

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 61

10 • 2016

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ОКТАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостроповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-495-678-64-84

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

Художественный редактор

М. Б. Белякова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *Т. Д. Малышева*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 24.08.2016.

Подписано в печать 03.10.2016.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 649.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию:

eibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2016. № 10. 669—732.

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 61
10 • 2016

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *T.D. Malysheva*

Layout editor *Zyukina*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of 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"

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н. Диагностическое значение содержания в плазме крови тропонина и белка кардиомиоцитов, связывающего жирные кислоты при остром коронарном синдроме 672
- Осминин С.В., Ветшев Ф.П., Руденко В.В., Залетаев Д.В., Хоробрых Т.В., Немцова М.В. Молекулярно-генетические изменения в слизистой пищевода как маркеры онкологической прогрессии и оценки эффективности антирефлюксных операций у больных пищеводом Барретта. 681
- Щекотова А.П., Булатова И.А., Щекотов В.В., Титов В.Н. Лабораторная оценка динамики прогрессирования фиброза печени при хроническом гепатите. 686
- Лунева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л. Исследование показателей электролитного состава и фосфатазной активности синовиальной жидкости у больных остеоартрозом коленного сустава 690
- Панова И.А., Рокотянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А., Назаров С.Б., Хлипунова Д.А. Маркеры воспалительной реакции и дисфункции эндотелия у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза 692

ЦИТОЛОГИЯ

- Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н., Иванцова Л.П. Цитоморфологические особенности паращитовидных желез при различных формах гиперпаратиреоза. 697
- Славнова Е.Н., Волченко Н.Н. Использование автоматизированной системы оценки морфологии клеток для диагностики лимфомы Ходжкина в образовательном процессе курса клинической онкоцитологии. 701

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Барановская И.Б., Зенцова О.А., Сысоева И.П. Особенности новых показателей гемограммы при циррозах печени 705

ИММУНОЛОГИЯ

- Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета 710
- Бутина Е.В., Зайцева Г.А. Методы диагностики иммунной тромбоцитопении плода и новорожденного. 715

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Лебедев С.Н., Беляева Е.А., Трошин А.В., Червинец А.В., Миронов А.Ю. Адгезивная и антагонистическая активность микрофлоры полости рта больных злокачественными образованиями языка 719
- Кузнецова Э.Э., Горехова В.Г., Богородская С.Л. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий. 723
- Розова Л.В., Годовых Н.В. Микробиологическое исследование гнойного очага воспаления у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей 727
- Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А. Алгоритмы этиологической лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов. 730

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N. The diagnostic significance of the content in blood plasma of troponin and protein of cardiomyocytes binding fatty acids under acute coronary syndrome 672
- Osminin S.V., Vetshev F.P., Rudenko V.V., Zaletaev D.V., Khorobrykh T.V., Nemtsova M.V. The molecular genetic alterations in mucosa of intestines as markers of oncologic progression and estimate of effectiveness of anti-reflux operations in patients with Barrett's esophagus 681
- Schekotova A.P., Bulatova I.A., Schekotov V.V., Titov V.N. The laboratory evaluation of dynamics of progression of liver fibrosis under chronic hepatitis 686
- Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveeva E.L. The study of indices of electrolytic composition and phosphatase activity of synovial fluid in patients with osteoarthritis of knee joint 690
- Panova I.A., Rokotyanskaya E.A., Kuzmenko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A., Nazarov S.B., Khlipunova D.A. The markers of inflammation reaction and dysfunction of endothelium in pregnant women with hypertension disorders of various genesis 692

CYTOLOGY

- Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N., Ivantsova L.P. The cytomorphic characteristics of parathyroid gland under various forms of hyperparathyroidism 697
- Slavnova E.N., Volchenko N.N. The application of automated system of evaluation of morphology of cells for diagnostic of Hodgkin's lymphoma in education process of course of clinical oncocytology 701

HEMATOLOGY

- Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Sysoieva I.P. The characteristics of the new indices of hemogram under liver cirrhosis 705

IMMUNOLOGY

- Nazarov V.D., Lapin S.V., Surkova E.A., Makshakov G.S., Mazing A.V., Evdoshenko E.P., Totolian A.A. The methods of detection of binding and neutralizing antibodies to preparations of interferon-beta 710
- Butina E.V., Zaitseva G.A. The methods of diagnostic of immune thrombocytopenia of fetus and newborn 715

MICROBIOLOGY

- Tchervinets V.M., Tchervinets Yu.V., Lebedev S.N., Belyaeva E.A., Troshin A.V., Tchervinets A.V., Mironov A.Yu. The adhesive and antagonistic activity of microflora of oral cavity in patients with malignant neoplasms of tongue 719
- Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Bogorodskaya S.L. The microbiota of intestine. The role in development of various pathologies 723
- Rosova L.V., Godovykh N.V. The microbiological study of purulent focus of inflammation in patients with chronic osteomyelitis of long bones 727
- Mavzyutov A.R., Mavzyutova G.A. The algorithms of etiologic laboratory diagnostic of parenteral viral hepatitis 730

БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., 2016

УДК 616.12-009.72-06:616.127-005.8-008.6-036.11]-008.9-074

Титов В.Н.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ТРОПОНИНА И БЕЛКА КАРДИОМИОЦИТОВ, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Содержание белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК) в сыворотке крови, начинает повышаться через 2–3 ч после острого коронарного синдрома (ОКС) и инфаркта миокарда (ИМ) и достигает максимального значения в среднем через 8,5 ч после начала гибели кардиомиоцитов. К концу 1-х суток ОКС содержание БСЖК в крови существенно понижается (экскреция с мочой); уровень БСЖК в крови остается несколько выше исходного в течение суток. Высокая клиническая чувствительность и относительно высокая органоспецифичность характерна для БСЖК в сроки 12 ч после ОКС; в ранние сроки ИМ клиническая специфичность БСЖК преобладает над концентрацией тропонинов (Тн). Через 12 ч после ОКС более высокую клиническую чувствительность и диагностическую специфичность начинают проявлять тропонины, которые далее главенствуют в течение нескольких суток ИМ. При одновременном измерении БСЖК и Тн чувствительность биохимической диагностики в первые 12 ч возрастает на 30%. В более поздние сроки преимущество одновременного определения БСЖК и Тн перестает быть необходимым; БСЖК в это время выводятся почками при экскреции с мочой; после 12 ч диагностическая значимость определения Тн становится доминирующей. Не выявлено связи между содержанием в сыворотке крови БСЖК и признаками реперфузии миокарда, по данным электрокардиограммы, вероятно, по причине редкого взятия крови на определение БСЖК — столь динамичного теста. Тест не подходит для оценки состояния пациентов с недостаточностью кровообращения из-за получения не в полной мере адекватных результатов. Лучшим вариантом дифференциальной диагностики ОКС в течение 1-х суток было бы использование комбинированного экспресс-иммунохроматографического теста, который позволит «у постели» пациента или в машине скорой помощи динамично одновременно определить в цельной крови содержание БСЖК, Тн и «сохранить» результаты до объективной оценки.

Ключевые слова: белок связывающий жирные кислоты; тропонины; инфаркт миокарда; острый коронарный синдром; нестабильная стенокардия.

Для цитирования: Титов В.Н. Диагностическое значение содержания в плазме крови тропонина и белка кардиомиоцитов, связывающего жирные кислоты при остром коронарном синдроме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10):672-680

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-672-680

Titov V.N.

THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE CONTENT IN BLOOD PLASMA OF TROPONIN AND PROTEIN OF CARDIOMYOCYTES BINDING FATTY ACIDS UNDER ACUTE CORONARY SYNDROME

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

The content of fatty acids-binding protein in blood serum increases in 2-3 hours after acute coronary syndrome and myocardium infarction and reaches its maximal value after 8/5 hours in average after beginning of cardiomyocytes destruction. To the end of the first day of acute coronary syndrome the content of fatty acids-binding protein in blood significantly decreases due to excretion with urine. The level of fatty acids-binding protein in blood during a day remains slightly higher than initial one. The high clinical sensitivity and relatively high organ specificity is characteristic for fatty acids-binding protein in 12 hours after acute coronary syndrome. In early terms of myocardium infarction clinical specificity of fatty acids-binding protein is prevailed over concentration of troponins. In 12 hours after acute coronary syndrome troponins begin to manifest higher clinical and sensitivity and diagnostic specificity that dominate during several days of myocardium infarction. Under simultaneous measurement of fatty acids-binding protein and troponins sensitivity and of biochemical diagnostic increases up to 30% during first 12 hours. In later time periods advantage of simultaneous detection of fatty acids-binding protein and troponins stops to be necessary.

At this time, fatty acids-binding proteins are evacuated through kidneys with urine excretion. After 12 hours the diagnostic significance of detection of troponins becomes dominating. No relationship between was established between content and of fatty acids-binding proteins in blood serum and indications of reperfusion of myocardium according electrocardiogram data. The possible cause is probably related to rare blood sampling for detection of fatty acids-binding protein such a dynamic test. The test doesn't do for evaluating the condition of patients with circulatory deficiency because of results not enough adequate. The best alternative of differentiate diagnostic during first day of acute coronary syndrome would be application of combined express

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. клинической биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, e-mail: vn_titov@mail.ru

immune chromatographic test permitting "at bedside of patient" or in ambulance car to dynamically and simultaneously detect fatty acids-binding proteins and troponins in whole blood and "to preserve" the results up to objective assessment.

Key words: *fatty acids-binding proteins; troponins; myocardium infarction; acute coronary syndrome; unstable angina pectoris.*

For citation: Titov V.N. The diagnostic significance of the content in blood plasma of troponin and protein of cardiomyocytes binding fatty acids under acute coronary syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 672-680. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-672-680

For correspondence: *Titov V.N.*, doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of clinical biochemistry of lipoproteins of Institute of clinical cardiology of the Russian Cardiology R&D production complex of Minzdrav of Russia, e-mail: vn_titov@mail.ru

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

Financing. *The study had no sponsor support.*

Received 20.02.2016
Accepted 15.03.2016

Характерной особенностью начала XXI века в медицине стало то, что достижения биолого-медицинских, диагностических дисциплин значительно опережают успехи, которые достигнуты в клинике при лечении наиболее распространенных в популяции заболеваний. Это атеросклероз, резистентность к инсулину, эссенциальная (метаболическая) артериальная гипертензия, метаболический синдром и ожирение; такие заболевания мы именуем метаболическими пандемиями. Частота их в популяциях экономически развитых стран продолжает возрастать, и все усилия клиницистов и фармацевтических фирм желаемого результата пока не приносят; этиология метаболических пандемий становится более понятной, чего, однако, не скажешь в отношении их патогенеза.

Если большие ожидания относительно использования в клинике достижений генетики и геномики, полиморфизма генов себя явно не оправдали, то возможности метаболомики (липидомики) и протеомики столь велики, что использование их в диагностике практически не начато [1]. Мы не готовы в плане диагностики трактовать физико-химические данные, которые предоставляют нам современные методы физической химии; это касается одновременного определения концентрации десятков протеинов, субстратов и метаболитов. Мы не можем использовать результаты современных методов диагностики; у нас нет теоретической базы — современной теории патологии.

Совершенствование диагностики, включая методы секвенирования и экспрессии генов, протеомики, метаболомики (липидомики), — результат развития физической химии, биохимии и аналитического приборостроения за последние десятилетия. Теория же становления болезней, теория общей патологии, которую мы имеем, сформирована более чем на 150 лет ранее работами К. Рокитанского и Р. Вирхова. Совершенствование медицинской науки и практики, тенденции развития общей биологии, физической химии и диагностических дисциплин требуют новой теории патологии, теории XXI века. Важными становятся системное воззрение на медицину как на биологическую, «историческую» науку и анализ длительного развития на ступенях филогенезе вида *Homo sapiens*. Новая теория патологии призвана сформировать положения фундаментальной медицины и на ее основе, используя системный подход, продолжить развитие медицинской науки. Необходимо разобраться в общности и различии этиологии и патогенеза столь распространенных в популяциях заболеваний, как метаболические пандемии [2].

Дифференциальная диагностика острого коронарного синдрома. Среди диагностических методов, которые используют при обследовании больных в отделениях неотложной кардиологии, лабораторным тестам клинической химии отведена важная роль; клиническая биохимия в кардиологии развивается наиболее интенсивно. Это можно объяснить

как совершенствованием тестов диагностики, повышением их органоспецифичности, так и созданием новых методов клинической биохимии, определением энзимов, концентрации ранее не исследованных протеинов, биологически активных предшественников и метаболитов. Дифференциальная диагностика острого коронарного синдрома (ОКС) — важный раздел в клинике кардиологии [3].

ОКС — сочетание клинических симптомов, которые обусловлены единым патогенезом; они позволяют провести дифференциальную диагностику состояния нестабильной стенокардии (НС) и инфаркта миокарда (ИМ) с подъемом или без подъема сегмента *ST* на электрокардиограмме (ЭКГ). ОКС — не окончательный диагноз; используют его при первом контакте клинициста кардиолога с пациентом. Далее функциональные и биохимические методы дифференциальной диагностики дают основание поставить диагноз — НС или ИМ.

ОКС без подъема сегмента *ST*, с преходящей или стойкой депрессией *ST*, изменениями зубца *T* на ЭКГ, что сопровождается сжимающей болью за грудиной с иррадиацией в левое плечо, чаще обусловлен острой ишемией миокарда — состоянием НС [4]. Тактика ведения таких пациентов направлена на устранение ишемии. При НС — повторное снятие и анализ ЭКГ, определение динамики содержания в сыворотке крови маркеров некроза кардиомиоцитов: тропонины *T* и *I* (ТнТ и ТнI), активность кретинкиназы (КК), кардиоспецифичного изофермента *MB* (КК-*MB*) или специфичного для кардиомиоцитов (по кинетическим параметрам) белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК) в клетках. При отсутствии в крови биомаркеров гибели кардиомиоцитов клинические проявления ОКС рассматривают как картину НС. При повышении содержания маркеров некроза миокарда в сыворотке крови — как проявление субэндокардиального (мелкоочагового, интрамурального) ИМ без подъема интервала *ST*. Для быстрой, достоверной дифференциальной диагностики НС и ИМ без подъема сегмента *ST* надо определять содержание маркеров гибели кардиомиоцитов; в настоящее время для большинства случаев ОКС в экстренном порядке это недоступно. ОКС без подъема сегмента *ST* и состояние нестабильной стенокардии рассматривают как равнозначные, взаимозаменяемые понятия.

ОКС с подъемом сегмента *ST* на ЭКГ, который сопровождается болевым приступом, впервые возникшей блокадой левой ножки пучка Гиса, обусловлен, как правило, острой окклюзией коронарной артерии. Это ИМ; диагноз предполагает быстрое проведение реперфузионной терапии в форме тромболитика, прямой ангиопластики или экстренного стентирования коронарных артерий. ОКС — обострение стабильного течения ишемической болезни сердца — клинически проявляется формированием ИМ, развитием НС или состояния внезапной смерти. Единение патогенеза (разрыв мягкой атеротромботической бляшки, локальная, воспалительная

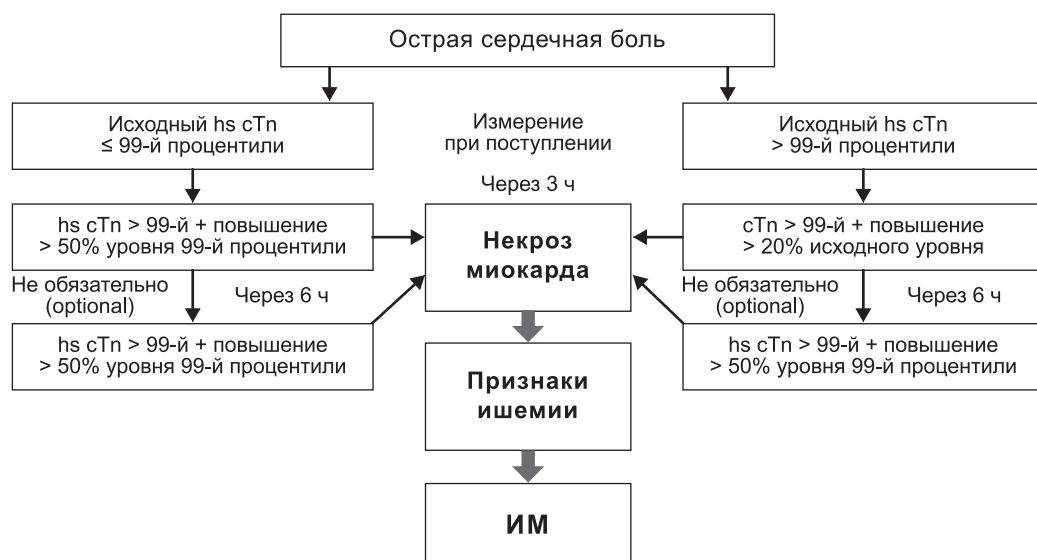


Рис. 1. Алгоритм диагностических тестов клинической биохимии при ОКС для дифференциальной диагностики состояния НС и ИМ.

эрозия монослия эндотелия, окклюзирующий, пристеночный тромбоз атероматозной бляшки коронарной артерии) позволяет, с определенными допущениями, объединить клиническую картину НС и ИМ единым понятием — ОКС (рис. 1).

Ишемия миокарда — основная причина повреждения кардиомиоцитов и гибели их по типу некроза; гибель может быть обусловлена: а) критическим стенозом коронарных артерий атеротромботическими массами липидов в интиме артерий эластического типа или б) атеротромбозом (образование тромба при разрыве покрывки мягких, богатых ТГ, атером), прекращением кровотока и отсутствием подвоза эритроцитами O_2 к кардиомиоцитам. За десятки секунд ишемии миокарда в кардиомиоцитах выражено изменяются биохимические реакции: а) блокада аэробного метаболизма — β -окисления жирных кислот (ЖК) в митохондриях; б) активация анаэробного гликолиза, гликогенолиза в цитоплазме; в) истечение из цитоплазмы K^+ при одновременном увеличении содержания Ca^{2+} ; г) блокада образования энергии в форме АФТ в дыхательной цепи митохондрий при отсутствии окисления ЖК; д) падение сократимости левого желудочка, снижение ударного, минутного объемов крови и нарушения оксигенации тканей *in vivo* [5]. Все функциональные изменения быстро находят отражение на ЭКГ.

В следующие минуты происходят выраженные нарушения метаболизма; они создают условия для формирования синдрома цитолиза — выхода из цитоплазмы кардиомиоцитов, специфичных протеинов, развитие внутриклеточного ацидоза, гиперкальциемии и повышение осмолярности межклеточной среды. Наиболее ранними ультраструктурными изменениями оказываются набухание митохондрий, отек их с увеличением в цитоплазме Na^+ и формирование большого количества эндосом из канальцев эндоплазматической сети, феномен «блэббинга». Основная причина происходящего — дефицит энергии, блокада синтеза АТФ в дыхательной цепи митохондрий. Точкой невозврата, началом гибели кардиомиоцитов являются нарушения целостности сарколеммы, истечение в лимфо- и кровоток специфичных маркеров кардиомиоцитов; отток от миокарда маркеров последовательно проходит вначале в потоке лимфы, а позже в крови.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ диагноз «инфаркт миокарда» основывают на наличии болевого приступа, характерных изменений ЭКГ и повышении в крови активности «кардиоспецифичных» протеинов. В случаях повторных ин-

фарктов при выраженных явлениях кардиосклероза, нарушениях ритма сердца, когда данные ЭКГ становятся исходно измененными, биохимические тесты доминируют в диагностике. По данным проспективного исследования, проведенного в США, только 25% ИМ можно диагностировать без определения активности, количества ферментов и концентрации кардиоспецифичных белков. Это вызвано тем, что чувствительность ЭКГ, при высокой их специфичности, не превышает 80%, а более четверти больных с диагнозом ИМ, подтвержденным на аутопсии, не имели изменений на ЭКГ. За последнее десятилетия основными способами диагностики ИМ стало

определение в крови кардиоспецифичных протеинов, включая ТнТ и ТнИ (рис. 2), активности КК и содержание кардиоспецифичного изофермента МВ-КК.

Общепризнанные, специфичные маркеры гибели кардиомиоцитов — белки Тн с молекулярной массой около 30 кДа; располагаются они на мембране кардиомиоцитов; семейство тропонинов включает ТнТ, ТнИ и ТнС. Тропонин С столь прочно фиксирован на сарколеммальной мембране, что выходит в кровоток только по окончанию деструкции кардиомиоцитов. Органоспецифичными маркерами кардиомиоцитов являются также изофермент МВ-КК, изофермент-1 лактатдегидрогеназы и кинетически специфичный для поперечнополосатых кардиомиоцитов БСЖК. Этот белок функционирует в цитоплазме каждой из клеток, однако члены большого семейства белков различаются кинетическими параметрами, скоростью и производительностью переноса ЖК от мембраны к митохондриям. Скорость развития афизиологичных, патологических процессов при гипоксии, ишемии и гибели клеток по типу некроза, параметры истечения специфичных маркеров из миокарда определены *in vivo* многими факторами [6].

1. Каталитическая активность и содержание ферментов и протеинов в цитозоле. Повышение в кардиомиоцитах Ca^{2+} становится причиной экспрессии синтеза и возрастания активности энзимов, включая фосфолипазы, фосфорилазы [7] и протеазы — каспазы. Каспазы (cysteine-dependent aspartate specific protease) — семейство цистеиновых протеаз, которые

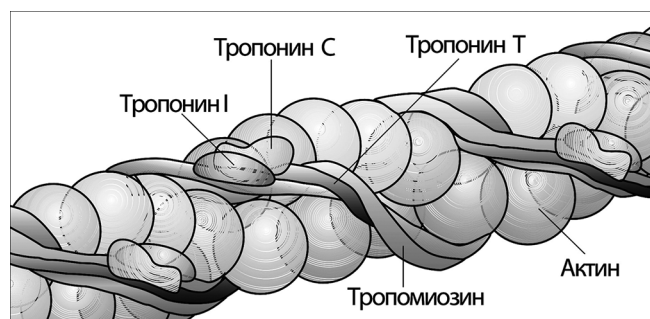


Рис. 2. Расположение трех молекул тропонина на цепях актина в кардиомиоцитах.

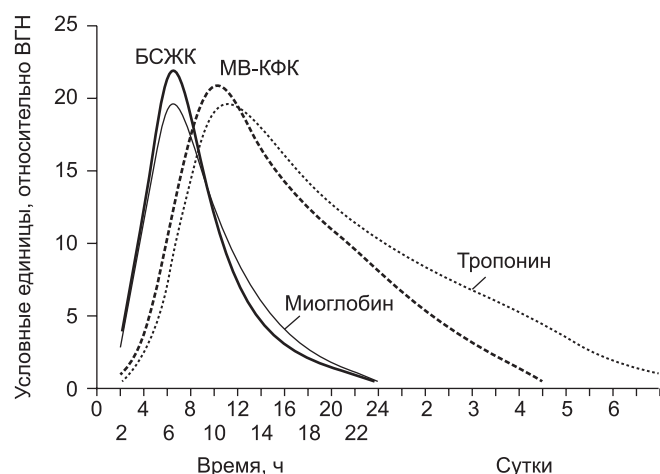


Рис. 3. Сравнение динамики в крови активности маркеров острого инфаркта миокарда в течение часов и суток.

гидролизуют полипептидную связь после аминокислотного остатка аспартата. Каспазы активированы при апоптозе, гибели клеток по типу некроза и при воспалительных процессах; они-то и высвобождают в цитоплазму кардиомиоцитов фибриллярные белки — Тн, белки-маркеры патологии миокарда. Афизиологичное повышение активности гидролитических ферментов, деструкция субклеточных образований начинается через несколько часов после начала гипоксии.

2. Локализация протеина в клетке: свободно расположен в цитоплазме миоглобин, БСЖК при синдроме цитолиза истекают в лимфатические пути раньше, чем структурированные на сарколемме Тн (рис. 3).

3. Молекулярная масса протеина: малые размеры молекул БСЖК и миоглобина — условие быстрого истечения их в лимфотоке в сравнении с изоферментом МВ-КК — тетрамером молекулярной массой 360 кДа.

4. Параметры клиренса маркера из локального внутрисосудистого пула межклеточной среды при реализации биологической функции эндозеологии, биологической реакции экскреции. БСЖК и миоглобин фильтрует базальная мембрана гломерул в паракринно регулируемых сообществах нефрона. Далее клетки проксимальных, извитых канальцев эпителия реабсорбируют протеины, переносят их в цитоплазме от апикального к базолатеральной стороне клеток и путем биологической реакции экзоцитоза выводят в паратубулярное пространство нефрона.

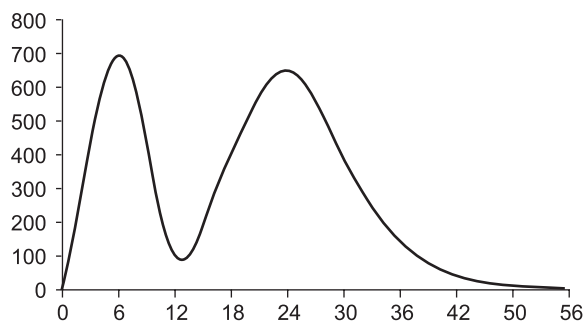


Рис. 4. Два инцидента истечения БСЖК из кардиомиоцитов, верификация повторного инфаркта миокарда.

По оси ординат — содержание БСЖК в плазме крови; по оси абсцисс — часы от момента ОКС.

Далее маркеры локально поглощают оседлые макрофаги и утилизируют их с образованием свободных аминокислот и коротких пептидов, которые по лимфатическим путям оттекают в кровоток. Если количество протеинов, которые субстрат-зависимо приходится реабсорбировать оседлым макрофагам, включая альбумин, становится столь большим и клетки с утилизирующей их не справляются, макрофаги начинают синтезировать хемиаттрактивный гуморальный медиатор и «зывают» из кровотока в паратубулярное пространство нефрона моноциты гематогенного происхождения. Моноциты после короткого срока специализации *ex tempore in situ* превращаются в моноциты → макрофаги и начинают исполнять функцию оседлых макрофагов. Это состояние всегда сопровождается инфльтрацией паратубулярного пространства лейкоцитами с формированием локального паратубулярного нефроза.

5. Динамика более быстрого поступления в кровоток и скорой фильтрации в клубочках дает возможность зафиксировать несколько пиков БСЖК и миоглобина. При динамичном наблюдении содержания маркеров можно в течение короткого времени видеть несколько пиков повышения в плазме крови содержания миоглобина. Это дает основание полагать, что гибель кардиомиоцитов может происходить и не одномоментно; возможно несколько эпизодов гибели кардиомиоцитов. Быстрое нарастание в плазме крови (прирост) содержания маркера может зависеть и от формирования кардиогенного шока и состояния острой почечной недостаточности (рис. 4). Первый пик повышения БСЖК соответствует патофизиологичной его длительности; второе столь длительное повышение содержания связано, более вероятно, с развитием: а) кардиогенного шока после 2-го инцидента гибели кардиомиоцитов и (или) б) сердечной и почечной недостаточности, падением уровня фильтрации первичной мочи в клубочках нефрона и уменьшением экскреции БСЖК с мочой.

6. Значение градиента концентрации цитоплазма → межклеточная среда, как и скоростные параметры лимфотока, способны оказать влияние на содержание маркеров в плазме крови.

Независимо от возможностей клинично-диагностических лабораторий, лечебных учреждений при ферментной диагностике необходимо принимать во внимание ряд положений, которые повышают чувствительность и специфичность диагностических методов. При диагностике ИМ необходимо учитывать время, прошедшее от момента возникновения ангинозного приступа. Выход из миоцитов больших белковых молекул, какими являются ферменты, оказывается следствием нарушения целостности сарколеммальной плазматической мембраны (см. рис. 3). Выходя за пределы клеточной мембраны, ферменты попадают в межклеточную жидкость и далее оттекают от сердца по лимфатическим путям, а не непосредственно в кровоток. Это и определяет относительно длительный промежуток времени от момента появления ангинозных болей до появления активности «кардиоспецифичных» ферментов в крови. Вначале возрастает в крови активность самого малого из диагностически важных протеинов — Тн, далее — общая активность КК и содержание в плазме крови кардиоспецифичного изофермента МВ-КК. Клиническая чувствительность определения активности ферментов зависит от времени, прошедшего от начала приступа загрудинных болей. Так, для КК чувствительность в первые часы после возникновения приступа болей составляет только 25—45%, и она возрастает до 89—98% в последующие 6—8 ч. Ранее 8 ч ложноотрицательные результаты дает определение активности КК в 31% случаев. Желание кардиолога иметь данные об активности ферментов в крови в сроки ранее 8 ч после начала болевых приступов часто приводит к диагностической ошибке, когда даже при обширном ИМ активность ферментов и изоферментов в крови порой оказывается в норме.

Диагностику ИМ проводят комплексно и экономически обоснованно, определяя в сыворотке крови: а) общую активность КК; б) содержание ТнТ или ТнИ и в) активность КК, изофермента МВ-КК и БСЖК. Комплексный подход обусловлен тем, что а) при исследовании активности одного фермента можно допустить ошибку; б) каждый из ферментов в вышеупомянутом комплексе отличается по времени появления в сосудистом русле и параметрам клиренса; в) определение отношения активности ферментов, которые входят в комплекс, позволяет повысить органоспецифичность диагностики. Повышенная активность КК — достоверный признак ИМ, начиная с 6—8 ч после болевого приступа, и этот фермент даже при обширном ИМ может быть выведен из кровотока в течение 48 ч. Скорость истечения КК из зоны поражения кардиомиоцитов зависит от величины очага поражения, присоединения кардиогенного шока, применения сердечных гликозидов.

Повышает органоспецифичность диагностики и динамическое исследование активности ферментов на протяжении суток после появления болей при определении их с интервалом в 4—6 ч. Однократное определение активности КК и содержания Тн дает возможность диагностировать ИМ в 66% случаев. Определение динамики активности ферментов в течение суток повышает органоспецифичность поражения кардиомиоцитов до 86%. Определение динамики маркеров в течение суток позволяет провести дифференциальную диагностику между ИМ и гиперферментемией при поражении скелетных мышц, интенсивных тренировках, в частности после марафонского бега. В сроки 8—12 ч после ангинозного приступа динамика активности ферментов и изоферментов настолько показательна, что если нет нарастания активности КК, Тн и МВ-КК, то нет и ИМ.

БСЖК плазмы крови — маркер состояния нестабильной стенокардии и инфаркта миокарда. Исходя из специфичной, непрерывной сократительной функции кардиомиоцитов, необходимости большого количества энергии, субстратов для наработки митохондриями макроэргического АТФ; отсутствия синтеза в кардиомиоцитах *in situ de novo* ЖК из ацетил-КоА, из глюкозы; отсутствия в кардиомиоцитах депо НЖК и МЖК в форме неполярных эфиров со спиртом глицерином — триглицеридов (ТГ), кинетически специфичный для кардиомиоцитов БСЖК привлекает внимание исследователей. Это в полной мере относится и к диагностике ОКС. Содержание в кардиомиоцитах БСЖК велико; оно превышает 5% всего количества протеинов цитоплазмы. При этом снабжение митохондрий кардиомиоцитов субстратами для наработки энергии, НЖК + МЖК, для β -окисления и наработки АТФ происходит практически «с колес»: подвезли и тут же использовали.

Филогенетически позднюю биологическую функцию локотомии, замкнутой системы кровообращения, обеспечивает субстратами для наработки АТФ специализированный, столь же поздний в филогенезе пул жировых клеток — подкожных адипоцитов. Однако между адипоцитами и поперечнополосатыми кардиомиоцитами «дистанция огромного размера». Преодолевают ее: а) функция альбумина, который специфично связывает и переносит в межклеточной среде, внутрисосудистом локальном пуле мононенасыщенные жирные кислоты (МЖК) и насыщенные ЖК (НЖК) в форме полярных, неэтерифицированных ЖК (НЭЖК); б) липидтранспортный белок клатриновых кавеола [8], которые транспортируют ЖК через бислои полярных фосфолипидов сарколеммы кардиомиоцитов и в) семейство БСЖК [9], которые переносят ЖК в цитоплазму всех клеток от сарколеммы кардиомиоцитов к пероксисомам и митохондриям.

Внутренняя мембрана митохондрий проницаема для короткоцепочечных ЖК, олеиновой ω -6 С18: 1 ЖК растений и ω -9 С18: 1 олеиновую МЖК животных, синтез которой *in vivo* из глюкозы в животных клетках экспрессирует филогене-

нетически поздний инсулин. Филогенетически наиболее ранняя С16: 0 пальмитиновая НЖК не может быстро преодолеть внутреннюю мембрану митохондрий. Поэтому митохондрии рано в филогенезе сформировали специфичный транспортер карнитинпальмитоилацилтрансферазу. Снаружи внутренней мембраны митохондрий происходит перэтерификация пальмитиновой НЖК из тиоэфира с коэнзимом А (КоА) в эфир со спиртом карнитином. В этой форме пальмитиновая НЖК преодолевает внутреннюю мембрану митохондрий; после этого перэтерификация происходит в обратном порядке пальмитоилкарнитин \rightarrow пальмитоил-КоА.

В скелетных миоцитах БСЖК составляет не более 20% количества, которое содержат кардиомиоциты; одновременно содержание миоглобина в скелетных миоцитах в 2 раза ниже, чем в миоцитах миокарда. Кроме того, определение в плазме крови содержания БСЖК является более органоспецифичным тестом дифференциальной диагностики по сравнению с миоглобином при постановке диагноза ИМ в ранние сроки ОКС [10] или при нескольких эпизодах гибели кардиомиоцитов. При ОКС достоверного возроста содержания БСЖК в плазме крови не выявлено [11].

Диагностическое значение БСЖК отмечено во многих клинических протоколах как достоверный тест гибели кардиомиоцитов и активации реперфузии в условиях повышения сегмента ST [12, 13]. В отношении же прогностического значения БСЖК при ОКС не все мнения авторов не всегда однозначны. В сопоставлении с иными тестами ОКС как содержание в плазме крови белков-тропонинов, С-реактивного белка мономера — гуморального медиатора (высокочувствительный метод определения) и натрийуретического пептида дает возможность комплексно оценивать клиническую картину ОКС при использовании комплекса только относительно специфичных методов диагностики [14, 15].

Истечение из клеток свободно расположенных в цитоплазме миоглобина, БСЖК, КК и кардиоспецифичного МВ-КК, тем более фиксированных в структуре сарколеммы протеинов как Тн, оказывается достоверным тестом необратимого повреждения кардиомиоцитов, а не увеличения проницаемости сарколеммы при длительной, выраженной ишемии миокарда. В то же время длительное состояние гипоксии и дефицит энергии (образования АТФ) может привести к нарушению проницаемости мембраны кардиомиоцитов с истечением в кровоток малых протеинов цитоплазмы — БСЖК и миоглобина, но не структурированных Тн. Достоверное повышение в сыворотке крови содержания ТнТ и ТнИ становится тестом гибели и деструкции кардиомиоцитов. Низкую проницаемость мембраны клеток миокарда поддерживает гиперкалиемия и физиологично низкое содержание ионов Na^+ в цитоплазме кардиомиоцитов. Это требует постоянной затраты энергии, расхода АТФ, в частности для функции «клеточной помпы» — Na^+ , K^+ АТФазы. Энергозависимый насос постоянно вводит в цитоплазму кардиомиоцитов, как и иных клеток, три K^+ в обмен на выведение двух Na^+ . Появление же в плазме крови маркеров гибели митохондрий — доказательство гибели клеток.

Полностью специфичных маркеров поражения миокарда пока не найдено. Органоспецифичность изоферментной диагностики основана на различии процентного соотношения активности изоферментов в отдельных органах и тканях, а следовательно, и в сыворотке крови при их поражении. МВ-КК специфичен для клеток миокарда не потому, что в иных клетках его нет, а потому, что в кардиомиоцитах активность МВ-КК составляет 15—17% общей активности КК. В то время как в миоцитах скелетной мускулатуры не более 3%. При патологии миокарда и скелетной мускулатуры активность КК в плазме крови может быть повышена в одинаковой мере, но активность МВ-КК в процентах от активности КК будет достоверно выше. Масса МВ-КК, если она повышена, является

достоверным тестом ИМ. Возможно мнение, что длительные периоды ишемии миокарда могут сопровождаться выходом ферментов в кровь. Однако даже целенаправленные исследования не позволили отметить увеличения активности КК выше уровня дискриминации.

