в организм формируется гиперчувствительность как немедленного, так и замедленного типа [1—3]. Стрептококк отличается повышенной устойчивостью к действию комплемента, лизоцима и фагоцитов, а инфекционный процесс имеет склонность к хроническому течению

[35]. В такой ситуации макроорганизм вынужден переключать нагрузку на клеточное звено иммунитета с развитием гиперчувствительности для привлечения, активации и регуляции в очаге функций макрофагов, лимфоцитов и других клеток.

При многих острых стрептококковых инфекциях обнаружена повышенная гиперчувствительность замедленного типа к антигенам клеточной стенки, но эти реакции при неосложненных ревматизмом заболеваниях быстро ослабевают. При остром ревматизме обнаружен высокий уровень ГЗТ к различным структурам микробной клетки, особенно к мембранам, сохраняющийся чрезвычайно длительно, в течение 5 лет [35].

При роже наличие реакций ГЗТ установлено с помощью внутрикожных проб со стрептококковым аллергеном. Выраженная сенсibilизация к аллергену стрептококка обнаружена уже в первые дни болезни как у больных первичной рожой, так и при рецидивах. У больных первичной рожой через 6—7 мес после начала заболевания показатели внутрикожных проб не отличались от результатов контрольной группы. У пациентов с частыми рецидивами рожи на протяжении всего срока отдаленных наблюдений в подавляющем большинстве случаев сохранялись положительные результаты внутрикожных проб [36—39].

Хроническое воспаление кожи резко отличается от острого, причем не столько длительностью, сколько своей сущностью. При хроническом воспалении кожи преобладают пролиферативные процессы, связанные с реакцией клеток крови и мезенхимы, тогда как реконструктивная пролиферация ослаблена или нарушена. Увеличение числа лимфоцитов и длительная их задержка в очаге воспаления сопровождаются избыточным выделением лимфокинов. Центральный из них — МИФ — угнетает подвижность макрофагов, способствуя привлечению и накоплению их в месте повреждения, а скопление клеток само по себе может служить фактором повреждения ткани [6, 17].

Показано, что лимфоциты могут мигрировать в кожу, на которую нанесен антиген, и становиться сенсibilизированными *in situ*. Болезненные проявления ГЗТ в виде гранулем, клеточных инфильтратов, длительно текущих воспалительных реакций могут обеспечивать своеобразную патологическую симптоматику, что нередко маскирует защитную роль гиперчувствительности замедленного типа [1, 2].

Подтверждением значения ГЗТ при роже служит то, что во всех случаях обязательным условием возникновения рожи оказывается наличие предрасположенности (предварительной сенсibilизации определенных участков кожи к антигенам стрептококка наряду с наличием общего и местного иммунодефицита). Так, при рецидивирующей роже поражаются одни и те же участки кожных покровов, а при заражении здоровых людей стрептококками, выделенными от больных, не удается воспроизвести это заболевание. Перенесенная даже однократно, рожа усиливает предрасположенность к рецидивированию [37, 40].

Предрасположенность к роже представляет собой один из вариантов генетически детерминированной реакции организма на гемолитический стрептококк группы А [41]. В ряде случаев она реализуется лишь в пожилом возрасте, на фоне повторной сенсibilизации гемолитическим стрептококком группы А и при наличии определенных патологических состояний, в том числе связанных с инволюционным процессом: известно, что при старении происходит угнетение функциональной активности Т-системы иммунитета и количественное уменьшение циркулирующих в крови Т-лимфоцитов [42].

Установленный факт — снижение количества Т-лимфоцитов у больных рожой, более выраженное и стойкое снижение — при рецидивирующей форме заболевания. Соотношение Т-хелперов/Т-супрессоров в остром периоде болезни при роже изменено в сторону преобладания Т-супрессоров, а

более выраженный дисбаланс этих клеток наблюдают при частых рецидивах болезни [1—3]. Вторичная иммунологическая недостаточность по отношению гиперсупрессорному варианту сохраняется и в межрецидивном периоде [39].

Тканевые клетки-мишени обладают различной чувствительностью к антигенам стрептококка. В более поздние сроки после сенсibilизации экспериментальных животных антигенами стрептококка отмечено уменьшение числа макрофагов — прилипающих клеток в лимфатических узлах, что может быть одной из причин возникновения иммунорегуляторных нарушений и развития аутоиммунных реакций [40, 43—46].

Для выявления ГЗТ при роже долгое время использовали внутрикожную пробу, в которой ГЗТ определяют уже при первичной роже, но наибольшая сенсibilизация к стрептококку развивается при рецидивирующей роже [36].

Другой метод — реакция повреждения нейтрофилов *in vitro* [44], результаты которой сильно зависят от тяжести заболевания, — при роже не использовали.

Установлена высокая специфичность реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) в присутствии специфических антигенов. Из всех феноменов клеточного иммунитета РБТЛ при роже изучена наиболее полно. При постановке РБТЛ используются, как правило, неспецифические стимуляторы (ФГА, Соп А). Кроме того, тест достаточно сложный и продолжительный по времени — 3—7-дней.

У больных первичной рожой результаты РБТЛ со стрептококковыми антигенами не отличались от показателей здоровых лиц. При рецидивирующей роже отмечена слабая трансформация лимфоцитов, связанная, по мнению авторов, со снижением реактивности и недостаточностью клеточного иммунитета. В группе пациентов с буллезным процессом РБТЛ была выражена меньше, чем при эритематозной форме заболевания [47, 48].

РБТЛ отражает пролиферативную активность Т-клеток и не дает информации о функциональном состоянии Т-лимфоцитов [49, 50].

Среди методов, характеризующих состояние ГЗТ, широкое применение получила также реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) [46, 51], которая служит одним из немногих тестов оценки функциональной активности Т-клеток *in vitro* и представляет собой классический метод оценки клеточной сенсibilизации. РТМЛ отражает антигенспецифическую активацию лимфоцитов-эффекторов ГЗТ, которые посредством растворимых медиаторов МИФ и МСФ контролируют спонтанную подвижность фагоцитов, их циркуляцию, накопление в зоне воспаления и мобилизацию защитных свойств этих клеток. Торможение миграции лейкоцитов вызывается особым медиатором (migration inhibitory factor — МИФ), образующимся под влиянием специфического антигена [6, 8, 11, 14, 20, 27, 32, 33].

Существует много вариантов постановки РТМЛ (в капиллярах, из монослоя клеток в сосок под агарозу, из агарозных капель и др.). Однако эти методики отличаются большой трудоемкостью, нефизиологическим воздействием на клетки в ходе постановки теста, сложностью учета результатов [33, 45, 46, 52].

До недавнего времени о влиянии парциальных антигенов стрептококка различной химической структуры на формирование гиперчувствительности немедленного и замедленного типа (ГНТ и ГЗТ) было известно крайне мало. Установлено, что общие детерминанты различных М-белков стрептококка стимулируют Т-лимфоциты у неиммунизированных людей [43, 49].

С помощью РТМЛ со стрептококковым аллергеном у большинства больных рожой выявлена сенсibilизация к бета-гемолитическому стрептококку. Установлено раннее развитие ГЗТ к возбудителю и ее сохранение в периоде выздоровления. Результаты РТМЛ свидетельствуют также о высокой степени

сенсibilизации иммунокомпетентных клеток к тканевым аутоантигенам при частых и многократных рецидивах [35, 45, 48].

Скрининговый тест клеточной миграции (СТКМ) [49] выгодно отличается от других вариантов миграционных тестов простотой в постановке и учете результатов, несложным оборудованием, возможностью одновременного учета как реакции ускорения миграции, так и торможения при тестировании большого количества проб (до 20 проб в четырех повторях с контролями на одном планшете), минимальной травматизацией лейкоцитов и многократным использованием всех элементов конструкции. При этом предполагают, что подавление миграции макрофагов отражает формирование клеточного иммунитета, а стимуляция миграции ассоциирована с угнетением клеточного иммунитета и повышением активности супрессорных механизмов [1, 32—34, 50, 53].

В ранее проведенных исследованиях у больных кишечными инфекциями изучение миграционной активности лейкоцитов периферической крови в СТКМ с использованием *in vitro* ЛПС шигелл и сальмонелл разных видов, К-антигена сальмонелл и Шига-токсина позволило установить высокую чувствительность и специфичность реакции, ее особенности (характер и интенсивность) при различной клинической картине и периоде заболевания. Благодаря удобству постановки СТКМ позволяет изучать стимулирующий эффект одновременно большого количества антигенов в широком диапазоне концентраций [50].

СТКМ использован нами в качестве интегрального теста оценки клеточной кооперации в ответ на различные факторы патогенности *S. pyogenes* группы А. При стимуляции *in vitro* специфическими антигенами *S. pyogenes* выявлены дозовая зависимость и волнообразные изменения показателей миграционной активности лейкоцитов (МАЛ) в динамике заболевания, установлены особенности МАЛ при различном клиническом течении заболевания. Выявлена отчетливая динамика МАЛ от ускорения к торможению с точкой инверсии на 5-й день от начала заболевания [53, 54].

Волнообразные изменения показателей МАЛ на антигены стрептококка у больных рожей в сроки после 5-го дня болезни значительно отличались от МАЛ на ЛПС шигелл и сальмонелл у больных острыми кишечными инфекциями. В отличие от последних при роже мы отметили «возврат» к реакциям ускорения МАЛ даже на поздних стадиях заболевания [50, 53, 54]. Это, видимо, свидетельствует о неустойчивости формирующихся иммунных реакций на стрептококк.

Переход МАЛ из фазы ускорения в фазу торможения у больных рожей характеризует формирование полноценного иммунного ответа, соответствует благоприятному течению заболевания и обеспечивает низкую вероятность рецидивов. Отсутствие перехода МАЛ в фазу торможения в периоде ранней реконвалесценции говорит о задержке формирования иммунного ответа к стрептококку. Вероятность последующего рецидива (в течение, как минимум, 24 мес) значительно выше при тенденции МАЛ от торможения к ускорению, а также при стагнации показателей МАЛ (в фазе торможения или ускорения) [54, 55].

У большинства обследованных больных рожей выявлены идентичные показатели МАЛ при стимуляции поверхностными специфическими антигенами стрептококка (полисахарид, поверхностные белки, L-антиген) и отличная от них динамика показателей МАЛ на компоненты стрептококка с ферментативной (гиалуронидаза) и токсической (стрептолизин-О) активностью [53, 54].

Выявлена взаимосвязь между клиническими формами рожи и степенью сенсibilизации организма. В частности, при эритематозных и эритематозно-геморрагических формах первичной рожи индекс миграции в СТКМ был ниже, чем при эритематозно-буллезных и буллезно-геморрагических

формах. Можно предположить, что при буллезных формах рожи снижена продукция МИФ.

Отмечены значительные различия МАЛ в зависимости от характера местного процесса: при эритематозно-геморрагической форме первичной и рецидивирующей рожи активная динамика МАЛ от ускорения к торможению на поверхностные белки, L-антиген, гиалуронидазу и полный комплекс антигенов; при буллезно-геморрагической форме первичной рожи — угнетение МАЛ в разгар заболевания на полисахарид, поверхностные белки и гиалуронидазу, а при буллезно-геморрагической форме рецидивирующей рожи — гиперергические реакции ускорения МАЛ [53—55].

Активация миграционной активности клеток важна для привлечения их в очаг поражения и отмечается в разгар заболевания, как правило, в период высокой циркуляции специфического антигена возбудителя, как это было показано при кишечных инфекционных заболеваниях различной этиологии и роже. Торможение миграции обусловлено комплексами антиген-антитело, сформированными в условиях избытка антител, и свидетельствует о формировании иммунитета. При тяжелом течении кишечной инфекции, преимущественно смешанной этиологии, в начальном периоде заболевания на высоте интоксикации нередко также регистрируют угнетение миграции клеток, связанное, по-видимому, с токсическим поражением лимфоцитов и макрофагов лимфотоксиком или токсическими продуктами микроорганизма, впоследствии сменяющееся ускорением миграционной активности [50].

Определение миграционной активности клеток в качестве показателя ГЗТ (РТМЛ, СТКМ) привлекательны благодаря тому, что они позволяют характеризовать функции не отдельных клеточных линий в отрыве от других, а результат кооперации различных клеток, включая Т-, В-лейкоциты, моноциты/макрофаги, наряду с гуморальными медиаторами и другими сывороточными регуляторами клеточных реакций, свидетельствует о балансе активности МИФ и гипоталамо-гипофиз-адреналовой системы [1, 17, 18, 20, 27].

СТКМ отличается простотой и удобством постановки, визуальным учетом результатов реакции и может быть применен для оценки клеточного иммунитета к различным концентрациям парциальных антигенов микроорганизмов в диагностике, для оценки степени интоксикации, а динамика миграционной активности лейкоцитов свидетельствует о характере течения, прогнозе заболевания и возможности возникновения осложнений и рецидивов рожи.

Безусловно, изучение гиперчувствительности замедленного типа — перспективное направление инфекционной иммунологии и, несмотря на достаточно большое число публикаций, необходимо продолжить исследования с целью уточнения тонких механизмов реакции и влияния различных факторов. Ведущее значение МИФ в иммуно-нейро-эндокринной регуляции организма [1, 16—18, 20, 27, 30] обуславливает важность определения его баланса во взаимодействии с другими факторами межклеточных взаимодействий в реакции ГЗТ, в первую очередь *in vitro* в реакциях миграции лейкоцитов в качестве функционального теста.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—31, 34, 47, 51—52
см. REFERENCES)

1. Медуницын Н.В. *Повышенная чувствительность замедленного типа*. М.: Медицина; 1983.
2. Беклемишев Н.Д. *Имунопатология и иммунорегуляция (при инфекциях, инвазиях и аллергиях)*. М.: Медицина; 1986: 52—77.

ИММУНОЛОГИЯ

3. Новиков Д.К., Новикова В.И. *Оценка иммунного статуса*. М.: 1996.
4. Титов Л.П. Иммунология. *Терминологический словарь*. М.: МИА; 2008.
5. Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. *Микробиология*. Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
32. Сулов А.П., Селедцов В.И., Червонский А.В. и др. Сравнительное исследование биологических свойств и иммунологической специфичности «ранних» и «поздних» Т-МИФ-продуцентов. *Иммунология*. 1988; 9(6): 17—20.
33. Сулов А.П., Харкевич Д.Д. Продукция факторов, регулирующих подвижность макрофагов, в ранние сроки смешанной культуры лимфоцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1981; 92(4): 466.
35. Данилова Т.А. Fc рецепторы на клетках эндотелия клапанов сердца. Сопоставление IgG Fc связывающей активности этих рецепторов и Fc-рецепторов стрептококков группы А. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003; (2): 46—51.
36. Карташев В.В. *Внутрикожные пробы со стрептококковым аллергеном и стафилококком при первичной и рецидивирующей роже*. В кн.: Москаленко Е.П., Поляк А.И., ред. Актуальные вопросы иммунологии и иммунопатологии. Ростов-на-Дону; 1976: 30—1.
37. Черкасов В.Л. *Рожа*. Ленинград: Медицина; 1986.
38. Черкасов В.Л. *Рожа*. В кн.: Покровский В.И., ред. Руководство по внутренним болезням. *Инфекционные болезни*. М.; 1996: 135—50.
39. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. *Лекции по инфекционным болезням*. Том 1. М.; 1999: 228—42.
40. Амбалов Ю.М., Пшеничная Н.Ю. *Значение нарушений функциональной активности макрофагов и нейтрофилов в патогенезе рожистого воспаления*. В кн.: Актуальные проблемы инфекционной патологии. СПб.; 1993; ЧЗ: 13.
41. Петров Р.В. *Иммунология*. М.: Медицина; 1982.
42. Покровский В.И., Адамбеков Д.А., Литвинов В.И., ред. *Иммунология бактериальных инфекций: руководство для врачей*. Москва, Бишкек; 1994: 38—86.
43. Лямперт И.М., Смирнова М.Н., Семина И.А. Гиперчувствительность замедленного типа у экспериментальных животных, сенсibilизированных стрептококковым аллергеном. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1965; (12): 101—7.
44. Фрадкин В.А. *Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови*. М.; 1985.
45. Фролов В.М., Пересадин Н.А., Баскаков И.Н. Значение аутоиммунных реакций у больных рожей. *Врачебное дело*. 1988; (9): 107—10.
46. Иегер Л., ред. *Клиническая иммунология и аллергология*. Том 1. Перевод с немецкого. В 3-х томах. М.: Медицина; 1990.
48. Базанова Е.А., Гнездицкая Э.В., Нестеренко В.Г., Попова Л.К., Санина В.Ю., Игнатенко И.Н. Влияние полисахарида стрептококка группы А на пролиферацию Т-клеток, индуцированную ФГА. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1996; (2): 71—3.
49. Сулов А.П., Головин В.П., Скворцов В.Т., Коронцит Т.А. Скрининговый тест клеточной миграции из микрокультур *in vitro*. *Иммунология*. 1989; 10(2): 73—6.
50. Черкасов В.Л., Белая О.Ф., Жумабекова А.Б., Белая Ю.А. Патогенетическое и клинико-диагностическое значение изменений миграционной активности лейкоцитов у больных шигеллезами и сальмонеллезами. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1996; (4): 34—7.
53. Юдина Ю.В., Белая О.Ф., Пак С.Г. Т-клеточная реактивность на специфические антигены стрептококка группы А у больных первичной рожей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; (11): 41—4.
54. Юдина Ю.В., Белая О.Ф., Пак С.Г., Еровиченков А.А. Т-клеточная реактивность на специфические антигены стрептококка группы А у больных рецидивирующей рожей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; (4): 14—8.
55. Юдина Ю.В., Белая О.Ф. Прогностическое значение показателей миграционной активности лейкоцитов у больных рожей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; (5): 47—50.

REFERENCES

1. Medunitsyn N.V. *Delayed-type Hypersensitivity [Povyshennaya chuvstvitel'nost' zamedlennogo tipa]*. Moscow: Meditsina; 1983. (in Russian)
2. Beklemishev N.D. *Immunopathology and Immunoregulation (for infections, infestations and allergies) [Immunopatologiya i immunoregulyatsiya (pri infektsiyakh, invazyakh i allergiyakh)]*. Moscow: Meditsina; 1986: 52—77. (in Russian)
3. Novikov D.K., Novikova V.I. *Evaluation of the Immune Status [Otsenka immunnogo statusa]*. Moscow; 1996. (in Russian)
4. Titov L.P. *Immunology. Terminological Dictionary [Immunologiya. Terminologicheskiy slovar']*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
5. Zverev V.V., Boychenko M.N., eds. *Microbiology. Textbook [Mikrobiologiya. Uchebnik]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. (in Russian)
6. Baugh J.A., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit. Care Med*. 2002; 30: 27—35.
7. Leech M., Metz C., Hall P., Hutchinson P., Gianis K., Smith M. et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthr. Rheum*. 1999; 42(8): 1601—8.
8. Bernhagen J., Calandra T., Mitchell R.A., Martin S.B., Tracey K.J., Voelter W. et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993; 365(6448): 756—9.
9. Nishino T., Bernhagen J., Shiiki H., Calandra T., Dohi K., Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol. Med*. 1995; 1(7): 781—8.
10. Bacher M., Metz C.N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M. et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93(15): 7849—54.
11. Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J*. 1996; 10(14): 1607—13.
12. Baugh J.A., Donnelly S.C. Macrophage migration inhibitory factor a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J. Endocrinol*. 2003; 179(1): 15—23.
13. Nishibori M., Nakaya N., Tahara A. Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma, astrocytes and neurons in the bovine brain. *Neurosci. Lett*. 1996; 213: 193—6.
14. Imamura K., Nishihira J., Suzuki M., Yasuda K., Sasaki S., Kusunoki Y. et al. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1996; 40(6): 1233—42.
15. Bacher M., Meinhardt A., Lan H.Y., Dhabhar F.S., Mu W., Metz C.N. et al. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal functional. *Mol. Med*. 1998; 4(4): 217—30.
16. Rex S., Kraemer S., Grieb G, Emontz pohl C., Soppert J., Goetzenich A. et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in critical illness. *Mini Rev. Med. Chem*. 2014; 14(14): 1116—24.
17. Kim B.S., Rongisch R., Hager S. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Adipose Tissue Inflammation. *PLoS One*. 2015 Sep 8; 10(9): e0137366.
18. Calandra T., Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J. Inflamm*. 1996; 47: 39—51.
19. Metz C.N., Bucala R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv. Immunol*. 1997; 66: 197—223.
20. Calandra T., Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2003; 3(10): 791—800.
21. Bacher M., Eickmann M., Schrader J., Gemsa D., Heiske A. Human cytomegalovirus-mediated induction of MIF in fibroblasts. *Virology*. 2002; 299(1): 32—7.
22. Clark I.A., Awburn M.M., Whitten R.O., Harper C.G., Liomba N.G.,

- Molyneux M.E. et al. Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children. *Malar. J.* 2003; 2: 6.
23. Kobernick H., Grode L., David J.R., Rohde W., Rolph M.S., Mittrücker H.W. et al. Immunology. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(21): 13681—6.
 24. Rosado Jde D., Rodriguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7(9): 1239—56.
 25. Nishihira J. Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 2012; 1271: 53—7.
 26. Selvi E., Tripodi S.A., Catenaccio M., Lorenzini S., Chindamo D., Manganelli S. et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62(5): 460—4.
 27. Lerch J.K., Puga D.A., Bloom O., Popovich P.G. Glucocorticoids and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are neuroendocrine modulators of inflammation and neuropathic pain after spinal cord injury. *Semin. Immunol.* 2014; 26(5): 409—14.
 28. Morrison M.C., Kleemann R. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Front. Immunol.* 2015; 6: 308.
 29. Rassaf T., Weber C., Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2014; 102(2): 321—8.
 30. Bloom J., Al-Abed Y. MIF: Mood Improving/Inhibiting Factor? *J. Neuroinflammation.* 2014; 11: 11.
 31. Babu S.N., Chetal G., Kumar S. Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012. 13(5): 1737—44.
 32. Suslov A.P., Seledtsov V.I., Chervonskiy A.V. et al. A comparative study of the biological properties and the immunological specificity of the «early» and «late» T-MIF-producers. *Immunologiya.* 1988; 9(6): 17—20. (in Russian)
 33. Suslov A.P., Kharkevich D.D. Production factors governing mobility of macrophages in early mixed lymphocyte culture. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1981; 92(4): 466. (in Russian)
 34. Mosier D.E. Cell interactions in the primary immune response in vitro: a requirement for specific cell clusters. *J. Exp. Med.* 1969; 129: 351—62.
 35. Danilova T.A. Fc-receptors on the endothelial cells of the heart valves. Comparison of IgG Fc receptor binding activity of the Fc-receptors and streptococci group A. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2003; (2): 46—51. (in Russian)
 36. Kartashev V.V. *Intradermal tests with the streptococcus and staphylococcus allergen in primary and recurrent erysipelas.* In: Moskalenko E.P., Polyak A.I., eds. *Topical Issues of Immunology and Immunopathology [Aktual'nye voprosy immunologii i immunopatologii].* Rostov-na-Donu; 1976: 30—1. (in Russian)
 37. Cherkasov V.L. *Erysipelas [Rozha].* Leningrad: Meditsina; 1986. (in Russian)
 38. Cherkasov V.L. Erysipelas. In: Pokrovskiy V.I., ed. *Internal Medicine Guide. Infectious diseases [Rukovodstvo po vnutrennim boleznyam. Infektsionnye bolezni].* Moscow; 1996: 135—50. (in Russian)
 39. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. *Lectures on Infectious Diseases. Volume 1 [Lektsii po infektsionnym boleznyam. Tom 1].* Moscow; 1999: 228—42. (in Russian)
 40. Ambalov Yu.M., Pshenichnaya N.Yu. *Value of violations of the functional activity of macrophages and neutrophils in the pathogenesis of erysipelas.* In: *Actual Problems of Infectious Pathology [Aktual'nye problemy infektsionnoj patologii].* St.Petersburg; 1993; ChZ: 13. (in Russian)
 41. Petrov R.V. *Immunology [Immunologiya].* Moscow: Meditsina; 1982. (in Russian)
 42. *Immunology of bacterial infections: a guide for physicians,* eds. V.I. Pokrovskiy, D.A. Adambekov, V.I. Litvinov: Moscow, Bishkek; 1994. 38—86. (in Russian)
 43. Lyampert I.M., Smirnova M.N., Semina I.A. Delayed-type hypersensitivity in experimental animals, sensitized allergen streptococcal. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1965; (12): 101—7. (in Russian)
 44. Fradkin V.A. *Diagnosis of Allergy Blood Neutrophil Responses [Diagnostika allergii reaktivnymi neytrofilov krovi].* Moscow; 1985. (in Russian)
 45. Frolov V.M., Peresadin N.A., Baskakov I.N. Meaning of autoimmune reactions in patients with erysipelas. *Vrachebnoe delo.* 1988; (9): 107—10. (in Russian)
 46. Jäger L. *Klinische Immunologie und Allergologie. Teil I.* Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1983. (in German)
 47. Dale J.B., Simpson W.A., Ofek I., Beachey E.H. Blastogenic responses of human lymphocytes to structurally defined polypeptide fragments of streptococcal M protein. *J. Immunol.* 1981; 126(4): 1499—505.
 48. Bazanova E.A., Gnezditskaya E.V., Nesterenko V.G., Popova L.K., Sanina V.Yu., Ignatenko I.N. Effect of group A *Streptococcus* polysaccharide to T-cell proliferation induced by PHA. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1996; (2): 71—3. (in Russian)
 49. Suslov A.P., Golovin V.P., Skvortsov V.T., Korontsvit T.A. Cell migration screening test of microcultures in vitro. *Immunologiya.* 1989; 10(2): 73—6. (in Russian)
 50. Cherkasov V.L., Belaya O.F., Zhumabekova A.B., Belaya Yu.A. Pathogenetic and clinico-diagnostic importance of the leukocyte migration activity changes in patients with shigellosis and salmonellosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1996; (4): 34—7. (in Russian)
 51. Dobozy A., Chneider I., Hunyadi J., Simon N. Leukocyte migration test in recurrent erysipelas. *Acta Derm. Venereol.* 1973; 53(1): 35—8.
 52. Friedman H., Widen R., Lee I., Klein N. Cellular immunity to *Legionella pneumophila* in guinea pigs assessed by direct and indirect migration inhibition reactions in vitro. *Infect. Immun.* 1983; 41(3): 1132—7.
 53. Yudina Yu.V., Belaya O.F., Pak S.G. T-cell reactivity to specific antigens of group A streptococcus in patients with primary erysipelas. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2007; (11): 41—4. (in Russian)
 54. Yudina Yu.V., Belaya O.F., Pak S.G., Erovinchenkov A.A. T-cell reactivity to specific antigens of group A streptococcus in patients with recurrent erysipelas. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2008; (4): 14—8. (in Russian)
 55. Yudina Yu.V., Belaya O.F. Prognostic significance of migration activity indicators of leukocytes in patients with erysipelas. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2008; (5): 47—50. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 573.61+616.98:578.828.6-06:616-002.828-022.369-078