Согласно ВОЗ критерии диагноза ИМ — изменения на ЭКГ и достоверное изменение активности ферментов и Тн в сыворотке крови. Они включают измерения активности КК, количества КК-МБ и Тн. Не ослабевает интерес клиницистов и к динамике истечения из кардиомиоцитов и специфичного для них БСЖК. Разработчики тест-систем, откликаясь на запросы клиницистов, работают над созданием иммунохроматографической тест-системы для одновременного, специфичного определения содержания Тн + БСЖК для объективной оценки состояния кардиомиоцитов при ОКС [16—18]. При каждом инциденте ОКС в плазме крови в несколько раз увеличивается содержание и НЭЖК; это реализация *in vivo* биологической функции адаптации [1].

Белок, связывающий (переносящий) ЖК в цитозоле кардиомиоцитов и в сыворотке крови. БСЖК в цитоплазме кардиомиоцитов — семейство небольших, специфичных по кинетическим параметрам белков-переносчиков молекулярной массой 14—15 кДа; полипептид молекулярной массой 15 кДа состоит из 132 аминокислотных остатков [20]. Белки имеют один центр связывания и переносят в цитоплазме кардиомиоцитов от плазматической мембраны к митохондриям одну НЖК или МЖК. БСЖК выделили из атероматозных бляшек интимы артерий эластического типа. По структуре БСЖК напоминает две половины речной раковины двуустки, соединенные подвижной стороной; они открываются и закрываются. Внутренняя поверхность их гидрофобная; они как бы «заглатывают» НЭЖК из гидрофильной среды цитоплазмы, после того как они преодолели плазматическую мембрану. Имея молекулярную массу меньше, чем миоглобин (18 кДа), БСЖК раньше выходит в межклеточную среду; быстрее движется с потоком лимфы по лимфатическим путям и через *ductus thoracicus* изливается в кровоток. После этого БСЖК становится доступным для количественного определения иммунохимическими, иммунохроматографическими способами.

После гибели кардиомиоцитов БСЖК наиболее рано появляется в сыворотке крови; это маркер с достаточно высокой органоспецифичностью при диагностике. Метод определения БСЖК обладает чувствительностью в 94,4, 100% специфичностью, 100% способностью предсказать развитие ИМ или же его отсутствие со столь же высоко по сравнению с ТнТ [21], в том числе и без повышения сегмента ST.

БСЖК — около 20 членов семейства белков, которые переносят полярные ЖК в клетках между плазматической мембраной и внутриклеточными органеллами в процессе многоэтапного окисления (β -, α - и ω -окисления). Метаболизм ЖК в клетках происходит в пероксисомах и митохондриях при окислении физиологических, афизиологических ЖК и избытка в пище пальмитиновой НЖК. БСЖК-1 функционирует, главным образом, в цитоплазме гепатоцитов; БСЖК-2 доминирует в эритроцитах. Основное количество БСЖК-3 сосредоточено в филогенетически поздних поперечнополосатых миоцитах и кардиомиоцитах; содержание в них белка в 30 раз выше, чем в скелетных миоцитах. БСЖК-3 доминируют в филогенетически ранних висцеральных жировых клетках сальника и БСЖК-4 — в поздних в филогенезе подкожных адипоцитах [22].

БСЖК-7 и -8 переносят ЖК в цитоплазме нейтронов мозга и астроцитах периферической нервной системы; функционирует белок в клетках тестикул. Остальные члены семейства БСЖК функционируют в клетках рыб. Определение БСЖК характеризует высокую чувствительность и специфичность. Сравнительные исследования, в которых сопо-

ставлена динамика концентрации ТнТ молекулярной массой 27 кДа и БСЖК молекулярной массой 15 кДа, приведены в клинических протоколах [23]. За рубежом тест БСЖК известен десятки лет, там он и предложен, однако в лечебных учреждениях, согласно рекомендациям Американской ассоциации кардиологов, используют преимущественно Тн. Нарушение функциональной активности нефронов, явления кардиогенного шока с понижением артериального давления, формирование сердечной недостаточности может оказать влияние на динамику содержания в сыворотке крови как миоглобина, так и БСЖК. Определение БСЖК является диагностически важным даже при наличии некротических изменений в миокарде, когда повышение в сыворотке крови содержания ТнТ и ТнI еще не наступает [24].

При обследовании больших групп пациентов с ИМ динамика прироста БСЖК наиболее выражена в первые 6 ч ОКС и ИМ; она во многом сходна с миоглобином. В течение первых 6 ч после ОКС клиническая чувствительность (специфичность) определения содержания ТнТ, СК-МБ и БСЖК составляет 38, 76 и 95% соответственно. В эти сроки чувствительность БСЖК оказывается выше, чем ТнТ. Клиническая чувствительность этих же параметров при определении их в интервале 6—24 ч после ОКС составила 100, 90 и 91%. В этот период клиническая специфичность ТнТ более высока, чем БСЖК [18]. В срок же 24 ч после ОКС клиническая чувствительность ТнТ составила 100%, СК-МБ — 90% и БСЖК — только 27%. Следовательно, диагностическое значение определения БСЖК оказывается более достоверным в течение первых 12 ч после ОКС. БСЖК — более чувствительный маркер гибели кардиомиоцитов, но только в течение первых 6—12 ч после ОКС. Далее клиническое значение определения БСЖК понижается, уступая пальму первенства Тн; динамику Тн далее при ИМ можно проследить на протяжении нескольких суток.

Клинические исследования показали, что после высокого диагностического значения в сроки ранее 6 ч после ОКС при формировании ИМ возвращение к исходному уровню БСЖК происходит через 12—24 ч после ОКС. У пациентов с ИМ в первые 6—12 ч заболевания клиническая (диагностическая) чувствительность и специфичность БСЖК позволяют получить достоверную диагностическую информацию. В первые часы от начала заболевания чувствительность БСЖК достоверно ($p < 0,05$) выше, чем ТнТ [25]. При схожей с миоглобином чувствительности более высокая специфичность БСЖК, а также более высокая прогностическая значимость определения содержания БСЖК в течение 1-х суток ИМ расширяет его диагностические возможности. Именно в первые часы ИМ БСЖК превосходит биомаркеры ТнТ и СК-МБ по чувствительности, а миоглобин — по специфичности. Имея небольшую молекулярную массу, БСЖК при повышении проницаемости (нарушение целостности сарколеммальной мембраны) быстро и количественно истекает из кардиомиоцитов.

Интересно определение содержания БСЖК в сыворотке крови у пациентов до и после электроимпульсной терапии; сразу после нанесения разряда, по данным ЭКГ, отмечено повышение интервала ST. При проведении одного разряда и повышения ST содержание БСЖК в сроки до, через 30, 60 мин, 3 и 6 ч составили соответственно 5,35 → 4,98 → 5,21 → 5,84 → 6,40 нг/мл. При необходимости повторного разряда дефибриллятора содержание БСЖК в сыворотке крови возросло: 6,36 → 9,65 → 12,41 → 11,01 нг/мл. Это дает возможность оценить количество и параметры истечения БСЖК, главным образом из кардиомиоцитов [12]. Граница между нормой и патологией для БСЖК в сыворотке и цельной крови составила 6 нг/мл (рис. 5).

Результаты измерения содержания БСЖК, которые получены в ранние сроки ИМ в многоцентровом исследовании в Японии при применении высокочувствительного иммуно-

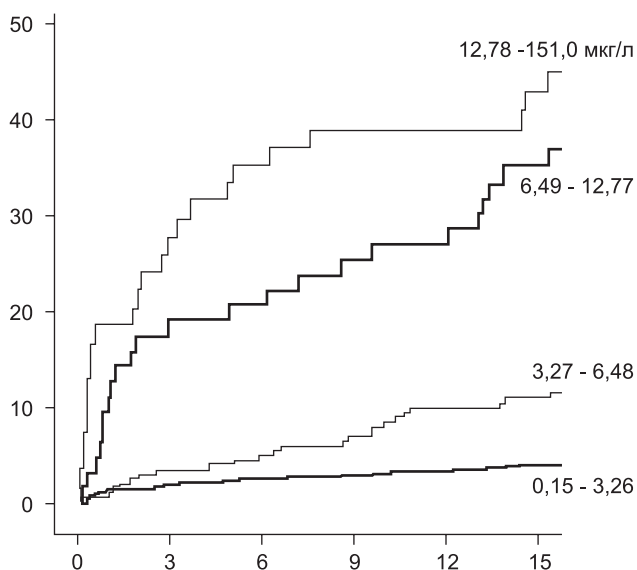


Рис. 5. Кривые Каплана—Майера — частота случаев летального исхода (ось ординат) в зависимости от содержания в плазме крови БСЖК.

По оси абсцисс — сроки летальности в месяцах после ОКС [26].

роматографического метода при определении белка в цельной крови, дает позитивный ответ при содержании БСЖК в концентрации выше 6,2 мкг/л [27]. Частота летальных исходов при ОКС прямо зависит от содержания в сыворотке крови БСЖК. У 1128 пациентов [28] с ОКС выполнены 2492 определения БСЖК. Тест БСЖК обладает высокой клинической чувствительностью, начиная с 3 ч после ОКС (64,3% позитивных результатов); эта величина возрастает до 85,3% в сроки 6—12 ч. Одновременное определение содержания ТнI увеличивает клиническую чувствительность до 71,4% в первые 3 ч и до 88,2% в сроки до 6 ч. Статистическая обработка результатов показала, что диагностическая чувствительность БСЖК в первые 6 ч достигает 97%. Одновременное использование двух тестов позволяет выявить гибель кардиомиоцитов при ОКС с инверсией интервала ST на ЭКГ во все сроки клинического наблюдения за пациентами с ИМ.

Через 12 ч диагностическое значение определения содержания БСЖК становится менее информативным: время проходит. Однако клиницисты также полагают, что диагностическое значение определения Тн более достоверно, поскольку органоспецифичность тропонинов более выражена по сравнению с меньшей мерой специфичности для БСЖК [29]. Авторы полагают, что сколь бы высокой не была клиническая чувствительность определения тестов гибели кардиомиоцитов в первые 6—12 ч ОКС и роль Тн в последующие сроки, динамическое наблюдение концентрации в сыворотке крови обоих маркеров (БСЖК + Тн) целесообразно [30]. Одновременно полагают, что для определения БСЖК в цельной крови достаточно использовать полуколичественный метод, если экспресс-иммунохроматографический тест технологически хорошо исполнен [31].

У пациентов с осложненным течением при поступлении уровень БСЖК в крови достоверно ($p < 0,05$) выше, чем при неосложненном течении ИМ. Максимальное повышение содержания БСЖК в крови у больных наблюдали в первые 6 ч после болевого приступа с постепенным снижением в сроки до 12 ч. Динамика содержания миоглобина у пациентов с осложненным и неосложненным течением ИМ схожа с данными, которые характеризуют кинетические параметры БСЖК. Содержание миоглобина повышается через 2 ч после

начала болевого приступа, достигает максимальных значений через 4—6 ч, и возвращается к нормальным значениям в сроки 18—24 ч. Выраженных различий в группах пациентов с разными формами течения ОКС и при тромболитике в течение 3 сут не выявлено [32].

У каждого 5-го пациента в течение 3 сут после успешного тромболитика охраняется повышенное содержание БСЖК в крови [34]; у части больных содержание БСЖК достигало диагностически значимых для ИМ значений [35], когда в течение года после выписки пациенты повторно поступали на стационарное лечение с прогрессированием ишемической болезни сердца и клиникой ОКС, прогрессированием нарушения функции левого желудочка. И в этих ситуациях повышение в крови содержания БСЖК в первые часы после ОКС является надежным тестом гибели кардиомиоцитов, свидетельством повреждению миокарда [13] (рис. 6). Повышенное содержание БСЖК в течение 3 сут после ОКС — предиктор ранних и поздних осложнений, которые могут быть связаны с повторными эпизодами острой ишемии миокарда. В последнее время предложено проводить определение содержания БСЖК в цельной крови непосредственно у постели пациента (по месту лечения) или в машине скорой помощи [7].

В клинических исследованиях установлено диагностическое значение определения содержания в крови БСЖК в ранние сроки ИМ, а в более поздние сроки в диагностике доминируют тропонины. Накоплены и достоверные результаты сопоставления динамика КК, массы МВ-КК в течение всего времени ИМ. У кардиохирургических больных в отсутствие других инструментально подтвержденных признаков некроза миокарда определение динамики концентрации БСЖК отражает «хирургическую травму» сердечной мышцы. Высокое содержание в сыворотке крови одновременно БСЖК и Тн в первые 12 ч ИМ — достоверный прогностический фактор летального исхода (рис. 7).

При коронарном шунтировании максимальное содержание БСЖК отмечено при операциях, проводимых в условиях искусственного кровообращения. Показано, что уровень в крови БСЖК у мужчин в 1-е сутки ИМ выше, чем у жен-

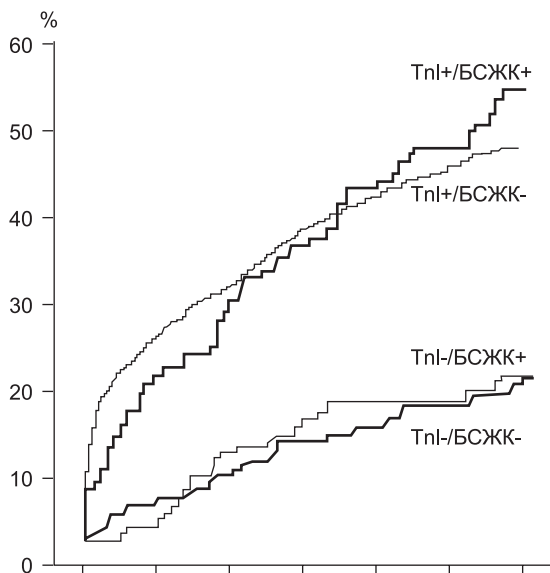


Рис. 6. При ОКС определение содержания БСЖК — достоверный предвестник летального исхода при сравнении с ТнI.

По оси ординат — все причины летальности; по оси абсцисс — время после ОКС в годах.

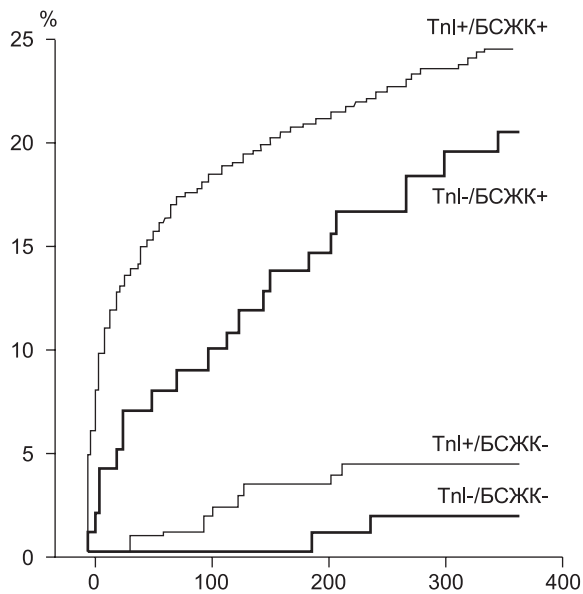


Рис. 7. Высокое содержание и ТнI и БСЖК отражает риск летального исхода (верхние кривые).

Отсутствие при ОКС повышения ТнI и БСЖК — прогноз отсутствия летальности в течение 6 мес. По оси ординат — летальность в процентах; по оси абсцисс — дни после ОКС.

щин. Концентрация в плазме крови БСЖК значимо коррелирует с иными клиническими проявлениями ИМ, в том числе Q-позитивными маркерами ОКС как Тн, активность КК и масса изофермента МВ-КК, а также с тестами активности биологической реакции воспаления. Диагностическая чувствительность метода является высокой при определении БСЖК иммуноферментным методом (иммунотурбидиметрией) при проведении измерений на автоматизированных анализаторах. Относительно концентраций БСЖК, которые необходимо измерять, достаточно оказывается и применение современных методов иммунохроматографии [37]; они позволяют определять даже содержание в сыворотке крови наркотиков.

Таким образом, содержание БСЖК в сыворотке крови начинает повышаться через 2—3 ч после ОКС и достигает максимального значения в среднем через 8,5 ч [12]. В конце 1-х суток ОКС содержание БСЖК в крови существенно понижается (экскреция с мочой) значительно уменьшается; уровень БСЖК в крови остается несколько выше исходного в течение 1-х суток. Высокая клиническая чувствительность и относительно высокая органоспецифичность характерна для БСЖК в сроки 12 ч после клинической картины ОКС; в ранние сроки клиническая специфичность БСЖК выражено преобладает над концентрацией тропонинов [38].

Через 12 ч после ОКС более высокую клиническую чувствительность и диагностическую специфичность начинают проявлять тропонины, которые далее главенствуют в течение нескольких суток ИМ. При одновременном измерении БСЖК и Тн чувствительность биохимической диагностики в первые 12 ч возрастает на 30% [39]. В более поздние сроки преимущество одновременного определения БСЖК и Тн перестает быть необходимым; БСЖК в это время выводятся почками при экскреции с мочой; после 12 ч диагностическая значимость определения тропонинов становится доминирующей [13]. Не выявлено связи между содержанием в сыворотке крови БСЖК и признаками реперфузии, миокарда, по данным ЭКГ, вероятно, по причине редкого взятия крови на определение столь динамичного теста как БСЖК. Тест не подходит для оценки

состояния пациентов с недостаточностью кровообращения по причине получения не в полной мере адекватных результатов. Мы полагаем, что лучший выход из диагностически сложной ситуации ОКС в течение 1-х суток — использование экспресс-иммунохроматографического теста, который позволит у постели пациента, в машине скорой помощи определить сразу содержание в цельной крови БСЖК и тропонина с возможностью «сохранить» результаты определения.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3—4, 6—7, 9—11, 16—31, 33, 36 см. REFERENCES)

1. Лохов П.Г., Маслов Д.Л., Балашова Е.Е., Трифонова О.П., Медведева Н.В., Торховская О.П. и др. Масс-спектрометрический анализ липидома плазмы крови, как способ диагностики заболеваний, оценки эффективности и оптимизации лекарственной терапии. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(1): 7-18.
2. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз*. М.: ИНФРА-М; 2014.
5. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи А.Н., Старков А.А. Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя. *Биохимия*. 2015; 80(5): 612—30.
8. Тараховский Ю.С. Трансфекция клеток ДНК-липидными комплексами — липоплексами. *Биохимия*. 2009; 74(12): 1589—602.
12. Трифонов И.Р. *Характеристика сердечного белка, связывающего жирные кислоты, как маркера некроза миокарда в часто встречающихся клинических ситуациях*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.; 2009.
13. Мазовец О.Л., Трифонов И.Р., Катруха А.Г., Медведева М.В., Грацианский Н.А. Уровни N-концевого предшественника мозгового натрийуретического пептида у больных, госпитализированных по поводу ухудшения сердечной недостаточности при поступлении и перед выпиской. Связь с риском смерти в последующие 6—12 месяцев. *Кардиология*. 2009; 49(1): 34—8.
14. Мазовец О.Л., Трифонов И.Р., Катруха А.Г., Медведева М.В., Березникова А.В., Деев А.Д. и др. Прогностическое значение сердечного белка, связывающего жирные кислоты, у больных, госпитализированных из-за ухудшения сердечной недостаточности. Результаты 6—12 месячного наблюдения. *Кардиология*. 2008; 48(1): 24—9.
15. Эрлих А.Д., Катруха А.Г., Трифонов И.Р., Березникова А.В., Грацианский Н.А. Острый коронарный синдром без подъемов сегмента ST на ЭКГ. Прогностическое значение определения сердечной формы белка, связывающего жирные кислоты. Результаты 12-месячного наблюдения. *Кардиология*. 2005; 45(5): 13—21.
32. Пархоменко А.Н., Иркин О.И., Лутай Я.М. Роль биологических маркеров в неотложной кардиологии. *Медицина неотложных состояний*. 2011; (7-8): 20.
34. Деметьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А. Сердечный белок, связывающий жирные кислоты, в оценке повреждений миокарда в кардиологии и кардиохирургии. *Врач скорой помощи*. 2010; (1): 53—8.
35. Титов В.Н., Вельков В.В. *Руководство по кардиологии*. Том 2. Чазова Е.И., ред. М.: Практика; 2014.
37. Яковлева Е.А., Андреева И.П., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Иммунохроматографический экспресс-анализ белка, связывающего жирные кислоты, для диагностики острого инфаркта миокарда. *Вестник Московского университета*. Серия 2: Химия. 2011; 52(6): 432—7.
38. Мартынов А.И., Воевода М.И., Арутюнов Г.П., Кокорин В.А., Спасский А.А. Клиническая эффективность ранней диагностики острого миокарда с помощью белка, связывающего жирные кислоты. *Российский кардиологический журнал*. 2012; (3): 7—11.
39. Рябов В.В., Киргизова М.А., Марков В.А. Использование экспресс-теста для определения сердечного белка связывающего жирные кислоты в диагностике острого инфаркта миокарда. *Российский кардиологический журнал*. 2014; (2): 84—8.

Поступила 20.02.16

REFERENCES

1. Lokhov P.G., Maslov D.L., Balashova E.E., Trifonova O.P., Medvedeva N.V., Torkhovskaya O.P. et al. Mass spectrometric analysis lipi-
doma blood plasma as a method of diagnosing diseases, and evaluat-

- ing the effectiveness of drug therapy optimization. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(1): 7—18. (in Russian)
- 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)
 - Collinson P.O., Gaze D.C., Thokala P., Goodacre S. Randomised Assessment of Treatment using Panel Assay of Cardiac markers — Contemporary Biomarker Evaluation (RATPAC CBE). *Health Technol. Assess.* 2013; 17(15): 1—122.
 - McCann C.J., Glover B.M., Menown I., Moore M.J., McEneny J., Owens C.G. et al. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. *Eur. Heart J.* 2008; 29(23): 2843—50.
 - Andreev A.Yu., Kushnarev Yu.E., Merfi A.N., Starkov A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species: ten years later. *Biokhimiya*. 2015; 80(5): 612—30. (in Russian)
 - Azzazy H.M., Pelsers M., Christenson R.H. Unbound free fatty acids and heart-type fatty acid-binding protein: diagnostic assays and clinical applications. *Clin. Chem.* 2006; 52(1): 19—29.
 - Figiel L., Wraga M., Bednarkiewicz Z., Lipiec P., Smigielski J., Krzemińska-Pakuła M. et al. Direct comparison of the diagnostic value of point-of-care tests detecting heart-type fatty acid binding protein or glycogen phosphorylase isoenzyme BB in patients with acute coronary syndromes with persistent ST-segment elevation. *Kardiolog. Pol.* 2011; 69(1): 1—6.
 - Tarakhovskiy Yu.S. Transfection of cells DNA-lipid complexes — lipoplexes. *Biokhimiya*. 2009; 74(12): 1589—602. (in Russian)
 - Syamsunarno M., Iso T., Hanaoka H., Yamaguchi A., Obokata M., Koitabashi N. et al. A critical role of fatty acid binding protein 4 and 5 (FABP4/5) in the systemic response to fasting. *PLoS One*. 2013; 8(11): e79386.
 - Ishii J., Ozaki Y., Lu J., Kitagawa F., Kuno T., Nakano T. et al. Prognostic value of serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein relative to cardiac troponin T on admission in the early hours of acute coronary syndrome. *Clin. Chem.* 2005; 51(8): 1397—404.
 - Seino Y., Ogata K., Takano T., Ishii J., Hishida H., Morita H. et al. Use of a whole blood rapid panel test for heart-type fatty acid-binding protein in patients with acute chest pain: comparison with rapid troponin T and myoglobin tests. *Am. J. Med.* 2003; 115(3): 185—90.
 - Trifonov I.R. *Characterization of Cardiac Binding Protein Fatty Acid as a Marker of Myocardial Necrosis in Common Clinical Situations*: Diss. Moscow; 2009. (in Russian)
 - Mazovets O.L., Trifonov I.R., Katrukha A.G., Medvedeva M.V., Gratsianskiy N.A. The levels of N-terminal brain natriuretic peptide precursor in patients hospitalized with worsening heart failure at admission and before discharge. Due to the risk of death in the next 6—12 months. *Kardiologiya*. 2009; 49(1): 34—8. (in Russian)
 - Mazovets O.L., Trifonov I.R., Katrukha A.G., Medvedeva M.V., Berznikova A.V., Deev A.D. et al. The prognostic value of cardiac protein, fatty acid binding, in patients hospitalized for worsening heart failure. Results 6—12 month follow-up. *Kardiologiya*. 2008; 48(1): 24—9. (in Russian)
 - Erlikh A.D., Katrukha A.G., Trifonov I.R., Berznikova A.V., Gratsianskiy N.A. Acute coronary syndrome without ST-segment elevation on ECG. The prognostic value of determining the cardiac form of the protein, fatty acid binding. The results of the 12-month follow-up. *Kardiologiya*. 2005; 45(5): 13—21. (in Russian)
 - Chen L., Guo X., Yang F. Role of heart-type fatty acid binding protein in early detection of acute myocardial infarction in comparison with cTnI, CK-MB and myoglobin. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2004; 24(5): 449—51.
 - Liyan C., Jie Z., Xiaozhou H. Prognostic value of combination of heart-type fatty acid-binding protein and ischemia-modified albumin in patients with acute coronary syndromes and normal troponin T values. *J. Clin. Lab. Anal.* 2009; 23(1): 14—8.
 - Ruzgar O., Bilge A.K., Bugra Z., Umman S., Yilmaz E., Ozben B. et al. The use of human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic biochemical marker of myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome, and its comparison with troponin-T and creatine kinase-myocardial band. *Heart Vessels*. 2006; 21(5): 309—14.
 - Roy V.K., Kumar A., Joshi P., Arora J., Ahanger A.M. Plasma free Fatty Acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013; 7(11): 2432—4.
 - Bertinchant J.P., Polge A. Diagnostic and prognostic value of heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP), an early biochemical marker of myocardial injury. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2005; 98(12): 1225—31.
 - Figiel L., Kasprzak J.D., Peruga J., Lipiec P., Drozd J., Krzeminska-Pakuta M. et al. Heart-type fatty acid binding protein—a reliable marker of myocardial necrosis in a heterogeneous group of patients with acute coronary syndrome without persistent ST elevation. *Kardiolog. Pol.* 2008; 66: 253—9.
 - Gimeno R.E., Ortegon A.M., Patel S., Punreddy S., Ge P., Sun Y. et al. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(18): 16039—44.
 - Bathia D.P., Carless D.R., Viswanathan K., Hall A.S., Barth J.H. Serum 99th centile values for two heart-type fatty acid binding protein assays. *Ann. Clin. Biochem.* 2009; 46(Pt. 6): 464—7.
 - Daly M.J., McCann C.J., Owens C.G., Harbinson M.T., Adgey J.A. Heart fatty acid-binding protein in combination with the 80-lead body surface potential map improves early detection of acute myocardial infarction in patients who are cardiac troponin T-negative at presentation. *J. Electrocardiol.* 2011; 44(4): 432—8.
 - Li C., Li Y., Liang X., Li X., Cui J., Yang Z. et al. Point-of-care test of heart-type fatty acid-binding protein for the diagnosis of early acute myocardial infarction. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010; 31(3): 307—12.
 - Viswanathan K., Kilcullen N., Morrell C., Thistlethwaite S.J., Sivanathan M.U., Hassan T.B. et al. Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality and re-infarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin-negative. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(23): 2590—8.
 - Okamoto F., Sohmiya K., Ohkaru Y., Kawamura K., Asayama K., Kimura H. et al. Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000; 38(3): 231—8.
 - McMahon C.G., Lamont J.V., Curtin E., McConnell R.I., Crocford M. et al. Diagnostic accuracy of heart-type fatty acid-binding protein for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. J. Emerg. Med.* 2012; 30(2): 267—74.
 - Kagawa Y., Toyofuku M., Masaoka Y., Muraoka Y., Okimoto T., Otsuka M. et al. Comparison of heart-type fatty acid binding protein and sensitive troponin for the diagnosis of early acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2013; 166(2): 347—51.
 - Body R., McDowell G., Carley S., Wibberley C., Ferguson J., Mackway-Jones K. A FABP-ulous 'rule out' strategy? Heart fatty acid binding protein and troponin for rapid exclusion of acute myocardial infarction. *Resuscitation*. 2011; 82(8): 1041—6.
 - Charpentier S., Maupas-Schwalm F., Cournot M., Elbaz M., Ducassé J.L., Bottela J.M. et al. Diagnostic accuracy of quantitative heart-fatty acid binding protein assays compared with cardiotect in the early detection of acute coronary syndrome. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2011; 104(10): 524—9.
 - Parkhomenko A.N., Irkin O.I., Lutay Ya.M. The role of biological markers in emergency cardiology. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2011; (7-8): 20. (in Russian)
 - O'Donoghue M., de Lemos J.A., Morrow D.A., Murphy S.A., Burros J.L., Cannon C.P. et al. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2006; 114(6): 550—7.
 - Dement'eva I.I., Morozov Yu.A., Charnaya M.A. Heart protein binding fatty acids in evaluating myocardial damage in cardiology and cardiac surgery. *Vrach skoroy pomoshchi*. 2010; (1): 53—8. (in Russian)
 - Titov V.N., Vel'kov V.V. *Manual of Cardiology. Volume 2 [Rukovodstvo po kardiologii. Tom 2]*. Chazova E.I., ed. Moscow: Praktika; 2014. (in Russian)
 - Kilcullen N., Viswanathan K., Morrell C., Thistlethwaite S.J., Sivanathan M.U., Hassan T.B. et al. Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality and re-infarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin-negative. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(23): 2590—8.
 - Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Osipov A.P. Immunochromatographic rapid analysis of protein, fatty acids to get involved, for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya*. 2011; 52(6): 432—7. (in Russian)
 - Martynov A.I., Voevoda M.I., Arutyunov G.P., Kokorin V.A., Spasskiy A.A. The clinical efficacy of early diagnosis of acute myocardial infarction via binding protein fatty acid. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2012; (3): 7—11. (in Russian)
 - Ryabov V.V., Kirgizova M.A., Markov V.A. Using a rapid test for determining cardiac fatty acid binding protein in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2014; (2): 84—8. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.329-006.4-092]:577.21.08

Осминин С.В.¹, Ветшев Ф.П.¹, Руденко В.В.³, Залетаев Д.В.¹, Хоробрых Т.В.¹, Немцова М.В.^{2,3}

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ПИЩЕВОДА КАК МАРКЕРЫ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОГРЕССИИ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИРЕФЛЮКСНЫХ ОПЕРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ПИЩЕВОДОМ БАРРЕТТА

¹ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва;

²ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава РФ, 125993, Москва;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, Российская Федерация

В основе развития заболевания пищеводом Барретта (ПБ) лежат процессы метаплазии эпителия пищевода, при которых вследствие рефлюкса желудочного сока и желчных кислот нормальный плоскоклеточный эпителий пищевода замещается цилиндрическим эпителием кишечного типа. Затем ПБ прогрессирует до дисплазии и аденокарциномы (АК) пищевода. Прогрессия от предраковых состояний до опухоли связана с появлением в клетках нарушений генома, которые ассоциированы со злокачественной трансформацией. Генетические и эпигенетические изменения, обуславливающие опухолевый рост, могут служить маркерами прогноза клинического течения заболевания. Чтобы получить возможные маркеры прогрессии ПБ, мы исследовали метилирование генов-супрессоров опухолевого роста MGMT, CDH1, p16/CDKN2A, DAPK, RAR-β и RUNX3 у больных с ПБ и АК пищевода, а также оценивали эффективность проведенного антирефлюксного хирургического лечения. Аномальное метилирование исследуемой генетической панели у больных ПБ до хирургического лечения достоверно чаще наблюдали в измененном эпителии по сравнению с неизменным ($p < 0,0001$), при дисплазии по сравнению с метаплазией ($p = 0,0358$) и при наличии длинных (>3 см) сегментов измененного эпителия по сравнению с короткими (<3 см) ($p = 0,0068$). В нормальном эпителии до операции аномальное метилирование панели генов определяли у 7 (12%) из 60 пациентов. На фоне оперативного лечения достоверно уменьшилось количество длинных и коротких сегментов измененного эпителия пищевода ($p < 0,05$), причем в коротких сегментах после операции частота метилирования значительно возросла ($p = 0,0068$). Хотя после операции снизилось количество больных ПБ с дисплазией и метаплазией, однако частота аномального метилирования у остальных пациентов выросла. Нами показано, что антирефлюксная операция улучшает состояние слизистой пищевода при ПБ, однако в случаях без регрессии происходит значительное увеличение частоты аномального метилирования исследуемой панели генов. Это доказывает, что аномальное метилирование системы генов связано с худшим ответом на проведение антирефлюксного оперативного лечения.

Ключевые слова: пищевод Барретта; метаплазия; дисплазия; аномальное метилирование; гены-супрессоры опухолевого роста; антирефлюксная хирургия; панель молекулярных маркеров.

Для цитирования: Осминин С.В., Ветшев Ф.П., Руденко В.В., Залетаев Д.В., Хоробрых Т.В., Немцова М.В. Молекулярно-генетические изменения в слизистой пищевода как маркеры онкологической прогрессии и оценки эффективности антирефлюксных операций у больных пищеводом Барретта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(10): 681-685

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-10-681-685

Osminin S.V.¹, Vetshev F.P.¹, Rudenko V.V.³, Zaletaev D.V.¹, Khorobrykh T.V.¹, Nemtsova M.V.^{2,3}

THE MOLECULAR GENETIC ALTERATIONS IN MUCOSA OF INTESTINES AS MARKERS OF ONCOLOGIC PROGRESSION AND ESTIMATE OF EFFECTIVENESS OF ANTI-REFLUX OPERATIONS IN PATIENTS WITH BARRETT'S ESOPHAGUS

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

²The Russian medical academy of post-graduate education of Minzdrav of Russia, 123995 Moscow, Russia

³The medical genetic research center, 115478 Moscow, Russia

The development of disease of Barrett's esophagus is based on processes of metaplasia of epithelium of esophagus when as a result of reflux of gastric juice and bile acids the normal planocellular epithelium of esophagus is replaced by cylindrical epithelium of intestinal type. Thereupon, Barrett's esophagus is progressing up to dysplasia and adenocarcinoma of esophagus. The progression from precancerous states up to tumor is related to development of genome disorders in cells associated with malignant transformation. The genetic and epigenetic alterations conditioning tumor growth can be used as markers of prognosis of clinical course of disease. To receive possible markers of progression of Barrett's esophagus the study was organized concerning methylation of such genes-suppressors of tumor growth as MGMT, CDH1, p16/CDKN2A, DAPK, RAR-β and RUNX3 in patients with Barrett's esophagus and adenocarcinoma of esophagus. The effectiveness of applied anti-reflux surgical treatment was evaluated too. The abnormal methylation of studied genetic panel in patients with Barrett's esophagus prior to surgical treatment was observed reliably more frequently in altered epithelium as compared with unaltered epithelium ($p < 0.0001$), under dysplasia as compared with metaplasia ($p < 0.0358$) and in the presence of long (>3 cm) segments of altered epithelium as compared with short (<3 cm) segments ($p = 0.0068$). In normal epithelium, prior to operation, abnormal methylation of panel of genes was detected in 7/60 (12%) of patients. Against the background of surgical treatment number of long and short segments of altered epithelium of esophagus reliably decreased ($p < 0.05$). At that, in short segments after operation rate of methylation increased significantly ($p = 0.0068$). Though after operation number of patients with Barrett's esophagus and dysplasia and metaplasia decreased, the rate of abnormal

Для корреспонденции: Немцова Марина Вячеславовна, д-р биол. наук, проф. каф. медицинской генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ, e-mail: nemtsova_m_v@mail.ru

methylation in the other patients increased. It is demonstrated that anti-reflux operation ameliorates condition of mucous membrane of esophagus under Barrett's esophagus. However, in cases without regression significant increasing of rate of abnormal methylation of studied panel of genes is occurred. This is a proof that abnormal methylation of system of genes is related to worse response to application of anti-reflux surgical treatment.