Кузнецова М.В.^{1,2}, Чарушина И.П.¹, Максимова А.В.², Баландина С.Ю.³, Демаков В.А.^{2,3}, Фельдблюм И.В.¹

ЭПИДЕМИОЛОГО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР *CANDIDA ALBICANS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В СТАЦИОНАРЕ ДЛЯ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

¹ ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь;

² ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, 614081, Пермь;

³ ГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Пермь

Исследовано 70 культур *Candida albicans*, выделенных от 19 пациентов ($n = 45$) и с объектов больничной среды ($n = 25$) в июле 2013 г. и в октябре 2014 г. в специализированном отделении для ВИЧ-инфицированных. Дана генотипическая характеристика кандид на основе ПЦР интронной области гена 25S рРНК, а также их биологические особенности с учетом генотипа. Частота встречаемости кандид А, В, С и D генотипов составила 58,6, 10, 18,6 и 12,8% соответственно. Выявлено существенное преобладание *C. albicans* генотипа А в различных комменсальных (зев) и транзиторных (кожные покровы) локусах. Они же в большинстве случаев послужили причиной кандидозной инфекции, в том числе инвазивного кандидоза. Кроме того, представители этой группы чаще (85%) контаминировали предметы больничной среды ($p = 0,0013$). Культуры *C. albicans* генотипа D (*Candida dubliniensis*) были малочисленными, они выделялись только из экологических биотопов пациентов без клиники кандидоза, не обнаруживались в окружающей среде, проявляли наименьшую активность экзоферментов (фосфолипазы и протеазы) и оказались чувствительны к протестированным антимикотикам. В различных биотопах одного пациента, как правило, персистировал единственный штамм, в ряде случаев выделялись и генотипически отличные культуры. Пребывание пациента в стационаре способствовало присоединению *C. albicans* других генотипов, в двух случаях отмечена полная смена культур. Таким образом, в больничной среде специализированных стационаров могут формироваться и длительно циркулировать госпитальные штаммы *C. albicans*, обладающие высокой ферментативной активностью, источником которых служат сами ВИЧ-инфицированные пациенты, что повышает риск возникновения кандидозной инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; *Candida albicans*; генотипирование; 25S рРНК; биологические свойства.

Для цитирования: Кузнецова М.В., Чарушина И.П., Максимова А.В., Баландина С.Ю., Демаков В.А., Фельдблюм И.В. Эпидемиолого-микробиологическая характеристика культур *Candida albicans*, циркулирующих в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 246-251. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251>

Kuznetsova M.V.^{1,2}, Charuchina I.P.¹, Maksimova A.V.², Balandina S.Yu.³, Demakov V.A.^{2,3}, Feldblum I.V.¹

THE EPIDEMIOLOGICAL MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CULTURES OF CANDIDA ALBICANS CIRCULATING IN HOSPITAL FOR HIV-INFECTED PATIENTS

¹The E.A. Wagner Permskii state medical academy of Minzdrav of Russia, 614990 Perm, Russia

²The institute of ecology and genetics of microorganisms of th Uralskii branch of the Russian academy of sciences, 614081 Perm, Russia

³The Permskii state national research institute, 614990 Perm, Russia

The study was organized relating to 70 cultures of *Candida albicans* isolates from 19 patients ($n=45$) and from objects of hospital environment ($n=25$) in July 2013 and October 2014 in specialized department for HIV-infected patients. The genotypical characteristic was given related to candida on the basis of polymerase chain reaction of intronic area of gene 25s рRNA and also their biological characteristics taking into account genotype. The rate of prevalence of *Candida* genotypes A, B, C and D made up to 58.6%, 10%, 18.6% and 12.8% correspondingly. It was established significant predominance of *C. albicans* genotype A in various commensal (pharynx) and transitory (skin) loci. In most cases, they were a cause of candidiasis, including invasive candidiasis. Besides, representatives of this group more frequently (85%) contaminated objects of hospital environment ($p=0.0013$). The cultures of *C. albicans* genotype B (*Candida dubliniensis*) were small in numbers and were isolated only from ecological biotypes of patients without clinic of candidiasis, were not detected in environment, were least active with exo-enzymes (phospholipase and protease) and were sensitive to tested anti-mycotic. In various biotops of single patients as a rule the only one strain persisted. In a number of cases genotypically different cultures were isolated. The residence of patient in hospital enhanced joining of *C. albicans* of other genotypes and in two cases were established a total change of cultures. Thus, in hospital environment of specialized hospitals can develop and long-time circulate hospital strains of *C. albicans* with high enzyme activity. The source are HIV-infected patients themselves that increases risk of of development of candidiasis.

Key words: HIV-infection; *Candida albicans*; genotyping; 25SpRNA; biological characteristics.

Для корреспонденции: Кузнецова Марина Валентиновна, д-р мед. наук, доц. каф. микробиологии и вирусологии с курсом КЛД, ст. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, 614081, Пермь, e-mail: mar@iegm.ru

For citation: Kuznetsova M.V., Charuchina I.P., Maksimova A.V., Balandina S.Yu., Demakov V.A., Feldblum I.V. The epidemiological microbiological characteristics of cultures of *Candida albicans* circulating in hospital for HIV-infected patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (4): 246-251. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-246-251>*

For correspondence: Kuznetsova M.V., doctor of medical sciences, associate professor of the chair of laboratory molecular microbiology and biotechnology. e-mail: mar@iegm.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.11.2016
Accepted 15.01.2017

Спектр микромицетов, выделяемых от ВИЧ-инфицированных людей, за последнее время существенно расширился. Тем не менее, представители рода *Candida* по-прежнему остаются наиболее значимыми этиопатогенами. В зависимости от формы заболевания, по разным данным, на долю *Candida albicans* приходится от 30 до 80% всех дрожжеподобных грибов, что обусловлено высоким уровнем их бессимптомного носительства [1—5, 11, 12]. Самое большое число поражений отмечают в полости рта; далее по убыванию встречаются персистирующий вульвовагинит, инвазивный кандидоз, кандидоз пищевода и поверхностный кандидоз кожи [5].

Инфицирование кандидами может происходить как эндогенным, так и экзогенным путем [6, 12—15]. Длительность пребывания пациентов в стационаре способствует их колонизации внутрибольничными штаммами, поэтому состояние специализированных отделений медицинских организаций, где по результатам ряда исследований выявлено преобладание грибковой флоры над бактериальной, играет немаловажную роль [7]. Ряд вопросов по эпидемиологии внутрибольничных кандидозов ВИЧ-инфицированных пациентов, таких как установление резервуаров, источников и путей передачи инфекции, особенности циркуляции *C. albicans* в больничной среде, остается без ответа. Решение проблемы без применения современных молекулярных методов исследования не представляется возможным. Кроме того, самостоятельный интерес представляет генотипическая характеристика *C. albicans*, изолированных от пациентов и с объектов больничной среды специализированного стационара.

Использование рибосомных последовательностей при идентификации и генотипировании широко применяют для микромицетов, включая *C. albicans* [16, 17]. М. McCullough и соавт. [18] предложили с помощью полимеразной цепной реакции по конечному продукту (специфический-ПЦР) с использованием праймера, предназначенного для перекрытия интронного региона гена 25S рРНК, классифицировать штаммы *C. albicans* на 4 генотипа по длине получаемого ПЦР-продукта. Хорошую дискриминирующую способность на штаммовом уровне имеют методы, в основе которых лежит использование праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся последовательностям ДНК. Так, несколько исследований показали, что ПЦР повторяющихся внегенных полиндромных последовательностей (repetitive estrogenic palindromic sequence PCR; реп-ПЦР) хорошо коррелировала с пульс-электрофорезом — молекулярной технологией, которая признана золотым стандартом в изучении эпидемиологии микроорганизмов [19—21].

Цель исследования — микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика культур *C. albicans*, изолированных в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов с оценкой их эпидемиологической значимости.

Материал и методы. Исследовано 70 штаммов *C. albicans*, изолированных в специализированном отделении Пермской краевой клинической инфекционной больницы в июле 2013 г. (скрининговое исследование) и в октябре 2014 г.

(проспективное эпидемиологическое наблюдение). Из них 45 штаммов выделены от 19 пациентов (колонизация и инфекция), 25 штаммов — с объектов больничной среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки).

Виды штаммов идентифицировали по культурально-морфологическим признакам согласно Приказу № 535 от 22.04.1985 г., МУК 4.2.2942—11. Определение чувствительности штаммов к амфотерицину, флюконазолу и кетоконазолу проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890—04, NCCLS M44-P, 2003. Активность фосфолипазы и протеазы оценивали согласно М.Ф. Price и соавт. (1982), R. Ruchel и др. (1982) в модификации Т.И. Карпуниной и соавт. (2006) [8, 22, 23].

Тотальную ДНК выделяли модифицированным методом, предложенным J. Marmur (1999). Генетическое типирование штаммов проводили посредством трех методов: на основе детерминации последовательности интронной области гена 25S рРНК с праймерами CA-INT-L (5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTA) и CA-INT-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGAT) [17], ERIC-ПЦР (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences) с праймером ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG) [24] и RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) с произвольными праймерами A, 6, 13 [25]. Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Протокол ПЦР для пары CA-INT-L/CA-INT-R: начальный цикл — 96°C, 2 мин, затем 30 циклов (денатурация — 96°C, 30 с, отжиг — 60°C, 3 с, элонгация — 74°C, 30 с), заключительный цикл — 72°C, 3 мин. Температура и время отжига при проведении ERIC- и RAPD-ПЦР: 45°C — 1 мин и 36°C — 30 с соответственно. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2% агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Дендрограммы филогенетического родства штаммов построены с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1, Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2000 и программы Statistica 6.0. При анализе полученных результатов определяли среднее арифметическое и его ошибку ($M \pm m$). Достоверность отличий двух независимых выборок определяли по критерию Манна—Уитни (M-U test). При $p < 0,05$ делали вывод о наличии статистически значимой разницы между сравниваемыми выборками. Сравнение качественных признаков выполняли с использованием коэффициента ассоциации Fisher (φ-критерий) и вычислением χ^2 .

Результаты. При оценке распространенности кандид в зева и на коже ВИЧ-инфицированных пациентов выявлено их достоверное преобладание в зева ($p = 0,0199$). В крови *C. albicans* встречались значительно реже, чем в сайтах персистирующего данного вида ($p < 0,005$). Генетическая дискриминация на основе гена 25S рРНК позволила распределить

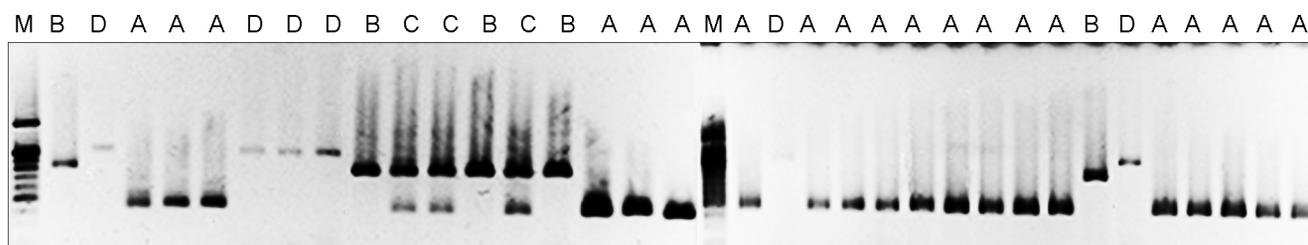


Рис. 1. Пример электрофореграмм продуктов амплификации интронной области гена 25S рРНК *C. albicans*. М — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 kb; А, В, С, D — определенный генотип клинического изолята.

все культуры *C. albicans* в 4 геномгруппы (рис. 1): генотип А (450 п. н.), генотип В (840 п. н.), генотип С (450 и 840 п. н.), а также генотип D (1080 п. н.), выделенный D.J. Sullivan и соавт. [26, 27] в *Candida dubliniensis*, но таксономический статус последнего как отдельного вида вызывает дискуссии из-за недостаточного количества фенотипических и генетических признаков. Частота встречаемости кандид А, В, С и D генотипов составила 58,6, 10, 18,6 и 12,8% соответственно. Грибы *C. albicans*, отнесенные к генотипу А, преобладали как у пациентов (44,5%), так и в группе изолятов с предметов больничной среды (84%) (см. таблицу). Второй по значимости оказалась группа с генотипом С, самым малочисленным — представительство культур генотипов В и D, при этом последние обнаружены только в экологических биотопах без признаков кандидозной инфекции. Показано, что штаммы *C. albicans*, относящиеся к различным генотипам, за исключением генотипа D, могут сохраняться/циркулировать на предметах больничной среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки).

При оценке частоты встречаемости *C. albicans* различных генотипов в материалах ВИЧ-инфицированных пациентов и предметах больничной среды выявлено, что культуры генотипа А достоверно чаще выделяли с предметов больничной среды ($p = 0,0013$), а генотипа D — от пациентов ($p = 0,0141$). Преимущественного сайта выделения культур, принадлежащих к определенному генотипу, при сравнении взятых биотопов (зев и другие, кожные покровы и другие и т.д.) не обнаружено ($p \geq 0,05$). Тем не менее, анализ распределения кандид в биотопах показал, что *C. albicans* генотипа А встречаются достоверно чаще у пациентов и на предметах больничной среды, чем представители других генотипов ($p < 0,05$).

Интересным представлялось оценить биологические свойства *C. albicans*, отнесенных к разным генотипам. Фосфолипазная активность ($M \pm m$) составила $2,86 \pm 0,38$, $2,52 \pm 0,31$, $2,49 \pm 0,35$ и $1,86 \pm 0,48$ усл. ед. для культур генотипов А,

В, С и D соответственно. Уровень протеазной активности для соответствующих групп — $1,4 \pm 0,56$, $1,33 \pm 0,33$, $1,72 \pm 0,86$ и $1,24 \pm 0,15$ усл. ед. Выявлена умеренная корреляция между данными свойствами ($r = 0,5046$; $p = 0,05$). Обращает на себя внимание, что культуры генотипа D проявляли наименьшую ферментативную активность в обоих случаях, хотя разница с кандидами других генотипов оказалась статистически незначимой во всех вариантах (M-U test: $p > 0,05$). Показательно, что не обнаружено достоверных отличий в активности фосфолипазы и протеазы для групп изолятов из разных биотопов (фосфолипаза: $2,51 \pm 0,42$ усл. ед. — зев, $2,63 \pm 0,14$ усл. ед. — кожные покровы, $2,62 \pm 0,03$ усл. ед. — кровь; протеаза: $1,49 \pm 0,43$ усл. ед. — зев, $1,32 \pm 0,57$ усл. ед. — кожные покровы), а также от пациентов из больничной среды (M-U test: $p > 0,05$). При анализе чувствительности *C. albicans* к антимикотикам выявлено, что все культуры были чувствительны к амфотерицину и флуконазолу. К кетоконазолу были устойчивы 9 штаммов генотипа А и 3 штамма генотипа В, тогда как в группе С и D все культуры были чувствительными.

Специальное исследование было направлено на оценку длительности циркуляции *C. albicans* в стационаре и определение эпидемиологических связей. Анализ 38 штаммов, выделенных в два этапа/срока из разных локусов пациентов в 2014 г., показал, что у 11 человек при поступлении в отделение во всех материалах обнаружены культуры одного генотипа, у 3 больных — культуры разных генотипов. Через неделю у 12 пациентов выделялись штаммы идентичных генотипов, при этом в 5 случаях к уже имеющимся присоединились штаммы, принадлежащие к другому генотипу, а в 2 произошла полная смена культур. Таким образом, в большинстве случаев во всех материалах, взятых из различных локусов пациента, присутствовали штаммы сходного генотипа. Это подтверждает возможность эндогенного инфицирования. В момент поступления, а особенно после пребывания в стационаре одновременно от одного больного могли быть выделены штаммы *C. albicans*, относящиеся к разным генотипам, что обусловлено экзогенным путем инфицирования, особенно в условиях высокой обсемененности объектов больничной среды.

Молекулярный скрининг, ориентированный на внутривидовую дифференцировку выделенных культур, проводили с помощью технологии Rep-ПЦР, хорошо зарекомендовавшей себя для типирования кандид [28]. Для общей характеристики и формирования геномгрупп использовали ERIC-ПЦР, в сомнительных случаях для улучшения дискриминации использовали RAPD-ПЦР с 3 праймерами, что считается обязательным при данном способе типирования [29]. В результате сравнительного анализа культуры *C. albicans* распределились в 9 геномгруппах, включающих идентичные или близкородственные изоляты, и 30 изолятов представляли индивидуальные геномоварианты (рис. 2, см. обложку). В состав геномгрупп IV и VII входили штаммы, выделенные только с объектов внешней среды стационара и рук больных, в остальных

Распределение штаммов *C. albicans*, относящихся к различным генотипам по 25S рРНК, с учетом источника выделения

Источник выделения	Число штаммов, n/%				
	общее	генотип			
		А	В	С	Д
Пациенты, всего	45	20/44,5	6/13,3	10/22,2	9/20,0
Зев	26	9/34,6	3/11,5	8/30,8	6/23,1
Кожные покровы	15	8/53,3	2/13,3	2/13,3	3/20,0
Кровь	4	3/75,0	1/25,0	—	—
Предметы больничной среды	25	21/84,0	1/4,0	3/12,0	—
Всего...	70	41/58,6	7/10	13/18,6	9/12,8

присутствовали изоляты, полученные как с объектов больничной среды, так и из нестерильных локусов (зев) обследованных пациентов. Значительный интерес представляла геномгруппа VI, в которую вошел изолят, выделенный из крови пациентки Г. с инвазивным кандидозом (№ 60), а также изоляты из зева больного Д. и с объектов больничной среды в этой же палате (№№ 26, 56, 58, 59). Более того, сравнительный анализ ДНК *C. albicans*, полученных в разные сроки, показал, что штамм, изолированный из крови пациентки Пк. с инвазивным кандидозом (2013), и культуры геномгруппы VI (2014) полностью идентичны и принадлежат к генотипу А на основе типирования 25S рРНК (рис. 3), т. е. инвазивный кандидоз у двух больных, госпитализированных в разное время, вызван одним штаммом *C. albicans*. Кроме того, этот же штамм циркулировал во внешней среде инфекционного стационара и оказался причиной кандидозного поражения полости рта других пациентов, которые не были связаны между собой вне лечебного учреждения. По-видимому, пациентка, находившаяся на лечении в стационаре в июле 2013 г., стала источником контаминировавшего объекты больничной среды отделения госпитального штамма *C. albicans*, который вызвал поражение полости рта и инвазивный кандидоз больных, госпитализированных в 2014 г.

Обсуждение. Известно, что у здоровых лиц *C. albicans* могут кратковременно или в течение длительного периода колонизировать кожные покровы, слизистые оболочки и пищеварительный тракт. «Доброкачественность поведения» кандид у здоровых лиц не обусловлена комменсализмом, а скорее служит результатом сильных врожденных и адаптивных реакций иммунной системы хозяина, которые ограничивают рост потенциально опасного микроорганизма в экологических биотопах [30]. Присутствие генотипически сходных кандид в различных локусах или их длительное персистирование в пределах одного способствует альтерации, определяющей начальную фазу воспаления. В организме иммунокомпрометированных людей чрезмерный рост *C. albicans* вкупе с повреждением слизистой в местах микробного обсеменения может облегчить последующую инвазию в ткани и/или их гематогенную транслокацию, вызывая различные, в том числе и системные кандидозы [29]. Возрастающая частота инвазивных кандидозов и высокая смертность, связанная с диссеминированной формой заболевания, актуализируют молекулярные исследования для понимания эпидемиологии грибковых инфекций.

Генотипическая характеристика кандид на основе по-

следовательности интронной области 25S рРНК позволила выявить преобладание *C. albicans* генотипа А в различных локусах пациентов и на объектах больничной среды в специализированном стационаре. Учитывая, что представители *C. albicans* этого генотипа составляют большинство при поверхностных кандидозах (75,6%) [31], орально кандидозе (57,1%) и часто выделяются со слизистой полости рта у здоровых лиц (64,7%) [16], преимущественное распространение их у ВИЧ-инфицированных людей вполне ожидаемо. Результаты, показывающие, что *C. albicans* генотипа D обнаружены только в экологических биотопах без признаков кандидозной инфекции согласуются с исследованием Y. Takagi и соавт. [16], в котором культуры данного генотипа были обнаружены только у здоровых людей, но не у больных кандидозом. Интересно, что в этой же работе подчеркнуто, что кандиды генотипа С встречались только в группе пациентов с кандидозной инфекцией. По нашим данным, представители этой группы у ВИЧ-инфицированных пациентов обнаруживались на коже и в зеве без признаков инфекционного процесса.

Считается, что из внешней среды *C. albicans* выделяются реже, чем другие виды кандид, что может быть следствием их большей патогенности (адаптации к паразитизму) для человека [32]. Предметы больничной среды контаминировали представители 3 генотипов, со значительным преобладанием *C. albicans* генотипа А, который доминировал и у пациентов ($p < 0,05$). Встречаемость *C. albicans* генотипа А показана в подавляющем большинстве исследований, где использовали типирование на основе гена 25S рРНК, но соотношение кандид различных генотипов в клинических образцах варьировало и отличалось среди сообщений [16, 17, 31]. Однако в единственном исследовании, где определяли связь между генотипом культуры и источником изоляции, существенной разницы в распределении кандид не выявлено [33]. Преимущественного сайта выделения культур, принадлежащих к определенному генотипу, при сравнении взятых биотопов (зев и другие, кожные покровы и другие и т.д.) у ВИЧ-инфицированных пациентов в представленной работе также не обнаружено ($p > 0,05$).