Key words: *Barrett's esophagus; metaplasia; dysplasia; abnormal methylation; gene-suppressor of tumor growth; anti-reflux surgery; panel of molecular markers*

For citation: Osminin S.V., Vetshev F.P., Rudenko V.V., Zaletaev D.V., Khorobrykh T.V., Nemtsova M.V. The molecular genetic alterations in mucosa of intestines as markers of oncologic progression and estimate of effectiveness of anti-reflux operations in patients with Barrett's esophagus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 681-685. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-681-685

For correspondence: *Nemtsova M.V.*, doctor of biological sciences, professor of the chair of medical genetics of the Russian medical academy of post-graduate education of Minzdrav of Russia, e-mail: nemtsova_m_v@mail.ru

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

Financing. *The study had no sponsor support.*

Received 21.04.2016
Accepted 15.05.2016

Введение. Рак пищевода занимает шестое место в мировой статистике причин смерти от онкологических заболеваний и располагается на восьмой позиции среди наиболее распространенных видов рака [1]. В течение последних трех десятилетий существенно изменялся «гистологический портрет» рака пищевода, произошло снижение заболеваемости плоскоклеточным раком на фоне возросшей в 6 раз частоты аденокарциномы пищевода [2]. Пятилетняя выживаемость при аденокарциноме пищевода зачастую не превышает 15—25%, что обусловлено поздней диагностикой заболевания и быстрой, анатомически обоснованной, диссеминацией опухолевого процесса.

Известно, что пищевод Барретта (ПБ) является предшественником аденокарциномы (АК) пищевода, увеличивая риск ее развития в 30—125 раз [3]. В основе развития ПБ лежат процессы метаплазии эпителия пищевода, при которых под действием различных факторов нормальный плоскоклеточный эпителий замещается цилиндрическим эпителием кишечного типа, затем ПБ прогрессирует до стадии дисплазии и до АК пищевода [4]. В эмбриогенезе пищевода изначально выстилали цилиндрические клетки мерцательного эпителия, которые заменялись многослойным плоским эпителием в процессе развития, а при ПБ происходит обратный процесс [5]. Метаплазия является защитной реакцией эпителия при хроническом воспалении, возникающем вследствие рефлюкс-эзофагита, которым страдает до 62% населения развитых стран [6]. Рефлюкс-эзофагит — это патологический заброс кислот желудочного сока и желчи в пищевод в результате нарушения клапанного механизма кардиального отдела желудка. Частота выявления ПБ при эндоскопическом исследовании может достигать 32%, а при аутопсии составляет 376 на 100 тыс. человек [7].

Переключение фенотипа клеток эпителия с плоскоклеточного на цилиндрический происходит из-за изменения экспрессии ряда ключевых генов-регуляторов фенотипа [5]. Аномальная экспрессия генов, наблюдаемая в эпителии при ПБ, возвращается к норме после выполнения антирефлюксных операций, что подтверждает возможность регенерации эпителия при устранении факторов развития хронического воспаления [8, 9]. Однако в ряде случаев независимо от проведенного лечения происходит прогрессия ПБ в дисплазию и далее в АК пищевода. Прогрессия предраковых состояний до опухолей связана с появлением в клетках нарушений генома, которые ассоциированы со злокачественной трансформацией. Генетические и эпигенетические изменения, обуславливающие опухолевый рост, могут служить маркерами раннего определения и клинического течения заболевания.

Нарушение метилирования генов-супрессоров является одним из ранних событий канцерогенеза, его можно опреде-

лить до клинического проявления опухолевого роста, в таких предопухолевых поражениях, как метаплазия и дисплазия. Чтобы получить возможные маркеры прогрессии ПБ, мы исследовали метилирование генов-супрессоров опухолевого роста *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* у больных ПБ с метаплазией, ПБ с дисплазией и АК пищевода.

Материал и методы. У 60 больных, оперированных в клинике факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова по поводу рефлюкс-эзофагита, осложненного ПБ, до и после хирургического лечения выполняли исследование метилирования генов *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* в измененном и неизменном эпителии пищевода. Из 60 пациентов с ПБ у 32 определяли метаплазию эпителия пищевода, у 28 — дисплазию эпителия. При хирургическом лечении пациентам традиционным или лапароскопическим методом выполняли антирефлюксную операцию по принятой в клинике методике. В дооперационном и послеоперационном периоде у всех больных проводилось эндоскопическое исследование длины измененных сегментов слизистой пищевода, их протяженность до 3 см определялась как короткие сегменты, свыше 3 см — как длинные сегменты. Для получения материала пациентам с ПБ при эндоскопическом исследовании до и после оперативного лечения выполняли четырехквadrантную биопсию из участков визуально измененной и нормальной слизистой оболочки дистальных отделов пищевода. После операции забор материала у пациентов с ПБ осуществляли в период от 6 до 54 мес.

Также аномальное метилирование генов *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* исследовали в операционных образцах у 34 больных с АК пищевода. В зависимости от локализации опухоли больным АК пищевода проводили трансторакальную или транسخиатальную экстирпацию пищевода с одномоментной пластикой желудочной трубкой с лимфаденэктомией 2S или 2F, образцы эпителия получали из макропрепарата.

Аномальное метилирование панели генов исследовали методом многокусовой метилчувствительной ПЦР, с использованием рестрикционной эндонуклеазы HpaII, на ДНК, полученной из всех образцов ткани пищевода по стандартной методике [10].

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Prism 6 (GraphPad-Prism version 6.0). Сравнение по частоте встречаемости метилирования между двумя независимыми группами определяли с помощью точного двустороннего критерия Фишера, для сравнения более чем двух независимых групп использовали двусторонний тест χ^2 или тест Краскела—Уоллиса. Для всех использованных тестов достоверными считали различия при

Результаты исследования аномального метилирования генов *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* у пациентов с пищеводом Барретта и аденокарциномой пищевода

Показатель	Признак (число больных)	Met+	Met-	<i>p</i>	
Пациенты	ПБ (60)	36	24	н.д.	
	АК (34)	22	12		
Стадии АК (TNM 2009)					
IA	2	—	2	0,0084	
IIA	4	2	2		
IIIB	10	4	6		
IIIC	10	10	—		
IV	8	6	2		
До лечения					
1-я	Метаплазия (32/60)	15	17	0,0358	
	Дисплазия (28/60)	21	7		
2-я	Нормальный эпителий (60)	7	53	0,0001	
	Измененный эпителий (60)	31	29		
3-я	Длинные сегменты (18/60)	17	1	0,0068	
	Короткие сегменты (42/60)	19	23		
После лечения					
1-я	Метаплазия (13)	10	3	н. д.	
	Дисплазия (5)	5	0		
2-я	Нормальный эпителий (60)	4	56	0,0194	
	Измененный эпителий (60)	14	46		
	Длинные сегменты (6)	4	2		н. д.
	Короткие сегменты (12)	11	1		

Примечание. н.д. — результаты сравнения недостоверны; 1–3-я – группы.

$p \leq 0,05$. Прогностическая ценность маркера метилирования определялась по критериям чувствительности (Ч) и специфичности (С), рассчитываемым по формулам $Ч = ИП/(ИП + ЛО)$ и $С = ИО/(ИО + ЛП)$ соответственно, где ИП — метилирование, выявленное в группе пациентов, не ответивших на хирургическую коррекцию морфологическим восстановлением дис-/метапластической ткани (истинноположительные результаты); ЛО — пациенты без метилирования до лечения, не ответившие на хирургическую коррекцию морфологическим восстановлением дис-/метапластической ткани (ложноотрицательные результаты); ИО — пациенты без метилирования до лечения, ответившие морфологическим восстановлением дис-/метапластической ткани до нормальной (истинноотрицательные результаты); ЛП — метилирование, выявленное в группе пациентов, ответивших на хирургическую коррекцию морфологическим восстановлением дис-/метапластической ткани (ложноположительные результаты).

Результаты. Для определения возможности использования аномального метилирования в качестве маркера для прогнозирования прогрессии ПБ в АК пищевода мы изучили

метилирование генов *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* в измененном и неизменном эпителии пищевода при ПБ до и после хирургического лечения, а также при АК. Пациенты с аномальным метилированием хотя бы одного гена из предложенной системы составили группу мет+, а без метилирования — группу мет-. Полученные результаты представлены в таблице.

Аномальное метилирование генетической панели наблюдалось у 22 (65%) из 34 больных АК пищевода. Выявлено достоверное возрастание частоты метилирования генетических маркеров по мере прогрессирования стадии опухолевого процесса от IA и IIA до IIIC и IV ($p = 0,0084$) (рис. 1).

Корреляция между частотой аномального метилирования и увеличением стадии АК пищевода подтверждается данными о накоплении генетических и эпигенетических повреждений с ростом и прогрессией опухоли. Преобладания аномального метилирования какого-либо одного гена в зависимости от стадии рака пищевода выявить не удалось, возможно, это связано с ограниченной 34 наблюдениями выборкой пациентов.

Аномальное метилирование исследуемой генетической панели у больных ПБ до хирургического лечения достоверно чаще наблюдали в измененном эпителии по сравнению с неизменным ($p = 0,0001$), при дисплазии по сравнению с метаплазией ($p = 0,0358$) и при наличии длинных (более 3 см) сегментов измененного эпителиа по сравнению с короткими (менее 3 см) ($p = 0,0068$). В нормальном эпителии до операции аномальное метилирование панели генов определяли у 7 (12%) из 60 пациентов.

После проведенного хирургического лечения достоверно уменьшилось количество больных с метаплазией и дисплазией эпителиа пищевода ($p < 0,0001$). В измененном эпителии наблюдали статистически значимое снижение частоты метилирования после лечения ($p = 0,0024$) (рис. 2). При сравнении измененного и неизменного эпителиа после лечения частота аномального метилирования в измененном эпителии осталась достоверно выше ($p = 0,0194$).

После лечения ПБ с метаплазией определяли в 10 случаях, а ПБ с дисплазией — в 5 случаях. При этом у 7 (12%) из 60 пациентов, имеющих аномальное метилирование в нормальном эпителии до лечения, у 4 (6%) из 60 больных его наблюдали и после операции. Визуально же у всех 4 больных отмечали некоторую регрессию воспалительных изменений в пищеводе. После оперативного лечения в измененном эпителии у двух больных с метаплазией и одного с дисплазией при гистологическом исследовании регрессии выявлено не было, лишь у одного пациента с дисплазией до операции после лечения диагностировали метаплазию клеток эпителиа.

На фоне оперативного лечения достоверно уменьшилось

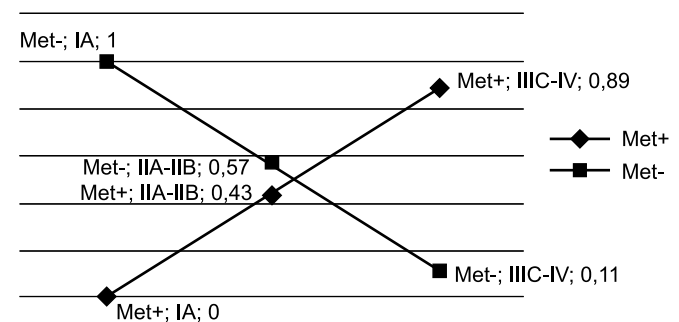


Рис. 1. Изменение частоты аномального метилирования панели маркеров в зависимости от стадии аденокарциномы пищевода, *p* (уровень достоверности, указан под стадией рака пищевода).

БИОХИМИЯ

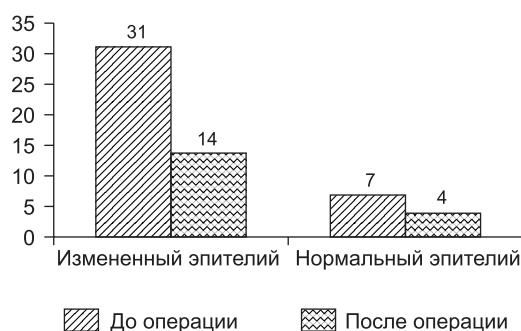


Рис. 2. Частота метилирования панели исследуемых генов до и после лечения у пациентов с ПБ (в %). По оси ординта — число пациентов ПБ.

количество длинных и коротких сегментов измененного пищевода ($p < 0,05$). Причем в коротких сегментах после операции частота метилирования у 11 (91%) из 12 значительно возросла по сравнению с частотой до лечения ($p = 0,0068$). Хотя после операции количество больных ПБ с дисплазией снизилось с 28 до 5, однако все больные попали в группу мет+. Частота метилирования у пациентов с метаплазией после операции также выросла — до 10 (76%) из 13. У больных с длинными сегментами ПБ после операции аномальное метилирование выявляли у 4 (66%) из 6, а у больных с короткими сегментами — у 11 (91%) из 12.

Частоты метилирования каждого гена у пациентов с АК пищевода, ПБ с метаплазией и ПБ с дисплазией представлены на рис. 3.

Из проведенного исследования видно, что чаще всего во всех трех группах выявляли метилирование гена *MGMT* (53% при ПБ с метаплазией, 57% при ПБ с дисплазией и 54% при АК пищевода). Метилирование гена *RAR-β* не было выявлено у пациентов с ПБ с метаплазией, частота его увеличивалась с 5% при ПБ с дисплазией до 15% при АК пищевода, также как и частота метилирования гена *DAPK*, которая нарастала от ПБ с метаплазией (7%) до ПБ с дисплазией (9%) и АК пищевода (18%). Наибольшая частота метилирования гена *RUNX3* была характерна для ПБ с дисплазией (52%).

Интересно отметить, что среди у 6 (10%) из 60 больных с триадой Saint (сочетание грыжи пищеводного отверстия диафрагмы, желчнокаменной болезни и дивертикулеза кишечника), а также при сочетании атрофического гастрита, бульбита и/или язвы двенадцатиперстной кишки аномальное метилирование системы наблюдали достоверно чаще ($p = 0,0181$).

Обсуждение. Изменение клеточного фенотипа при метаплазии и дисплазии ПБ, а также прогрессия до АК пищевода происходят вследствие изменения в клетке экспрессии ряда генов в результате их перестроек, накопления мутаций или эпигенетической инактивации. Накопленные изменения клеточного генома можно выявить лабораторными методами и составить из них систему маркеров, ассоциированную с клиническим поведением опухоли, ее прогрессией, инвазией или метастазированием. Современное развитие лабораторных методов исследования, в том числе и полногеномных, позволяет определить гены и их продукты, которые отличают опухолевые и предопухольные изменения. Опубликованные в 2011 г. результаты полногеномных исследования профилей метилирования ДНК при ПБ и АК пищевода показали значительные различия в профилях метилирования генов при этих процессах, а также позволили идентифицировать десятки генов, метилирование которых различается при этих состояниях [11]. Однако чтобы собрать метилированные гены в системы, которые можно использовать в практической медицине, необходимо проводить их исследование на

различных выборках больных с получением статистически значимых ассоциаций. Гены, используемые нами в системе, характеризуются высокой частотой метилирования и клинически значимыми ассоциациями.

Исследователи определили метилирование 9 генов (*APC*, *CDKN2A*, *ID4*, *MGMT*, *RBPI*, *RUNX3*, *SFRP1*, *TIMP3*, *TMEFF2*) в образцах пациентов с ПБ, АК пищевода и в нормальном эпителии и установили, что частота метилирования для *CDKN2A* и *RUNX3* была значительно выше для АК по сравнению с образцами пациентов с ПБ [12]. В своем исследовании мы не стремились определить частоты метилирования отдельных генов, а использовали все гены в панели, чтобы сделать различия более достоверными.

Zhe Jin и соавт. [13] в ходе двойного слепого мультицентрового исследования изучили аномальное метилирование панели генов (*p16*, *RUNX3*, *HPP1*, *NELL1*, *TAC1*, *SST*, *AKAP12*, *CDH13*) в 195 образцах биопсий эпителия пищевода у больных ПБ с целью использования данных маркеров для оценки риска прогрессии заболевания. Было показано, что метилирование генов *HPP1*, *p16* и *RUNX3* выявляется достоверно чаще при прогрессировании ПБ до дисплазии высокой степени и АК пищевода ($p = 0,0025$; $0,0066$ и $0,0002$ соответственно) в сравнении с остальными 5 маркерами из исследованной панели. Использование всей панели из 8 генов позволило выявить более 50% больных ПБ с прогрессией до дисплазии высокой степени и АК пищевода, которые не удавалось выявить на столь раннем этапе без применения биомаркеров. Специфичность панели, по данным авторов, достигала 90%, а чувствительность — 50%. Специфичность предложенной и исследованной нами панели генетических маркеров (*MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3*) составила 60%, чувствительность — 86%. Таким образом, у больных группы мет+ вероятность прогрессии заболевания почти в 10 раз выше ($OR = 9,559$). При этом мы в своем исследовании тестировали результаты проведенной антирефлюксной операции и соотносили его с показаниями эндоскопического исследования. Подобное исследование представлено в работе M.R. Timmer и соавт. [14]: авторы исследовали систему маркеров, в которую входили структурные изменения локусов 8q24 (*MYC*), 9p21 (*CDKN2A/p16*), 17q12 (*erbB2/HER-2/Neu*) и 20q13.2 (*ZNF217*) в материале, полученном от 181 пациента с ПБ, которым проводилось консервативное лечение с

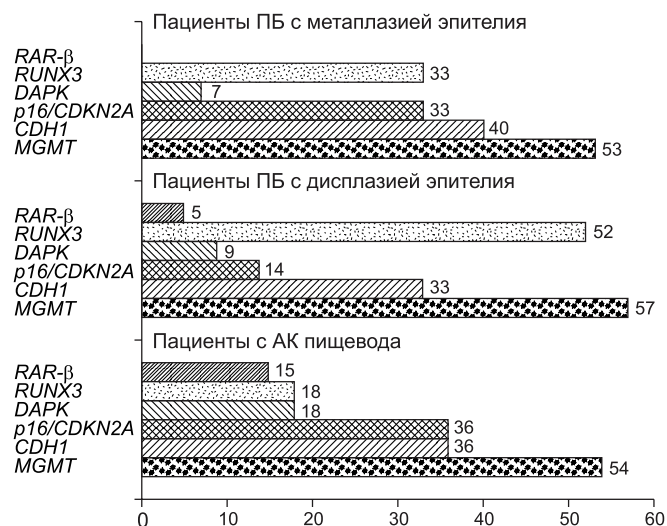


Рис. 3. Частота аномального метилирования генов *MGMT*, *CDH1*, *p16/CDKN2A*, *DAPK*, *RAR-β* и *RUNX3* в измененном эпителии до хирургического лечения (в %).

применением эндоскопической резекции слизистой в сочетании с медикаментозной терапией [14]. Авторы наблюдали полную регрессию изменений слизистой у 72% больных и прогрессию у 16% пациентов. Изменения копийности исследуемых локусов изучаемой панели, соответствующие группе мет+ в нашем исследовании, авторы наблюдали у 88 (44%) из 181 больного. На этом основании авторы полагают, что нарушение копийности генов, входящих в их систему, связано с негативной реакцией на проведенное лечение, и систему можно использовать в качестве дополнения к стандартному гистологическому исследованию при мониторинге пациентов после проведения лечения пациентов ПБ с помощью эндоскопической резекции слизистой в сочетании с медикаментозной терапией.

Снижение частоты аномального метилирования после выполнения антирефлюксных операций доказывает высокий потенциал к регенерации слизистой пищевода при устранении основных патогенетических факторов агрессии, что оправдывает правомочность и целесообразность хирургического лечения данной категории больных. Нами показано, что проведенное оперативное лечение улучшает состояние слизистой пищевода при ПБ, однако в оставшихся без регрессии случаях происходит значительное увеличение частоты аномального метилирования исследуемой панели генов. Это доказывает, что аномальное метилирование системы генов связано с худшим ответом на проведенное лечение. Такое перераспределение частоты метилирования генов можно объяснить тем, что после операции аномальное метилирование генов остается у пациентов с более тяжелыми изменениями и потенциально склонными к дальнейшей прогрессии. У таких пациентов не происходит нормализации слизистой пищевода за время наблюдения и им требуется дополнительный мониторинг для контроля дальнейшего лечения до полного выздоровления или для контроля возможной прогрессии ПБ в АК пищевода. Кроме того, наша система позволила выявить пациентов с метилированием в пограничной нормальной ткани, которое не всегда нормализуется после проведения антирефлюксного лечения. Такие пациенты являются потенциально склонными к дальнейшей прогрессии и требуют контроля и мониторинга после лечения.

Анализируя полученные результаты, можно предположить, что использование предложенной нами системы молекулярно-генетических маркеров у больных ПБ позволит на раннем этапе диагностировать, начать адекватное лечение и осуществлять мониторинг данной группы пациентов с целью формирования группы риска развития АК пищевода — что, несомненно, требует внедрения данной панели в клиническую практику.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—8, 11—14
см. REFERENCES)

9. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Немцова М.В., Ветшев Ф.П., Осминин С.В., Абдулхакимов Н.М. Возможности органосохраняющих операций в лечении пищевода Барретта с учетом данных молекулярно-генетического анализа. *Вестник хирургической гастроэнтерологии*. 2015; (1-2): 6—12.

10. Кекеева Т.В., Жевлова А.И., Подистов Ю.И., Соловьева Ю.В., Залетаев Д.В., Немцова М.В. Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста и микросателлитная нестабильность в предраковых состояниях шейки матки. *Молекулярная биология*. 2006; 40(2): 224—30.

Поступила 21.04.16

REFERENCES

1. Pennathur A., Gibson M.K., Jobe B.A., Luketich J.D. Oesophageal carcinoma. *Lancet*. 2013; 381(9864): 400—12.
2. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J. Cancer statistics. 2009. *CA Cancer J. Clin.* 2009; 59(4): 225—49.
3. Wang K.K., Sampliner R.E.; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* 2008; 103(3): 788—97.
4. Spechler S.J. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346(11): 836—42.
5. Wang D.H., Souza R.F. Biology of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2011; 21(1): 25—38.
6. Tosh D., Slack J.M. How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002; 3(3): 187—94.
7. Chandrasoma P.T., Der R., Ma Y., Peters J., Demeester T. Histologic classification of patients based on mapping biopsies of the gastroesophageal junction. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27(7): 929—36.
8. Martinez de Haro L.F., Ortiz A., Parrilla P., Munitiz V., Martinez C.M., Revilla B. et al. Long-term follow-up of malignancy biomarkers in patients with Barrett's oesophagus undergoing medical or surgical treatment. *Ann. Surg.* 2012; 255(5): 916—21.
9. Chernousov A.F., Khorobrykh T.V., Nemtsova M.V., Vetshev F.P., Osminin S.V., Abdulkhakimov N.M. Options of organ-preserve procedures in treatment of patients with Barrett's esophagus in view of molecular-genetics analysis. *Vestnik khirurgicheskoy gastroenterologii*. 2015; (1-2): 6—12. (in Russian)
10. Kekeeva T.V., Zhevlova A.I., Podistov Yu.I., Solov'eva Yu.V., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. Abnormal methylation of tumor suppressor genes and tumor microsatellite instability in precancerous cervical conditions. *Molekulyarnaya biologiya*. 2006; 40(2): 224—30. (in Russian)
11. Kaz A.M., Wong C.J., Luo Y., Virgin J.B., Washington M.K., Willis J.E. et al. DNA methylation profiling in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma reveals unique methylation signatures and molecular subclasses. *Epigenetics*. 2011; 6(12): 1403—12.
12. Smith E., De Young N.J., Pavey S.J., Hayward N.K., Nancarrow D.J., Whiteman D.C. et al. Similarity of aberrant DNA methylation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol. Cancer*. 2008; 7: 75.
13. Jin Z., Cheng Y., Gu W., Zheng Y., Sato F., Mori Y. et al. A multicenter, double-blinded validation study of methylation biomarkers for progression prediction in Barrett's esophagus. *Cancer Res.* 2009; 69(10): 4112—5.
14. Timmer M.R., Brankley S.M., Gorospe E.C., Sun G., Lutzke L.S., Iyer P.G. et al. Prediction of response to endoscopic therapy of Barrett's dysplasia using genetic biomarkers. *Gastrointest. Endosc.* 2014; 80(6): 984—91.

Received 21.04.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-002.2.-06:616.36-004]-074

Щекотова А.П.¹, Булатова И.А.¹, Щекотов В.В.¹, Титов В.Н.²

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

¹ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614090, г. Пермь;

²ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, г. Москва

Цель исследования — оценить скорость развития фиброза (СРФ) печени у больных хроническим гепатитом С (ХГС) с помощью лабораторных тестов.

В сыворотке крови 150 больных ХГС в фазе реактивации исследовали концентрацию гиалуроновой кислоты (ГК), альфа-фетопротеина (АФП), железа, ферритина, васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР), малонового диальдегида (МДА) и активность каталазы. Степень фиброза печени оценивали методом ультразвуковой эластографии (УЗЭ). СРФ рассчитывали как соотношение фиброза (в баллах) к длительности инфицирования (в годах).

СРФ в группе с медленным темпом прогрессирования заболевания составила в среднем $0,01 \pm 0,04$ балла/год, в группе с быстрым темпом прогрессирования ХГС — $0,45 \pm 0,34$ балла/год ($p < 0,001$). Медленный темп прогрессирования ХГС был ассоциирован с женским полом ($p = 0,01$). В группе больных с высокой СРФ регистрировали достоверно большие значения плотности печени, по данным УЗЭ ($p < 0,001$). Быстрая СРФ сопровождалась повышением сывороточных концентраций гиалуроновой кислоты (ГК) ($p < 0,001$), АФП ($p = 0,04$), ВЭФР ($p = 0,03$), железа ($p = 0,03$), ферритина ($p = 0,03$) и снижением активности каталазы ($p = 0,04$). Корреляционный анализ подтвердил наличие прямых достоверных взаимосвязей темпа прогрессирования фиброза с длительностью заболевания ($r = 0,27$; $p = 0,01$), плотностью печени ($r = 0,86$; $p < 0,001$), ГК ($r = 0,59$; $p < 0,001$), АФП ($r = 0,23$; $p = 0,04$), ферритином ($r = 0,23$; $p = 0,04$) и ВЭФР ($r = 0,21$; $p = 0,04$).

Ассоциация повышенных сывороточных уровней ГК, АФП, ВЭФР, железа, ферритина и низкой активности каталазы с быстрой СРФ позволяет рекомендовать их в качестве дополнительных критериев оценки темпа прогрессии фиброза при ХГС.

К л ю ч е в ы е с л о в а: скорость развития фиброза; гиалуроновая кислота; альфа-фетопротеин; каталаза; железо; васкулоэндотелиальный фактор роста; хронический гепатит С.

Для цитирования: Щекотова А.П., Булатова И.А., Щекотов В.В., Титов В.Н. Лабораторная оценка динамики прогрессирования фиброза печени при хроническом гепатите. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016; 61 (10): 686-689. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-686-689

Schekotova A.N.¹, Bulatova I.A.¹, Schekotov V.V.¹, Titov V.N.²

THE LABORATORY EVALUATION OF DYNAMICS OF PROGRESSION OF LIVER FIBROSIS UNDER CHRONIC HEPATITIS

¹The E.A. Wagner Permskii state medical university of Minzdrav of Russia, 614090 Perm, Russia

²The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

The study was carried out to evaluate velocity of development of fibrosis of liver in patients with chronic hepatitis C using laboratory tests. The sampling of 150 patients with chronic hepatitis C were examined to analyze blood serum in phase of reactivation detecting concentration of hyaluronic acid, alpha-fetoprotein, iron, ferritin, vascular endothelial risk factor, malonic dialdehyde and activity of catalase. The degree of fibrosis of liver was evaluated using technique of ultrasound elastography. The velocity of development of fibrosis of liver was calculated as ratio of fibrosis (in points) to duration of infection (in years).

The velocity of development of fibrosis of liver in group with slow rate of progression of disease made up in average 0.01 ± 0.04 points per year and in the group with fast rate of progression of chronic hepatitis C - 0.45 ± 0.34 points per year ($p < 0.001$). In the group of patients with high velocity of development of fibrosis of liver were registered reliably higher values of density of liver ($p < 0.001$). The fast velocity of development of fibrosis of liver was accompanied by increasing of serum concentrations of hyaluronic acid ($p < 0.001$), alpha-fetoprotein ($p = 0.04$), iron ($p = 0.03$), ferritin ($p = 0.03$) and decreasing of activity of catalase ($p = 0.04$). The correlation analysis substantiated availability of reliable direct relationships of rate of progression of fibrosis with duration of disease ($r = 0.27$, $p = 0.01$), density of liver ($r = 0.86$; $p < 0.001$), hyaluronic acid ($r = 0.59$; $p < 0.001$), alpha-fetoprotein ($r = 0.23$; $p = 0.04$), ferritin ($r = 0.23$; $p = 0.04$), vascular endothelial risk factor ($r = 0.21$; $p = 0.04$).

The association of increased serum levels of hyaluronic acid, alpha-fetoprotein, vascular endothelial risk factor, iron, ferritin and low activity of catalase with fast velocity of development of fibrosis of liver can be recommended as additional criteria of evaluation of rate of progression of fibrosis under chronic hepatitis C.

Key words: velocity of development of fibrosis; hyaluronic acid; alpha-fetoprotein; vascular endothelial risk factor; iron; ferritin; catalase; chronic hepatitis C

For citation: Schekotova A.N., Bulatova I.A., Schekotov V.V., Titov V.N. The laboratory evaluation of dynamics of progression of liver fibrosis under chronic hepatitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 686-689 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-686-689

Для корреспонденции: Булатова Ирина Анатольевна, канд. мед. наук, доц. каф. клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России; e-mail: bula.1977@mail.ru

For correspondence: Bulatova I.A., candidate of medical sciences, associate professor of chair of clinical laboratory diagnostic. e-mail: bula.1977@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsor support

Received 10.01.2016
Accepted 15.02.2016

За последние десятилетия вопросам оценки фиброза печени (ФП) посвящена масса как клинических, так и экспериментальных исследований. Однако остаются нерешенными вопросы темпа прогрессирования фиброза как прогностического маркера фатальных осложнений. При этом независимо от этиологического фактора только выраженность фиброза определяет, на какой стадии находится заболевание, т.е. фиброз служит именно тем показателем, который отражает темпы прогрессирования заболеваний печени в целом. Соответственно предикторами активного фиброгенеза становятся не только факторы, стимулирующие рост соединительной ткани, но и причины, усугубляющие механизмы этого многокомпонентного процесса [1, 2].

В некоторых исследованиях, помимо генотипа и уровня вирусной нагрузки, приводится ряд факторов, ассоциированных с увеличением скорости развития фиброза (СРФ) и определяющих индивидуальный прогноз пациента, такие как длительность воздействия этиологического фактора, пожилой возраст на момент заражения, мужской пол, наличие вирусов гепатита В и D, выраженный холестаза, инсулинорезистентность, синдром перегрузки железом, злоупотребление алкоголем [2—4].

В настоящее время предложено несколько десятков биохимических показателей, претендующих на роль неинвазивных маркеров фиброза печени [5—9]. Много исследований посвящено определению диагностических возможностей неинвазивной оценки степени выраженности ФП с помощью прямых маркеров, в том числе гиалуроновой кислоты (ГК), уровень которой прямо коррелирует со степенью поражения печени [9]. Данные о концентрации ГК при патологии печени не достаточно однородны. При этом главная ценность ГК, по мнению многих исследователей, заключается в возможности исключить преимущественно выраженный фиброз (F3) и цирроз печени с чувствительностью, по разным данным, 80—100% и специфичностью 80—100% по сравнению с биопсией при точке разделения 102—183,5 нг/мл [10—14].

Альфа-фетопротейн (АФП) — рутинный сывороточный маркер гепатоцеллюлярной карциномы, но в то же время его уровень может увеличиваться у 10—43% пациентов с острым и хроническим гепатитом без признаков карциномы, что обусловлено повышением регенераторной активности печени на фоне воспаления. По материалам многих исследований, АФП служит показателем некровоспалительных процессов, фиброза и нарушенной архитектоники органа [15—19].

Таким образом, в настоящее время недостаточно изучена диагностическая ценность неинвазивных показателей характера течения ХГС на различных стадиях прогрессирования заболевания. И практически неизвестны возможности различных молекул, участвующих в прогрессировании процесса фиброза печени, прогнозировать темпы его развития при ХГС.

Цель исследования — оценить скорость прогрессирования фиброза печени у больных ХГС с помощью лабораторных маркеров.

Материал и методы. Обследованы 150 пациентов с ХГС в фазе реактивации, средний возраст $38,89 \pm 11,31$ года, из них 74 мужчин и 76 женщин. По генотипу вируса пациенты с ХГС разделились следующим образом: генотип 1 определен у 52% больных, генотип 2 — у 10% и генотип 3 — у

38% пациентов. Уровни аланиновой и аспарагиновой трансаминаз (АЛТ, АСТ), а также железа в сыворотке крови исследовали на автоматическом биохимическом анализаторе Architect-c4000 (Abbott Laboratories, США) с использованием одноименных наборов (Abbott Clinical CHEMISTRY, США). Сывороточную ГК — прямой лабораторный маркер фиброза определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью одноименного набора BCM Diagnostics (США). В качестве теста регенерации гепатоцитов оценивали уровень АФП в сыворотке крови иммунохемилюминесцентным методом с помощью набора AFOP (Siemens) на анализаторе Immulite-1000 (Германия). Уровни васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР) и ферритина исследовали методом ИФА на планшетном фотометре Stat-Fax-2100 (США) с использованием соответствующих наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Активность фермента каталазы и концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови больных ХГС исследовали фотометрически: каталазу определяли по методу М.А. Королюка (1988), МДА — методом Ю.В. Владимирова, А.В. Арчакова (1972).

Степень выраженности фиброза печени оценивали методом ультразвуковой эластографии (УЗЭ) на приборе Fibrockan-502 (Echosens, Франция) по плотности печени, выраженной в килопаскалях, и с оценкой стадии фиброза по шкале METAVIR. У всех пациентов с определенной длительностью инфекции и стадией фиброза по результатам УЗЭ печени рассчитана СРФ как соотношение фиброза (в баллах) к длительности инфицирования (в годах) [3]. Данный показатель — количественное отражение темпов прогрессирования ХГС. Этот метод определения скорости развития ХГС позволил нам выделить быстрый (до 10 лет) и медленный (более 10 лет) темпы прогрессирования фиброза при гепатите в цирроз печени.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft). Проверку распределения показателей — с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Для описания полученных количественных признаков данные представляли в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm s$), а также медианы и 25 и 75 перцентиля (Me, 25; 75). Статистическую значимость различий определяли по критерию Манна—Уитни. Количественную оценку линейной связи между двумя независимыми величинами проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Значимость различий между выборками и взаимосвязей показателей считалась достоверной при значении для $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Предполагаемая длительность инфекционного процесса у пациентов с ХГС составила в среднем $5,96 \pm 3,49$ года (от 2 до 18 лет). У мужчин средняя длительность заболевания была короче и составила $5,3 \pm 2,9$ года, у женщин — $6,5 \pm 2,8$ года ($p < 0,04$). Анализ длительности заболевания в зависимости от генотипов вируса не дал значимых различий ($p = 0,87$). При сравнительном изучении предполагаемого периода инфицирования в зависимости от стадии ФП достоверное его нарастание выявлено от стадии F3 ($7,7 + 4,0$ года) к F4 ($11,3 + 5,9$ года) ($p = 0,01$). Корреляционный анализ подтвердил наличие взаимосвязи между длительностью инфицирования и выраженностью ФП по данным УЗЭ ($r = 0,27$; $p = 0,01$). Таким образом, длитель-

Показатели у пациентов с ХГС в зависимости от СРФ

Показатель	СРФ медленная	СРФ высокая	<i>p</i> *
Плотность печени, кПа	5,3 (4,6; 5,8)	8,5 (6,8; 8,9)	< 0,001
ГК, нг/мл	22,3 (17; 30,9)	52,3 (34; 78,6)	< 0,001
АФП, МЕ/мл	1,8 (1,3; 2,6)	2,4 (1,9; 3,1)	0,04
АЛТ, Е/л	58,2 (33; 103)	57,9 (34; 96)	0,98
АСТ, Е/л	37,9 (26; 46)	38,3 (25; 57)	0,67
МДА, мкмоль/л	7,8 (5,7; 12,8)	7,0 (5,1; 11,2)	0,24
Каталаза, мкат/л	9,8 (6,7; 15,9)	8,6 (6,1; 12)	0,04
Железо сыворотки, мкмоль/л	15,4 (3; 19)	24,3 (13; 43)	0,03
Ферритин, нг/мл	55,2 (30; 101)	110,2 (42; 452)	0,03
ВЭФР, пг/мл	335,9 (177; 490)	387,0 (279; 710)	0,03

Примечание. * — различия достоверны при $p < 0,05$.