Патогенность кандид обусловлена в первую очередь продукцией фосфолипазы [34] и протеазы [35]. Выявлено, что уровень активности данных ферментов у *C. albicans*, изолированных у ВИЧ-позитивных людей, по принятой классификации определен как средний и высокий [36]. Ранее M. Ollert и соавт. [37] показали, что протееолитическая актив-

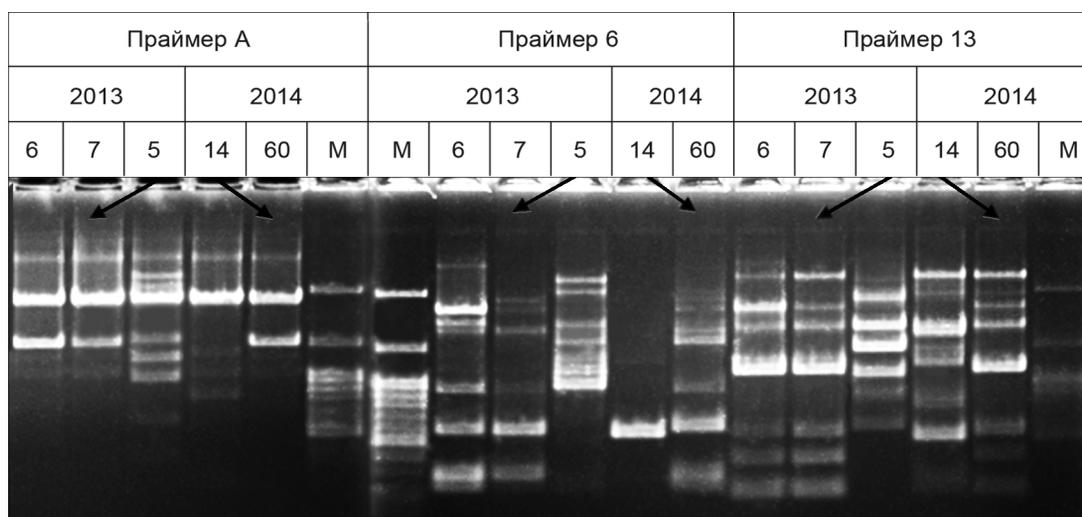


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов RAPD-ПЦР с использованием праймеров А, 6, 13. М — маркеры молекулярных масс 100 bp и 1 kb; №№ — изоляты *C. albicans*, выделенные от больных.

ность культур, выделенных от больных СПИДом, была выше, чем от не зараженных вирусом, и доказали важность фермента в патогенезе орального кандидоза при ВИЧ-инфекции. Сходные данные получены и в отношении фосфолипазы [38]. Впервые проведена оценка и сравнение биологических свойств *C. albicans* разных генотипов. Фосфолипазная активность убывала в ряду $A > B > C > D$, протеазная активность — в ряду $C > A > B > D$. Кандиды генотипа D проявляли наименьшую ферментативную активность в обоих случаях, что может быть косвенным подтверждением того, что культуры данного генотипа, по-видимому, редко становятся возбудителями кандидозов, а присутствуют как транзитная факультативная микрофлора, в том числе и у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

В настоящее время отмечают рост резистентности *C. albicans* к флуконазолу [9, 29]. В сообщениях об устойчивости кандид к антимикотикам, выделенными от ВИЧ-инфицированных пациентов, приведены сильно отличающиеся показатели. Например, только 43,8% культур *C. albicans*, изолированных у ВИЧ-позитивных людей с хронической патологией ЛОР-органов, были чувствительны к флуконазолу [10]. В другом исследовании флуконазол-резистентный орофарингеальный кандидоз был выявлен в 38,4% случаев [4]. В работе Р.А. Khan и соавт. [39] изолировано 10,3% резистентных *C. albicans*. В нашем исследовании все культуры оказались чувствительны к данному препарату, и только несколько штаммов генотипов А и В показали устойчивость к кетоконазолу.

В большинстве случаев во всех материалах, взятых из различных локусов пациента, присутствовали штаммы сходного генотипа, и это подтверждает возможность эндогенного инфицирования пациентов *C. albicans*. Так, в исследовании Н. Hattori и соавт. [31] выявлено, что штаммы, изолированные из комменсальных областей (паховая область, желудочно-кишечный тракт), были идентичны культурам, вызывающим впоследствии поверхностный кандидоз этих пациентов. В другой работе показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов рецидивирующий оральный кандидоз после лечения антимикотиками, как правило, был вызван тем же самым штаммом. При этом одновременно от одного больного могли быть выделены штаммы, относящиеся к разным генотипам, что в условиях высокой обсемененности кандидами объектов внешней среды стационара вполне объяснимо. Например, описано персистенция 3 различных MLST-вариантов *C. albicans* (определенных путем мультилокусного сиквенс-типирования) у одного пациента с инфекцией кровотока в короткий период времени (10 дней) [41]. Таким образом, полученные данные в целом согласуются с опубликованными ранее исследованиями зарубежных авторов, которые все же подчеркивали, что мультивариантность культур встречается чаще в группе здоровых лиц (при комменсализме), чем при кандидозной инфекции [16, 42].

Сравнительный анализ ДНК *C. albicans*, полученных в разные сроки, показал, что штаммы, изолированные из крови пациентов с инвазивным кандидозом в 2013 и 2014 гг., принадлежат к генотипу А на основе ПЦР гена 25S рРНК и полностью идентичны в различных реакциях гер-ПЦР, т. е. инвазивный кандидоз у двух больных, госпитализированных в разное время, вызван одним штаммом. Кроме того, этот же штамм циркулировал во внешней среде инфекционного стационара и служил причиной кандидозного поражения полости рта других пациентов, которые не были связаны между собой вне лечебного учреждения. Можно полагать, что больничная среда становится резервуаром кандид, которые далее контактно-бытовым путем через различные предметы и объекты внешней среды передаются другим пациентам и могут вызывать различные виды кандидозной инфекции.

Заключение. В результате проведенного исследования с использованием молекулярно-генетических методов выяс-

нены и уточнены эпидемиологические аспекты кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Установлено, что сами больные с носительством или различными формами инфекции служат источником *C. albicans*, которые контаминируют предметы больничной среды и, что существенно важно, могут длительно на них циркулировать и передаваться контактно-бытовым путем новым поступающим в стационар пациентам. Некоторые из кандид становятся комменсалами на коже и слизистых оболочках, другие — вызывают поверхностные и/или инвазивные кандидозы с тяжелым течением и летальностью. В больничной среде могут формироваться и длительно циркулировать госпитальные штаммы *C. albicans*, обладающие ферментативной активностью, сопоставимой с активностью штаммов, изолированных от пациентов, что повышает риск возникновения кандидозной инфекции в стационарах для лечения ВИЧ-инфицированных больных.

Впервые дана генотипическая характеристика изолированных в специализированном стационаре кандид на основе последовательности интронной области гена 25S рРНК, а также отмечены их биологические особенности с учетом генотипа. Показано, что у ВИЧ-инфицированных людей могут быть выделены *C. albicans* разных генотипов. При этом в нескольких биотопах одного пациента, как правило, персистирует единственный штамм, но возможно одномоментное выделение и генотипически отличных культур. Выявлено существование преобладание *C. albicans* генотипа А в различных комменсальных (зев) и транзитных (кожные покровы) локусах, и они же чаще всего были причиной кандидозной инфекции, в том числе инвазивного кандидоза. Показано, что в отличие от других представители именно этой группы контаминируют предметы окружающей среды (тумбочки, ручки дверей, вентиляционные решетки). Обращает на себя внимание, что культуры *C. albicans* генотипа D оказались самыми малочисленными, были обнаружены только в экологических биотопах пациентов без клиники кандидоза, они не контаминировали предметы больничной среды, проявляли наименьшую активность экзоферментов (фосфолипазы и протеазы) и были чувствительны к протестированным антимикотикам. Характеристика различных субпопуляций, в том числе на основе генотипов, и корреляции с распространенностью, клиническими проявлениями (персистенция, инфекционный процесс), могут иметь значение для объяснения взаимоотношений *C. albicans* (комменсализм или патогенность) с организмом здорового или иммунокомпромитированного хозяина и понимания патогенеза кандидоза.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 11—42 см. REFERENCES)

1. Андреев В.А., Зачиняева А.В., Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., ред. *Медицинская микология*. Руководство. М.: ГЭОТАР — Медиа; 2008.
2. Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В. *Диагностика микозов*. СПб.: Издательский дом СПбМАИ; 2004.
3. Дрожжина В.А., Каспина А.И., Степанова Е.В., Виноградова А.Н. Кандидоз слизистой оболочки рта у больных ВИЧ-инфекцией на фоне проведения антиретровирусной терапии. *Институт стоматологии*. 2008; 2(39): 74—6.
4. Михед Т.М., Красавцев Е.Л., Редько Д.Д. Кандидоз ротовой полости у ВИЧ-инфицированных. *Проблемы здоровья и экологии*. 2010; (1): 43—7.
5. Баринаева А.Н., Плавинский С.Н., Зайцева Е.Е. Микозы у ВИЧ-инфицированных больных. *Проблемы медицинской микологии*. 2012; 14(2): 34—8.
6. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А., ред. Candida. Кандидозы. *Лабораторная диагностика*. СПб.: Коста; 2010.

7. Чарушина И.П. Сравнительный анализ микобиоты стационаров различного профиля. *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17(1): 47—51.
8. Карпунина Т.И., Олина А.А., Машуров М.Г., Чемуриева Н.В., Драбкова В.А. Фосфолипазы оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов. *Проблемы медицинской микологии*. 2006; 8(4): 41—6.
9. Корнишева В.Г., Могилева Е.Ю. Микозы при ВИЧ-инфекции. Обзор литературы. *Проблемы медицинской микологии*. 2013; 15(4): 10—9.
10. Щемерова М.С., Затолока П.А. Чувствительность грибов рода *Candida*, выявленных у ВИЧ-инфицированных пациентов, имеющих хроническую инфекционно-воспалительную патологию ЛОР-органов. *Оториноларингология восточная Европа*. 2015; (2): 69—73.

REFERENCES

1. Andreev V.A., Zachinyaeva A.V., Moskalev A.V., Sboychakov V.B., eds. *Medical Mycology. Guide* [Медицинская микология. Рукводство]. Moscow: GEOTAR — Media; 2008. (in Russian)
2. Araviyskiy R.A., Klimko N.N., Vasil'eva N.V. *Diagnosis of Fungal Infections [Diagnostika mikofov]*. St. Petersburg: Izdatel'skiy dom SPbMAP; 2004. (in Russian)
3. Drozhzhina V.A., Kaspina A.I., Stepanova E.V., Vinogradova A.N. Candidiasis of the oral mucosa in patients with HIV infection on a background antiretroviral therapy. *Institut stomatologii*. 2008; 2(39): 74—6. (in Russian)
4. Mikhed T.M., Krasavtsev E.L., Red'ko D.D. Candidiasis of the oral cavity in HIV-infected. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2010; (1): 43—7. (in Russian)
5. Barinova A.N., Plavinskiy S.N., Zaytseva E.E. Mycoses in HIV-infected patients. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2012; 14(2): 34—8. (in Russian)
6. Elinov N.P., Vasileva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A., eds. *Candida. Candidiasis. Laboratory diagnosis [Candida. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika]*. St. Petersburg: Kosta; 2010. (in Russian)
7. Charushina I.P. Comparative analysis of the mycobiota of hospitals. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2015; 17(1): 470—51. (in Russian)
8. Karpunina T.I., Olina A.A., Mashurov M.G., Chemurzieva N.V., Drabkova V.A. Phospholipase of opportunistic fungi: their possible role in the pathogenesis and diagnosis of fungal infections. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2006; 8(4): 41—6. (in Russian)
9. Kornisheva V.G., Mogileva E.Yu. Mycoses in HIV infection. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2013; 15(4): 10—9. (in Russian)
10. Shchemerova M.S., Zatoloka P.A. The sensitivity of fungi of the genus *Candida* were detected in HIV-infected patients with chronic infectious-inflammatory pathology of ENT organs. *Otorinolaringologiya vostochnaya Evropa*. 2015; (2): 69—73. (in Russian)
11. Owotade F.J., Patel M. Virulence of oral *Candida* isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol*. 2014; 118(4): 455—60.
12. Ribeiro Ribeiro A.L., de Alencar Menezes T.O., de Melo Alves-Junior S., de Menezes S.A., Marques-da-Silva S.H., Rosário Vallinoto A.C. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol*. 2015; 120(1): 29—33.
13. Brusselaers N., Blot S., Vogelaers D. Deep-seated *Candida* infections in the Intensive Care Unit. *Neth. J. Crit. Care*. 2011; 15(4): 184—90.
14. Eggimann P., Garbino J., Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis*. 2003; 3(11): 685—702.
15. Nucci M., Anaisse E.J. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33(12): 1959—67.
16. Takagi Y., Fukano H., Shimozato K., Tanaka R., Horii T., Kawamoto F. et al. Genotypes of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J. Infect. Chemother*. 2013; 19(6): 1072—9.
17. Iwata T., Hattori H., Chibana H., Mikami Y., Tomita Y., Kikuchi A. et al. Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). *J. Dermatol. Sci*. 2006; 41(1): 43—54.
18. McCullough M.J., Clemons K.V., Stevens D.A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 37(2): 417—21.
19. Chen K.W., Lo H.J., Lin Y.H., Li S.Y. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J. Med. Microbiol*. 2005; 54(Pt.3): 249—58.
20. Costa F., Manaia C.M., Figueira M.H., Pinto E. Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. *Let. Appl. Microbiol*. 2008; 46(4): 445—9.
21. Lopez-Ribot J.L., McAtee R.K., Kirkpatrick W.R., Perea S., Patterson T.F. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Rev. Iberoam. Micol*. 2000; 17(2): 49—54.
22. Price M.F., Wilkison I.D., Gentry L.O. Plate methods for detection of phospholipase in *Candida albicans*. *Saboraudia*. 1982; 20(1): 7—14.
23. Ruchel R., Tgegeler R., Trost M. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. *Saboraudia*. 1982; 20(3): 233—44.
24. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823—31.
25. Haase A., Melder A., Smith-Vaughan H., Kemp D., Currie B. RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiol. Infect*. 1995; 115(1): 115—21.
26. Sullivan D.J., Westerneng T.J., Haynes K.A., Bennett D.E., Coleman D.C. *Candida dubliniensis* sp nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995; 141(Pt.7): 1507—21.
27. Imran Z.K. *Candida albicans* ssp. *dubliniensis* stat. et comb. nov., a new combination for *Candida dubliniensis* based on genetic criteria. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2015; 9(17): 1205—14.
28. Abaci O., Haliki-Uztan A., Ozturk B., Toksavul S., Ulusoy M., Boyacioglu H. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from denture wearers by repetitive sequence-based PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2011; 30(2): 141—9.
29. Moris D.V., Melhem M.S., Martins M.A., Mendes R.P. Oral *Candida* spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2008; 14(2): 224—57.
30. Cassone A., Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012; 26(12): 1457—72.
31. Hattori H., Iwata T., Nakagawa Y., Kawamoto F., Tomita Y., Kikuchi A., Kanbe T. Genotype analysis of *Candida albicans* isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS. *J. Dermatol. Sci*. 2006; 42(1): 31—46.
32. Dignani M.C., Solomkin J.S., Anaisse E., McGinnis M.R., Pfaller M.A., eds. *Candida. Medical Mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone*; 2003.
33. Millar B.C., Xu J., McMullan R., Walker M.J., Hedderwick S., Moore J.E. Frequency and distribution of group I intron genotypes of *Candida albicans* colonizing critically ill patients. *Br. J. Biomed. Sci*. 2005; 62(1): 24—7.
34. Ibrahim A.S., Mirbord F., Filler S.G., Banno Y., Cole G.T., Kitajima Y. et al. Evidence implicating phospholipases as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun*. 1995; 63(5): 1993—8.
35. Hube B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev. Iberoam. Micol*. 1998; 15(2): 65—8.
36. Menezes T.O., Gillet L.C., Menezes S.A., Feitosa R.N., Ishak M.O., Ishak R. et al. Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. *Curr. HIV Res*. 2013; 11(4): 304—8.
37. Ollert M.W., Wende C., Gorlich M., Macmullan-Vogel C.G., Borg-von Zeppelin M., Vogel C. et al. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33(10): 2543—9.
38. De Paula Menezes R., de Melo Riceto E.B., Borges A.S., De Brito Röder D.V., Dos Santos Pedroso R. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch. Oral. Biol*. 2016; 66: 61—5.
39. Khan P.A., Malik A., Khan H.S. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran. J. Microbiol*. 2012; 4(4): 204—9.
40. Sangeorzan J.A., Bradley S.F., He X., Zarins L.T., Ridenour G.L., Tiballi R.N. et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med*. 1994; 97(4): 339—46.
41. Da Matta D.A., Melo A.S., Guimarães T., Frade J.P., Lott T.J., Colombo A.L. Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Med. Mycol*. 2010; 48(5): 757—62.
42. Shimizu K., Hattori H., Adachi H., Oshima R., Horii T., Tanaka R. et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida albicans* isolated from patients with superficial candidiasis. *Med. Mycol. J*. 2011; 52(2): 129—38.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.327.2+618.151-008.87-078

Кунгурцева Е.А.¹, Белькова Н.Л.^{1,2}, Приставка А.А.³, Иванова Е.И.¹, Даренская М.А.¹, Сердюк Л.В.¹, Лещенко О.Я.¹

СТРУКТУРА УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОБИОТЫ НОСОГЛОТКИ И ВАГИНАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ И ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

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

² ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН, 664033, Иркутск;

³ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», 664003, Иркутск

Изучен микробиоценоз носоглотки и вагинального тракта у женщин с репродуктивными нарушениями и хроническим эндометритом (ХЭ). Женщины разделены на две группы; в первую группу включены женщины с морфологически верифицированным хроническим эндометритом (n = 65), во вторую — группу сравнения — женщины без хронического эндометрита (n = 32). У 21 из 65 женщин первой группы выявлен хронический тонзиллит (ХТ), в группе сравнения — у 9. В исследованных биотопах отмечено сходство ведущих инфекционных агентов: стафилококков, энтерококков, кишечной палочки. В носоглоточном биотопе нормоценоз выявлен в первой и второй группе в 33,3 и 45,0% случаев соответственно. Первая степень дисбиоза диагностирована в обеих группах с равной частотой (55,5%), вторая степень дисбиоза определена только у женщин с ХЭ и ХТ (11,1%).

Ключевые слова: хронический эндометрит; хронический тонзиллит; условно-патогенная микробиота; носоглотка; вагинальный тракт; бесплодие; невынашивание беременности.

Для цитирования: Кунгурцева Е.А., Белькова Н.Л., Приставка А.А., Иванова Е.И., Даренская М.А., Сердюк Л.В., Лещенко О.Я. Структура условно-патогенной микробиоты носоглотки и вагинального тракта у женщин с репродуктивными нарушениями и хроническим эндометритом. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 252-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-252-256>

Kungurtseva E.A.¹, Belkova N.L.^{1,2}, Pristavka A.A.³, Ivanova E.I.¹, Darenskaya M.A.¹, Serdyuk L.V.¹, Leschenko O.Ya.¹

THE STRUCTURE OF OPPORTUNISTIC MICROBIOTA OF NASOPHARYNX AND VAGINAL TRACT IN WOMEN WITH REPRODUCTION DISORDERS AND CHRONIC ENDOMETRITIS

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

²The limnologic institute of the Siberian branch of the Russian academy of sciences, 664033 Irkutsk, Russia

³The Irkutskii state university, 664033 Irkutsk, Russia

The study was carried out to investigate microbiocenosis of nasopharynx and vaginal tract in women with reproductive disorders and chronic endometritis. The females were separated on two groups. The first group included females with morphologically verified chronic endometritis (n=32). The second group included females without chronic endometritis (n=32). The chronic tonsillitis was established in 21 out of 65 females from first group and in comparison group only in 9 females. In the analyzed biotypes resemblance of main infection agents (staphylococcus, enterococcus, colibacillus) was established. In nasopharynx biotope normocenosis was established in first and second groups in 33.3% and 45% of cases correspondingly. The first degree of dysbiosis was determined in both groups with equal rate (55.5%), second degree of dysbiosis was established only in women with chronic endometritis and chronic tonsillitis (11.1%).

Key words: chronic endometritis; chronic tonsillitis; opportunistic microbiota; nasopharynx; vaginal tract; infertility; pregnancy miscarriage.

For citation: Kungurtseva E.A., Belkova N.L., Pristavka A.A., Ivanova E.I., Darenskaya M.A., Serdyuk L.V., Leschenko O.Ya. The structure of opportunistic microbiota of nasopharynx and vaginal tract in women with reproduction disorders and chronic endometritis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 252-256. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-252-256>

For correspondence: Kungurtseva E.A., junior researcher of laboratory of microecology. e-mail: ekaterina_kozlova_84@bk.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 09.12.2016
Accepted 15.01.2017

Введение. Микробиом влагалища — динамичная среда с резкими изменениями в видовом составе и количестве бактерий. В его состав входят различные микроорганизмы: грамположительные и грамотрицательные аэробные, факультативно-анаэробные, облигатно-анаэробные (лактобациллы, бифидобактерии, коринебактерии, различные стреп-

тококки, эшерихии, пептококки, пептострептококки и др.), в том числе те, которые в определенных условиях способны инициировать воспалительный процесс [1]. По мнению А.И. Новикова [2], почти все микроорганизмы во влагалище могут принимать участие в воспалительном процессе. При клинических проявлениях воспалительного процесса в

Для корреспонденции: Кунгурцева Екатерина Александровна, мл. научн. сотр. лаб. микрoэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: ekaterina_kozlova_84@bk.ru

39,1% случаев встречается состояние микрофлоры влагалища, ассоциированное с избыточным содержанием лактобактерий в вагинальном секрете [3]. Многими исследователями отмечен рост клинической значимости условно-патогенной микрофлоры (УПМ) и представителей нормобиоты в патогенезе постспецифических воспалительных и дегенеративно-дистрофических процессов в урогенитальном тракте. В последние 10—15 лет в мире прослеживается тенденция к снижению заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), на фоне нарастания частоты выявления представителей УПМ, что может осложнить течение основного заболевания или стать непосредственной причиной воспалительных изменений урогенитального тракта [4].

Среди основных причин, ведущих к росту оппортунистических инфекций, большинство авторов отмечают агрессивную антибактериальную терапию и увеличение контингента лиц с иммунодефицитом, в т. ч. и среди беременных [5].

Исследование Н.А. Гомболовской и соавт. [6] показало, что у женщин с измененными микроэкологическими параметрами вагинального биотопа риск восходящей инфекции и колонизации эндометрия УПМ в 3,6 раза выше, чем у пациенток с нормоценозом. При гистологически подтвержденном хроническом эндометрите (ХЭ) микроорганизмы в эндометрии выявляются в 73,1% случаев. При отсутствии морфологических признаков ХЭ микробы в слизистой оболочке матки выявляются только у 5% пациентов.

При исследовании 438 женщин с ХЭ частота выявления инфекционных агентов во влагалище и в эндометрии этих женщин составила соответственно 58 и 73%, а в группе сравнения 5 и 41% ($n = 100$) [7].

В значительной степени резервы противостояния репродуктивной функции организма инфекции определяются наличием и характером течения других экстрагенитальных заболеваний. Хронический тонзиллит (ХТ), являющийся хроническим очагом инфекции в организме, снижает иммунитет и может вызывать развитие пиелонефрита, бесплодия, инфекционного эндокардита, ревматизма, полиартрита, аднексита [8]. Исследована взаимосвязь ХТ с воспалительными заболеваниями женских внутренних половых органов, с тиреоидной патологией [9]. Частота ХТ среди взрослых людей достигает 45%, причем подчеркивается ассоциация заболевания с женским полом [10]. Прослеживается некоторая аналогия изменений в эндометрии при ХЭ у женщин с хроническим тонзиллитом [11]. Неоспоримым остается факт, что более 100 соматических заболеваний, по данным ВОЗ, могут быть сопряжены с ХТ [12].