ность инфекционного процесса, характеризующая темпы прогрессии HCV-инфекции, увеличивается преимущественно к стадии F4 заболевания и короче у мужчин и не была связана с генотипом вируса гепатита С, что согласуется с рядом работ [2—4].

В нашем исследовании у больных с начальным фиброзом (F1) средняя СРФ была достоверно ниже ($0,21 \pm 0,13$ балла/год), чем у больных ХГС с последующими стадиями заболевания: F2 $0,44 \pm 0,31$ балла/год ($p = 0,01$), F3 $0,53 \pm 0,4$ балла/год ($p = 0,01$), F4 — $0,32 \pm 0,03$ балла/год ($p = 0,69$). При анализе темпов прогрессирования ХГС в зависимости от пола пациентов у мужчин СРФ была в 2 раза выше, чем у женщин ($p = 0,04$). Достоверных различий темпов прогрессирования ХГС у пациентов с генотипами HCV-1 и HCV-2,3 не найдено ($p = 0,47$). Таким образом, СРФ, характеризующая темпы прогрессии HCV-инфекции, увеличивается от стадии к стадии заболевания, более выражена у мужчин и не связана с генотипом вируса гепатита С, о чем упоминается в других исследованиях [3].

Пациенты были условно разделены на две группы по СРФ. В первую группу вошли 90 (60%) больных с медленной СРФ ($< 0,19$ балла/год), а во вторую группу включены 50 (40%) пациентов ХГС с высокой СРФ ($> 0,19$ балла/год). СРФ в группе с медленным темпом прогрессирования заболевания составила в среднем $0,02 \pm 0,02$ балла/год, в группе с быстрым темпом прогрессирования фиброза при ХГС — $0,45 \pm 0,34$ балла/год ($p < 0,001$). Длительность заболевания в группе с медленным темпом прогрессирования фиброза составила в среднем $6,65 \pm 3,1$ года, в группе быстрым темпом прогрессирования ХГС — $5,1 \pm 3,6$ года ($p = 0,02$). В группе с медленной СРФ преобладали женщины — 58% ($p = 0,01$). Таким образом, наблюдается ассоциация медленного темпа прогрессирования ХГС с женским полом. Значимых различий по возрасту в зависимости от темпов прогрессирования ФП не найдено ($p = 0,45$). При анализе распределения по стадиям ФП отмечено, что при медленном темпе прогрессирования ХГС преобладали пациенты со стадией F0 (84%), больные со стадиями F1 и F2 составляли соответственно 14 и 2%. При быстром темпе прогрессирования заболевания преобладали пациенты со стадией F4 (37%), больные со стадиями F1, F2 и F3 составляли соответственно 24, 26 и 13%.

В группе пациентов с высокой СРФ ожидаемо регистрировались достоверно большие значения плотности печени, по данным УЗЭ ($p < 0,001$). Сывороточные уровни ГК и АФП при быстром темпе прогрессии HCV-инфекции были выше в 2,3 и 1,3 раза соответственно, чем при медленном темпе

прогрессирования заболевания ($p < 0,001$ и $p = 0,04$) (см. таблицу). Корреляционный анализ подтвердил наличие прямых достоверных взаимосвязей темпа прогрессирования фиброза с плотностью печени ($r = 0,86$; $p < 0,001$), ГК ($r = 0,59$; $p < 0,001$) и АФП ($r = 0,23$; $p = 0,04$).

При анализе уровня трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови в группах больных ХГС с медленной и быстрой СРФ значимых различий не было получено ($p = 0,98$ и $p = 0,67$). Это не согласуется с результатами некоторых исследований, в которых у пациентов с наличием прогрессии фиброза наблюдали повышение активности АЛТ [3].

Для пациентов с прогрессией фиброза были характерны: достоверно низкая активность каталазы ($p = 0,04$), высокий уровень сывороточного железа ($p = 0,03$) и ферритина ($p = 0,03$), а также сывороточной концентрации ВЭФР ($p = 0,03$). Корреляционный анализ подтвердил наличие прямых достоверных взаимосвязей темпа прогрессирования фиброза с уровнем ферритина ($r = 0,23$; $p = 0,04$) и концентрацией ВЭФР ($r = 0,21$; $p = 0,04$). Эти данные частично согласуются с результатами, полученными в других исследованиях, в которых у пациентов с наличием прогрессии фиброза регистрировали достоверно больший уровень сывороточного железа, ферритина и ВЭФР, прямо коррелировавших со степенью фиброза [10, 13, 20].

Значимых различий концентраций МДА при медленной и быстрой СРФ не обнаружено ($p = 0,24$). Результаты тестов, хотя и коррелирует с тяжестью воспалительного процесса в печени, по данным некоторых исследователей, но не могут применяться для прогнозирования СРФ при ХГС [21].

Заключение. Прогрессирование процессов фиброза при ХГС сопровождается активацией механизмов регенерации и неогенеза, нарастанием синдрома перегрузки железом и истощением механизмов антиоксидантной защиты. Скорость развития фиброза увеличивается по мере прогрессирования ХГС и не связана с генотипом вируса.

Медленный темп прогрессирования ХГС ассоциирован с женским полом. Ассоциация повышенных сывороточных уровней ГК, АФП, ВЭФР, железа, ферритина и низкой активности каталазы с быстрой СРФ позволяет рекомендовать их в качестве дополнительных критериев оценки темпа прогрессии фиброза при ХГС.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 5, 6, 8, 9, 12, 15—17 см. REFERENCES)

- Ивашкин В.Т. Фиброз печени. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
- Мехтиев С.Н., Степаненко В.В., Зиновьева Е.Н., Мехтиева О.А. Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции. *Фарматека*. 2014; (6): 80—7.
- Краснова Л.И., Никольская М.В. Встречаемость и выраженность фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом в зависимости от возраста и длительности заболевания. В кн.: *Сборник тезисов XIX Российского конгресса «Гепатология сегодня»*. М.; 2014: 26.
- Павлов Ч.С., Глушенков Д.В., Ивашкин В.Т. Современные возможности эластометрии, фибро- и акти-теста в диагностике фиброза печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 2008; (4): 43—52.
- Щекотова А.П., Булатова И.А., Ройтман А.П. Чувствительность и специфичность определения гиалуриновой кислоты, коэффициента де Ритиса и ВЭФР для диагностики хронического гепатита и цирроза печени. *Пермский медицинский журнал*. 2013; 30(4): 84—9.
- Винницкая Е.В., Дроздов В.Н., Юнусова Ю.М., Варванина Г.Г., Шапошникова Н.А., Петраков А.В. и др. Диагностическая значимость сывороточных маркеров фиброза при хронических заболеваниях печени. *Терапевтический архив*. 2013; (2): 27—31.

13. Гусев Д.А. Хронический гепатит С: течение, прогноз и лечение больных в военно-медицинских учреждениях: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. СПб.; 2006.
14. Ющук Н.Д., Знойко О.О., Сафиуллина Н.Х., Келли Е.И. Пункционная биопсия печени и возможности неинвазивного мониторинга фиброза при хроническом вирусном гепатите С. *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2002; (1): 9—16.
18. Белавина И.А., Дуданова О.П. Роль альфа-фетопротейна в комплексной диагностике прогрессирующего течения хронических гепатитов В и С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2012; (3): 57—62.
19. Жданов К.В., Гусев Д.А., Пастушенков В.Л., Шкуро А.В. Сывороточное содержание а-фетопротейна у больных хроническим гепатитом С на фоне интерферонотерапии. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2004; 14(1): 12.
20. Павлов Ч.С., Маевская М.В., Левина А.А., Лукина Е.А., Ивашкин В.Т. Содержание железа и ферритина в ткани печени больных хроническими вирусными гепатитами. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002; 12(1): 12.
21. Гейвандова Н.И., Ягода А.В., Гудзовская Д.А., Косторная И.В. Сывороточные фосфолипиды, показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты как дополнительные неинвазивные маркеры активности хронического вирусного гепатита С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2008; 18(6): 38—42.
8. Boursier J., de Ledinghen V., Poynard T., Guechot L., Carrat F., Leroy V. et al. An extension of STARD statements for reporting diagnostic accuracy studies on liver fibrosis tests: The Liver-FibroSTARD standards. *J. Hepatol.* 2015; 62(4): 807—15.
9. Parsian H., Rahimipour A., Nouri M., Somi M.H., Qujeq D., Fard M.K. et al. Serum hyaluronic acid and laminin as biomarkers in liver fibrosis. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2010; 19(2): 169—74.
10. Shchekotova A.P., Bulatova I.A., Roytman A.P. The sensitivity and specificity of the hyaluronic acid ratio and de Rytis VEFR for diagnosis of chronic hepatitis and cirrhosis. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 30(4): 84—9. (in Russian)
11. Vinnitskaya E.V., Drozdov V.N., Yunusova Yu.M., Varvanina G.G., Shaposhnikova N.A., Petrakov A.V. et al. Diagnostic value of serum markers of fibrosis in chronic liver diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; (2): 27—31. (in Russian)
12. Halfon P., Bourliere M., Penaranda G., Deydier R., Renou C., Botta-Fridlund D. et al. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp. Hepatology*. 2005; 4: 6—13.
13. Gusev D.A. Chronic Hepatitis C: For, Prognosis and Treatment of Patients in Military Hospitals: Diss. St.Petersburg; 2006. (in Russian)
14. Yushchuk N.D., Znoyko O.O., Safiullina N.Kh., Kelli E.I. Needle biopsy of the liver and the possibility of non-invasive monitoring of fibrosis in chronic viral hepatitis C. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2002; (1): 9—16. (in Russian)
15. Chen C.H., Lin S.T., Kuo C.L., Nien C.K. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in chronic hepatitis C without hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2008; 55(55): 1423—7.
16. Di Bisceglie A.M., Sterling R.K., Chung R.T., Everhart J.E., Dienstag J.L., Bonkovsky H.L. et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C. Results from the HALT-C trial. *J. Hepatol.* 2005; 43(3): 434—41.
17. Tai W.C., Hu T.H., Wang J.H., Hung C.H., Lu S.N., Changchien C.S. et al. Clinical implications of alpha-fetoprotein in chronic hepatitis C. *J. Formos. Med. Assoc.* 2009; 108(3): 210—8.
18. Belavina I.A., Dudanova O.P. The role of alpha-fetoprotein in the complex diagnosis of progressive course of chronic hepatitis B and C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2012; (3): 57—62. (in Russian)
19. Zhdanov K.V., Gusev D.A., Pastushenkov V.L., Shkuro A.V. Serum content of a-fetoprotein in patients with chronic hepatitis C interferon in the background. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2004; 14(1): 12. (in Russian)
20. Pavlov Ch.S., Maevskaya M.V., Levina A.A., Lukina E.A., Ivashkin V.T. The content of iron and ferritin in the liver tissue of patients with chronic viral hepatitis. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2002; 12(1): 12. (in Russian)
21. Geyvandova N.I., Yagoda A.V., Gudzovskaya D.A., Kostornaya I.V. The serum phospholipids, lipid peroxidation and antioxidant protection as additional non-invasive marker of chronic hepatitis C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2008; 18(6): 38—42. (in Russian)

Поступила 10.01.16

REFERENCES

1. Ivashkin V.T. Liver Fibrosis [Fibroz pecheni]. Moscow; GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
2. Mekhtiev S.N., Stepanenko V.V., Zinov'eva E.N., Mekhtieva O.A. Modern ideas of hepatic fibrosis, and the methods of its correction. *Farmateka*. 2014; (6): 80—7. (in Russian)
3. Poynard T., Bedossa P., Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*. 1997; 349: 825—32.
4. Krasnova L.I., Nikol'skaya M.V. The incidence and severity of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B, depending on the age and duration of disease. In: Abstracts XIX Russian Congress «Hepatology today» [Sbornik tezisev XIX Rossiyskogo kongressa «Gepatologiya segodnya»]. Moscow; 2014: 26. (in Russian)
5. Poynard T., Ngo Y., Munteanu M., Thabut D., Massard J., Moussalli J. et al. Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies. *Antivir. Ther.* 2010; 15(4): 617—31.
6. Castera L., Vergniol J., Foucher J., Le Bail B., Chanteloup E., Haaser M. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005; 128(2): 343—50.
7. Pavlov Ch.S., Glushenkov D.V., Ivashkin V.T. Modern possibilities elastometry, fibrosis and ActiTest in the diagnosis of liver fibrosis. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 2008; (4): 43—52. (in Russian)

Received 10.01.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.728.3-008.8-074

Лулева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭЛЕКТРОЛИТНОГО СОСТАВА И ФОСФАТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ КОЛЕННОГО СУСТАВА

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

Проведено исследование показателей электролитного состава и фосфатазной активности синовиальной жидкости больных со II и III стадиями дегенеративно-дистрофических поражений коленных суставов. При определении частоты встречаемости изменений исследуемых показателей установлено, что чаще всего происходили увеличение соотношения между кальцием и фосфором и уменьшение концентрации фосфат-ионов, поэтому концентрации данных показателей можно использовать для оценки состояния суставной среды.

Ключевые слова: остеоартроз; минеральный обмен; кальций; фосфор; кислая фосфатаза; щелочная фосфатаза; синовиальная жидкость.

Для цитирования: Лулева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л. Исследование показателей электролитного состава и фосфатазной активности синовиальной жидкости у больных остеоартрозом коленного сустава. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10): 690-692. DOI:10.18821/0869-2084-2016-61-10-690-692

Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveieva E.L.

THE STUDY OF INDICES OF ELECTROLYTIC COMPOSITION AND PHOSPHATASE ACTIVITY OF SYNOVIAL FLUID IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS OF KNEE JOINT

The academician G.A. Ilizarov Russian research center "The restorative traumatology and orthopedics" of Minzdrav of Russia, 640014 Kurgan, Russia

The study was carried out concerning indices of electrolytic content and phosphatase activity of synovial fluid in patients with degenerate dystrophic affections of knee joints stage II and III. The detection of rate of occurrence of alterations of studied indices established that most often occurred increasing of ratio calcium-phosphorus and decreasing of concentration of phosphate-ions. Therefore, concentration of the mentioned indices can be applied in evaluation of conditions of joint medium.

Key words: osteoarthritis; mineral metabolism; calcium; phosphorus; acid phosphatase; alkaline phosphatase; synovial fluid.

For citation: Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveieva E.L. The study of indices of electrolytic composition and phosphatase activity of synovial fluid in patients with osteoarthritis of knee joint. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 690-692. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-690-692

For correspondence: Luneva S.N., doctor of biological sciences, professor, head of laboratory of biochemistry, e-mail: vluneva_s@mail.ru

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

Financing. *The study had no sponsor support.*

Received 15.04.2016
Accepted 30.04.2016

Введение. Актуальность изучения показателей минерального обмена и маркеров остеогенеза обусловлена многофункциональностью костной ткани, которая является звеном системы поддержания минерального гомеостаза [1]. Заболевания костной ткани, связанные с нарушением минерального обмена, являются серьезной проблемой, поскольку они обуславливают ограничение способности к передвижению и самообслуживанию, снижают качество жизни и могут привести к инвалидности больных [2]. Известно, что при развитии дегенеративно-дистрофических изменений в суставах отмечается взаимосвязь нарушений метаболизма суставного хряща и субхондральной зоны кости. Наиболее распространенными патологиями суставов по-прежнему остаются заболевания дегенеративно-дистрофического происхождения, а число заболевших остеоартрозом растет с каждым годом [3]. При лабораторном исследовании показателей минерального обмена можно получить важную информацию о состоянии

организма, которая поможет врачу в определении тактики лечения пациента.

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы явилось изучение частоты встречаемости изменений показателей минерального обмена и активности фосфатаз в синовиальной жидкости у больных дегенеративно-дистрофическими изменениями коленного сустава.

Материал и методы. Нами была исследована синовиальная жидкость 263 больных деформирующим артрозом коленного сустава в возрасте $56,4 \pm 0,9$ года (88 мужчин и 175 женщин) на II и III стадиях артрозного процесса. Стадию артрозного процесса устанавливали по классификации, разработанной в лаборатории патологии суставов ФГУ РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России [4]. Материал получали в условиях асептики и антисептики до оперативного вмешательства и проведения каких-либо терапевтических мероприятий [5]. Первую клиническую группу составили образцы синовиальной жидкости от 83 больных со II стадией остеоартроза коленного сустава в возрасте $41,9 \pm 2,1$ года (24 мужчины и 59 женщин); вторую группу — 180 больных с III стадией в возрасте $63,2 \pm 0,6$ года

Для корреспонденции: Лулева Светлана Николаевна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. биохимии, e-mail: luneva_s@mail.ru

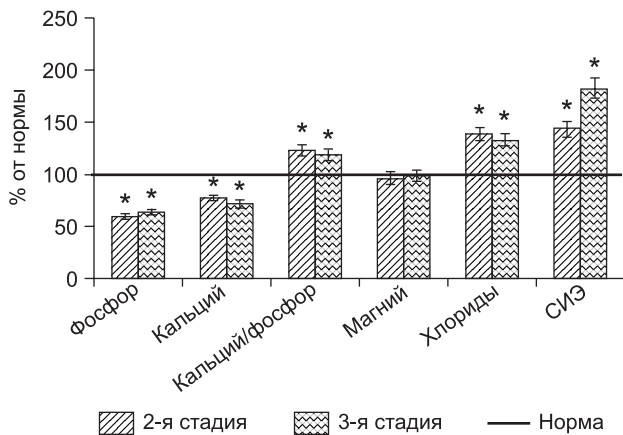


Рис. 1. Показатели минерального состава синовиальной жидкости больных со II и III стадиями дегенеративно-дистрофических изменений.

Здесь и на рис. 2: * — показатели, статистически значимо отличающиеся от нормы.

(64 мужчины и 116 женщин). В качестве контроля использовали 65 образцов синовиальной жидкости трупов людей (обоих полов) в возрасте от $54,3 \pm 0,9$ лет, не имевших зарегистрированной экспертом суставной патологии. Синовиальная жидкость извлекалась в соответствии с приказом Минздрава РФ от 24.04.03 № 161 «Об утверждении Инструкции по организации и производству экспертных исследований в бюро судебно-медицинской экспертизы». Электролитный состав синовиальной жидкости оценивали по концентрации общего кальция, неорганического фосфата, магния и хлоридов. Концентрацию электролитов, а также содержание кислой и щелочной фосфатаз в синовиальной жидкости определяли спектрофотометрическим методом на анализаторе Stat Fax® 1904 Plus (США), используя наборы фирмы Vital Diagnostic (Санкт-Петербург). Для каждой группы исследования рассчитывали медиану значений и интерквартильные размахи 0,25 и 0,75 перцентили [6]. Для оценки достоверности различий полученных результатов использовали непараметрический критерий Вилкоксона, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Изучив изменения показателей концентраций электролитов в синовиальной жидкости у больных дегенеративно-дистрофическими поражениями суставов, мы получили следующие данные. Результаты исследования показали снижение концентраций кальция на 24% на I стадии и на 29% на II стадии остеоартрозного процесса в коленном суставе (рис. 1).

Общая частота встречаемости отклонений показателей минерального обмена в синовиальной жидкости относительно референсных значений у пациентов с дегенеративно-дистрофическими изменениями коленного сустава

Показатель	Количество пациентов с отклонениями в показателях	p (95% доверительный интервал)
Кальций	173/261	0,66 (0,60 – 0,72)
Фосфор	218/260	0,84 (0,80 – 0,89)
Кальций/фосфор	222/258	0,86 (0,82 – 0,90)
Хлориды	47/65	0,72 (0,61 – 0,83)
СИЭ	44/65	0,58 (0,56 – 0,79)
Щелочная фосфатаза	105/151	0,70 (0,62 – 0,77)

Примечание. В знаменателе – общее количество больных.

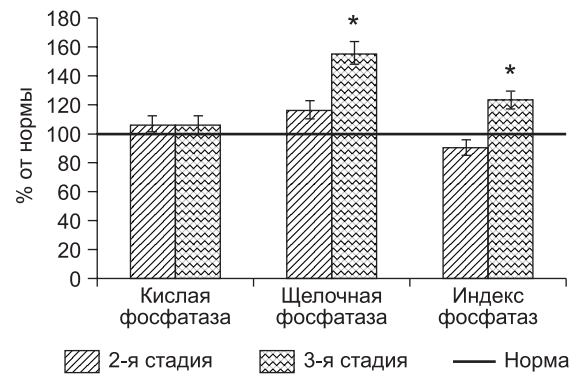


Рис. 2. Показатели активности фосфатаз в синовиальной жидкости больных со II и III стадиями дегенеративно-дистрофических изменений, отличающиеся от нормы.

Концентрация фосфат-ионов снижалась на 40% относительно нормальных значений. Интегральный показатель Ca/P повышался на 20%, а концентрация хлорид-ионов — на 35%. На фоне изменения этих показателей происходило статистически значимое возрастание системного индекса электролитов на II стадии на 40%, а на декомпенсированной — на 80%. При развитии остеоартрозного процесса в суставах концентрация магния оставалась без изменений.

При исследовании маркеров остеогенеза — кислой и щелочной фосфатазы — были получены следующие результаты (рис. 2).

Активность кислой фосфатазы не имела статистически значимых изменений, тогда как активность щелочной фосфатазы на III стадии развития данного заболевания возрастала на 56%. Следовательно, индекс фосфатаз увеличивался на 24%.

Для определения частоты встречаемости изменений биохимических показателей в синовиальной жидкости мы рассматривали данные, которые статистически значимо отличались от нормы. Рассчитав общую частоту встречаемости статистически значимо увеличивающихся концентрации хлорид-ионов, отношения кальций/фосфор, системного индекса электролитов, костного изофермента — щелочной фосфатазы, а также статистически значимо сниженных концентраций кальция и фосфат-ионов, мы получили следующие результаты (см. таблицу).

Было установлено, что чаще всего происходило увеличение соотношения между кальцием и фосфором, частота встречаемости (частота встречаемости — 0,86; 222 больных из 258 обследованных). В 218 случаях из 260 происходило уменьшение концентрации фосфат-ионов (частота встречаемости — 0,84).

Заключение. Таким образом, для оценки состояния коленного сустава при дегенеративно-дистрофических изменениях можно использовать исследование электролитного состава синовиальной жидкости. Наиболее информативными показателями являются содержание фосфат-ионов и соотношение кальций/фосфор.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 3 см. REFERENCES)

- Делух Н.В., Зупанец И.А., Черных В.Ф., Дрогвовоз С.М. Остеоартрозы. Пути фармакологической коррекции. Харьков: Основа; 1992.
- Матвеев Р.П., Брагина С.В. Остеоартроз коленного сустава: про-

- блемы и социальная значимость. *Экология человека*. 2012; (9): 53—62.
- Макушин В.Д., Чегуров О.К. Гонартроз (вопросы патогенеза и классификации). *Гений ортопедии*. 2005; (2): 19—22.
 - Матвеева Е.Л., Макушин В.Д., Чегуров О.К. Факторный анализ биохимических и клинических показателей гонартроза. *Гений ортопедии*. 2007; (1): 81—4.
 - Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Ленинград: Медицина; 1973.
 - Matveev R.P., Bragina S.V. Osteoarthritis of the knee: problems and social importance. *Ekologiya cheloveka*. 2012; (9): 53—62. (in Russian)
 - Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. Osteoarthritis, Clinical and Experimental Aspects. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
 - Makushin V.D., Chegurov O.K. Osteoarthritis (the pathogenesis and classification). *Geniy ortopedii*. 2005; (2): 19—22. (in Russian)
 - Matveeva E.L., Makushin V.D., Chegurov O.K. Factor analysis of biochemical and clinical parameters of gonarthrosis. *Geniy ortopedii*. 2007; (1): 81—4. (in Russian)
 - Gubler E.V., Genkin A.A. The Use of Nonparametric Statistics in Biomedical Research [Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh]. Leningrad: Meditsina; 1973. (in Russian)

Поступила 15.04.16

REFERENCES

Received 15.04.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 618.3-06:616.12-008-.331.1]-074

Панова И.А., Рокотьянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А., Назаров С.Б., Хлипунова Д.А.

МАРКЕРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ И ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У БЕРЕМЕННЫХ С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России, 153045, г. Иваново, Российская Федерация

Изучены маркеры эндотелиальной дисфункции и факторы воспаления у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза. Проводилось клинико-лабораторное обследование 158 женщин в сроке беременности 22—37 нед. Из них 30 женщин с хронической артериальной гипертензией (ХАГ), 30 женщин с ХАГ и присоединившейся преэклампсией — ПЭ (ХАГ + ПЭ); 43 женщины с ПЭ; 55 женщин с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств (контрольная группа). Установлено, что у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза развивается эндотелиальная дисфункция и воспаление, что подтверждается увеличением в крови количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, С-реактивного белка и гомоцистеина во всех группах; ростом сывороточного уровня t-PA, эндотелина (1-21), MMP-2, sVCAM-1 и IL-6 при ПЭ, в том числе и присоединившейся к ХАГ; повышением содержания IL-6 в сыворотке крови при ХАГ с присоединившейся ПЭ. Разработаны критерии, позволяющие дифференцированно диагностировать существовавшую ранее гипертензию и ПЭ, в том числе присоединившуюся к ХАГ, по уровням t-PA, sVCAM-1, эндотелина (1-21) и MMP-2 в сыворотке крови.

Ключевые слова: беременные; гипертензивные расстройства; преэклампсия; дисфункция эндотелия; факторы воспаления.

Для цитирования: Панова И.А., Рокотьянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А., Назаров С.Б., Хлипунова Д.А. Характер воспалительной реакции и дисфункции эндотелия у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10):692-696. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-10-692-696

Panova I.A., Rokotyanskaya E.A., Kuzmenko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A., Nazarov S.B., Khlipunova D.A.

THE MARKERS OF INFLAMMATION REACTION AND DYSFUNCTION OF ENDOTHELIUM IN PREGNANT WOMEN WITH HYPERTENSION DISORDERS OF VARIOUS GENESIS

The V.N. Gorodkov Ivanovskii research institute of maternity and childhood of Minzdrav of Russia, 153045 Ivanovo, Russia

The markers of endothelium dysfunction and factors of inflammation in pregnant women with hypertension with hypertension disorders of various genesis were analyzed. The clinical laboratory study was carried out on the basis of sampling of 158 women at pregnancy period of 22-37 weeks. Out of this sampling 30 women had previously present chronic arterial hypertension, 30 women had chronic arterial hypertension and consecutive preeclampsia, 43 women had preeclampsia and 55 women had uncomplicated course of pregnancy without hypertension disorders (control group). It is established that in pregnant women with hypertension disorders of various genesis endothelial dysfunction and inflammation are developed/ This occurrence is confirmed by increasing of in blood of number of circulating desquamated endotheliocytes, C-reactive protein and homocystein in all groups; by increasing of serum level of t-PA, endothelin (1-21), MMP-2, sVCAM-1 and IL-6 under preeclampsia, including one consecutive to chronic arterial hypertension; by increasing of content of IL-6 in blood serum under chronic arterial hypertension with consecutive preeclampsia. The criteria are developed concerning serum content of t-PA, sVCAM-1, endothelin (1-21) and MMP-2 permitting to diagnose differentially previously present hypertension and preeclampsia, including consecutive one to chronic arterial hypertension.

Для корреспонденции: Панова Ирина Александровна, д-р мед. наук, зав. отд. акушерства и гинекологии, e-mail: ia_panova@mail.ru

Key words: *pregnant woman; hypertension disorders; preeclampsia; dysfunction of endothelium; inflammation factors*

For citation: *Panova I.A., Rokotianskaya E.A., Kuzmenko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A., Nazarov S.B., Khlipunova D.A. The markers of inflammation reaction and dysfunction of endothelium in pregnant women with hypertension disorders of various genesis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (10): 692-696 (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-692-696*

For correspondence: *Panova I.A., doctor of medical sciences, head of department of obstetrics and gynecology. e-mail: ia_panova@mail.ru*

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

Financing. *The study had sponsor support of the Grant of the President of the Russian Federation № МК-6885.2015.7*

Received 10.05.16

Accepted 15.05.16

Введение. Многие годы проблема артериальной гипертензии у беременных не теряет актуальности и остается в центре внимания научных исследований. Гипертензивные нарушения у беременных — неоднородное понятие, включающее в себя несколько нозологических форм: хроническая (или существовавшая ранее) гипертензия, гестационная гипертензия (артериальная гипертензия, выявленная после 20 нед беременности), преэклампсия (ПЭ), эклампсия, а также ПЭ на фоне хронической гипертензии.

В настоящее время считается общепризнанным, что развитие гипертензивных нарушений у беременных — это результат сочетания множества патогенетических звеньев, центральную роль в котором играет неадекватный ответ иммунной системы матери на факторы плацентарного происхождения [1—3].

Мишенью патологических воздействий является эндотелий сосудов, а клинические признаки гипертензивных нарушений у беременных — следствие развития эндотелиальной дисфункции в результате вазоспазма, оксидантного стресса и гипоксически-ишемических изменений органов-мишеней [4—6]. Вероятно, степень выраженности изменений в продукции факторов, определяющих эти процессы, лежит в основе разнообразия проявлений гипертензивных нарушений у беременных.

Цель настоящего исследования — выявить особенности экспрессии факторов, способных индуцировать дисфункцию эндотелия, и факторов, отражающих состояние эндотелия, у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза.

Материал и методы. Проводилось клинико-лабораторное обследование 158 женщин в сроке беременности 22—37 нед. В группу женщин с существовавшей ранее артериальной гипертензией (хроническая артериальная гипертензия — ХАГ) вошли 30 беременных. Группу с ХАГ с присоединившейся ПЭ (ХАГ+ПЭ) составили 30 женщин. В группу женщин с ПЭ вошли 43 женщины с впервые выявленной артериальной гипертензией после 20-й недели беременности в сочетании с протеинурией. Контрольную группу составили 55 женщин без признаков гипертензивных расстройств и с неосложненным течением беременности на момент обследования.

Критериями исключения были острые и обострение хронических воспалительных заболеваний, аллергические реакции на момент обследования, злокачественные новообразования различной локализации, системные заболевания соединительной ткани, хроническая почечная недостаточность.

Материалом для лабораторного исследования служила периферическая кровь из локтевой вены. Количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) определяли по методу Hladovec (1978) в модификации Н.Н. Петрищева и соавт. [7].

Методом иммуноферментного анализа в периферической крови женщин определяли содержание: тканевого активато-

ра плазминогена (t-PA) («Asserachrom», Франция), активного фрагмента эндотелина (1-21) (Biomedika, Австрия), матриксной металлопротеиназы — MMP-2 (R & D Systems, США), растворимой формы адгезивной молекулы клеток сосудов — sVCAM-1 (Bender MedSystems, Австрия), IL-1β (ООО «Цитокин», Россия), IL-6 (Bender MedSystems, Австрия), TNFα (BioSource International, США).

Методом иммунохемилюминесцентного анализа оценивали уровень гомоцистеина (Siemens, США) и высокочувствительного С-реактивного белка —hsCRP(Siemens, США).

Для статистического анализа полученных результатов использовали пакет прикладных лицензионных программ Microsoft Office 2010, Statisticafor Windows 6.0 и MedCalc v.7.4.4.1.

Результаты и обсуждение. Уровень ДЭ, а также содержание различных факторов, продуцируемых непосредственно клетками эндотелия, достаточно полно характеризуют его состояние и могут служить маркерами эндотелиальной дисфункции. Проведенные исследования показали (табл. 1), что у всех женщин, имеющих гипертензивные расстройства при беременности независимо от их генеза, было более высокое содержание ДЭ в венозной крови по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$ во всех случаях).

Достоверное повышение уровня t-PA, эндотелина и MMP-2 в сыворотке крови по сравнению с таковым в группе контроля отмечалось только у женщин с ПЭ и с ПЭ, присоединившейся к ХАГ (для t-PA $p < 0,001$, $p < 0,01$ соответственно; для эндотелина $p < 0,02$, $p < 0,01$ соответственно; для MMP-2 $p < 0,001$ в обеих группах). В группе женщин с ХГА данные показатели были сопоставимы с таковыми в контрольной группе ($p > 0,05$ во всех случаях). Это определяло достоверное повышение уровня t-PA и эндотелина в сыворотке крови в группах с ПЭ и с ПЭ, присоединившейся к ХАГ, по сравнению с аналогичными показателями в группе женщин с ХАГ (для t-PA $p < 0,02$ в обеих группах; для эндотелина $p < 0,05$, $p < 0,01$ соответственно).

Проведенный корреляционный анализ исследованных показателей выявил прямую зависимость повышения содержания ДЭ в крови от степени выраженности клинических проявлений ПЭ — уровня среднего артериального давления ($r = 0,80$, $p = 0,0001$) (рис. 1), и суточной протеинурии ($r = 0,88$, $p = 0,0001$) (рис. 2).

Изменения в содержании растворимых форм молекул межклеточной адгезии в периферической крови могли, с одной стороны, отражать уровень их экспрессии клетками эндотелия, с другой — указывать на особый механизм активации клеток, опосредованный взаимодействием данных молекул с соответствующими лигандами на эндотелии. По нашим данным (см. табл. 1), только в группах женщин с ПЭ и с ПЭ, присоединившейся к ХАГ, отмечалось достоверное повышение уровня sVCAM-1 в сыворотке крови по сравнению с показателями в контрольной группе ($p < 0,001$, $p < 0,01$ соответственно). В группе женщин с ХАГ среднее значение

Таблица 1

Содержание ДЭ, t-PA, эндотелина, MMP-2, sVCAM-1 в крови у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза

Группа обследованных	ДЭ, кл/мкл, (M ± m)	t-PA, нг/мл (Ме (C ₂₅ —C ₇₅))	Эндотелин, фмоль/мл (Ме (C ₂₅ —C ₇₅))	MMP-2, нг/мл (M ± m)	sVCAM-1, нг/мл (M ± m)
Контрольная	5,48 ± 0,70	5,08 (3,57—5,77)	0,12 (0—0,48)	331,9 ± 20,6	905,5 ± 94,1
ХАГ	13,03 ± 1,63	6,47 (4,50—8,05)	0,38 (0—2,18)	346,9 ± 32,4	1136,4 ± 109,5
<i>p</i> ₁	<0,001				
ПЭ	15,28 ± 1,52	8,80 (6,54—13,20)	0,99 (0—8,89)	464,6 ± 26,7	1940,9 ± 249,5
<i>p</i> ₁	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
<i>p</i> ₂		<0,02	<0,05		<0,01
ХАГ с ПЭ	13,53 ± 0,94	9,42 (6,46—11,9)	1,20 (0—12,8)	536,9 ± 33,4	1568,7 ± 179,3
<i>p</i> ₁	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01
<i>p</i> ₂		<0,02	<0,01		<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 *p*₁ — достоверность различий по сравнению с контрольной группой, *p*₂ — по сравнению с группой ХАГ.

содержания sVCAM-1 не отличалось от соответствующего показателя в контрольной группе (*p* > 0,05 во всех случаях).

Большинство исследователей сходятся во мнении, что важнейшую роль в дисфункции эндотелия у женщин с гипертензивными расстройствами при беременности играет системная воспалительная реакция [8—10]. Результаты исследования уровня hsCRP, гомоцистеина в сыворотке крови, а также провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNFα представлены в табл. 2.