Таблица 1

Сочетание морфологических признаков ХЭ у женщин с репродуктивными нарушениями, n (%)

Частота сочетания признаков		Воспалительные инфильтраты	Плазматические клетки	Фиброз стромы	Склеротические стенки артерий
абс.	%				
11	33,3	+	-	-	-
6	18,2	+	+	-	-
5	15,2	+	-	-	+
3	9,1	+	+	+	+
2	6,1	+	-	+	-
2	6,1	-	+	-	-
1	3,0	+	+	+	-
1	3,0	+	+	-	+
1	3,0	-	-	+	+

Цель исследования — определить структуру условно-патогенной микрофлоры носоглоточного и вагинального тракта у пациенток с хроническим эндометритом и хроническим тонзиллитом.

Материал и методы. В исследование включены 97 женщин с репродуктивными нарушениями, обратившиеся в клинику ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, с жалобами на бесплодие или невынашивание беременности в период 2013—2016 гг. Выявленные гинекологические и соматические нарушения рубрифицированы в соответствии с МКБ-10.

Основная группа — женщины с репродуктивными нарушениями и хроническим эндометритом ($n = 65$) в возрасте 18—40 лет (средний возраст $31,0 \pm 5,3$ года). Хронический эндометрит диагностирован на основании морфологических признаков при гистологическом исследовании эндометрия. Забор эндометрия проводили методом пайпель-биопсии на 5—11-й день менструального цикла. Дополнительно учитывались УЗ-критерии хронического эндометрита [13].

В группу сравнения вошли 32 женщины с репродуктивными нарушениями, сопоставимые по возрасту (средний возраст $31,5 \pm 5,9$ года). Хронический эндометрит у женщин этой группы не подтвержден гистологическим исследованием эндометрия.

При включении женщин в исследование соблюдались этические принципы, сформулированные Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра (Сеул, октябрь 2008 г.).

К УЗ-критериям хронического эндометрита у женщин основной группы отнесены следующие признаки: утолщение эндометрия, неровный контур эндометрия, изменения в стенке миометрия, расширение сосудов стенок матки, синехии в полости матки. Эхографические признаки хронического эндометрита выявлены у 86% женщин основной группы (изменения структуры эндометрия на М-эхо, т. е. срединном эхо): наличие участков повышенной эхогенности различной формы и величины в зоне срединного М-эхо — 66% случаев; асимметрия толщины передней и задней стенок эндометрия — 46%; неровность границ эндометрия в зоне М-эхо — 54%; истончение менее 8 мм — 56%. Эхоструктура эндометрия, не соответствующая фазе секреции, выявлена в 61% случаев. У каждой второй пациентки с ХЭ отмечали наличие нескольких из перечисленных признаков, чаще всего таких как утолщение эндометрия, неровный контур эндометрия и/или изменения в стенке миометрия.

По данным гистологического исследования эндометрия матки выявлены следующие признаки ХЭ: воспалительные лимфоидные инфильтраты в строме эндометрия, наличие плазматических клеток, склеротические изменения стенок спиральных сосудов эндометрия и очаговый фиброз стромы. Выявленные признаки сочетались следующим образом (табл. 1).

Материалом для исследования явились мазки из влагалища и носоглотки. Мазки из носоглотки взяты у женщин натощак с соблюдением правил асептики ватным тампоном в пробирку с транспортной средой. Посев материала на питательные среды осуществлялся не позднее чем через 2 ч после забора. Микробиологические исследования носоглоточного биотопа и микробиома влагалища проводились в соответствии с общепринятыми методиками [14—17].

Для сбора, транспортировки и хранения микроорганизмов использовали транспортную среду Amies без угля (модификация среды STUART, «HiMedia»).

Родовую и видовую идентификацию культур осуществляли на основании морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных микроорганизмов.

В вагинальном биотопе у женщин исследованных групп

Таблица 2

Микробиота вагинального и носоглоточного биотопов женщин исследованных групп, n (%) (2013—2015 гг.)

Микроорганизмы	Вагинальный биотоп		Носоглотка	
	1-я группа (основная, n = 53)	2-я группа (сравнения, n = 23)	1-я группа (основная, n = 45)	2-я группа (сравнения, n = 20)
Коагулазонегативные стафилококки (CNS)	25 (46,3%)	7 (30,4%)	31 (70%)	14 (70%)
<i>Enterococcus faecium</i>	11 (20,8%)	4 (17,4%)	22 (49%)	10 (50%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	11 (20,8%)	4 (17,4%)	9 (20%)	3 (15%)
<i>Candida spp.</i>	10 (18,5%)	4 (17,4%)	5 (11,1%)	0
<i>S. aureus</i>	4 (7,4%)	1 (4,4%)	28 (62%)	10 (50%)
<i>Streptococcus spp.</i>	4 (7,4%)	1 (4,4%)	*	*
<i>Escherichia coli</i>	8 (14,8%)	5 (21,7%)	2 (4%)	0
<i>Klebsiella spp.</i>	2 (4%)	0	2 (4%)	0
<i>Proteus spp.</i>	0	0	1 (2,2%)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	1 (2,2%)	0
<i>Corynebacterium spp.</i>	4 (7,4%)	4 (17,4%)	0	0
Дефицит лактобактерий	27 (50,9%)	7 (30,4%)	—	—
<i>Enterobacter spp.</i>	1 (2%)	0	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	—	—	5 (11,1%)	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	—	8 (17,8%)	2 (10%)
<i>Streptococcus sp. oralis</i>	—	—	15 (33,3%)	12 (60%)
<i>Streptococcus</i> β-гемолитический	—	—	19 (42%)	13 (65%)

Примечание. * — данные виды микроорганизмов описаны в таблице ниже; «—» — данный вид микроорганизмов не определялся.

определяли дефицит лактобактерий, характеризующийся ростом лактобактерий в количестве 3 Ig КОЕ/г и менее или полным отсутствием роста на питательной среде.

Статистическую значимость различий в распределениях частот выявления индигенной и УПМ и микробиологических типов носоглоточного биотопа у пациенток основной группы и группы сравнения проводили с использованием χ^2 (критерий согласия Пирсона). При расчетах применяли программную среду R, которая включает программные пакеты обработки данных с языком программирования высокого уровня (язык R).

Результаты. Структура репродуктивных нарушений у женщин с ХЭ (1-я группа) и без ХЭ (2-я группа) включала: невынашивание беременности — 37 и 28%; первичное бесплодие — 18,5 и 28%; вторичное бесплодие — 30,8 и 41% соответственно ($p > 0,05$). У обследованных пациенток среди воспалительных заболеваний нижнего и верхнего этажа урогенитального тракта встречались: хронический цервицит (40,0 и 27,7%), кольпит (24,6 и 40,6%), вульвовагинит (18,5 и 37,5%) и хронический сальпингоофорит (27,7 и 28,1% соответственно).

На боли в нижней части живота женщины 1-й группы предъявляли жалобы в 23,1% случаев, женщины 2-й группы — в 28,1%.

Наиболее частыми соматическими патологиями у женщин обеих групп были: хронический тонзиллит (32,3 и 28,1%); хронический цистит (23,1 и 21,8%); хронический пиелонефрит (15,4 и 9,4%); хронический гастрит (9,2 и 3,1%, в 1-й и 2-й группах соответственно; $p > 0,05$).

Вагинальный биотоп женщин 1-й группы (с ХЭ) отличался дефицитом лактобактерий в 50,9% случаев, присутствием

коагулазонегативных стафилококков (CNS) — в 46,3%, энтерококков *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* — по 20,8% соответственно, грибов рода *Candida* — 18,5% (табл. 2). *Escherichia coli* у женщин этой группы выделена в 14,8% случаев, *Staphylococcus aureus*, стрептококки, коринебактерии — по 7,4%, клебсиелла — в 4%, *Enterobacter spp.* — в 2%.

Сопоставлено наличие определенного критерия, подтверждающего ХЭ и УПМ, и микроорганизмов, выделенных из вагинального биотопа у женщин основной группы (табл. 3). Воспалительные инфильтраты при гистологическом исследовании эндометрия выявлялись чаще наряду с детекцией CNS (53%) из влагалища женщин. Энтерококки и *E. coli* выделены в 29 и 18% случаев соответственно. Плазматические клетки чаще всего диагностированы при одинаковой частоте выделения из влагалища энтерококков, CNS и *E. coli* (по 17% в каждом случае). Фиброз стромы эндометрия чаще совпадал с выделением из влагалища *E. coli*, составив 43%. На втором месте по частоте (29%) оказались энтерококки, далее CNS и грибы рода *Candida spp.* (по 14%). Склероз стенок артерий чаще диагностировали при выделении из вагинального биотопа CNS (67%), энтерококков (56%) и *E. coli* (33%).

В носоглоточном биотопе у пациенток 1-й группы спектр выделенных бактерий шире в сравнении с вагинальным биотопом за счет появления разных видов стрептококков, бактерий рода *Proteus* и *Pseudomonas*. Из носоглотки, как и из вагинального биотопа, чаще других выделяли CNS — в 70% случаев, на втором месте *S. aureus* — 62%, далее *E. faecium* — 49%, *E. faecalis* — в 20%. Грибы рода *Candida* находили реже в сравнении с вагинальным биотопом (11,1%). Клебсиеллы и *E. coli* выделены в 4% случаев. Из стрептококков чаще выделяли β-гемолитический стрептококк (42%). *Streptococcus* группы *oralis* изолирован в 33,3% случаев, *S. pneumoniae* — в 17,8%, *S. pyogenes* — в 11,1%.

У женщин группы сравнения (2-я группа) в вагинальном биотопе дефицит лактобактерий диагностирован реже, чем у женщин с ХЭ, и составил 30,4% случаев (см. табл. 2). Среди УПМ чаще выделялись CNS (30,4%), *E. coli* (21,7%),

Таблица 3

Частота выделения УПМ из вагинального биотопа при наличии определенного критерия, подтверждающего ХЭ у женщин основной группы, n (%)

Микроорганизмы	Воспалительные инфильтраты (n = 34)	Плазматические клетки (n = 12)	Фиброз стромы (n = 7)	Склероз стенок артерий (n = 9)
<i>Enterococcus spp.</i>	10 (29%)	2 (17%)	2 (29%)	5 (56%)
Коагулазонегативные стафилококки (CNS)	18 (53%)	2 (17%)	1 (14%)	6 (67%)
<i>S. aureus</i>	3 (9%)	1 (8%)	0	0
<i>Streptococcus spp.</i>	2 (6%)	0	0	0
<i>Neisseria spp.</i>	1 (3%)	0	0	0
<i>Candida spp.</i>	5 (15%)	0	1 (14%)	1 (11%)
<i>E. coli</i>	6 (18%)	2 (17%)	3 (43%)	3 (33%)
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0	0	1 (11%)

Таблица 4

Микроэкологические типы носоглоточного биотопа у женщин исследованных групп, n (%)

Микроэкологические типы носоглоточного биотопа	Группы	
	основная группа, женщины с ХЭ и ХТ (n = 45)	группа сравнения, женщины без ХЭ и ХТ (n = 20)
Нормоценоз	15 (33,3%)	9 (45%)
I степень дисбиоза	25 (55,5%)	11 (55,5%)
II степень дисбиоза	5 (11,1%)	0
III степень дисбиоза	0	0

E. faecium и *E. faecalis* (по 17,4%). В 17,4% случаев выделены грибы рода *Candida* и коринебактерии. *S. aureus* и стрептококки встречались по 1 случаю (4,4%). Клебсиеллы и энтеробактер в отличие от 1-й группы у данных женщин не выявлены. Из носоглоточного биотопа женщин 2-й группы так же, как и из влагалища, чаще выделялись CNS (70%). Второе место занимали *E. faecium* и *S. aureus* (по 50%). *E. faecalis* изолирован в 15% случаев. Из стрептококков чаще выделялся β-гемолитический, составивший 65%, реже встречался *Streptococcus* группы *oralis* (60%), *S. pneumoniae* выделен в 10% случаев, *S. pyogenes* не выделен. Грибы рода *Candida*, *E. coli*, клебсиелла, протей, *Pseudomonas aeruginosa*, коринебактерии, энтеробактер у женщин 2-й группы не выделены.

В структуре микробиоценоза слизистой оболочки носоглоточного биотопа у женщин 1-й и 2-й групп выделено 4 микроэкологических типа биотопа: нормоценоз и три степени дисбиоза (табл. 4) [18]. Различия между выборками не выявлены ($p > 0,05$). Присутствие лишь индигенной микробиоты (нормоценоз) установлено у женщин с ХЭ в 15 (33%) случаях. ХТ в этой группе диагностирован у 21 пациентки из 65. У женщин группы сравнения (2-я группа — без ХЭ) нормоценоз диагностирован у 9 женщин из 20 (45%). Первая степень дисбиоза, характеризующаяся увеличением содержания стрептококков и нейссерий до 6—7 lg КОЕ/мл и появлением прочих УПМ в количестве до 3—4 lg КОЕ/мл, выявлена у женщин обеих групп с равной частотой (по 55,5% случаев). Вторая степень дисбиоза носоглотки (повышение количества факультативно-анаэробных УПМ до 4—5 lg КОЕ/мл и появление УПМ с факторами патогенности) определена только у женщин 1-й группы (с ХЭ) и составила 11,1%.

Обсуждение. Склероз стенок артерий, воспалительные инфильтраты, плазматические клетки, фиброз стромы при гистологическом исследовании эндометрия чаще совпадал с выделением из влагалища CNS, энтерококков, *E. coli*.

У женщин 1-й группы (с ХЭ) микрофлора носоглоточного биотопа представлена большим количеством видов УПМ (13), чем у женщин 2-й группы (7), за счет грибов, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, клебсиелл, протей. Показано, что у пациенток с тонзиллитом микробный пейзаж слизистой оболочки миндалин значимо шире в сравнении со здоровыми благодаря энтерококкам и энтеробактериям [19]. Эти данные согласуются с нашими результатами, так как у 21 из 65 женщин с ХЭ подтвержден хронический тонзиллит, а у 30 женщин выявлен дисбиоз I и II степени. Виды УПМ со слизистой носоглотки у женщин обеих групп, за исключением орального и β-гемолитического стрептококка, чаще выделяли у пациенток 1-й группы. У женщин 1-й группы чаще, чем у пациенток 2-й группы, из носоглоточного биотопа высевали *S. aureus*, *S. pyogenes* выделен только у женщин с ХЭ (1-я группа), что позволяет предположить их этиологическую роль в возникновении и течении заболеваний верхних дыхательных путей, что согласуется с данными литературы [19].

Доля CNS на слизистой оболочке носоглотки составила 70,0% в каждой группе, независимо от наличия у женщин хронического тонзиллита. Высокая частота выделения CNS и *S. aureus* из носоглотки женщин обеих групп может свидетельствовать о наличии у них иммунодефицита [20].

Видовой спектр микробиоты в вагинальном биотопе женщин 1-й и 2-й группы был менее разнообразным, чем в носоглоточном, за счет разных видов стрептококков. У женщин 1-й группы (с ХЭ) как в вагинальном биотопе, так и в носоглоточном количество видов бактерий выше, чем у женщин 2-й группы (10 против 8), за счет отсутствия у женщин без ХЭ клебсиелл и энтеробактера. Дефицит лактобактерий и частота выделения всех видов бактерий за исключением коринебактерий и *E. coli* у женщин 1-й группы выше, чем у женщин без ХЭ. Такой дисбаланс вносит вклад в развитие и прогрессирование воспалительных заболеваний влагалища и вышерасположенных органов малого таза, что подтверждается многими источниками [6].

Высокая частота выделения из влагалища грибов рода *Candida* и таких резидентов кишечного биотопа, как энтерококки и *E. coli*, у женщин 1-й и 2-й группы подтверждает транслокацию микроорганизмов из кишечника на фоне иммунодефицита у женщин с хроническим воспалением эндометрия и тонзиллитом.

Определение нами нормоценоза в структуре микробиоценоза слизистой оболочки носоглотки у пациенток с ХЭ и ХТ только в 33,3% случаев и только в этой же группе пациенток второй степени дисбиоза (в 11,1%) подтверждает наличие в носоглотке очага хронического воспаления, ухудшающего здоровье этих женщин. Выявление дисбиоза первой степени (в 55,5% случаев) у женщин 2-й группы дает основание предполагать наличие у этих женщин скрытой (безангинной) формы ХТ, которая тем не менее сопровождается всеми осложнениями, присущими ХТ с ангинами [10—12]. Следствием безангинной формы ХТ у женщин группы сравнения являются воспалительные заболевания нижнего и верхнего этажа полового тракта и репродуктивные нарушения.

Заключение. Полученные данные подтверждают ведущую роль микробов в развитии и персистенции хронических заболеваний у женщин с репродуктивными нарушениями и хроническим тонзиллитом.

Отмечено сходство ведущих микроорганизмов, обнаруженных как в вагинальном биотопе, так и в носоглотке у женщин с ХЭ. Сравнение микрофлоры, персистирующей во влагалище и обнаруженной в носоглотке, свидетельствует об общности этиопатогенетических механизмов развития и поддержания патологических процессов различной локализации. Следует отметить клиническую значимость экстрагенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний в ходе обследования и решения вопроса о лечении женщин с ХЭ. Пристальное внимание необходимо уделять не только санации влагалища и эндометрия, но и всех очагов хронической инфекции, что позволит надеяться на улучшение результатов лечения хронического эндометрита.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 7 см. REFERENCES)

1. Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Тулупова М.С., Смирнова Т.В. *Микробном влагалища — стабильность и нестабильность: современный взгляд на проблему.* Доктор.Ру. 2014; (S1): 21—4.
2. Новиков А.И. *Оппортунистические инфекции: эпидемиологические, иммунологические аспекты и качество жизни.* Гинекология. 2004; 6(4): 169—73.
3. Шишкова Ю.С., Становая Т.В., Бугрова Л.Н., Графова Е.Д., По-

- номарева Т.А. Молекулярно-биологический анализ содержания лактобактерий во влагалище у женщин репродуктивного возраста. *Вестник Челябинского государственного университета*. 2013; (7): 44—5.
4. Баткаев Э., Рюмин Д., Бабаев О. Роль условно-патогенной микробиоты в патогенезе постспецифических изменений у рогенитального тракта. *Врач*. 2009; (4): 72—4.
5. Плотко Е.Э., Донников А.Е., Ворошилина Е.С., Хаяутин Л.В., Тумбинская Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? *Акушерство и гинекология*. 2011; (1): 66—70.
6. Гомболевская Н.А., Муравьева В.В., Марченко Л.А., Анкирская А.С. Современные возможности этиологической диагностика хронического эндометрита. *Акушерство и гинекология*. 2012; (8-1): 40—5.
8. Хараева З.Ф., Нагоева М.Х., Афашагова М.М., Барзбиева С.М. Персистентный потенциал возбудителей хронического тонзиллита. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (2): 124.
9. Салтанова Ж.Е. Хронический тонзиллит и его бактериальные возбудители. Кремлевская медицина. *Клинический вестник*. 2013; (2): 206—12.
10. Громада Н.А. Хронический тонзиллит и его влияние на течение других заболеваний. *Вестник Кыргызско-Российского славянского университета*. 2003; 3(7): 121—4.
11. Мотовилова Т.М., Гречканев Г.О., Качалина Т.С. Сравнительная характеристика микрофлоры полости матки и небных миндалин у пациенток с персистирующим эндометритом. *Медицинский альманах*. 2015; (4): 105—7.
12. Туровский А.Б., Колбанова И.Г. *Хронический тонзиллит — современные представления*. Доктор.Ру. 2009; (5): 16—21.
13. Сухих Г.Т., Шуршалина А.В. Хронический эндометрит: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
14. Кира Е.Ф. Клиника и диагностика бактериального вагиноза. *Акушерство и гинекология*. 1994; (2): 32—5.
15. ОСТ 91500.11.00042003. Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003. М.; 2003.
16. Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.; 1989.
17. Покровский В.И., Поздеев О.К., ред. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 1998.
18. Метельская В.А., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Караулов А.В., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С. и др. Колонизационная резистентность и иммунологическая реактивность слизистой ротоглотки у детей в норме и при бронхолегочных заболеваниях. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010; (7): 10—5.
19. Соболева Ю.В., Фадеев С.Б. Таксономическое разнообразие микробных биоценозов носа и миндалин здоровых лиц и больных хроническим тонзиллитом. *Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН*. 2013; (1): 9.
20. Янковский Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека. Пробиотики в современной медицине. *Здоровье женщины*. 2003; (4): 145—58.
3. Shishkova Yu.S., Stanovaya T.V., Bugrova L.N., Grafova E.D., Ponomareva T.A. Molecular biological analysis of the content of lactobacilli in the vagina in women of reproductive age. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2013; (7): 44—5. (in Russian)
4. Batkaev E., Ryumin D., Babaev O. The role of conditionally pathogenic microbiota in the pathogenesis of post-specific changes in the urogenital tract. *Vrach*. 2009; (4): 72—4. (in Russian)
5. Plotko E.E., Donnikov A.E., Voroshilina E.S., Khayutin L.V., Tumbinskaya L.V. Vaginal biocenosis in terms of quantitative PCR: what is the norm? *Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; (1): 66—70. (in Russian)
6. Gombolevskaya N.A., Murav'eva V.V., Marchenko L.A., Ankirskaya A.S. Modern possibilities of etiological diagnosis of chronic endometritis. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012; (8-1): 40—5. (in Russian)
7. Cicinelli E., De Ziegler D., Nicoletti R., Colafoglio G., Saliani N., Resta L. et al. Chronic endometritis: correlation among hysteroscopic, histologic, and bacteriologic findings in a prospective trial with 2190 consecutive office hysteroscopies. *Fertil. Steril*. 2008; 89(3): 677—84.
8. Kharaeva Z.F., Nagoeva M.Kh., Afashagova M.M., Barzbieva S.M. Persistent potential causative agents of chronic tonsillitis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (2): 124. (in Russian)
9. Saltanova Zh.E. Chronic tonsillitis and bacterial pathogens. Kremlevskaya meditsina. *Klinicheskij vestnik*. 2013; (2): 206—12. (in Russian)
10. Gromada N.A. Chronic tonsillitis and its influence on the course of other diseases. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta*. 2003; 3(7): 121—4. (in Russian)
11. Motovilova T.M., Grechkanev G.O., Kachalina T.S. The comparative characteristic of the microflora of the uterine cavity and tonsils in patients with persistent endometritis. *Meditsinskiy al'manakh*. 2015; (4): 105—7. (in Russian)
12. Turovskiy A.B., Kolbanova I.G. *Chronic tonsillitis — modern ideas*. Doktor.Ru. 2009; (5): 16—21. (in Russian)
13. Sukhikh G.T., Shurshalina A.V. *Chronic Endometritis: a Guide [Khronicheskij endometrit: rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
14. Kira E.F. Clinic and diagnosis of bacterial vaginosis. *Akusherstvo i ginekologiya*. 1994; (2): 32—5. (in Russian)
15. OST 91500.11.00042003. Industry Standard. Treatment Protocol. Intestinal dysbiosis. Order of the RF Ministry of Health № 231 from 09.06.2003. Moscow; 2003. (in Russian)
16. Order of the USSR Ministry of Health number 535 of 22.04.1985. On the unification of microbiological (bacteriological) methods of research used in clinical diagnostic laboratories of health facilities. Moscow; 1989. (in Russian)
17. Pokrovskiy V.I., Pozdeev O.K., eds. *Medical Microbiology [Meditsinskaya mikrobiologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media. 1998. (in Russian)
18. Metel'skaya V.A., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Karaulov A.V., Nesvizhskiy Yu.V., Afanas'ev S.S. et al. Colonization resistance and immunological reactivity of the mucosa of the oropharynx in children in norm and at a bronchial and pulmonary diseases. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2010; (7): 10—5. (in Russian)
19. Soboleva Yu.V., Fadeev S.B. Taxonomic diversity of microbial biocenoses nose and tonsils of healthy individuals and patients with chronic tonsillitis. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra URO RAN*. 2013; (1): 9. (in Russian)
20. Yankovskiy D.S. The composition and functions of microbiocenosis of different biotopes of man. Probiotics in modern medicine. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2003; (4): 145—58. (in Russian)

Поступила 09.12.16

Принята к печати 15.01.17