Содержание hsCRP и гомоцистеина в крови во всех группах женщин с гипертензивными нарушениями при беременности достоверно превышало показатели в контрольной группе (для hsCRP *p* < 0,01 во всех группах; для гомоцистеина *p* < 0,05 в группе с ХАГ, *p* < 0,001 в группе с ПЭ и *p* < 0,02 в группе с ХАГ и присоединившейся ПЭ). В группе женщин с ПЭ уровень гомоцистеина в сыворотке достоверно превышал аналогичный показатель в группе женщин с ХАГ (*p* > 0,02).

Анализ уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке проводился в группах женщин с ПЭ и с ХАГ, присоеди-

нившейся к ХАГ. По нашим данным, в обеих группах по сравнению с показателями в контрольной группе достоверно повышалось содержание IL-1β (*p* < 0,01 в группе с ПЭ; *p* < 0,05 в группе с ХАГ и присоединившейся ПЭ), но повышение уровня IL-6 было характерным только для группы женщин с ПЭ, присоединившейся к ХАГ (*p* < 0,01). Уровень TNFα был сопоставим в трех сравниваемых группах (*p* > 0,05 во всех случаях).

Результаты проведенных исследований легли в основу разработки ряда тестов дифференциальной диагностики генеза гипертензивных расстройств у беременных (табл. 3).

При проведении ROC-анализа было установлено, что содержание t-PA, sVCAM-1, эндотелина (1-21), MMP-2 в сыворотке крови с различной степенью чувствительности и специфичности позволяет дифференцированно диагностировать существовавшую ранее гипертензию и ПЭ, в том числе присоединившуюся к ХАГ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие всех нозологических форм гипертензивных расстройств при беременности сочеталось с усилением воспалительной реакции на системном уровне, о чем говорит повышение уровня hsCRP и гомоцистеина в сыворотке крови.

В настоящее время вопрос о том, вызывает ли воспаление структурные и функциональные изменения в стенке сосуда и приводит к гипертензии или является следствием самой гипертензии, остается нерешенным [11], однако усиление синтеза и продукции различных факторов воспаления отмечалось и при ХАГ, и при ПЭ. По данным литературы, артериальная гипертензия сопровождается ростом уровня hsCRP, TNFα, IL-6, хемокинов (MCP-1), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и молекул адгезии (P-селектин, sICAM-1) в плазме крови и сосудистой ткани [11, 12]. В ряде работ показано, что развитие гипертензивных расстройств, ассоциированных с беременностью, сочеталось с ростом уровня IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα, IFNγ в периферической крови и в плаценте [11, 13—15]. Это подтверждается и данными нашей работы. Особо следует отметить, что достоверное повышение уровня IL-6 в

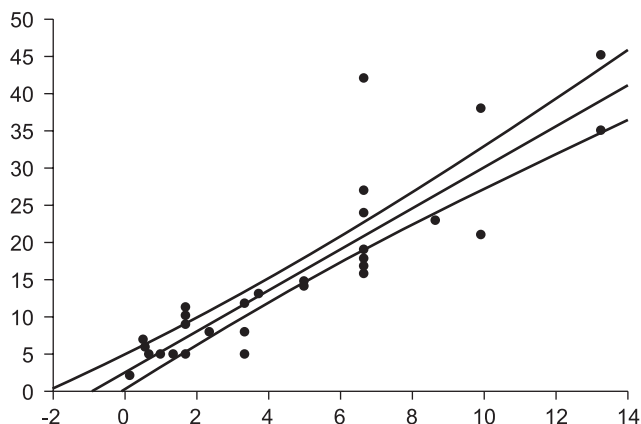


Рис. 1. Корреляционная связь между уровнем ДЭ в венозной крови и средним давлением (АД_{ср}) при ПЭ.

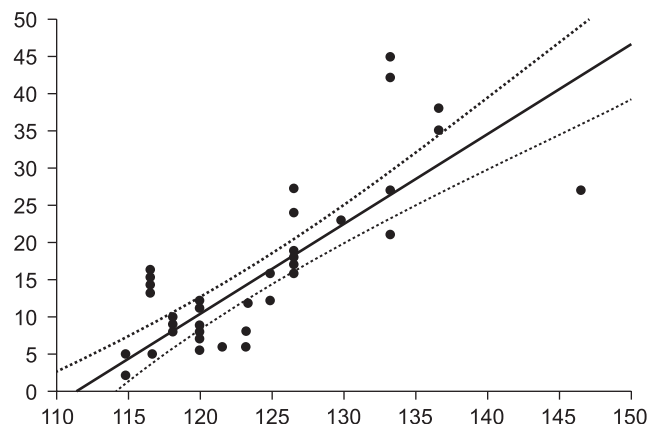


Рис. 2. Корреляционная связь между уровнем ДЭ в венозной крови и суточной протеинурией при ПЭ.

Таблица 2

Содержание hsCRP, гомоцистеина, IL-1β, IL-6, IL-8 и TNFα в сыворотке периферической крови у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза (M ± m)

Группа обследованных	hsCRP, мг/л (Me (C ₂₅ —C ₇₅))	Гомоцистеин, мкмоль/л	IL-1β, пкг/мл	IL-6, пкг/мл	TNFα, пкг/мл
Контрольная	3,40 (2,20—4,72)	8,00 ± 0,61	19,7 ± 3,18	1,06 (0—4,90)	23,1 ± 3,30
ХАГ	9,40 (3,70—16,8)	10,6 ± 0,87	—	—	—
<i>p</i> ₁	<0,01	<0,05			
ПЭ	8,20 (3,00—17,4)	17,9 ± 1,91	121,9 ± 32,2	2,41 (0—5,50)	18,6 ± 4,67
<i>p</i> ₁	<0,01	<0,001	<0,01		
<i>p</i> ₂		<0,02			
ХАГ с ПЭ	9,70 (5,50—13,1)	13,2 ± 1,56	136,5 ± 50,8	5,47 (1,70—12,7)	28,3 ± 9,06
<i>p</i> ₁	<0,01	<0,02	<0,05	<0,01	

сыворотке крови было выявлено только при ПЭ, развившейся на фоне ХАГ. Высокий уровень продукции IL-6 был отмечен и при артериальной гипертензии вне беременности [12]. В экспериментальных моделях артериальной гипертензии показано, что стимуляция продукции IL-6 различными типами клеток происходит под воздействием ангиотензина II [16], в то же время сам IL-6 может апрегулировать экспрессию рецептора ангиотензина I, усиливая эффекты ангиотензина II в воспалении сосудов, вазоконстрикции и гипертензии [11]. Установлено, что длительное введение TNFα или IL-6 в конце беременности у крыс приводит к значительному росту внутрисосудистого давления в почках [17]. Как известно, в динамике воспалительной реакции пик синтеза и продукции IL-6 отмечается значительно позднее, чем усиление синтеза IL-1β. Длительное сохранение высокого уровня IL-6 свидетельствует о переходе воспалительной реакции в хроническую форму, что, вероятно, и происходит при ХАГ. Таким образом, характер воспалительного процесса различался в зависимости от генеза артериальной гипертензии. Возможно, это определяло особенности проявления дисфункции эндотелия при ХАГ и при ПЭ.

Так, при существовавшей ранее гипертензии в отсутствие ПЭ единственным маркером эндотелиальной дисфункции было увеличение уровня циркулирующих ДЭ в крови. Циркуляция клеток эндотелия в сосудистом русле является специфичным и наиболее объективным критерием повреждения эндотелия [18], отражая ослабление

Таблица 3

Дифференциально-диагностические критерии гипертензивных расстройств у беременных

Показатель	ХАГ	ПЭ, в том числе ХАГ с ПЭ	Чувствительность, %	Специфичность, %	AUC
t-PA, нг/мл	≤7	>7	80,0	72,2	0,853
sVCAM-1, нг/мл	≤1465,5	>1465,5	51,9	84,2	0,713
Эндотелин (1-21), фмоль/мл	<0,2	>0,2	75,4	68,4	0,706
ММР-2, нг/мл	≤377,6	>377,6		68,4	0,764

межклеточной интеграции и процессы апоптоза в эндотелии [19]. Случивание в кровь эндотелиальных клеток происходит и при физиологических условиях, но повышение содержания ДЭ в крови при гипертензии является отражением процесса эндотелиоза, обусловленного воздействием эндотоксинов, супероксидных радикалов, гомоцистеина, гистамина и других повреждающих факторов [7, 20]. Отмечено влияние нарушений функции эндотелия на состояние здоровья новорожденного, у матери которого была ПЭ [14]. При ПЭ, в том числе и на фоне ХАГ, в дополнение к росту уровня ДЭ к факторам, отражающим эндотелиальную дисфункцию, следует отнести высокий уровень t-PA, активного фрагмента эндотелина (1-21) и ММР-2. Причем, как показали проведенные нами ранее исследования, при ПЭ высокий уровень продукции ММР-2 не

определялся его синтезом нейтрофилами и моноцитами [21]. Усиление фибринолитической, протеолитической и сосудосуживающей активности сыворотки крови при ПЭ усугубляет патологический процесс.

Исследования последних лет показывают, что эндотелиальная дисфункция, являясь патогенетической основой ПЭ, имеет общность происхождения с генерализованной внутрисосудистой воспалительной реакцией [22—24]. Активированный под влиянием воспаления эндотелий усиливает экспрессию молекул адгезии, таких как селектины, сосудистые молекулы адгезии (VCAM-1), молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) [25, 26]. Подтверждением этому служат наши данные о повышении уровня sVCAM-1 в сыворотке крови при ПЭ. Кроме того, при ПЭ отмечалось усиление экспрессии молекул адгезии L-селектина, PECAM-1 и VLA-2 нейтрофилами [27, 28], что способствует их трансмиграции и аккумуляции в стенке сосуда [29]. Все это вторично усиливает выработку цитокинов, факторов роста и матриксных металлопротеиназ (ММР).

В последнее время в качестве триггерного механизма эндотелиальной дисфункции и воспалительной реакции при ПЭ рассматривается активация клеток микрочастицами синцитиотрофобласта, уровень которых значительно возрастает в периферическом кровотоке женщин с ПЭ [30]. Развитие эндотелиальной дисфункции у беременных приводит к нарушению функций систем органов и развитию полиорганной недостаточности, к комплексным изменениям в фетоплацентарной системе.

Выводы. 1. Гипертензивные расстройства у беременных независимо от нозологической формы, сопровождаются развитием воспалительной реакции и эндотелиальной дисфункции, в максимальной степени выраженной при ПЭ.

2. Существует прямая зависимость повышения содержания циркулирующих эндотелиоцитов в крови от степени клинических проявлений ПЭ.

3. Уровень t-PA, sVCAM-1, эндотелина (1-21) и ММР-2 в сыворотке крови позволяет дифференцированно диагностировать существовавшую ранее гипертензию и ПЭ, в том числе присоединившуюся к ХАГ.

Финансирование. Работа поддержана грантом Президента РФ № МК-6885.2015.7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—3, 5—6, 9—12, 16—18, 20,
23—24, 29—30 см. REFERENCES)

1. Посисеева Л.В., Посисеева Л.В., Сотникова Н.Ю. *Иммунные механизмы развития гестоза*. Иваново: «Иваново»; 2008.
4. Мурашко Л.Е., Тумбаев И.В., Ткачёва О.Н. Роль эндотелия в патогенезе гипертензии при беременности. *Проблемы беременности*. 2006; (11): 49—4.
7. Петрищев Н.Н., Беркевич О.А., Власов Т.Д., Волкова Е.В. Диагностическое значение оценки десквамированных эндотелиальных клеток в крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2001; (1): 50—2.
8. Медвинский И.Д. *Роль синдрома системной воспалительной реакции в патогенезе гестоза (прогноз развития, диагностика, выбор метода анестезиологической защиты)*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Челябинск; 2004.
13. Чистякова Г.Н., Газиева И.А., Ремизова И.И. Оценка системы цитокинов при беременности, осложненной гестозом. *Акушерство и гинекология*. 2006; (2): 25—8.
14. Попова И.Г., Чаша Т.В., Кузьменко Г.Н., Ситникова О.Г., Филькина Е.В., Назаров С.Б. Лабораторная оценка функционального состояния эндотелия у доношенных новорожденных, родившихся у матерей с гестозом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; (6): 12—4.
15. Сотникова Н.Ю. Роль ранних нарушений продукции цитокинов в формировании патологии беременности. *Российский иммунологический журнал*. 2007; 1(1): 258—5.
19. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Власов Т.Д., Гавришева Н.А., Меншутина М.А. Типовые формы дисфункции эндотелия. *Клинико-лабораторный консилум*. 2007; (18): 31—5.
21. Панова И.А. Синтез матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов периферическими фагоцитами у беременных с гипертензивными расстройствами. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2015; 64(3): 26—32.
22. Сидорова И.С., Никитина Н.А., Унания А.Л., Рзаева А.А., Кинякин В.В. Патогенетическое обоснование дифференцированного подхода к ведению беременных с артериальной гипертензией и преэклампсией. *Акушерство и гинекология*. 2013; (2): 35—40.
25. Петрищев Н.Н., Васина Л.В. Нарушение адгезионной активности как форма эндотелиальной дисфункции. *Трансляционная медицина*. 2014; (6): 5—15.
26. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. *Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты*. М.: Бинوم пресс; 2008.
27. Панова И.А. Экспрессия молекул клеточной адгезии фагоцитами как критерий дифференциальной диагностики гипертензивных расстройств беременных. *Акушерство и гинекология*. 2015; (7): 33—7.
28. Панова И.А., Кудряшова А.В., Хлипунова Д.А., Смирнова Е.В., Рокотьянская Е.А. и др. Характеристика зрелости и адгезионной способности нейтрофилов при преэклампсии. *Российский иммунологический журнал*. 2014; 8(3): 360—4.

Получена 10.05.16

REFERENCES

1. Posiseeva L.V., Posiseeva L.V., Sotnikova N.Yu. *Immune Mechanisms of Development of Gestosis [Immunnye mekhanizmy razvitiya gestoza]*. Ivanovo: «Ivanovo»; 2008. (in Russian)
2. Steegers E.A., von Dadelszen P., Duvekot J.J., Pijnenborg R. Preeclampsia. *Lancet*. 2010; 21(376): 631—42.
3. Shenoy V., Kanasaki K., Kalluri R. Preeclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010; 21(9): 529—36.
4. Murashko L.E., Tumbaev I.V., Tkacheva O.N. Role of endothelium in the pathogenesis of hypertension in pregnancy. *Problemy beremennosti*. 2006; (11): 49—4. (in Russian)
5. Wang P.H., Yang M.J., Chen C.Y., Chao H.T. Endothelial cell dysfunction and preeclampsia. *J. Chin. Med. Assoc.* 2015; 78(6): 321—2.
6. Wikström A.K., Nash P., Eriksson U.J., Olovsson M.H. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecology*. 2009; 201(6): 597—6.
7. Petrishchev N.N., Berkevich O.A., Vlasov T.D., Volkova E.V. Diagnostic value assessment of desquamated endothelial cells in the

- blood. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001; (1): 50—2. (in Russian)
8. Medvinsky I.D. *The Role of Systemic Inflammatory Response Syndrome in the Pathogenesis of Preeclampsia (forecast, development, diagnosis, choice of method anesthetic protection)*: Diss. Chelyabinsk; 2004. (in Russian)
9. Can M., Sancar E., Harma M., Guven B., Mungan G., Acikgoz S. et al. Inflammatory markers in preeclamptic patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011; 49(9): 1469—2.
10. Ramma W., Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39(6): 1619—27.
11. Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 78(6): 539—52.
12. Chae C.U., Lee R.T., Rifai N., Ridker P.M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension*. 2001; 38(3): 399—3.
13. Chistyakova G.N., Gazieva I.A., Remizova I.I. Evaluation of cytokines in pregnancies complicated by preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2006; (2): 25—8. (in Russian)
14. Popova I.G., Chasha T.V., Kuz'menko G.N., Sitnikova O.G., Fil'kina E.V., Nazarov S.B. Laboratory evaluation of functional state of endothelium in full-term newborns born to mothers with preeclampsia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; (6): 12—4. (in Russian)
15. Sotnikova N.Yu. The role of early disturbances of cytokine production in the formation of pathology of pregnancy. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2007; 1(1): 258—5. (in Russian)
16. Ruiz-Ortega M., Ruperez M., Lorenzo O., Esteban V., Blanco J., Mezzano S. et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney. Int. Suppl.* 2002; (82): S12—22.
17. Orshal J.M., Khalil R.A. Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004; 286(6): 1013—23.
18. Canbakan B., Keven K., Tutkac H., Danisman N., Ergun I., Nergizoglu G. Circulating endothelial cells in preeclampsia. *J. Hum. Hypertens.* 2007; 21(7): 558—63.
19. Petrishchev N.N., Vasina L.V., Vlasov T.D., Gavrishcheva N.A., Menshutina M.A. Model forms of endothelial dysfunction. *Kliniko-laboratorny konsilium*. 2007; (18): 31—5. (in Russian)
20. Prochazka M., Procházková J., Lubušský M., Pilka R., Úlehlová J., Michalec I. et al. Markers of endothelial activation in preeclampsia. *Clin. Lab.* 2015; 61(1-2): 39—6.
21. Panova I.A. Synthesis of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral phagocytes in pregnant women with hypertensive disorders. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2015; 64(3): 26—32. (in Russian)
22. Sidorova I.S., Nikitina N.A., Unanyan A.L., Rzaeva A.A., Kinyakin V.V. Pathogenetic substantiation of differentiated approach to the management of pregnant women with hypertension and preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; (2): 35—40. (in Russian)
23. Hill J.A., Olson E.N. *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. Academic Press; 2012; 1: 1329—7.
24. Ouyang Y.Q., Li S.J., Zhang Q., Cai H.B., Chen H.P. Interactions between inflammatory and oxidative stress in preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*. 2009; 28(1): 56—2.
25. Petrishchev N.N., Vasina L.V. Violation adhesion activity as a form of endothelial dysfunction. *Translyatsionnaya meditsina*. 2014; (6): 5—15. (in Russian)
26. Belotskiy S.M., Avtalion P.P. *Inflammation. Cell Mobilization and Clinical Effects [Vospalenie. Mobilizatsiya kletok i klinicheskie efekty]*. Moscow: Binom press; 2008. (in Russian)
27. Panova I.A. Expression of cell adhesion molecules by phagocytes, as a criterion of differential diagnosis of hypertensive disorders of pregnancy. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2015; (7): 33—7. (in Russian)
28. Panova I.A., Kudryashova A.V., Khlipunova D.A., Sмирнова Е.В., Рокотьянская Е.А. et al. Characteristic of maturity and adhesive capacity of neutrophils in preeclampsia. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2014; 8(3): 360—4. (in Russian)
29. Heerkens E.H., Izzard A.S., Heagerty A.M. Integrins 25, vascular remodeling, and hypertension. *Hypertension*. 2007; 49(1): 1—4.
30. Lok C.A., Van der Post J.A., Sturk A., Sargent I.L., Nieuwland R. The function of microparticles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2011; 1(1): 59—65.

Received 10.05.16

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.447-008.61-091-076.5

Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н., Иванцова Л.П.

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАРАЦИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
Минздрава Московской области, 129110, Москва, Российская Федерация

Исследование посвящено определению критериев цитологической диагностики патологии паращитовидных желез (ПЩЖ) при различных формах гиперпаратиреоза (ГПТ). Ультразвуковое исследование ПЩЖ выполнено 74 больным ГПТ в возрасте 24–66 лет (20 мужчин и 54 женщины). С первичным ГПТ (костно-висцеральная форма) обследованы 11, с вторичным ГПТ тяжелого течения — 51, с третичным ГПТ (посттрансплантационным) — 12 пациентов. Визуализированы и подвергнуты тонкоигольной аспирационной биопсии 109 увеличенных ПЩЖ. Цитологический материал был информативным в 105 (96,%) наблюдениях, 99 (90,8%) образцов содержали элементы ткани ПЩЖ. Основными цитоморфологическими признаками аденомы ПЩЖ были фолликулоподобные и сосочковые структуры из главных паратирицитов, обнаруженные у всех больных первичным ГПТ, главные паратирициты в разных стадиях секреторного цикла — у 64% больных и макрофаги — у 50% больных. Характерными цитоморфологическими признаками гиперплазии ПЩЖ оказались расположенные в группах, папиллярных и ветвистых структурах с выраженными межклеточными контактами главные темные паратирициты, обнаруженные у 88% пациентов с вторичным ГПТ, паратирициты в разных стадиях секреторного цикла (53% больных) и мелкие базофильные гранулы секрета в цитоплазме паратирицитов и/или внеклеточном пространстве (31% больных). К отличительным цитологическим признакам ткани ПЩЖ при третичном ГПТ относились преобладание главных светлых паратирицитов, расположенных в небольших скоплениях и группах со слабовыраженными межклеточными контактами, и наличие крупных базофильных секреторных гранул в цитоплазме паратирицитов, внеклеточном пространстве и коллоидоподобном веществе (92% больных). Сравнительный анализ выявил сходные цитологические признаки в ткани ПЩЖ и строго определенные критерии, характерные для первичного, вторичного и третичного ГПТ. Обсуждается связь между структурно-функциональным состоянием ткани ПЩЖ и развитием той или иной формы ГПТ. Цитоморфологические особенности ткани ПЩЖ при первичном, вторичном и третичном ГПТ могут быть использованы в алгоритме предоперационной диагностики.

Ключевые слова: цитологическое исследование; паращитовидные железы; гиперпаратиреоз; тонкоигольная аспирационная биопсия.

Для цитирования: Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н., Иванцова Л.П. Цитоморфологические особенности паращитовидных желез при различных формах гиперпаратиреоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(10): 697-700. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-697-700

Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N., Ivantsova L.P.

THE CYTOMORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF PARATHYROID GLAND UNDER VARIOUS FORMS OF HYPERPARATHYROIDISM

The M.F.Vladimirsii Moskovskii oblastnoi research clinical institute of Minzdrav of the Moskovskaia oblast, 129110 Moscow, Russia

The study was organized to establish criteria of cytological diagnostic of pathology of parathyroid glands under various forms of hyperparathyroidism. The ultrasound examination of pathology of parathyroid glands was applied to 74 patients with hyperparathyroidism aged 24-66 years (20 males and 54 females). The examination was applied to 11 patients with primary hyperparathyroidism (bone visceral form), 51 patients with secondary hyperparathyroidism of severe course and 12 patients with tertiary hyperparathyroidism (post-transplantation). The 109 samples of expanded parathyroid glands were visualized and subjected to fine-needle aspiration biopsy. The cytologic material was colored with azure-eosin according Pappenheim method and analyzed using light microscopy technique. The cytological material was informative in 105 (96%) findings. The elements of tissue of parathyroid glands were detected in 99 (90.8%) samples. The main cytomorphologic indications of adenoma of parathyroid gland were follicle-like and papillary structures of main parathyrocytes detected in all patients with primary hyperparathyroidism; main parathyrocytes at various stages of secretory cycle - in 64% of patients and macrophages - in 50% of patients. The characteristic cyto-morphologic indications of hyperplasia of parathyroid gland turned out to be situated in groups, papillary and branching structures with expressed intercellular contacts, main dark parathyrocytes detected in 88% of patients with secondary hyperparathyroidism, parathyrocytes at various stages of secretory cycle (53% of patients) and small basophilic granules of secretion of parathyrocytes in cytoplasm and/or extracellular space (31% of patients). The distinctive cytological indications of tissue of parathyroid gland under tertiary hyperparathyroidism included prevalence of main light parathyrocytes situated in small clusters and groups with ill-defined intercellular contacts and presence of large basophilic secretory granules in cytoplasm of parathyrocytes, extracellular space and colloid-like substance (92% of patients). The comparative analysis detected

Для корреспонденции: Ветчинникова Ольга Николаевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния трансплантологии и диализа, проф. каф. трансплантологии нефрологии и искусственных органов факультета усовершенствования врачей, e-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

similar cytological indications in tissue of parathyroid gland and strictly definite criteria characteristic for primary, secondary and tertiary hyperparathyroidism. The relationship between structural functional condition of tissue of parathyroid gland and development of either form of hyperparathyroidism is discussed. The cytomorphologic characteristics of tissue of parathyroid gland under primary, secondary and tertiary hyperparathyroidism can be included in algorithm of pre-surgery diagnostic.

Key words: *cytological analysis; parathyroid gland; hyperparathyroidism; fine-needle aspiration biopsy.*

For citation: Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N., Ivantsova L.P. The cytomorphologic characteristics of parathyroid gland under various forms of hyperparathyroidism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (10): 697-700.* (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-697-700

For correspondence: *Vetchinnikova O.N., doctor of medical sciences, senior research worker of department of transplantology and dialysis, professor of chair of transplantology, nephrology and artificial organs of the faculty of advanced training of physicians e-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru*

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

Financing. *The study had no sponsor support.*

Expression of gratitude.

Received 18.04.2016
Accepted 27.04.2016

Гиперпаратиреоз (ГПТ) — это патология паращитовидных желез (ПЩЖ), характеризующаяся избыточной секрецией паратиреоидного гормона (ПТГ). Выделяют 3 патогенетические формы ГПТ: первичный, вторичный и третичный (посттрансплантационный).

Первичный ГПТ — это первичное заболевание ПЩЖ, характеризующееся избыточной секрецией ПТГ с развитием синдрома гиперкальциемии. Морфологическим субстратом первичного ГПТ чаще является солитарная паратиреома (80—85%), реже (10—15%) — множественные аденомы (4%), гиперплазия одной или нескольких ПЩЖ (10%), еще реже — аденокарцинома ПЩЖ (3%). Распространенность первичного ГПТ в общей популяции составляет в среднем 1—2%, наибольшая приходится на женщин старшей возрастной группы [1, 2].

Вторичный ГПТ — это заболевание ПЩЖ, характеризующееся избыточной секрецией ПТГ, которое развивается на фоне основного (другого) заболевания, чаще хронической болезни почек (ХБП), реже патологии желудочно-кишечного тракта и других заболеваний. Снижение почечной функции приводят к возникновению дефицита образующегося в проксимальных канальцах нефрона активной формы витамина D (кальцитриола), который в свою очередь, с одной стороны, ограничивает активацию специфических рецепторов (витамин D-чувствительных), расположенных на мембранах главных клеток (паратироцитов) ПЩЖ, а с другой — индуцирует гипокальциемию за счет снижения всасывания кальция в кишечнике. И недостаточная активация витамином D-чувствительных рецепторов, и гипокальциемия стимулируют секрецию ПТГ, вызывая гиперплазию ткани ПЩЖ. Снижение функции почек приводит также к положительному балансу в обмене фосфора, что напрямую и опосредованно (через развивающуюся гипокальциемию) стимулирует секрецию ПТГ. Морфологическим субстратом вторичного ГПТ является диффузная и/или диффузно-узловая гиперплазия ПЩЖ. Вторичный ГПТ — достаточно распространенное осложнение ХБП, которое встречается в среднем у трети — половины всех пациентов [3, 4].

Третичный (посттрансплантационный) ГПТ развивается в результате прогрессирования вторичного, при переходе поликлональной клеточной пролиферации в моноклональную. Морфологическим субстратом третичного ГПТ является диффузно-нодулярная гиперплазия ПЩЖ с формированием автономного узла(ов) (аденомы) железы. Оценить встречаемость третичного ГПТ у больных ХБП на этапе диализной терапии практически невозможно в силу неопределенности каких-либо специфических клинических и лабораторно-инструментальных критериев. Частота третичного ГПТ у пациентов после успешной трансплантации почки достигает 8—18% [3—5].

Диагностика ГПТ представляет собой комплексный клиничко-лабораторно-инструментальный процесс, в котором цитологическое исследование материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТИАБ) под контролем ультразвукового исследования (УЗИ) образований, расцененных как увеличенные ПЩЖ, может занять определенное место. Отдельные исследования, в том числе собственное, убедительно показали, что цитологический анализ ткани ПЩЖ при ГПТ является перспективным и достаточно информативным методом верификации пролиферативного процесса в железе. Ткань гиперплазированной ПЩЖ имеет характерные цитоморфологические признаки, отличные от таковых ткани щитовидной железы [6—10]. В то же время некоторые морфологи сомневаются в возможности установления органоспецифичности в отношении щитовидной или паращитовидных желез на основании анализа клеточного состава пункционного материала [11—13]. Еще большая трудность возникает при дифференциальной диагностике морфологического субстрата (аденома/диффузная/диффузно-узловая гиперплазия ПЩЖ) при ГПТ [14]. В связи с этим определенный интерес представляет анализ характера пролиферативного процесса в ткани ПЩЖ при различных формах ГПТ, что может иметь как прикладное значение для выбора терапевтической тактики, так и теоретическое для понимания механизмов развития ГПТ.

Целью настоящего исследования явилось определение критериев цитологической диагностики патологии ПЩЖ при первичном, вторичном и третичном ГПТ.

Материал и методы. В исследование включены 74 больных (20 мужчин, 54 женщины) ГПТ в возрасте 24—66 лет. Первичный ГПТ смешанной (костно-висцеральной) формы диагностирован у 11 больных: уровень ПТГ составил 118—6490 пг/мл (медиана 771 пг/мл), сывороточные концентрации кальция и фосфора — соответственно 2,4—3,7 и 0,9—1,4 ммоль/л (медиана 2,7 и 1,0 ммоль/л). С вторичным ГПТ тяжелого течения при ХБП на этапе диализной терапии длительностью от 9 мес до 17 лет обследован 51 больной: уровень ПТГ составил 931—3641 пг/мл (медиана 2148 пг/мл), сывороточные концентрации кальция и фосфора — соответственно 2,1—3,0 и 1,6—2,8 ммоль/л (медиана 2,3 и 2,2 ммоль/л). Третичный ГПТ диагностирован у 12 больных через год после успешной трансплантации почки: уровень ПТГ составил 320—513 пг/мл (медиана 342 пг/мл), сывороточные концентрации кальция — 2,6—3,1 ммоль/л (медиана 2,8 ммоль/л), расчетная скорость клубочковой фильтрации по формуле СКД-ЕРІ (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration [15]) — 40—82 мл/мин (медиана 62 мл/мин).

УЗИ ПЩЖ проводили на аппарате фирмы «Philips» с линейным датчиком 7—12 МГц без специальной подготовки, в

положении пациента лежа на спине с запрокинутой головой, с подложенным под плечи валиком. Сканирование осуществляли в области передних отделов шеи с использованием продольных, поперечных и косых проекций. Оценивали состояние щитовидной железы, особенно области задних поверхностей долей у нижних полюсов и на уровне средних третей, т. е. зон типичного расположения ПЩЖ (при таком исследовании неувеличенные ПЩЖ не визуализировались). Визуализированы и подвергнуты ТИАБ 109 увеличенных ПЩЖ: при первичном ГПТ — 11 (7 левых нижних и 4 правые нижние), при вторичном ГПТ — 84 (41 правая и 43 левых), при третичном ГПТ — 14 (у одной пациентки 3: обе правые и левая нижняя, у остальных по одной: 7 левых нижних и 4 правых нижних).

Цитологический материал наносили на обезжиренные предметные стекла, высушивали на воздухе и красили азур-эозином по методу Паппенгейма. Исследование цитологических препаратов проводили посредством световой микроскопии по общепринятой методике. Цитологические заключения были сопоставлены с данными гистологического исследования послеоперационного материала у 55 оперированных больных.

Результаты и обсуждение. Цитологический материал был информативным в 105 (96%) наблюдениях, 99 (90,8%) образцов содержали элементы ткани ПЩЖ. Анализируемые цитogramмы различались по соотношению разновидностей эпителиальных клеток, количеству внеклеточных масс и содержанию в них базофильных гранул. В ранее проведенном нами исследовании установлены 4 морфологические разновидности клеток железистого эпителия ПЩЖ (паратироцитов) — 3 разновидности главных клеток (темные паратироциты, светлые паратироциты и главные клетки с центрально расположенным ядром и околядерным просветлением — «штампованные» клетки) и оксифильные клетки, а также внеклеточные массы, имеющие слабобазофильную или слабооксифильную окраску и содержащие базофильные гранулы [6].

Фрагменты цитogramм ПЩЖ больных первичным ГПТ представлены на рис. 1 (см. вклейку). Анализ цитологического материала больных этой группы показал, что к основным цитоморфологическим признакам аденомы ПЩЖ — наиболее часто морфологического субстрата первичного ГПТ — относятся фолликулоподобные и сосочковые структуры из главных паратироцитов, которые были обнаружены во всех препаратах, и главные паратироциты в разных стадиях секреторного цикла, обнаруженные в 7 препаратах (см. рис. 1, а, б, в). В половине исследованных образцов определялись элементы кисты — макрофаги (см. рис. 1, г). Редко в цитogramмах обнаруживали фрагменты капилляров (2 пациента) и жировые клетки (1 пациент) (см. рис. 1, д, е).

При гистологическом исследовании удаленной ПЩЖ у 10 больных первичным ГПТ верифицирована аденома, у одного — диффузная гиперплазия железы.

Фрагменты цитogramм ПЩЖ больных с вторичным ГПТ — диффузной/диффузно-узловой гиперплазии ПЩЖ — представлены на рис. 2 (см. вклейку). На клеточном уровне невозможно дифференцировать диффузную и диффузно-узловую гиперплазию ткани ПЩЖ, однако наиболее характерные цитоморфологические признаки этих состояний можно описать следующим образом. В подавляющем большинстве исследованных препаратов (88,3%) определялись темные паратироциты с признаками выраженной пролиферации, которые располагались в группах, папиллярных и ветвистых структурах, плотно прилегали друг к другу с образованием тесных межклеточных контактов (см. рис. 2, а, б). В половине цитологического материала (53%) определялись все разновидности паратироцитов (главные темные паратироциты, главные светлые паратироциты, паратироциты с околядерным просветлением цитоплазмы) в разных стадиях секреторного цик-

ла (см. рис. 2, в, г). Наконец, достаточно характерными признаками ткани ПЩЖ при вторичном ГПТ оказались мелкие базофильные гранулы секрета, располагающиеся в цитоплазме паратироцитов и/или внеклеточном пространстве, и коллоидоподобное внеклеточное вещество, которые определялись соответственно в 31 и 24% препаратов (см. рис. 2, д).

Паратиреоидэктомия выполнена 39 пациентам этой группы. По результатам гистологического исследования операционного материала диффузная гиперплазия ткани ПЩЖ верифицирована у 4, диффузно-узловая — у 35 пациентов.

Фрагменты цитogramм ПЩЖ больных третичным ГПТ представлены на рис. 3 (см. вклейку). Установлены следующие отличительные цитологические признаки ткани ПЩЖ при этой форме ГПТ. Во всех цитологических препаратах наблюдалось значительное преобладание главных светлых паратироцитов, располагающихся в тяжах, небольших скоплениях и группах, со слабовыраженными межклеточными контактами, в то время как главные темные паратироциты образовывали лишь небольшие скопления, содержащие не более 10 клеток, но также с ослабленными межклеточными контактами. Реже регистрировались группы оксифильных (онкоцитарных) паратироцитов, их присутствие в ткани связывают с пролиферативным процессом (опухолевым или опухолеподобным). Характерным признаком оказалось наличие крупных базофильных секреторных гранул в цитоплазме паратироцитов, внеклеточном пространстве и коллоидоподобном веществе (см. рис. 3, а, г). Указанные цитоморфологические признаки ткани ПЩЖ при третичном ГПТ выявлены у 12 (92,3%) больных. Описанная цитологическая картина свидетельствует, во-первых, о высокой функциональной активности паратироцитов (большее количество зрелых светлых паратироцитов в сравнении с главными темными клетками и наличие крупных секреторных гранул) и, во-вторых, о преобладании деструктивных процессов над пролиферативными (значительное число дистрофически измененных эпителиальных клеток в виде «голых» ядер, рыхлое расположение паратироцитов в группах с ослабленными межклеточными связями, отсутствие многоклеточных скоплений и микрофолликулов).

Паратиреоидэктомия выполнена 5 пациентам этой группы. По результатам гистологического исследования изменения в ткани удаленных ПЩЖ соответствовали диффузно-узловой гиперплазии.

Проведенный нами сравнительный анализ цитоморфологических признаков ткани ПЩЖ при различных формах ГПТ выявил следующее. Общим цитологическим признаком первичного и вторичного ГПТ является высокая активность пролиферативных процессов в ПЩЖ. На это, в частности, указывает преобладание молодых, т. е. с высокой функциональной потенциальностью, клеток — главных темных паратироцитов. Другое проявление высокой активности пролиферативных процессов в ПЩЖ — наличие большого количества тесных межклеточных контактов с образованием многослойных клеточных скоплений и многомерных клеточных структур. Весьма сходная цитологическая картина при аденоме и гиперплазии ПЩЖ описана и другими специалистами [10].

Общим цитологическим признаком первичного и третичного ГПТ следует считать выраженность секреторной активности клеток ПЩЖ. Сопоставление биохимических параметров сыворотки крови и цитоморфологических характеристик ткани ПЩЖ у больных первичным и третичным ГПТ, а также первичным и вторичным ГПТ указывает на то, что наличие грубых базофильных гранул, расположенных в цитоплазме паратироцитов и внеклеточном пространстве, скорее всего, является косвенным признаком характерной для первичного и третичного ГПТ гиперкальциемии. К общим цитологическим признакам вторичного и третичного ГПТ относятся наличие паратироцитов, в том числе оксифильных эпителиальных клеток, и отсут-

Сравнительная характеристика основных цитологических признаков ткани ПЩЖ при различных формах ГПТ

Признак	Форма ГПТ		
	первичный	вторичный	третичный
Структуры:			
микрофолликулярные	+	+	—
папиллярные	+	+	—
однослойные скопления	+	+	+
группы	+	+	+
Межклеточные контакты:			
выражены	+	+	—
ослаблены	—	—	+
Преобладание главных темных паратироцитов	+	+	—
Преобладание главных светлых паратироцитов	—	—	+
Группы оксифильных паратироцитов	±	±	+
«Голые» ядра	±	±	+
Секреторные гранулы:			
мелкие	+	+	—
крупные	±	—	+
Элементы кисты	±	±	—
Жировые клетки	±	—	—

Примечание. — признак отсутствует; ± — слабовыраженный признак; + — выраженный признак.

ствие жировых клеток и макрофагов. Сравнительная характеристика основных цитологических признаков ткани ПЩЖ при различных формах ГПТ представлена в таблице.

Есть основания полагать, что существует определенная связь между структурно-функциональным состоянием ткани ПЩЖ и развитием той или иной формы ГПТ. С одной стороны, при первичном, вторичном и третичном ГПТ выявляются общие, сходные цитологические признаки в ткани ПЩЖ, с другой — строго определенные, патогномоничные. Первичный ГПТ характеризуется высокой степенью пролиферативных процессов и секреторной активности ПЩЖ, вторичный — ярко выраженной пролиферативной активностью эпителиальных клеток ПЩЖ, третичный — преобладанием дистрофических процессов над пролиферацией и наличием признаков выраженной секреторной активности паратироцитов. Пролiferация ткани ПЩЖ при вторичном ГПТ, на что указывает большое количество в цитологическом материале молодых (незрелых) клеток — главных темных паратироцитов, скорее всего, отражает адаптационную внутриорганную перестройку, направленную на поддержание нарушенного у больных ХБП минерального гомеостаза. Преобладание процессов деструкции и старения клеток ткани ПЩЖ наряду с их повышенной функциональной активностью при третичном ГПТ, по-видимому, связано с этапами развития данной патологии. У больных с успешно трансплантированной и функционирующей почкой и соответственно с нормализацией кальций-фосфорного метаболизма ранее имевший место вторичный ГПТ (диффузная гиперплазия ПЩЖ) подвергается обратному развитию, а сформировавшиеся в ткани ПЩЖ автономные узлы (аденомы) сохраняются [3, 4].

Заключение. Наличие цитоморфологических особенностей, свойственных первичному, вторичному и третичному ГПТ, имеет как прикладное, так и теоретическое значение. Представляется целесообразным включение цитологического исследования ткани ПЩЖ в дифференциально-диагностический алгоритм ГПТ. Цитологический анализ ха-

рактера пролиферативного процесса в ткани ПЩЖ интересен и для понимания механизмов развития ГПТ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—4, 7—13, 15 см. REFERENCES)

1. Гарднер Д., Шобек Д. *Базисная и клиническая эндокринология (книга вторая)*. Перевод с английского. М.: Издательство БИНОМ; 2013: 649—56.
5. Ветчинникова О.Н., Калинин А.П., Казанцева И.А., Полякова Е.Ю., Козлова Н.И. Клинико-морфологические ассоциации при вторичном (почечном) гиперпаратиреозе. В кн.: *Материалы XX Российского симпозиума с международным участием «Современные аспекты хирургической эндокринологии»*. Казань; 2012: 59—63.
6. Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н., Иванцова Л.П. Цитологическая диагностика гиперпаратиреоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; (12): 36—40.
14. Яковлева Л.П., Доброхотова В.З., Павловская А.И., Кондратьева Т.Т. Первичный гиперпаратиреоз на фоне гиперплазии паратировидной железы. Особенности и трудности диагностики. *Опухоли головы и шеи*. 2015; 5(1): 49—53.

Поступила 18.04.16

REFERENCES

1. Gardner D.G., Shoback D.M. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
2. Vandembulcke O., Delaere P., Vander Poorten V., Debruyne F. Incidence of multiglandular disease in sporadic primary hyperparathyroidism. *B-ENT*. 2014; 10(1): 1—6.
3. Jamal S., Miller P.D. Secondary and Tertiary Hyperparathyroidism. *J. Clin. Densitom.* 2013; 16(1): 64—8.
4. Komada H., Kakuta T., Fukagawa M. Diseases of the parathyroid gland in chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 2011; 15: 797—809.
5. Vetchinnikova O.N., Kalinin A.P., Kazantseva I.A., Polyakova E.Yu., Kozlova N.I. Clinical and morphological association with secondary (renal) hyperparathyroidism. In: *Modern Aspects of Surgical Endocrinology: XX Russian Congress with International Participation [Materialy XX Rossiyskogo simpoziuma s mezhduнародным uchastiem «Sovremennyye aspekty khirurgicheskoy endokrinologii»]*. Kazan'; 2012: 59—63. (in Russian)
6. Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N., Ivantsova L.P. Cytological diagnostic of hyperparathyroidism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostica* 2014; (12): 36—40. (in Russian)
7. Abati A., Skarulis M., Shawker T., Solomon D. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of parathyroid lesions: a morphological and immunocytochemical approach. *Hum. Pathol.* 1995; 26(3): 338—43.
8. Glenthoj A., Karstrup S. Parathyroid identification by ultrasonically guided aspiration cytology. Is correct cytological identification possible? *APMIS*. 1989; 97(6): 497—502.
9. Knezević-Obad A., Tomić-Brzac H., Zarković K., Dodig D., Stromar I.K. Diagnostic pitfalls in parathyroid gland cytology. *Coll. Antropol.* 2010; 34(1): 25—9.
10. Tseng F.Y., Hsiao Y.L., Chang T.C. Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology of parathyroid lesions. A review of 72 cases. *Acta Cytol.* 2002; 46(6): 1029—36.
11. Auger M., Charbonneau M., Hüttner I. Unsuspected intrathyroidal parathyroid adenoma: mimic of lymphocytic thyroiditis in fine-needle aspiration specimens—a case report. *Diagn. Cytopathol.* 1999; 21(4): 276—9.
12. Ryska A., Kerekes Z., Cáp J. Differentiating parathyroid adenoma from microfollicular thyroid nodule in fine-needle aspiration cytology. *Cesk. Patol.* 1996; 32(3): 110—4.
13. Bancos I., Grant C.S., Nadeem S., Stan M.N., Reading C.C., Sebo T.J. et al. Risks and benefits of parathyroid fine-needle aspiration with parathyroid hormone washout. *Endocr. Pract.* 2012; 18(4): 441—9.
14. Yakovleva L.P., Dobrokhotova V.Z., Pavlovskaya A.I., Kondrat'eva T.T. Primary hyperparathyroidism at the background of parathyroid glands hyperplasia. Peculiarities and difficulties of diagnostics. *Opuhohi golovy i shei*. 2015; 5(1): 49—53. (in Russian)
15. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 2013; 3(1): 1—150.

Received 18.04.16

© СЛАВНОВА Е.Н., ВОЛЧЕНКО Н.Н., 2016

УДК 616-006.442-018.1-076.5:681.5

Славнова Е.Н., Волченко Н.Н.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА В ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ КУРСА КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЦИТОЛОГИИ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ «Национальный медицинский радиологический исследовательский центр» Минздрава РФ, 125284, Москва, Российская Федерация

Анализ данных цитологического исследования показал, что цитологический диагноз лимфомы Ходжкина установлен верно в точной или предположительной форме в 92,8%, а варианты в цитологических заключениях не указывались. С помощью системы для цитологического анализа Vision Cyto® на основе анализа клеточного состава по микрофотографиям цитологических препаратов у 119 больных с установленным морфологическим (гистологическим и цитологическим) диагнозом лимфомы Ходжкина разработаны обучающие программы для цитологической диагностики и определения вариантов заболевания. Создана галерея фотографий опухолевых и фоновых клеток, которые играют ключевую роль в цитологической диагностике, определены характерные дифференциально-диагностические признаки различных вариантов лимфомы Ходжкина.

Ключевые слова: цитологическая диагностика; лимфома Ходжкина; обучающие программы; системы Vision Cyto®.

Для цитирования: Славнова Е.Н., Волченко Н.Н. Использование автоматизированной системы оценки морфологии клеток для диагностики лимфомы Ходжкина в образовательном процессе курса клинической онкоцитологии.

Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(10): 701-704. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-701-704.

Slavnova E.N., Volchenko N.N.

THE APPLICATION OF AUTOMATED SYSTEM OF EVALUATION OF MORPHOLOGY OF CELLS FOR DIAGNOSTIC OF HODGKIN'S LYMPHOMA IN EDUCATION PROCESS OF COURSE OF CLINICAL ONCOCYTOLOGY

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

The analysis of cytological analysis data demonstrated that cytological diagnosis of Hodgkin's lymphoma was established properly in exact and estimated form in 92.8%. The cytological reports mentioned no alternatives. The cytological analysis system Vision Cyto® was applied to analyze cellular content by micro photos of cytological samples of 119 patients with established morphologic (histological and cytological) diagnosis of Hodgkin's lymphoma. On the basis of the received data training programs were developed concerning cytological diagnostic and detection of forms of disease. The gallery was organized concerning pictures of tumor and background cells playing key role in cytological diagnostic. The distinctive differential diagnostic indications of various forms of Hodgkin's lymphoma were established.

Key words: cytological diagnostic; Hodgkin's lymphoma; training programs; system Vision Cyto®.

For citation: Slavnova E.N., Volchenko N.N. The application of automated system of evaluation of morphology of cells for diagnostic of Hodgkin's lymphoma in education process of course of clinical oncocytoology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 701-704. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-701-704.

For correspondence: Slavnova E.N., candidate of medical sciences, senior research worker of department of oncocytoology. e-mail: slavnov@rambler.ru

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 20.04.2016
Accepted 15.05.2016

Введение. Современная онкология основана на точности морфологической диагностики злокачественных новообразований. Одним из разделов морфологической диагностики является цитологический метод, который основан на оценке разницы клеточного состава в норме и при патологии, т.е. необходимо оценивать не одну отдельно взятую клетку, а их совокупность.

Большое значение имеет фон препарата. Каждое исследование должно завершаться формулировкой заключения [1].

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния онкоцитологии, e-mail: slavnov@rambler.ru

А цитологические заключения по возможности должны согласовываться с гистологическими классификациями ВОЗ.

Критерии цитологической диагностики злокачественных новообразований составляются из оценки клетки, ядра и ядрышка. Для клетки, ядра и ядрышек важными критериями злокачественности являются оценка размеров, формы, соотношения ядра и цитоплазмы. Как правило, при наличии злокачественного процесса клетка увеличена, приобретая порой гигантские размеры. Также меняется ее форма, наблюдается полиморфизм клеточных элементов, нарушается соотношение ядра и цитоплазмы в сторону увеличения доли ядра. Увеличению ядра сопутствуют полиморфизм, бугристость, неравномерный рисунок хроматина, неровность контуров ядерной мембраны, гиперхромия. Увеличиваются число и размер

ядрышек, они приобретают неправильную форму. Разнообразие злокачественных новообразований диктует важность качественной подготовки специалистов клинической лабораторной диагностики в области клинической цитологии [1].

Одним из сложных разделов цитологического исследования является диагностика лимфомы Ходжкина и определение ее вариантов.

Лимфома Ходжкина (ЛХ) — злокачественное заболевание с первичным поражением лимфатических узлов. В классификации ВОЗ (2008) [2] ЛХ имеет следующие характерные признаки:

— как правило, ЛХ начинается с поражения шейных лимфатических узлов;

— болезнь возникает чаще в молодом возрасте (15—35 лет), хотя существует и второй пик заболеваемости (в 50—60 лет);

— опухолевая ткань обычно содержит небольшое количество рассеянных крупных опухолевых одноклеточных клеток Ходжкина (КХ) и многоядерных клеток Березовского—Штернберга (КБШ), окруженных реактивными воспалительными клетками (лимфоцитами, плазмócитами, гистиоцитами, нейтрофилами, эозинофилами, фибробластами);

— опухолевые клетки часто располагаются среди розеток, образованных Т-лимфоцитами.

Первые ЛХ описана в 1832 г. Томасом Ходжкином [3]. В 1965 г. Сэмюель Уилкс назвал это заболевание «болезнью Ходжкина» [4], а позднее — лимфогранулематозом. В Европе и США ЛХ составляет 30% всех злокачественных лимфом, а в Японии — менее 10%. В классификации ВОЗ 2001 г. [5] введен термин «лимфома Ходжкина», а термины «болезнь Ходжкина» и «лимфогранулематоз» считаются устаревшими. Если ранее природа данного заболевания была неизвестна, то в настоящее время благодаря современным технологиям установлена в основном В-клеточная природа ЛХ. В 1890 г. русский врач С.Я. Березовский [6], а за рубежом — К. Штернберг (в 1898 г.) [7] и Д. Рид (в 1902 г.) [8] описали морфологию многоядерных клеток, характерных для ЛХ. С тех пор в нашей стране эти клетки носят название КБШ, а за рубежом — клетки Рид—Штернберга. В литературе обсуждается вопрос об этиологической роли в развитии ЛХ вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) [9—14]. Биологические и клинические исследования последних 30 лет позволили в классификациях ВОЗ 2001 и 2008 гг. выделить два варианта ЛХ: нодулярное лимфоидное преобладание и классический (нодулярный склероз — I и II типы, богатый лимфоцитами, смешанно-клеточный, лимфоидное истощение). Различные варианты ЛХ отличаются по клиническому течению, морфологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) признакам [15, 16]. Диагностика ЛХ, как правило, основана на гистологическом и ИГХ исследовании биопсированных лимфатических узлов или опухолевых тканей. А.И. Воробьев и А.М. Кременецкая [17] в монографии «Опухоли лимфатической системы» считают, что во всех случаях ЛХ обязательными являются приготовление и цитологический анализ отпечатков биопсированной ткани, что значительно облегчает диагностику, так как позволяет детально изучить морфологию клеточных элементов. Широкое внедрение пункций лимфатических узлов под контролем ультразвукового исследования и иммуногистохимического исследования требует от цитологов знаний особенностей дифференциальной цитологической диагностики ЛХ и ее вариантов. Определение морфологических вариантов ЛХ важно до начала лечения, так как они имеют различное клиническое течение и прогноз.

Для обучения цитологов диагностике ЛХ и ее вариантов возможны различные методики.

1. Пересмотр цитологических препаратов, когда диагноз

ставится высококвалифицированным врачом и проводятся цитогистологические сопоставления.

2. Непосредственный визуальный контроль высококвалифицированного врача-цитолога.

3. Использование автоматизированных систем оценки морфологии клеток в цитологических мазках.

Первый способ — наиболее простой и малозатратный, но у него есть серьезный недостаток: при повторном просмотре мазка сложно найти клетку, вызвавшую затруднения при интерпретации. Второй способ очень наглядный, но весьма дорог (требуется тринокулярный микроскоп) и связан с большими затратами времени исследователя. Оба способа не позволяют сохранить изображения клеток с последующим разбором их морфологии. Новым перспективным подходом в процессе обучения цитологической диагностики является внедрение компьютерных технологий, в частности применение автоматизированных систем, предназначенных для оценки морфологии клеток в цитологических мазках.

Цель исследования — определить возможности системы оценки морфологии клеток в цитологических мазках Vision Cyto® для обучения цитологов диагностике классической ЛХ и ее вариантов.

Материал и методы. Обучение проводилось на цитологических препаратах от 119 больных с морфологическим (цитологическим и гистологическим) диагнозом ЛХ. У 24 больных гистологически установлен диагноз классической ЛХ без указания варианта из-за малого количества материала в биоптате. У 95 больных на основании данных гистологии и иммуногистохимии определен морфологический вариант ЛХ: у 1 (1%) — нодулярный тип лимфоидного преобладания, у 94 (99%) — классический вариант. Классический вариант ЛХ представлен: у 74 (78%) больных нодулярным склерозом; у 44 (60%) больных — нодулярным склерозом I типа и у 30 больных (40%) — нодулярным склерозом II типа, у 18 (19%) — смешанно-клеточным подвариантом, у 1 (1%) — лимфоидным преобладанием и у 1 (1%) — лимфоидным истощением.

Рутинные цитологические препараты окрашивали азур-эозиновыми красителями. Для исследования морфологии клеток и обучения цитологов применяли систему Vision Cyto®, состоящую из тринокулярного микроскопа с цифровой камерой и персонального компьютера, оснащенного специальным программным обеспечением.

Результаты и обсуждение. Анализ данных цитологического исследования показал, что цитологический диагноз ЛХ установлен верно в точной или предположительной форме в 92,8%, ошибки составили 7,2%: гиподиагностика — 2,4%, гипердиагностика — 1,6%, расхождения по гистологической форме — 3,2%. Варианты ЛХ при анализе цитологических препаратов в заключении практически не указываются, что связано с отсутствием цитологических критериев различных морфологических вариантов ЛХ. Таким образом, создание обучающей программы для цитологической диагностики и определения варианта ЛХ является весьма актуальной задачей.

В ходе применения системы Vision Cyto® для обучения были использованы следующие приемы.

1. Использовались фотографии различных опухолевых и фоновых клеток при ЛХ. Фотографии демонстрировали врачам-цитологам в виде слайд-шоу с задержкой 7 с. Это время давалось обучаемому для осмысления предъявленного изображения, его идентификации и указания в бланке ответа.

Цитограмма ЛХ: опухоль представлена различными типами КБШ и КХ, расположенными среди реактивного фонового микроокружения, составляющего до 99% клеточной популяции (рис. 1, см. вклейку). В состав реактивного ми-

кроокружения в различном количестве входят лимфоциты, гистиоциты, нейтрофильные лейкоциты, эозинофилы, плазмочиты и фибробласты либо фиброциты.

2. Предварительно с применением системы автоматизированного анализа морфологии клеток проводили исследование цитологического мазка клеток ЛХ (КЛХ). Учащиеся распределяли опухолевые клетки и клетки фона по галереям, а при необходимости осуществляли коррекцию, что позволило отнести тот или иной препарат к определенному варианту ЛХ. Проводилось коллегиальное обсуждение морфологических особенностей той или иной клетки и правильность ее идентификации.

Нами изучена морфология различных типов КБШ и КХ. Выделено несколько типов КБШ: одноядерные с лопастным ядром, двухъядерные или многоядерные клетки размером от 30 до 120 мкм. Хроматин тонкодисперсный, разряженный, ядерная мембрана уплотнена. Как правило, каждое ядро содержало крупное ядрышко — это важный диагностический признак. Ядрышки варьировали по форме, размеру и количеству. Характерно перинуклеарное гало.

Классические диагностические КБШ крупные, многоядерные, чаще — двухъядерные, ядра округлые или овальные, хроматин тонкодисперсный, равномерный. Ядра содержали крупные ядрышки, сопоставимые с ядром малого лимфоцита и иногда занимающие почти все ядро, с просветлением вокруг них. Двухъядерные клетки с крупными ядрышками в каждом из ядер напоминали «глаза совы» (рис. 2, см. вклейку).

КХ — крупные одноядерные клетки со светлым ядром, с тонкодисперсным хроматином, с четкими увеличенными полиморфными по размеру ядрышками, соответствующими диагностическим КБШ (рис. 3, см. вклейку).

Лакунарные клетки в цитологических препаратах представлены крупными клетками, содержащими многодольчатое ядро или множество округло-овальных мелких ядер, расположенных зеркально, в виде подковы, либо перекрывающих друг друга, с более мелкими, чем в диагностических КБШ, ядрышками (рис. 4, см. вклейку). Клетки имели широкую светлую цитоплазму. Название клеток объясняется тем, что при фиксации в формалине имеет место ретракция цитоплазмы, и в гистологических препаратах ядро клетки как бы лежит в пустоте. В рутинных цитологических препаратах этого явления не наблюдалось, лишь в жидкостных цитологических препаратах, приготовленных по технологии BD SurePath, морфология клеточных элементов была приближена к гистологии.

LP-клетки (прежнее название — L&H, lymphocyte&histiocyte) — крупные клетки с многодольчатым ядром, тонкой ядерной мембраной, мелкими или укрупненными ядрышками, часто локализующимися у ядерной мембраны, умеренно выраженной светлой цитоплазмой. Доли ядра наслаиваются друг на друга и напоминают воздушную кукурузу («попкорн») (рис. 5, см. вклейку).

В гистологических препаратах классической ЛХ встречались сморщенные, «мумифицированные» КХ и КБШ. В цитологических препаратах такого типа клеток мы не наблюдали.

3. Анализ морфологии опухолевых клеток и клеточных элементов фона в сформированных Vision Cyto® галереях изображений позволил сформировать характерные цитогаммы для различных вариантов ЛХ и подвариантов КЛХ. Достоинством используемой системы является не только возможность коллегиального обсуждения морфологии выведенного через мультимедийный проектор изображения опухолевых и фоновых клеток, но и возможность автоматического обнаружения опухолевых клеток в препарате при повторной микроскопии с использованием большого увеличения для детальной оценки морфологических особенностей. Это позволяет на конкретных примерах объяснить учащимся осо-

бенности как различных опухолевых и фоновых клеток, так и разных вариантов КЛХ.

В нашем исследовании нодулярный вариант ЛХ с лимфоидным преобладанием определен в 1 случае у мужчины 45 лет при исследовании подмышечных лимфатических узлов, причем цитологический и гистологический диагнозы совпали. Цитограмма нодулярного варианта ЛХ с лимфоидным преобладанием характеризовалась выраженной пролиферацией лимфоидных элементов, гистиоцитов, в том числе эпителиоидных, на фоне которых обнаруживали окруженные лимфоцитами LP-клетки типа «попкорн», образующие розеткоподобные структуры. Отсутствовали классические КХ и КБШ, а также в реактивном фоне не определялись гранулоциты (нейтрофильные лейкоциты, эозинофилы) и плазматические клетки.

Цитограмма классического варианта ЛХ, богатого лимфоцитами (КЛХБЛ) (1 больной), характеризовалась выраженной пролиферацией лимфоидных элементов, гистиоцитов, в том числе эпителиоидных, на фоне которых обнаруживали редкие КХ и КБШ, мононуклеарные лакунарные и LP-клетки типа «попкорн», окруженные мелкими лимфоцитами, образующими розеткоподобные структуры. Следует отметить, что КХ и КБШ были меньше по размерам и величине ядрышек, чем при других классических вариантах ЛХ. В реактивном фоне не определялись гранулоциты (нейтрофильные лейкоциты, эозинофилы). Фон составляли мелкие лимфоциты, гистиоциты и плазмочиты.

Цитограмма при нодулярном склерозе (74 больных), которая в классификации ВОЗ определяется как вариант классической ЛХ (КЛХНС), характеризовалась различным количеством КХ и КБШ лакунарного типа, малых лимфоцитов и других неопухолевых воспалительных клеток. КХ и КБШ лакунарного типа в цитологических мазках имели многочисленные ядерные доли, мелкозернистый хроматин и более мелкие ядрышки по сравнению с классическими диагностическими КХ и КБШ. Отмечается обильная бледно окрашенная цитоплазма.

Цитограмма при нодулярном склерозе I типа характеризовалась редкими КХ и КБШ лакунарного типа на фоне реактивной воспалительной инфильтрации с различным количеством лимфоцитов, плазмочитов, эозинофилов, нейтрофилов, гистиоцитов, эпителиоидных гистиоцитов, клеток эндотелия синусов.

Таким образом, реактивный фон составляли многочисленные лимфоидные элементы разной степени зрелости и небольшое количество плазмочитов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, гистиоцитов, эпителиоидных гистиоцитов, клеток эндотелия синусов (фон, богатый лимфоцитами). Смешанно-клеточный реактивный фон составляли все элементы в равных количествах: лимфоциты, немного плазмочитов, эозинофилы, нейтрофилы, гистиоциты, эпителиоидные гистиоциты, клетки эндотелия синусов. Фиброгистиоцитарный фон составляли лимфоидные элементы, немного лейкоцитов, гистиоциты, эпителиоидные гистиоциты, клетки эндотелия синусов, возможно — фибробласты либо фиброциты.

Цитограмма при нодулярном склерозе II типа характеризовалась большим количеством КХ и КБШ с признаками полиморфизма на фоне лимфоидного истощения.

Цитологическая картина классической ЛХ смешанно-клеточного варианта (18 больных) характеризовалась выраженным клеточным полиморфизмом. Цитограммы представлены тремя типами в зависимости от клеточного состава реактивного фона.

Первый тип. Опухолевые клетки: «классические» КХ и КБШ. Реактивный фон представлен многочисленными лимфоидными элементами разной степени зрелости и неболь-

шим количеством плазмочитов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, гистиоцитов, эпителиоидных гистиоцитов и клеток эндотелия синусов.

Второй тип. Опухолевые клетки: «классические» КХ и КБШ. Реактивный фон представлен в равных количествах всеми элементами фона: лимфоцитами, эозинофилами, нейтрофилами, гистиоцитами, эпителиоидными гистиоцитами, клетками эндотелия синусов и небольшим количеством плазмочитов.

Третий тип. Опухолевые клетки: единичные КХ и КБШ. Реактивный фон представлен лимфоидными элементами, небольшим количеством лейкоцитов, гистиоцитов, эпителиоидных гистиоцитов, клеток эндотелия синусов.

Цитограмма классической ЛХ, лимфоидного истощения (КЛХЛИ) (1 большой) ретикулярного (саркоматозного) подварианта характеризовалась наличием плеоморфных атипичных КХ и КБШ, которые и преобладали (рис. 6, см. вклейку). Встречались совершенно неправильной формы гигантские клетки со структурным хроматином и мелкими нуклеолами, а также мелкие клетки с такой же структурой хроматина ядра; наблюдалось почти полное исчезновение лимфоцитов (рис. 7, см. вклейку). Цитологическая картина была сходна с саркомой.

Выводы

1. Применение системы Vision Cyto® позволило лучше изучить морфологию опухолевых и фоновых клеток при лимфоме Ходжкина.

2. Анализ морфологии опухолевых клеток и клеточных элементов фона в сформированных Vision Cyto® галереях изображений позволил сформировать цитограммы, характерные для различных вариантов ЛХ и подвариантов КЛХ.

3. Созданные на основе галерей изображений обучающие программы позволят проводить более качественное обучение врачей-цитологов диагностике лимфомы Ходжкина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—5, 7—14 см. REFERENCES)

1. Волченко Н.Н. Глава 3: Современные возможности цитологического метода в диагностике опухолей и опухолеподобных процессов. В кн.: Чиссов В.И., Дарьялова С.Л., ред. *Руководство по онкологии*. М.: МИА; 2008.
6. Березовский С. К вопросу о строении и клиническом течении Lymphadenomae malignae. *Русская медицина*. 1890; 39: 611—3.
15. Ковригина А.М., Пробагова Н.А. *Лимфома Ходжкина и крупноклеточные лимфомы*. М.: МИА; 2007.
16. Тумян Г.С. *Клиническая и иммуноморфологическая характеристика лимфомы Ходжкина*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.; 2004.
17. Воробьев А.И., Кременецкая А.М. *Атлас. Опухоли лимфатической системы*. М.: Ньюдиамед; 2007.

REFERENCES

1. Volchenko N.N. Chapter 3: modern possibilities of cytological assay in the diagnosis of tumors and tumor-like processes. In: Chissov V.I., Dar'yalova S.L., eds. *Guide Oncology [Rukovodstvo po onkologii]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
2. WHO. *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon; 2008.
3. Hodgkin T. On some morbid appearances of absorbant glands and spleen. *Med. Chir. Trans.* 1832; 17: 68—114.
4. Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's Disease) with remarks. *Guy's Hospital. Reports*. 1965; 11: 56—67.
5. Jaffe E., Harris N., Stein H., Vardiman J. *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.
6. Berезovskiy S. On the question of the structure and the clinical course Lymphadenoma malignae. *Russkaya meditsina*. 1890; 39: 611—3. (in Russian)
7. Sternberg C. Ueber eine eigernartige unter dem Bilde der Pseudo-leukamie. Tuberculose deslymphatischen Apparates. *Zeitschr. Heilk.* 1898; 19: 21—99. (in German)
8. Reed D.M. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp. Rep.* 1902; 10: 133—96.
9. Araujo I., Bittencourt A.L., Barbosa H.S., Netto E.M., Mendonça N., Foss H.D. et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. *Virchows Arch.* 2006; 449(3): 315—9.
10. Brousset P., Schlaifer D., Meggetto F., Bachmann E., Rothenberger S., Pris J. et al. Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood*. 1994; 84(8): 2447—51.
11. Weiss L.M., Chen Y.Y., Liu X.F., Shibata D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol.* 1991; 139(6): 1259—65.
12. Brousset P., Chittal S., Schlaifer D., Icart J., Payen C., Rigal-Huguet F. et al. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMeX) sections. *Blood*. 1991; 77(8): 1781—6.
13. Pinkus G.S., Lones M., Shintaku I.P., Said J.W. Immunohistochemical detection of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in Reed-Sternberg cells and variants of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 1995; 147(5): 1408—15.
14. Vasef M.A., Kamel O.W., Chen Y.Y., Medeiros L.J., Weiss L.M. Detection of Epstein-Barr virus in multiple sites involved by Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 1995; 147(5): 1408—15.
15. Kovrigina A.M., Probatova N.A. *Hodgkin's Lymphoma and Large Cell Lymphoma [Limfoma Khodzhkina i krupnokletochnye limfomy]*. Moscow: MIA; 2007. (in Russian)
16. Tummyan G.S. *Clinical and Immunomorphological Characteristics of Hodgkin lymphoma*: Diss. Moscow; 2004. (in Russian)
17. Vorob'ev A.I., Kremenetskaya A.M. *Atlas. Tumors of the Lymphatic System [Atlas. Opukholi limfaticheskoy sistemy]*. Moscow: N'yudiamed; 2007. (in Russian)

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-004-07:616.15-074

Барановская И.Б., Зенцова О.А., Сысоева И.П.

ОСОБЕННОСТИ НОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОГРАММЫ ПРИ ЦИРРОЗАХ ПЕЧЕНИ

ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края, 350012, г. Краснодар, Российская Федерация

Проанализирована диагностическая значимость новых показателей гемограммы при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями (n = 64). Установлено, что по сравнению с контрольной группой у пациентов с циррозами статистически значимо увеличено содержание незрелых клеток трех ростков гемопоэза: ретикулоцитов до $1,99 \pm 1,54\%$, гранулоцитов до $0,44 \pm 0,77\%$, незрелых тромбоцитов до $3,23 \pm 1,7\%$. При патологии печени отмечен «левый сдвиг» ретикулоцитарной и лейкоцитарной формулы, достоверно снижено содержание гемоглобина в ретикулоцитах. Увеличение содержания фрагментированных эритроцитов (Frg) до $0,83 \pm 1,21\%$, а также уровня дельта-гемоглобина ($D\text{-He} > 4 \text{ ng}$) интерпретировали как дополнительные маркеры гемолиза. При этом отрицательные значения дельта-гемоглобина ($D\text{-He} < 0 \text{ ng}$) у 6,3% пациентов сопряжены с сопутствующим воспалением. В результате исследования получены новые данные об особенностях кроветворения при циррозах печени, повышающие качество лабораторного мониторинга пациентов с данной патологией.

Ключевые слова: цирроз печени; незрелые клетки крови; ретикулоциты; тромбоциты.

Для цитирования: Барановская И.Б., Зенцова О.А., Сысоева И.П. Особенности новых показателей гемограммы при циррозах печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10):705-710. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-705-710.

Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Sysoieva I.P.

THE CHARACTERISTICS OF THE NEW INDICES OF HEMOGRAM UNDER LIVER CIRRHOSIS

The Kraievaia clinical hospital №2 of Minzdrav of Krasnodarskii kraii, 350012 Krasnodar, Russia

The diagnostic significance of new indices of hemogram under liver cirrhosis associated with thrombocytopenia (n=64) was analyzed. It is established that in comparison with control group the patients with cirrhosis are characterized by statistically valuable increasing of content of immature cells of three germs of hematopoiesis: reticulocytes up to $1.99 \pm 1.54\%$, granulocytes up to $0.44 \pm 0.77\%$, immature thrombocytes up to $3.23 \pm 1.7\%$. Under liver pathology, the following occurrences are detected: "left shift" of reticulocyte and leukocyte formula; reliable decreasing of content of hemoglobin in reticulocytes. The increasing of both of content of fragmentary erythrocytes (Frg) up to $0.83 \pm 1.21\%$ and level of delta-hemoglobin ($D\text{-He} > 4 \text{ ng}$) were interpreted as additional markers of hemolysis. At that, negative values of delta-hemoglobin ($D\text{-He} < 0 \text{ ng}$) in 6.3% of patients are associated with concomitant inflammation. As a result of study, new data was obtained concerning characteristics of hematopoiesis under liver cirrhosis increasing quality of laboratory monitoring of patients with the given pathology.

Key words: liver cirrhosis; immature blood cells; reticulocyte; thrombocyte.

For citation: Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Sysoieva I.P. The characteristics of the new indices of hemogram under liver cirrhosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 705-710. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-705-710.

For correspondence: Baranovskaya I.B., candidate of biological sciences, biologist of clinical diagnostic laboratory of department of clinical research. e-mail: irina.baranovskaya@yandex.ru

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 18.05.2016
Accepted 30.05.2016

В настоящее время современные автоматизированные системы анализа крови предоставляют комплекс новых показателей гемограммы, которые, по сути, «исследовательские» и нуждаются в клинической интерпретации. Так, например, проточная цитофлуорометрия — технология ряда анализаторов серии Sysmex — значительно расширяет возможности исследования клеток различных ростков гемопоэза. При

Для корреспонденции: Барановская Ирина Борисовна, канд. биол. наук, биолог клинико-диагностической лаборатории подразделения клинических исследований, e-mail: irina.baranovskaya@yandex.ru

помощи оптической детекции анализируются качественные особенности клетки крови, зависящие от размера/объема, внутренней структуры, содержания нуклеиновых кислот (РНК/ДНК, зрелость и метаболическая активность). Диагностическая значимость показателей проточной цитофлуорометрии возрастает при состояниях, сопровождающихся гематологическими нарушениями.

Цирроз печени — достаточно распространенное заболевание, которое в манифестной стадии характеризуется дисфункцией трех ростков гемопоэза: лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного. В общем анализе крови у пациентов с развившимся циррозом печени или печеночной

недостаточностью можно выявить признаки гемолиза, тромбоцитопению, лейкоцитопению [3].

По поводу показателей крови при циррозах печени сведения специальной литературы фрагментарны и противоречивы. Известно, что аномальные показатели эритроцитов, в частности увеличение ретикулоцитов и снижение концентрации гемоглобина, связаны с повышенным риском смерти при трансплантации печени [11]. Имеются данные как о снижении относительного количества ретикулоцитов до 0,79% при наличии фиброза у детей [6], так и о повышении абсолютного количества ретикулоцитов до $0,064 \cdot 10^{12}/л$ у взрослых с верифицированным циррозом печени [9]. Ряд авторов сообщают о комплексном нарушении системы гемостаза, в том числе тромбоцитопении [5, 8, 10].

Что касается новых показателей лейкоцитарного, ретикулоцитарного и тромбоцитарного анализа, получаемых посредством лазерной детекции, то вопрос об их информативной ценности при циррозах печени остается открытым.

Цель работы — выявить информативную ценность новых показателей гемограммы, получаемых при помощи проточной цитофлуорометрии при циррозах печени.

Материал и методы. Анализировали результаты общего анализа крови лиц основной и контрольной групп.

Основная группа представлена 64 пациентами с верифицированным циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией. Структура циррозов была следующей: 38 случаев вирусной этиологии, 24 — алиментарно-токсической, 2 — криптогенного генеза. Выборка представлена 30 мужчинами и 34 женщинами в возрасте $62,1 \pm 39,5$ года.

Контрольная группа сформирована из 70 здоровых добровольцев, проходящих плановое профилактическое обследование. Выборка представлена 35 мужчинами и 35 женщинами $55,3 \pm 28,7$ года.

Образцы крови исследовали на анализаторе Sysmex-XE 2100. Анализировали следующие показатели: 1) лейкоцитарные: количество лейкоцитов (WBC, $10^9/л$); относительное количество незрелых гранулоцитов (IG, %); абсолютное количество незрелых гранулоцитов (IG, $10^9/л$); 2) эритроцитарные и ретикулоцитарные: количество эритроцитов (RBC, $10^{12}/л$); гематокрит (HCT, %); средний объем эритроцита (MCV, фл); среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг); средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC, г/дл); коэффициент вариации эритроцитов по объему (RDW, %); относительное количество фрагментированных эритроцитов (Frg, %); относительное количество ретикулоцитов (Ret, %); абсолютное количество ретикулоцитов (Ret, $10^{12}/л$); относительное количество незрелых ретикулоцитов (IRF, %); относительное количество ретикулоцитов с низкой, средней и высокой флуоресценцией (LFR, %, MFR, % и HFR%); среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He, пг); дельта-гемоглобин (D-He, пг); 3) тромбоцитарные: количество тромбоцитов, измеренное в импедансном режиме (PLT, $10^9/л$); количество тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме (PLT-O, $10^9/л$); относительное количество незрелых тромбоцитов (IPF, %); коэффициент вариации тромбоцитов по объему (PDW, %); средний объем тромбоцита (MPV, фл); процент больших тромбоцитов больше 12 фл (P-LCR, %); тромбокрит (PCT, %).

Анализируемые показатели разделены на две группы: получаемые при помощи импедансной, или кондуктометрической технологии (традиционные параметры) и проточной цитофлуорометрии (новые параметры).

Статистическую обработку данных производили с помощью программ Statistica 7 и Excell 2003. Использовали следующие статистические параметры: *M* — среднее значение, *Sd* — стандартное отклонение, *Sd. er.* — стандартная ошибка. Межгрупповые различия оценивали на основе критерия Стью-

Таблица 1

Традиционные показатели общего анализа крови у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией

Показатели	Основная группа (циррозы)	Контрольная группа
	<i>M ± Sd (St. er.)</i>	
WBC, $10^9/л$	$5,06 \pm 3,37$ (0,42)	$7,01 \pm 1,81$ (0,18)
RBC, $10^{12}/л$	$4,02 \pm 0,75$ (0,09)	$4,94 \pm 0,53$ (0,05)
HGB, г/дл	$11,49 \pm 2,10$ (0,26)	$13,95 \pm 1,57$ (0,16)
HCT, %	$36,32 \pm 6,02$ (0,75)	$44,94 \pm 3,58$ (0,36)
MCV, фл	$91,51 \pm 11,17$ (1,4)*	$91,84 \pm 3,8$ (0,38)*
PLT, $10^9/л$	$82,45 \pm 30,51$ (3,81)	$256,03 \pm 53,36$ (5,31)
RDW, %	$16,08 \pm 3,05$ (0,39)	$13,15 \pm 0,76$ (0,08)
PDW, %	$13,31 \pm 1,99$ (0,29)*	$13,17 \pm 1,66$ (0,17)*
MPV, %	$11,19 \pm 0,91$ (0,13)*	$11,08 \pm 0,78$ (0,08)*
P-LCR, %	$34,4 \pm 7,27$ (1,06)*	$33,64 \pm 6,82$ (0,69)*
PCT, %	$0,09 \pm 0,03$ (0,01)	$0,28 \pm 0,06$ (0,01)

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — межгрупповые различия статистически недостоверны ($p > 0,05$).

дента при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализировали статистически значимые ($p \leq 0,05$) коэффициенты корреляции по Пирсону (*r*). Для анализа распределения значений показателей рассчитывали кривые, отображающие плотность вероятности *p(x)* (отношение вероятности к длине интервала) и представляющие собой теоретический аналог гистограммы.

Результаты. В табл. 1 и 2 представлены результаты анализа гемограмм (традиционные и новые показатели) у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией, и лиц контрольной группы.

В соответствии с таблицами у пациентов с циррозами по сравнению с контрольной группой статистически значимо снижено количество лейкоцитов (WBC) до $5,06 \pm 3,37 \cdot 10^9/л$, увеличено содержание незрелых гранулоцитов (IG) до $0,44 \pm 0,77\%$, или $0,04 \pm 0,15 \cdot 10^9/л$. Согласно результатам индивидуального анализа, у 46,8% лиц основной группы зарегистрирована лейкоцитопения ($WBC < 4,0 \cdot 10^9/л$).

Таблица 2

Показатели проточной цитофлуорометрии у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией

Показатели	Основная группа (циррозы)	Контрольная группа
	<i>M ± Sd (St. er.)</i>	
IG, %	$0,44 \pm 0,77$ (0,10)	$0,19 \pm 0,11$ (0,01)
IG, $10^9/л$	$0,04 \pm 0,15$ (0,02)	$0,01 \pm 0,01$ (0,00)
PLT-O, $10^9/л$	$92,08 \pm 32,30$ (4,04)	$290,81 \pm 61,53$ (6,28)
IPF, %	$3,23 \pm 1,7$ (0,22)	$1,89 \pm 1,16$ (0,12)
Ret, %	$1,99 \pm 1,54$ (0,19)	$1,10 \pm 0,33$ (0,03)
Ret, $10^{12}/л$	$0,07 \pm 0,04$ (0,00)	$0,05 \pm 0,02$ (0,000)
IRF, %	$5,03 \pm 4,85$ (0,61)	$3,35 \pm 1,78$ (0,18)
LFR, %	$94,97 \pm 4,84$ (0,61)	$96,59 \pm 1,82$ (0,18)
MFR, %	$4,56 \pm 4,15$ (0,52)	$3,18 \pm 1,67$ (0,17)
HFR, %	$0,47 \pm 0,9$ (0,11)	$0,18 \pm 0,20$ (0,02)
Ret-He, пг	$29,15 \pm 5,52$ (0,69)	$32,54 \pm 1,32$ (0,13)
D-He, пг	$2,71 \pm 1,97$ (0,25)*	$2,90 \pm 0,72$ (0,07)*
Frg, %	$0,83 \pm 1,21$ (0,15)	$0,10 \pm 0,14$ (0,01)

По сравнению с контрольной группой значения традиционных эритроцитарных показателей (количество эритроцитов, уровень гематокрита, концентрация гемоглобина) у пациентов с циррозом статистически значимо снижены ($p \leq 0,05$), а коэффициент вариации эритроцитов по объему достоверно увеличен (см. табл. 1). Отмечено отсутствие межгрупповых различий, касающихся среднего объема эритроцитов ($p > 0,05$).

Установлено, что при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, количество тромбоцитов, подсчитанное импедансным методом (PLT), достоверно снижено до $82,45 \pm 30,51 \cdot 10^9/\text{л}$ (см. табл. 1). Содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме анализатора (PLT-O), на 10,5% выше, чем PLT, и составляет $92,08 \pm 32,30 \cdot 10^9/\text{л}$ (см. табл. 2). На фоне тромбоцитопении зарегистрировано статистически значимое увеличение незрелых тромбоцитов (IPF) до $3,23 \pm 1,7\%$. Согласно результатам корреляционного анализа, имела место обратная зависимость между содержанием тромбоцитов, измеренном в оптическом режиме, и количеством их незрелых форм ($r = -0,45$).

На рис. 1 представлены гистограммы распределения значений незрелых тромбоцитов основной и контрольной групп.

В соответствии с рис. 1 наиболее вероятное значение (мода распределения) IPF при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, составляет 4,5%, в то время как у лиц контрольной группы — 2%. Согласно результатам индивидуального анализа, у 6 пациентов IPF значительно превышает норму и составляет 6—10%.

Межгрупповой сравнительный анализ не выявил достоверных различий, касающихся традиционных показателей тромбоцитарного клеточного ряда (PDW, MPV, P-LCR), $p > 0,05$. Статистически значимое снижение тромбокриты (PCT) у пациентов с циррозами обусловлено наличием тромбоцитопении.

У больных основной группы зарегистрировано статистически значимое увеличение относительного и абсолютного содержания ретикулоцитов до 1,99%, или $0,07 \cdot 10^{12}/\text{л}$ (см. табл. 2). Выявлены достоверные различия, касающиеся и других показателей ретикулоцитарного анализа. В частности, содержание незрелых ретикулоцитов (IRF) при циррозах увеличено до $5,03 \pm 4,85\%$, что на 33,4% выше значения аналогичного показателя лиц контрольной группы. Поскольку фракцию незрелых ретикулоцитов составляют ретикулоциты с низкой и высокой флуоресценцией, возрастание IRF, очевидно, сопряжено с увеличением долевого вклада HFR и MFR в общий ретикулоцитарный пул. В целом при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, зарегистрирована тенденция к омоложению ретикулоцитарной формулы.

У пациентов основной группы среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He) статистически значимо снижено до $29,15 \pm 5,52$ пг ($p \leq 0,05$). Уменьшение Ret-He сопряжено с анемическим синдромом, который в соответствии с критериями ВОЗ зарегистрирован у 72% больных основной группы. Однако в 67% случаях Ret-He вписывался в референсные нормы, составляющие, по данным литературы, 28—35 пг [4].

Установлено, что количество фрагментированных эритроцитов (Frg) у пациентов с циррозами на 88% выше аналогичного показателя лиц контрольной группы и составляет $0,83 \pm 1,21\%$. Рис. 2 демонстрирует вариационный ряд Frg в анализируемых выборках.

В соответствии с рис. 2 при циррозах печени распределение значений Frg описывается пологой кривой с выраженной правосторонней асимметрией; максимальное значение показателя составляет 6%. Согласно данным индивидуального

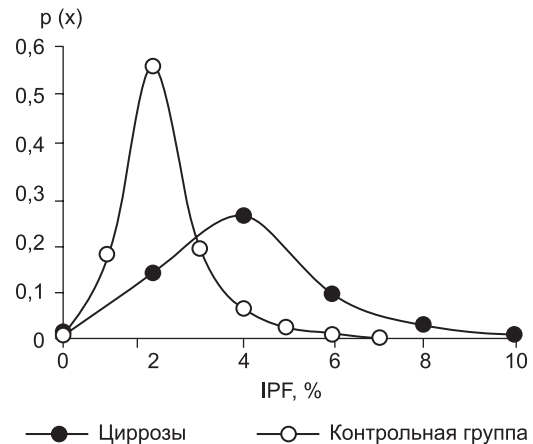


Рис. 1. Гистограммы распределения количества незрелых тромбоцитов.

анализа, у 40% пациентов содержание шизоцитов повышено более чем в 10 раз. Так, у 28,1% больных $\text{Frg} \geq 1\%$, а у 9,4% $\text{Frg} \geq 3\%$. У лиц контрольной группы гистограмма Frg островершинна, наиболее вероятное значение показателя (мода) составляет 0,5%, а максимальное значение показателя — 1,2%.

Согласно полученным данным (см. табл. 2), значение дельта-гемоглобина (D-He) статистически значимо не различалось у лиц основной и контрольной групп, составляя соответственно $2,71 \pm 1,97$ и $2,9 \pm 0,72$ пг. Рис. 3 демонстрирует особенности распределения D-He.

В соответствии с рис. 3 у лиц контрольной группы числовой ряд D-He принимает область положительных значений, распределение близко к «нормальному» гауссовому. Наиболее вероятное значение показателя — 2,5 пг. При циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, диапазон варьирования D-He включает как область отрицательных, так и область положительных значений, варьируя в интервале $[-3,5—7,5]$ пг. Индивидуальный анализ показал, что отрицательные значения D-He < 0 пг зарегистрированы у 6,3% лиц основной группы. Высокие положительные значения показателя (D-He > 4 пг), не встречающиеся в норме, зарегистрированы в 22% случаях цирроза. Корреляционный анализ показал наличие тесных прямых взаимосвязей между

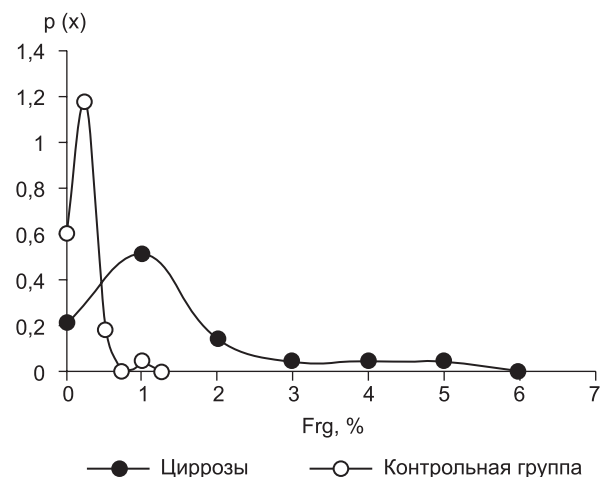


Рис. 2. Гистограммы распределения количества фрагментированных эритроцитов.

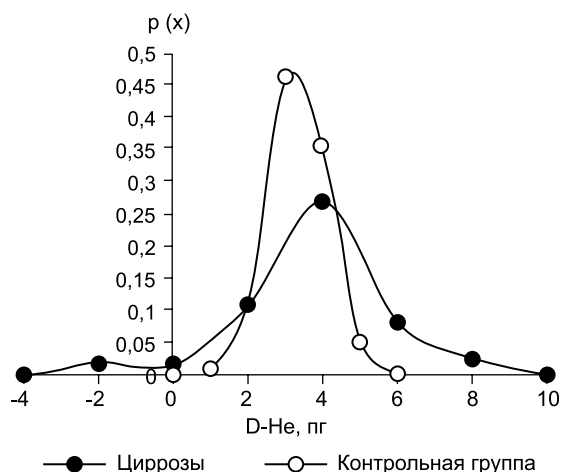


Рис. 3. Гистограммы распределения значений дельта-гемоглобина.

уровнем дельта-гемоглобина и содержанием гемоглобина в ретикулоцитах ($r = 0,57$), а также количеством незрелых гранулоцитов ($r = 0,45$) в условиях нарушения синтетической функции печени.

Обсуждение. Лабораторные показатели при циррозе печени в большинстве случаев не зависят от этиологии заболевания и обусловлены преимущественно уровнем гепатоцеллюлярной недостаточности. При оценке функции печени общепринято ориентироваться на биохимические тесты, в то время как диагностическая значимость показателей проточной цитофлуорометрии, как правило, остается за рамками клинической интерпретации.

Ранее установлено отсутствие значимой математической взаимосвязи новых показателей гемограммы (относительное и абсолютное количество ретикулоцитов, количество незрелых тромбоцитов, уровень дельта-гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, количество фрагментированных эритроцитов) с полом и возрастом [1]. Относительная стабильность в норме, низкая биологическая вариабельность, очевидно, повышает клиническую значимость данных параметров в условиях патологии.

Известно, что при циррозах печени, как правило, затронуты все ростки гемопоэза. Выявленная в результате исследования тенденция к лейкоцитопении и омоложению лейкоформулы соответствует общепринятым представлениям о механизмах нарушения гранулоцитопоэза при нарушениях функции печени. На фоне спленомегалии, являющейся частым спутником циррозов, ускоренная деструкция нейтрофилов, сокращенный срок их циркуляции в сосудистом русле [4] обуславливают снижение общего содержания лейкоцитов крови. При этом имеет место задержка созревания части гранулоцитов на стадии промиелоцитов, миелоцитов или метамиелоцитов. Вероятно, здесь по принципу «обратной связи» уменьшение содержания зрелых клеток крови на периферии компенсируется ускоренным выходом из костномозгового депо гранулоцитов, в том числе низкой степени зрелости.

Картина красной крови отражает особенности кинетики и функциональной активности соответствующих клеток гемопоэза при циррозах печени. Изменяется скорость пролиферации и уровень гемоглобинизации, время пребывания клеток в костном мозге, продолжительность циркуляции в периферической крови зрелых клеточных элементов. Согласно полученным данным, у пациентов основной выборки анемия носила умеренный характер, значения эритроцитарных показателей (RBC, HGB, Hct) снижены на 17–20% по сравнению с нормой.

Патогенез гематологических нарушений при циррозах носит мультифакторный характер. Особое значение придает гемолитическим процессам, секвестрирующей роли селезенки, аутоиммунным и токсическим механизмам. Интересно, что, согласно результатам проведенного исследования, в основной выборке зарегистрировано отсутствие статистически значимого увеличения среднего объема эритроцитов (MCV), что было бы естественно для заболевания печени. Наряду с другими возможными факторами генез анемии в данном случае, вероятно, обусловлен преимущественно нарушением процессов гемоглобинизации и созревания эритроидных элементов костного мозга.

Тромбоцитопения при циррозах печени является проявлением гиперспленизма и обусловлена повышенным потреблением за счет увеличенной секвестрации, угнетения активности мегакариоцитов и уменьшением продукции тромбопоэтина [10]. Согласно полученным данным, содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом блоке анализатора (PLO-O), достоверно отражало истинное количество клеток за счет правильной идентификации гигантских тромбоцитов (при импедансном методе большие тромбоциты ошибочно подсчитываются как эритроциты).

Вне зависимости от генеза, число тромбоцитов в периферической крови регулируется в соответствии с общебиологическими законами: избыток тормозит тромбоцитопоэз, тромбоцитопения — стимулирует. Действительно, по сравнению с контрольной группой при циррозах зарегистрировано увеличение на 41% долевого вклада незрелых тромбоцитов в общий тромбоцитарный пул. Возрастание IPF свидетельствовало о том, что процессы пролиферации на уровне костного мозга не нарушены, и даже, возможно, имеет место ускоренное тромбоцитотоделение крупных тромбоцитов, а генез тромбоцитопении обусловлен преимущественно ускоренным потреблением клеток на периферии.

Установлено, что значения рутинных показателей тромбоцитарного анализа (PDW, MPV и P-LCR) достоверно не различались в основной и контрольной группе ($p > 0,05$). Отсутствие статистически значимых корреляций с показателями гемограммы дополнительно нивелировало диагностическую значимость тестов. Согласно ранним результатам исследований [2], приводятся данные о низкой информативной ценности P-LCR и MPV в системе дифференциальной диагностики тромбоцитопений беременных.

Результаты исследования продемонстрировали, что из всего спектра тромбоцитарных параметров показатели оптической детекции (IPF, PLT-O) наиболее адекватно отражали особенности тромбоцитопоэза при циррозах печени. Актуальность измерения показателей возрастает в случаях выраженных тромбоцитопений, связанных с необходимостью принятия клинического решения.

Косвенными маркерами функциональной активности клеток костного мозга служат показатели ретикулоцитарного клеточного ряда, чувствительные к эритропоэтину. В норме эритропоэтин не только основной стимулятор пролиферации клеток красной крови, но также индуктор образования мегакариоцитов, увеличения количества и реактивности тромбоцитов [8]. В этой связи логично было бы предположить наличие прямой взаимосвязи между незрелыми клетками эритроцитарного и тромбоцитарного ростков кроветворения. Однако результаты корреляционного анализа свидетельствовали об отсутствии предполагаемой зависимости ($r \approx 0$).

У пациентов с циррозами печени на фоне омоложения ретикулоцитарной формулы отмечено достоверно более высокое по сравнению с нормой количество ретикулоцитов (см. табл. 2). Индивидуальный анализ показал, что в 36% случаев относительное содержание ретикулоцитов превышает 2%, а у 8% больных показатель Ret% выше 5%. Содержание не-

зрелых ретикулоцитов у 12% пациентов превышает 14%, в то время как в контрольной группе IRF $3,35 \pm 1,78\%$. При циррозах печени увеличение общего количества ретикулоцитов, так же как и долевого вклада фракций низкой степени зрелости (IRF, HFR, MFR), обусловлено рядом факторов. Ведущим механизмом здесь, вероятно, служит гемолиз, по принципу обратной связи стимулирующий эритропоэз. О наличии гемолитического компонента при циррозах печени дополнительно свидетельствовало и статистически значимое увеличение фрагментированных эритроцитов: значение Ftg у лиц основной и контрольной групп различалось более чем в 8 раз.

Отдельного внимания заслуживает новый исследовательский показатель дельта-гемоглобин (D-He), представляющий собой математическую разность среднего содержания гемоглобина в ретикулоцитах и среднего содержания гемоглобина в эритроцитах. У здоровых людей значение D-He всегда положительно и колеблется в диапазоне 2—4 пг. Отрицательные значения D-He встречаются нечасто, например при анемиях хронических заболеваний. В случае воспаления гепсидин, синтезируемый печенью, блокирует перенос железа трансферрином, что приводит к дефициту железа, доступно для эритропоэза [12].

Согласно полученным данным, патологически высокие или низкие значения ($2 \text{ пг} > \text{D-He} > 4 \text{ пг}$) зарегистрированы в 46% случаев цирроза печени. У небольшой части пациентов (6,3%) D-He < 0 . Отрицательные значения D-He, очевидно, обусловлены сопутствующим воспалением. В условиях нарушения синтетической функции печени статистически значимое уменьшение содержания гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-He) свидетельствовало об ограниченности железа для нужд кроветворения и в целом подтверждало вышеуказанный тренд.

Изменения функциональных характеристик клеток красной крови при патологии печени не ограничиваются ретикулоцитами. Одновременно возникают нарушения на уровне зрелых эритроцитов. При высоких значениях дельта-гемоглобина (D-He $> 4 \text{ пг}$) ретикулоциты насыщены железом. И в генезе нарушения на первое место выступают механизмы гемолиза в периферическом кровяном русле, разрушения в селезенке функционально неполноценных эритроцитов. Последнее обусловлено тем обстоятельством, что при циррозах нарушен синтез метаболитов, необходимых для эритропоэза, в том числе витамина B₁₂. Поэтому отдельные линии эритроцитов представлены гемоглобинизированными мегалоцитами: функционально неполноценными, короткоживущими и осмотически нестойкими.

Таким образом, при циррозах печени отмечают изменения содержания, функциональных характеристик, соотношения зрелых и незрелых клеточных элементов гемопоэза. Анализ показателей проточной цитофлуорометрии позволяет детализировать данные изменения, выявить уровень и размеры нарушений центрального и периферического звеньев эритрона. Получаемая таким образом целостная картина кроветворения способствует выработке адекватной диагностической и клинической стратегии в отношении пациентов с тяжелой печеночной патологией.

Выводы. 1. У пациентов с циррозами, ассоциированными с тромбоцитопениями, содержание тромбоцитов, измеренное в оптическом режиме (PLT-O), на 10,5% выше, чем подсчитанное импедансным методом. В случае критически низких концентраций тромбоцитов представляется целесообразным ориентироваться на показатель PLT-O как наиболее адекватно отражающий истинное число тромбоцитов.

2. Количество незрелых тромбоцитов у пациентов с циррозом печени, ассоциированным с тромбоцитопенией, статистически значимо увеличено до $3,23 \pm 1,7\%$, что сви-

детельствует об активации костномозгового тромбоцитопоэза. Степень «запроса» на незрелые клетки регулируется по принципу обратной связи.

3. Расчетные показатели тромбоцитарного анализа (PDW, MPV и P-LCR) не предоставляют дополнительную информацию, характеризующую особенности тромбоцитопоэза при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопенией.

4. Установлено, что при циррозах печени имеет место диссоциация между содержанием лейкоцитов и количеством незрелых гранулоцитов: тенденция лейкоцитопении сопровождается «левым сдвигом» лейкоформулы.

5. По сравнению с контрольной группой при циррозах печени, ассоциированных с тромбоцитопениями, статистически значимо увеличено относительное и абсолютное количество ретикулоцитов, снижено среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, имеет место омоложение ретикулоцитарной формулы ($p \leq 0,5$).

6. Дельта-гемоглобин (D-He) при циррозе печени, ассоциированном с тромбоцитопенией, принимает как положительные, так и отрицательные значения. Отрицательные значения D-He сопряжены с сопутствующим воспалительным компонентом. Выявлена прямая взаимосвязь между D-He и содержанием гемоглобина в ретикулоцитах ($r = 0,57$), D-He и количеством незрелых гранулоцитов ($r = 0,45$).

7. При циррозах печени статистически значимое увеличение по сравнению с нормой среднего содержания фрагментов (0,83 \pm 1,21%) и/или уровня дельта-гемоглобина (D-He $> 4 \text{ пг}$), вероятно, обусловлены сопутствующим гемолитическим компонентом, характерным для патологии печени.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—12 см. REFERENCES)

1. Барановская И.Б., Зенцова О.А., Самохина О.Ф., Демидченко Г.А., Тен Ф.П. Новые показатели общего анализа крови в клинической практике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (12): 19—23.
2. Барановская И.Б., Зенцова О.А., Самохина О.Ф., Демидченко Г.А., Тен Ф.П. Тромбоцитарные показатели при тромбоцитопениях беременных. *Вестник муниципального здравоохранения*. 2013. Available at: <http://vestnik.kmldo.ru/pdf/13/05/07.pdf> (дата обращения 3 ноября 2013).
3. Ерёмкина Е.Ю. Болезнь Вильсона—Коновалова. *Вестник современной клинической медицины*. 2011; 4(1): 38—46.
4. Луговская С.А. Лабораторная гематология. М.: Триада; 2006.
5. Тугушев А.С., Кремзер А.А., Избитский В.В., Нечепуренко И.Г., Панченко Л.В. Оценка показателей гемостаза при циррозе печени. *Запорожский медицинский журнал*. 2011; 13(3): 74—5.

Поступила 18.05.16

REFERENCES

1. Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Samokhina O.F., Demidenko G.A., Ten F.P. New indicators of complete blood count in clinical practice. *Klinicheskay laboratornaya diagnostika*. 2013; (12): 19—23. (in Russian)
2. Baranovskaya I.B., Zentsova O.A., Samokhina O.F., Demidenko G.A., Ten F.P. Platelet indices with thrombocytopenia in pregnant women. *Vestnik munitsipal'nogo zdravookhraneniya*. 2013. Available at: <http://vestnik.kmldo.ru/pdf/13/05/07.pdf>. (Accessed 3 November 2013) (in Russian)
3. Eremina E.Yu. Wilson's Disease. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2011; 4(1): 38—46. (in Russian)
4. Lugovskaya S.A. *Laboratory Hematology [Laboratornaya gematologiya]*. Moscow: Triada; 2006. (in Russian)
5. Tugushev A.S., Kremzer A.A., Izbitskiy V.V., Nechipurenko I.G., Panchenko L.V. Assessment of hemostasis in liver cirrhosis. *Zaporo-*

- zhskiy meditsinskiy zhurnal* (Ukrainian). 2011; 13(3): 74—5. (in Russian)
- Akyay A., Olcay L., Kuzu I., Bozdoğan N., Ünal-İnce E., İleri T. et al. A child with myelodysplastic syndrome with hypocellular fibrosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2010; 32(8): 617—20.
 - Buttarelo M., Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130(1): 104—6.
 - Homoncik M., Jilma-Stohlawetz P., Schmid M., Ferlitsch A., Peck-Radosavljevic M. Erythropoietin increases platelet reactivity and platelet counts in patients with alcoholic liver cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20(4): 437—43.
 - Kabutomori O., Kanakura Y., Iwatani Y. Marked decreases of total and immature reticulocytes in myelodysplastic syndrome among patients with pancytopenia. *Acta Haematol.* 2003; 109(4): 212—3.
 - Kim H.R., Park B.R., Lee M.K., Park A.J., Ahn J.Y. Comparison of an immature platelet fraction and reticulated platelet in liver cirrhosis. *Korean J. Lab. Med.* 2007; 27(1): 7—12.
 - Parker R., Armstrong M.J., Bruns T. Reticulocyte count and hemoglobin concentration predict survival in candidates for liver transplantation. *Transplantation.* 2014; 97(4): 463—9.
 - Weiman A., Weiman K., Lun A. Hämatologische Veränderungen in der intensivmedizin — Das erweiterte Blutbild. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 2009; 44(3): 164—70. (in German)

Received 18.05.16

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.373:578.2451.03:616.832-004.21.015.4

Назаров В.Д.¹, Лапин С.В.¹, Суркова Е.А.¹, Макшаков Г.С.², Мазинг А.В.¹, Евдошенко Е.П., Тотолян А.А.³

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА

¹ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург;

²СПбГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, г. Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский НИИ

эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Рекомбинантный человеческий интерферон-бета (ИФН-β) является наиболее часто используемым для лечения ремиттирующей-рецидивирующей формы рассеянного склероза лекарственным средством. У части пациентов отсутствует клинический ответ на проводимую терапию, что может быть обусловлено появлением антител к био-препарату. В зависимости от возможности блокировать связывание ИФН-β со своим рецептором все антитела, образующиеся против ИФН-β, делятся на связывающие и нейтрализующие. Целью данной работы является исследование аналитических и клинико-диагностических параметров тестов, использующихся для определения различных типов антител, синтезирующихся против ИФН-β. В исследовании участвовали 33 пациента с диагнозом рассеянный склероз, ремиттирующая-рецидивирующая форма, получавших терапию ИФН-β-1а, а также 40 доноров и 15 больных рассеянным склерозом, не получавших терапию ИФН-β. Концентрация связывающих антител измерялась с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), а также методом иммуноблоттинга. Титр нейтрализующих антител был определен с помощью чувствительной к ИФН-β клеточной линии HL-116. Связывающие и нейтрализующие антитела у доноров и пациентов, не получавших ИФН-β, выявлены не были. Распространенность связывающих антител к препаратам ИФН-β-1а составила 57,6% при исследовании образцов с помощью метода иммуноблоттинга и 60,6% при использовании коммерческой тест-системы. Статистический анализ результатов показал высокую сходимость и корреляцию значений концентрации связывающих антител, полученных при использовании метода иммуноблоттинга и иммуноферментного теста ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). У 21,21% пациентов обнаружены клинически значимые титры нейтрализующих антител. Все пациенты с клинически значимым титром нейтрализующих антител были положительны в отношении связывающих антител, измеренных методами ИФА и иммуноблоттинга. Показана высокая корреляция значений титров нейтрализующих антител с концентрацией связывающих антител, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$). Использование в клинической практике данных о наличии связывающих и нейтрализующих антител к ИФН-β поможет оптимизировать терапию дорогостоящими биологическими препаратами у пациентов с рассеянным склерозом и другими аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: *рассеянный склероз; интерферон-бета; иммуногенность; нейтрализующие антитела; связывающие антитела.*

Для цитирования: Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (10): 710-714. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-710-714.

Nazarov V.D.¹, Lapin S.V.¹, Surkova E.A.¹, Makshakov G.S.², Mazing A.V.¹, Evdoshenko E.P., Totolian A.A.³

THE METHODS OF DETECTION OF BINDING AND NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PREPARATIONS OF INTERFERON-BETA

Для корреспонденции: Назаров Владимир Дмитриевич, сотр. научно-исследовательского центра по мол. медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: Nazarov19932@mail.ru

¹The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university, 197022 St. Petersburg, Russia

²The municipal clinical hospital № 31, 197110 St. Petersburg, Russia

³The Pasteur Sankt-Peterburgskii research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

The human recombinant β -interferon is most frequently applied for treatment of remittent recurrent form of multiple sclerosis using pharmaceuticals. The clinical response to applied therapy is absent in some of patients that can be conditioned by development of antibodies too preparations. Depending on possibility of blocking binding of human recombinant β -interferon with its receptor, all antibodies are divided on binding and neutralizing ones. The purpose of study is to investigate analytical and clinical diagnostic parameters of tests using for detection of different types of antibodies synthesized against human recombinant β -interferon. The study sampling consisted of 33 patients with remittent recurrent form of multiple sclerosis receiving therapy with human recombinant β -interferon and also of 40 donors and 15 patients with multiple sclerosis without therapy with human recombinant β -interferon. The concentration of binding antibodies was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Also immune blotting assay was applied. The titer of neutralizing antibodies was determined using cell line HL-116 sensitive to human recombinant β -interferon. The binding and neutralizing antibodies were not detected in donors and patients without human recombinant β -interferon therapy. The prevalence of binding antibodies to human recombinant β -interferon amounted to 57.6% when analysis of samples using immune blotting assay was used and 60.6% when commercial testing system was applied. The statistical analysis of results demonstrated high convergence and correlation of values of concentrations of binding antibodies obtained using immune blotting assay and enzyme-linked immunosorbent assay ($r=0.9159$, $p<0.0001$). The clinically significant titers of neutralizing antibodies were detected in 21.21% of patients. All patients with clinically significant titer of neutralizing antibodies were positive in relation to binding antibodies measured by immune blotting assay and enzyme-linked immunosorbent assay. The high correlation between values of titers of neutralizing antibodies and concentration of binding antibodies measured by immune blotting assay ($r=0.7909$, $p=0.0055$). The application in clinical practice of data concerning presence of binding and neutralizing antibodies to human recombinant β -interferon can input into optimization of therapy with expensive biologic preparations in patients with multiple sclerosis and other autoimmune diseases.

Key words: multiple sclerosis; human recombinant β -interferon; immunogenicity; binding antibodies; neutralizing antibodies.

For citation: Nazarov V.D., Lapin S.V., Surkova E.A., Makshakov G.S., Mazing A.V., Evdoshenko E.P., Totolian A.A. The methods of detection of binding and neutralizing antibodies to preparations of interferon-beta. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (10): 710-714.* (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-710-714.

For correspondence: Nazarov V.D., worker of the research center of molecular medicine. e-mail: Nazarov19932@mail.ru

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

Financing. The study had support of the Russian Scientific Foundation Agreement № 16-15-00118

Received 11.05.2016
Accepted 24.05.2016

Введение. Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся эпизодами демиелинизации и прогрессирующей атрофией головного мозга [1, 2]. Препараты интерферона-бета (ИФН- β) являются наиболее часто используемым для лечения ремиттирующей-рецидивирующей формы рассеянного склероза (РРС) лекарственным средством [3—5]. Несмотря на доказанную эффективность препаратов ИФН- β при РРС, у 30—50% пациентов отсутствует клинический ответ на проводимую терапию [6, 7]. Некоторые авторы связывают это с высоким уровнем эндогенной экспрессии генов интерферонового ответа, а также со снижением фармакологической активности ИФН- β , что обусловлено иммуногенностью генно-инженерного биологического препарата (ГИБП) [8, 9].

На данный момент существует два типа препаратов ИФН- β . Идентичный человеческому аналогу ИФН- β -1a синтезируют в клетках яичника хомячка, а негликозилированный рекомбинантный ИФН- β -1b — в бактериальной клеточной линии *E. coli*. Препараты ИФН- β , являясь по своей структуре белковыми молекулами, потенциально иммуногенны [10]. Иммуногенностью называют склонность ГИБП вызывать иммунный ответ в отношении молекул биопрепарата, а также родственных белков организма [11]. Одним из следствий иммуногенности препаратов ИФН- β является появление антител, ингибирующих их биологическую и фармакологическую активность. Данные антитела синтезируются в результате постепенного снижения толерантности иммунной системы к молекуле ГИБП, что обусловлено многократным введением ИФН- β [12]. На иммуногенность ИФН- β значительное влияние оказывают различия в аминокислотной последовательности с эндогенным аналогом,

отсутствие гликозилирования, формулировка препарата, путь введения и наличие молекулярных агрегатов [12, 13]. Кроме этого, aberrации гуморального иммунного ответа, наблюдаемые при РС, также предрасполагают к появлению антител к ИФН- β . Пациенты с олигоклональным синтезом иммуноглобулинов в спинно-цереброспинальной жидкости, принимающие ИФН- β , имеют больший риск появления нейтрализующих антител (НАТ), чем пациенты с нормальным паттерном интертеккального синтеза [14]. Различают два типа синтезирующихся против препаратов ИФН- β антител — связывающие антитела (САТ) и НАТ. Образующиеся против ИФН- β САТ представляют собой совокупность всех антител, способных связываться с молекулой ГИБП [15, 20]. Однако остается неясной клиническая значимость выявления САТ к ИФН- β . Высокие концентрации САТ могут изменять фармакодинамику и фармакокинетику препаратов ИФН- β , а также предсказывать снижение клинической эффективности проводимого лечения в будущем. В методах, направленных на выявление САТ, используется специфическое взаимодействие антител с исследуемым иммобилизованным ГИБП, что позволяет получить количественную информацию о концентрации САТ. Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг являются распространенными методами определения САТ. В свою очередь НАТ представляют собой высокоаффинную фракцию иммуноглобулинов класса G, входящую в пул САТ, способную препятствовать связыванию ИФН- β со своим рецептором и таким образом нарушать фармакологическую активность и ингибировать терапевтический эффект препарата [10, 15]. Показано снижение эффективности терапии, а именно увеличение количества рецидивов и появление новых очагов в головном мозге, детектируемых с помощью магнитно-резонансной томографии, у пациентов с РС в присутствии высоких титров НАТ к ИФН- β [5, 16]. Концен-

трация НАТ к препаратам ИФН-β определяется с помощью чувствительных к ИФН клеточных линий. Любой образец, содержащий НАТ, будет снижать или полностью устранять ответ клеточной линии, индуцированный известной концентрацией ИФН-β [16, 17].

Целью данной работы является исследование аналитических и клинико-диагностических параметров тестов, используемых для определения различных типов антител, синтезирующихся против ИФН-β.

Материал и методы. В исследовании принимали участие 33 амбулаторных больных РППС, получавших терапию препаратами ИФН-β-1a различных производителей более одного года. Кроме того, были использованы сыворотки 40 доноров крови, не получавших препараты ИФН-β и не имевших аутоиммунных заболеваний, 15 пациентов с диагнозом РППС, не получавших препараты ИФН-β, а также контрольные положительные и отрицательные образцы на САТ и НАТ. У всех 33 пациентов с РС была измерена концентрация САТ с помощью иммуноблоттинга и ИФА.

Для определения САТ использовался коммерческий набор для ИФА компании BÜHLMANN Laboratories AG (Швейцария). Исследования проводились в полном соответствии с инструкцией производителя. Контрольные образцы были предоставлены производителем. Кроме того, для определения концентрации САТ к препаратам ИФН-β была разработана методика, основанная на принципе иммуноблоттинга. В качестве несущей поверхности использовалась пористая нитроцеллюлозная мембрана (НМ) с размером пор 0,45 мкм (GEHealthCare, LifeTechnologies), на которую наносился ГИБП. После отмывки фосфатно-солевым буфером проводилась забивка свободных участков мембраны путем инкубации в блокирующем буфере, содержащем 1% твин-20 и 0,5% альбумин человека. Далее НМ с иммобилизованным на них белковым препаратом инкубировались с исследуемыми сыворотками пациентов. Для детекции связавшихся с мембраной антител использовались вторичные антитела к Fc-сегменту IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Life Technologies, США). Количество связавшихся меченых антител определялось цветной реакцией с использованием хромогена BCIP-NCT (Life Technologies, США). Окрашивание мембран измерялось в условных единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) путем денситометрии окрашенных участков мембраны. Принцип метода и характерные результаты приведены на рис. 1 (см. обложку).

Для определения референсных значений была исследована концентрация антител в серии пошаговых разведений (от 1:10 до 1:200) 40 образцов сывороток крови доноров, никогда не получавших препаратов ИФН-β. Для подтверждения специфичности реакции связывания САТ с ИФН-β была проведена проба нейтрализации антител. Пошаговые разведения препарата ИФН-β в концентрациях 100; 10; 1 мкг/мл были инкубированы с тремя образцами, в которых ранее были выявлены высокие концентрации САТ, что позволило проанализировать ингибирование реакции избытком антигена. После этого образцы были проанализированы на наличие САТ методом иммуноблоттинга. В постановку также был включен отрицательный контроль.

В данном исследовании концентрация НАТ была измерена с помощью чувствительной к ИФН-β клеточной линии HL-116 фибросаркомы человека, несущей стабильный трансфект гена люциферазы, экспрессия которого контролируется регуляторной областью интерферонового ответа. Концентрация определялась с помощью метода, предложенного Y. Kawade [18, 19]. После каждого измерения при расчетах использовался поправочный «фактор Каваде». Титр антител измерялся в лабораторных единицах на миллилитр (ЛЕ/мл). Клеточная линия HL-116, а также контрольные образцы бы-

Результаты реакции нейтрализации связывающихся антител к препаратам ИФН-β

Концентрация препарата в буфере для инкубации, мкг/мл	Отрицательный контроль	Образец 1	Образец 2	Образец 3
		Ед. опт. пл.		
0	1,17	105	98	58
1	1,44	90	90	58
10	1,09	58	20	37
100	1,23	30	3,9	6

ли любезно предоставлена проф. G. Giovannoni (Лондон, Великобритания). Для детекции уровня люциферазы использовались наборы реактивов Steady Glo Luciferase Kit (Promega, США). Для измерения уровня люминесценции использовался микропланшетный люминометр LM-01Г с термостатом (производства Immunotech, Чехия), с программным обеспечением LIANA.

В исследовании использовались референтные значения титров НАТ к ИФН-β, описанные в международных рекомендациях [16]. Отрицательными в отношении НАТ считались сыворотки со значениями < 20 ЛЕ/мл, с низкими/промежуточными значениями — 20—100 ЛЕ/мл, с высокими — >100 ЛЕ/мл. У всех 33 пациентов был проведен скрининг на наличие НАТ, а в дальнейшем рассчитаны точные титры антител с использованием метода Kawade и коррекционного фактора.

Для статистической обработки использовалась программа GraphpadPrism 6.0. Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену. Уровень значимости для всех статистических тестов принимался менее 0,05. Для всех обследованных групп проводился анализ на нормальность распределения данных, в зависимости от типа которого применялись параметрические или непараметрические методы оценки выборок. Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты. В ходе исследования порога нормы САТ в контрольной группе доноров крови, измеряемых с помощью методики иммуноблоттинга, было установлено, что референсное значение Ед. опт. пл. составляет 16,08 (доверительный интервал 95% ± 0,43). Данное значение нормы было получено путем пошагового разведения сывороток доноров и определения наименьшей возможной ОП при наибольшем разведении образца.

Для подтверждения специфичности САТ к препарату ИФН-β была проведена реакция нейтрализации. Высокие концентрации ИФН-β (100 мкг/мл), инкубированные с образцами, вызвали связывание САТ с растворенным препаратом, что привело к ингибированию их связывания с ИФН-β, иммобилизованным на НМ. С увеличением концентрации растворенного препарата снижается оптическая плотность хромогенной реакции, что указывает на эффективное подавление связывания САТ с растворенным препаратом. Данные приведены в таблице.

У 15 пациентов с РППС, не получавших терапию препаратами ИФН-β, проведено исследование концентраций САТ к ИФН-β с помощью ИФА и иммуноблоттинга, а также определены титры нейтрализующих антител. Концентрации САТ, измеренные двумя лабораторными методами, а также титры НАТ к ИФН-β не достигли положительных значений ни у одного из пациентов данной группы.

У 33 больных РС, получавших терапию ИФН-β-1a более одного года, был уточнен уровень САТ с помощью двух методов: иммуноблоттинга и коммерческого ИФА-теста. По

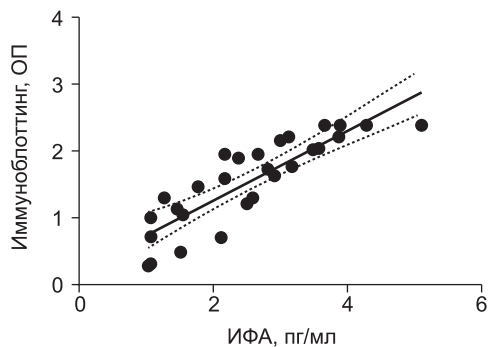


Рис. 2. Корреляция значений концентрации связывающих антител, измеренных методами ИФА (ось абсцисс, пг/мл) и иммуноблоттинга (ось ординат, ед. опт. пл.), ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$).

данным иммуноблоттинга, у 19 (57,6%) пациентов были выявлены положительные титры САТ, в то время как по данным ИФА у 20 (60,7%) пациентов титр САТ соответствовал критериям позитивности. Корреляционный ранговый анализ результатов тестов иммуноблоттинга и ИФА показал статистически значимое соответствие полученных данных ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). Данные приведены на рис. 2.

Кроме того, у всех 33 пациентов был измерен титр НАТ. С помощью скрининг-теста нами были обнаружены НАТ к препаратам ИФН-β в 11 (33,3%) из 33 образцов. Из исследованных 11 образцов, положительных по результатам скрининга, в семи выявлено клинически значимое повышение титра НАТ (>20 ЛЕ/мл) — крайне высокое содержание НАТ. У всех пациентов с клинически значимыми значениями НАТ были высокие концентрации САТ. Также была обнаружена статистически значимая зависимость между титром НАТ и концентрацией САТ, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$) и ИФА ($r = 0,6636$, $p = 0,0306$). Данные приведены на рис. 3 и 4. У всех пациентов, имеющих клинически значимые титры НАТ, были обнаружены САТ, измеренные как методом иммуноблоттинга, так и ИФА.

Обсуждение. Препараты ИФН-β являются рекомбинантными белковыми молекулами. Они хорошо зарекомендовали себя во многих научных и клинических исследованиях в качестве базисных средств терапии РС, позволяющих достичь стойкой ремиссии у большинства пациентов и поддержать ее [20]. Развитие терапевтической резистентности к препаратам данной группы остается серьезной проблемой при лечении

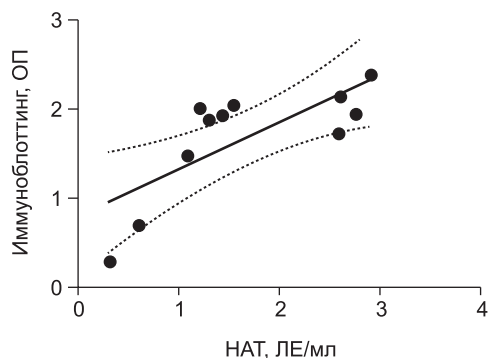


Рис. 3. Корреляция значений нейтрализующих антител (ось абсцисс, ЛЕ/мл) и связывающих антител, измеренных методом иммуноблоттинга (ось ординат, ед. опт. пл.) ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$).

этого тяжелого и инвалидизирующего заболевания. Одной из причин сниженного ответа на терапию может быть образование антител, ингибирующих эффект ИФН-β. Допускается, что САТ к ИФН-β синтезируются у 80% пациентов [21, 22]. И хотя САТ не обязательно ингибируют действие ИФН-β, рядом авторов показано, что отсутствие САТ исключает возможность наличия НАТ [23]. Распространенность НАТ к ИФН-β-1a сильно варьирует в различных исследованиях: НАТ были обнаружены у 2—35,4% пациентов, принимавших ИФН-β [15, 24]. После окончания трехлетнего исследования NABINMS (Neutralizing Antibodies on Interferon-Beta in Multiple Sclerosis) были изданы международные рекомендации, уточняющие референсные значения титров НАТ, предпочтительные способы измерения НАТ, клиническое использование титров НАТ, а также подходы к ведению пациентов, имеющих высокие титры НАТ к ИФН-β [16].

Данная работа посвящена исследованию САТ и НАТ у пациентов с РРС, получающих терапию ИФН-β-1a более года, с помощью различных лабораторных тестов.

При исследовании концентраций САТ в группе пациентов с РС было обнаружено, что при использовании метода иммуноблоттинга у 57,6% больных определяются высокие концентрации САТ к препаратам ИФН-β. В то же время при использовании ИФА высокие концентрации САТ были обнаружены у 60,6% больных. Оба теста показали высокий уровень схожести и корреляции результатов измерений концентраций САТ ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). Полученные данные о распространенности САТ, измеренных двумя лабораторными методами, сопоставимы с таковыми других авторов. Так, в исследовании С. Gneiss и соавт. (2006) САТ определялись у 45—66% пациентов, получающих ИФН-β-1a, а N. Aarskog и соавт. (2009) обнаружили САТ к ИФН-β-1a в 45,9—67% случаев [21, 25]. Следует отметить, что данные о распространенности САТ у пациентов, принимающих ИФН-β-1a, сильно варьируют, что связано с разными критериями включения пациентов в исследование, временем проведения анализа, гетерогенностью пациентов с РС, а также методами детекции САТ [26, 27].

При исследовании титра НАТ с помощью клеточной линии HL-116 фибросаркомы человека, несущей стабильный трансфект гена люциферазы, более чем у 20% пациентов обнаружены клинически значимые титры антител. Данные, полученные нами, соответствуют результатам ранних клинических исследований препаратов ИФН-β-1a, а также научных работ, проведенных различными группами исследователей [28, 29]. Исследовательские группы PRISM и SPECTRIMS показали, что у 15—22% пациентов, длительно получающих ИФН-β-1a, обнаруживаются НАТ [4, 5]. Важным результатом про-

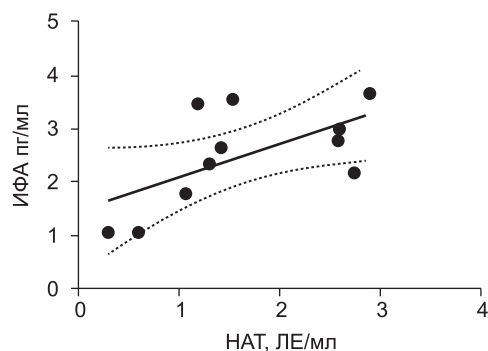


Рис. 4. Корреляция значений нейтрализующих антител (ось абсцисс, ЛЕ/мл) и связывающих антител, измеренных методом ИФА (ось ординат, пг/мл) ($r = 0,6636$, $p = 0,0306$).

веденного исследования было доказательство возможности использования САТ в качестве маркера наличия клинически значимых титров НАТ к препаратам ИФН-β. Все пациенты с титром НАТ, превышающим 20 ЛЕ/мл, были положительны в отношении САТ, измеренных методами ИФА и иммуноблоттинга. Также была показана высокая корреляция титра НАТ с концентрацией САТ, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$). Полученные нами данные подтверждают предположения, выдвинутые рядом других исследователей [25]. Так, высокая концентрация САТ говорит о возможном наличии НАТ у пациента, а отсутствие САТ полностью исключает такую возможность. Надо также отметить, что некоторые авторы говорят о возможном прогностическом значении САТ. Высокий титр САТ на 3-м месяце терапии ИФН-β предсказывает появление НАТ на 2-й год терапии [15]. Данный феномен требует дальнейших исследований. Показано, что САТ образуются у достаточно большого количества пациентов, долгое время находящихся на терапии ИФН-β-1а. Кроме того, высокая концентрация САТ предсказывала наличие НАТ, а также статистически значимо коррелировала с титром НАТ.

Понимание закономерностей продукции антител к препаратам ИФН-β, а также использование описанных методов детекции САТ и НАТ в клинической практике поможет персонализировать терапию пациентов с РС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом РНФ. Соглашение № 16-15-00118.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—29 см REFERENCES)

1. Бойко А.Н., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Гусев Е.И. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза. В кн.: Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н., ред. Рассеянный склероз. М.; 2004: 7—42.

Поступила 11.05.16

REFERENCES

1. Boyko A.N., Favorova O.O., Kulakova O.G., Gusev E.I. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. In: Gusev E.I., Zavalishin I.A., Boyko A.N., eds. Multiple Sclerosis [Rasseyannyi skleroz]. Moscow; 2004: 7—42. (in Russian)
2. Makshakov G., Nazarov V., Kochetova O., Surkova E., Lapin S., Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. PLoS One. 2015; 10(11): e0143375.
3. Manfredonia F., Pasquali L., Dardano A., Iudice A., Murri L., Monzani F. Review of the clinical evidence for interferon beta 1a (Rebif) in the treatment of multiple sclerosis. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2008; 4(2): 321—36.
4. Evdoshenko E., Maslyanskiy A., Lapin S., Zaslavsky L., Dobson R., Totolian A. et al. Dynamics of B-Cell Populations in CSF and Blood in Patients Treated with a Combination of Rituximab and Mitoxantrone. ISRN Neurol. 2013: 748127.
5. Ebers G.C. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. Lancet. 1998; 352(9139): 1498—504.
6. Río J., Nos C., Tintoré M., Borrás C., Galán I., Comabella M. et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. Ann. Neurol. 2002; 52(4): 400—6.
7. Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M. et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). Ann. Neurol. 1996; 39(3): 285—94.
8. Vosslander S., van Baarsen L.G., Verweij C.L. Pharmacogenomics of IFN-beta in multiple sclerosis: towards a personalized medicine approach. Pharmacogenomics. 2009; 10(1): 97—108.
9. Comabella M., Lünemann J.D., Río J., Sánchez A., López C., Julià

- E. et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. Brain. 2009; 132(Pt.12): 3353—65.
10. Sorensen P.S. Neutralizing antibodies against interferon-Beta. Ther. Adv. Neurol. Disord. 2008; 1(2): 125—41.
11. FDA Wound Healing Clinical Focus Group. Guidance for industry: chronic cutaneous ulcer and burn wounds — developing products for treatment. Wound Repair Regen. 2006; 9(4): 258—68.
12. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nat. Rev. Drug Discov. 2002; 1(6): 457—62.
13. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). Pharm Res. 1998; 15(4): 641—649. doi:10.1023/A:1011974512425.
14. Lundkvist M., Greiner E., Hillert J., Fogdell-Hahn A. Multiple sclerosis patients lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid are less likely to develop neutralizing antibodies against interferon beta. Mult. Scler. 2010; 16(7): 796—800.
15. Deisenhammer F. Interferon-Beta: Neutralizing Antibodies, Binding Antibodies, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, and Clinical Outcomes. J. Interferon Cytokine Res. 2014; 34(12): 938—45.
16. Polman C.H., Bertolotto A., Deisenhammer F., Giovannoni G., Hartung H.P., Hemmer B. et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2010; 9(7): 740—50.
17. Martins T.B., Rose J.W., Gardiner G.L., Kusakawa N., Husebye D., Hill H.R. Cell-based reporter gene assay for therapy-induced neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis. J. Interferon Cytokine Res. 2013; 33(2): 52—7.
18. Kawade Y., Finter N., Grossberg S.E. Neutralization of the biological activity of cytokines and other protein effectors by antibody: Theoretical formulation of antibody titration curves in relation to antibody affinity. J. Immunol. Methods. 2003; 278(1-2): 127—44.
19. Grossberg S.E., Kawade Y., Kohase M., Yokoyama H., Finter N. The neutralization of interferons by antibody. I. Quantitative and theoretical analyses of the neutralization reaction in different bioassay systems. J. Interferon Cytokine Res. 2001; 21(9): 729—42.
20. Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S., Edan G., Hartung H.P., Miller D.H. et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. Neurology. 2006; 67(7): 1242—9.
21. Gneiss C., Tripp P., Reichartseder F., Egg R., Ehling R., Lutterotti A. et al. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. Mult. Scler. 2006; 12(6): 731—7.
22. Ross C., Clemmesen K.M., Sorensen P.S., Koch-Henriksen N., Bendtzen K. Measuring and evaluating interferon b-induced antibodies in patients with multiple sclerosis. Mult. Scler. 2006; 12(1): 39—46.
23. Gilli F., Hoffmann F., Sala A., Marnetto F., Caldano M., Valentino P. et al. Qualitative and quantitative analysis of antibody response against IFNbeta in patients with multiple sclerosis. Mult. Scler. 2006; 12(6): 738—46.
24. Govindappa K., Sathish J., Park K., Kirkham J., Pirmohamed M. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis — A systematic review and meta-analysis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2015; 71(11): 1287—98.
25. Aarskog N.K., Marøy T., Myhr K.M., Vedeler C.A. Antibodies against interferon-beta in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 2009; 212(1-2): 148—50.
26. Hegen H., Millonig A., Bertolotto A., Comabella M., Giovannoni G., Guger M. et al. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. Mult. Scler. 2014; 20(5): 577—87.
27. Cakal B., Uygunoglu U., Saip S., Altintas A., Siva A., Badur S. BAb and MxA as functional biomarkers in routine clinical laboratories for the determination of anti-IFN-beta antibodies and their bioactivity levels in multiple sclerosis patients. J. Immunoassay Immunochem. 2014; 35(4): 398—411.
28. Sorensen P.S., Ross C., Clemmesen K.M., Bendtzen K., Frederiksen J.L., Jensen K. et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Lancet. 2003; 362(9391): 1184—91.
29. Hartung H.P., Polman C., Bertolotto A., Deisenhammer F., Giovannoni G., Havrdova E. et al. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: expert panel report. J. Neurol. 2007; 254(7): 827—37.

Received 11.05.16

© БУТИНА Е.В., ЗАЙЦЕВА Г.А., 2016

УДК 616.155.294-092.612.017.1]-053.31-078.33

Бутина Е.В., Зайцева Г.А.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ ПЛОДА И НОВОРОЖДЕННОГО

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», 610027, Киров

Тромбоцитопения встречается у 1–5% новорожденных. В зависимости от механизмов патогенеза тромбоцитопения условно подразделяется на иммунную и неиммунную. В основе иммунного разрушения тромбоцитов лежит реакция взаимодействия антител с антигенами поверхностных структур клеток. Во внутриутробном периоде и периоде новорожденности могут наблюдаться ауто-, транс- и аллоиммунные варианты возникновения тромбоцитопении. Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (НАИТ) регистрируется с частотой 1 случай на 800–1000 новорожденных. Цель работы заключалась в разработке алгоритма диагностики иммунной тромбоцитопении, определении основных диагностических критериев, изучении клинического значения результатов лабораторных тестов. Методы исследования включали типирование генов системы HPA с помощью ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, определение совместимости HPA-генотипов матери и ребенка, исследование антитромбоцитарных ауто- и аллоантител в образцах крови матери и ребенка методом проточной цитометрии. Рассматривали следующие критерии диагностики НАИТ: 1) выявление несовместимых сочетаний генов HPA у матери и ребенка (HPA-1bb/HPA-1ab; HPA-5aa/HPA-5ab; HPA-15aa/HPA-15ab); 2) выявление в сыворотке крови матери антител, адсорбирующихся более чем на 3% тромбоцитов ребенка; 3) отсутствие антитромбоцитарных аутоантител у матери и ребенка (коэффициент аутоингибиции менее 5%). Иммунный генез тромбоцитопении установлен у 40% детей с низким числом тромбоцитов при рождении. В 50% случаев причиной стали антитромбоцитарные аллоантитела, поставлен диагноз НАИТ. Также в 50% случаев снижение числа тромбоцитов у детей произошло в результате действия материнских аутоантител, выставлен диагноз — «трансиммунная тромбоцитопения». Рассмотренные лабораторные методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью и позволяют адекватно диагностировать иммунные причины тромбоцитопении у новорожденных.

Ключевые слова: неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения; HPA; тромбоциты; антитела.

Для цитирования: Бутина Е.В., Зайцева Г.А. Методы диагностики иммунной тромбоцитопении плода и новорожденного. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (10): 715-719. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-715-719.

Butina E.V., Zaitseva G.A.

THE METHODS OF DIAGNOSTIC OF IMMUNE THROMBOCYTOPENIA OF FETUS AND NEWBORN

The Kirovskii research institute of hematology and blood transfusion of the Federal medical biological agency of Russia, 610027 Kirov, Russia

The thrombocytopenia is found in 1%-5% of newborns. Depending on mechanisms of pathogenesis of thrombocytopenia is divided on immune and non-immune one. The reaction of interaction between antibodies and antigens of superficial structures of cells are in the basis of immune destruction of thrombocytes. During intrauterine period and period of newbornness auto-, trans- and alloimmune alternatives of development of thrombocytopenia can be observed. The neonatal alloimmune thrombocytopenia is registered with rate of 1 case per 800-1000 newborns. The study was targeted to developing algorithm of diagnostic of immune thrombocytopenia, detecting main diagnostic criteria, exploring clinical significance of results of laboratory tests. The methods of study included typing of genes of HPA system using polymerase chain reaction with detection of results in real-time mode, detection of compatibility of HPA-genotypes of mother and child using flow cytometry technique. The following criteria of diagnostic of neonatal alloimmune thrombocytopenia: 1. detection of incompatible combination of HPA genes in mother and child (HPA-1bb/HPA-1ab; HPA-5aa/HPA-5ab; HPA-15aa/HPA-15ab); 2. detection in blood serum of mother antibodies adsorbing more than on 3% of thrombocytes of child; 3. absence of anti-thrombocyte antibodies in mother and child (coefficient of auto-sensitization is less than 5%). The immune genesis of thrombocytopenia is established in 40% of children with low number of thrombocytes at birth. In 50% of cases the cause was determined as anti-thrombocyte alloantibodies with diagnosis neonatal alloimmune thrombocytopenia. Also in 50% of cases decreasing of number of thrombocytes in children occurred as result of impact of autoantibodies of mother with diagnosis "transimmune thrombocytopenia". The considered laboratory methods have high specificity and permit to properly diagnose immune causes of thrombocytopenia in newborns.

Key words: neonatal alloimmune thrombocytopenia; HPA; thrombocyte; antibody

For citation: Butina E.V., Zaitseva G.A. The methods of diagnostic of immune thrombocytopenia of fetus and newborn. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 715-719. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-715-719.

For correspondence: *Butina E.V.*, candidate of medical sciences, senior research worker of laboratory of immunohematology. e-mail: butinalena@yandex.ru

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

Financing. *The study had no sponsor support*

Received 12.04.2016
Accepted 15.05.2016

Тромбоцитопения — снижение числа тромбоцитов в периферической крови ниже $150 \cdot 10^9/\text{л}$ — встречается у 1—5% новорожденных [1, 2]. В зависимости от механизмов патогенеза тромбоцитопению условно подразделяют на иммунную и неиммунную. Неиммунные причины снижения числа тромбоцитов: внутриутробные инфекции (цитомегаловирусная инфекция, токсоплазмоз, краснуха); плацентарная недостаточность; сепсис; ДВС-синдром, тромбоз; гиперспленизм; хромосомные нарушения (трисомия 18, 13, 21, триплодия); наследственные заболевания (анемия Фанкони, TAR-синдром); гемобластозы; аплазия мегакариоцитарного роста кроветворения [3, 4]. В основе иммунного разрушения тромбоцитов лежит реакция взаимодействия антител с антигенами поверхностных структур клеток. Во внутриутробном периоде и периоде новорожденности могут наблюдаться ауто-, транс- и аллоиммунные варианты возникновения тромбоцитопении [5—7].

1. Аутоиммунная тромбоцитопения развивается у ребенка при срыве иммунологической толерантности и образовании антител к собственным клеткам крови.

2. Трансиммунная тромбоцитопения наблюдается у детей, матери которых страдают иммунной тромбоцитопенией (ИТП) или системными заболеваниями, сопровождающимися аутосенсбилизацией, при этом тромбоциты плода разрушаются материнскими аутоантителами, проходящими через плацентарный барьер.

3. Аллоиммунная тромбоцитопения плода и новорожденного развивается вследствие сенсбилизации матери к специфическим тромбоцитарным антигенам системы HPA (Human Platelet Antigens), унаследованным ребенком от отца. Во время беременности материнские IgG антитела адсорбируются на тромбоцитах плода, вызывая их разрушение в клетках ретикуло-эндотелиальной системы печени и селезенки ребенка [8—10]. Кроме прямой деструкции тромбоцитов, происходит недостаточная их продукция мегакариоцитами [11—13]. Характерная особенность неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении (НАИТ) — изолированное снижение числа тромбоцитов у относительно здоровых детей, не имеющих клинических отягощающих факторов. Патогенез НАИТ сопоставим с патогенезом гемолитической болезни плода и новорожденного, однако клиника НАИТ может развиваться уже при первой несовместимой беременности [14, 15].

Дифференциальная диагностика причин тромбоцитопении служит основой для назначения терапии, определения прогноза для жизни и здоровья ребенка, установления риска развития подобной патологии у сибсов [16—18].

НАИТ регистрируют с частотой 1 случай на 800—1000 новорожденных [19—21]. Наиболее опасным осложнением НАИТ становятся внутривенные кровоизлияния во внутриутробном или раннем постнатальном периодах. Тяжелые нарушения, приводящие к инвалидности, регистрируют в 20% случаев НАИТ, смертность составляет 15%. Установлено, что в 75—80% зарегистрированных случаев НАИТ возникает при несовместимости по гену *HPA-1a* (генотип ребенка — *HPA-1ab*, матери — *HPA-1bb*). Причиной НАИТ в 10—15% случаев оказываются антитела к антигену *HPA-5b* (генотип ребенка — *HPA-5ab*, матери — *HPA-5aa*) и в 3—5% случаев — анти-15b антитела (генотип ребенка — *HPA-15ab*, матери — *HPA-15aa*). Сочетание антител указанных специфичностей выявляют в 2—6% случаев НАИТ [22, 23].

Цель исследования — разработка алгоритма диагностики иммунной тромбоцитопении плода и новорожденного, оценка результатов внедрения генетических и иммуногематологических методов в лабораторную практику, сопоставление полученных лабораторных данных с клинической картиной заболевания.

Материал и методы. Полиморфизм генов системы HPA

исследован у 320 доноров компонентов крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови в 2013—2015 гг.

Диагностика иммунных причин тромбоцитопении проведена у 40 детей с числом тромбоцитов в периферической крови менее $150 \cdot 10^9/\text{л}$ (от 39 до $133 \cdot 10^9/\text{л}$, медиана — $70 \cdot 10^9/\text{л}$), родившихся в Кировском областном клиническом перинатальном центре в 2015 г. Генетические и иммунологические исследования проведены также у их матерей (40 женщин). При установлении диагноза НАИТ учитывали данные акушерского анамнеза, течение настоящей беременности, состояние здоровья женщины, клинической картины заболевания, динамики тромбоцитопении, результатов лабораторных исследований. Для решения вопроса об аллоиммунном характере разрушения тромбоцитов выявляли различия генотипов системы HPA у матери и ребенка, определяли в сыворотке крови матери антитромбоцитарные антитела, взаимодействующие с тромбоцитами ребенка (аллоантитела) и собственными тромбоцитами женщины (аутоантитела).

Ниже представлены этапы лабораторной диагностики иммунной тромбоцитопении.

1. Получение препаратов геномной ДНК из образцов периферической крови матери и ребенка с использованием автоматических станций для выделения и очистки нуклеиновых кислот.

2. Типирование генов системы HPA методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием оборудования и реактивов отечественного производства (детектирующий амплификатор ДТ-96 (ДНК-технология); наборы реагентов ТромбоГенТест (Россия)). Анализ заключается в определении а- и b-форм генов локусов HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15.

3. Исследование антитромбоцитарных аутоантител в образцах крови матери и ребенка. Анализ проводится в соответствии со способом, описанным в Патенте на изобретение Российской Федерации № 2488114 [24, 25]. Методом проточной цитометрии определяют относительное количество тромбоцитов, адсорбированных IgG антитела после инкубации с аутосывороткой. Коэффициент аутосенсибилизации $\geq 3\%$ свидетельствует о наличии антитромбоцитарных аутоантител и является одним из диагностических критериев аутоиммунной тромбоцитопении.

4. Определение антител к тромбоцитам ребенка в крови матери. Анализ осуществлялся методом проточной цитометрии аналогично с п. 3, но в качестве объекта исследования служили тромбоциты новорожденного, инкубированные с сывороткой крови матери. Выявление адсорбции антител более чем на 5% тромбоцитов свидетельствовало о наличии у женщины аллосенсибилизации.

Результаты. Результаты исследования генов HPA у 320 доноров компонентов крови представлены в табл. 1. Полученные данные согласуются со сведениями по HPA-типированию, проведенными в Москве [26] и Санкт-Петербурге [27].

Наибольшее клиническое значение имеет определение полиморфизма гена *HPA-1b* в гомозиготном состоянии (*HPA-1bb*). Выявление данного генетического сочетания у реципи-

Таблица 1

Частота встречаемости генов системы HPA у доноров компонентов крови, %

Аллельные сочетания	Локусы системы HPA					
	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-15
aa	71,1	79,4	30,7	100,0	84,4	24,9
ab	26,0	20,0	50,0	0	15,0	49,2
bb	2,94	0,6	19,2	0	0,6	26,0

ентов сопряжено с высоким риском образования анти-HPA-1a антител и, как следствие, рефрактерности к переливаниям тромбоцитов. Генотип *HPA-1bb* у беременных женщин служит показанием для углубленного обследования в связи с угрозой рождения ребенка с НАИТ. Развитие аллосенсибилизации возможно также у лиц с генотипами *HPA-5aa* и *HPA-15aa*.

При обследовании женщин, дети которых родились с тромбоцитопенией, «генотипы риска» выявлены у 18 из них: генотип *HPA-1bb* определен у 6 женщин, генотип *HPA-5aa* — у 8 и генотип *HPA-15aa* — у 4 женщин.

Аллосенсибилизация к антигенам тромбоцитов установлена у 8 матерей. Аллоантитела к тромбоцитам ребенка выявлены у всех женщин с генотипом *HPA-1bb* и у двух — с генотипом *HPA-5aa*.

Трансиммунный генез тромбоцитопении определен у 8 детей. Проведенный анализ выявил у матерей этих новорожденных наличие аутоантител к тромбоцитам и снижение у них числа тромбоцитов в периферической крови (от 44 до $105 \cdot 10^9/\text{л}$). В остальных случаях лабораторные данные, свидетельствующие об иммунном характере тромбоцитопении, получены не были.

Таким образом, иммунный генез тромбоцитопении установлен у 40% детей с низким числом тромбоцитов при рождении. В 50% случаев причиной стали антитромбоцитарные аллоантитела, был поставлен диагноз НАИТ. Также в 50% случаев снижение числа тромбоцитов у детей произошло в результате действия материнских аутоантител, был выставлен диагноз — «трансиммунная тромбоцитопения».

Клинические примеры диагностики иммунной тромбоцитопении представлены ниже.

Пример 1. Новорожденный С., 6-й день жизни, родился в сроке гестации 39 нед от второй беременности, первых родов. Масса тела при рождении 3440 г. Число тромбоцитов в периферической крови при рождении $100 \cdot 10^9/\text{л}$, на 3-й день жизни — $80 \cdot 10^9/\text{л}$, на 6-й день жизни — $50 \cdot 10^9/\text{л}$. Уровень гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в норме. Признаки инфекционного процесса отсутствуют. Наследственных заболеваний не выявлено. Геморрагических признаков тромбоцитопении не обнаружено. Число тромбоцитов в периферической крови матери — $250 \cdot 10^9/\text{л}$. Клинический диагноз: «тромбоцитопения неясной этиологии».

Образцы крови матери и ребенка направлены в лабораторию для проведения иммуногематологического и молекулярно-генетического анализа. Результаты исследований: HPA-генотип матери: *HPA-1bb, 2aa, 3ab, 4aa, 5ab, 15ab*. HPA-генотип ребенка: *HPA-1ab, 2ab, 3ab, 4aa, 5ab, 15aa*.

Коэффициент аутоенсибилизации к тромбоцитам у матери — 2,6%, у ребенка — 0,8% (оба значения в пределах нормы).

Методом проточной цитометрии в сыворотке крови матери выявлены антитела, адсорбирующиеся на 58,8% тромбоцитов ребенка (в норме не более 3%).

Заключение. Установлен высокий генетически обусловленный риск развития НАИТ по антигену HPA-1a (генотип матери *HPA-1bb*). В сыворотке крови матери выявлены аллоантитела к тромбоцитам ребенка. Лабораторный диагноз: «аллоиммунная тромбоцитопения новорожденного».

Пример 2. Новорожденный М., 4-й день жизни, родился от третьей беременности, вторых родов. Срок гестации 35 нед. Масса тела при рождении 2440 г. Число тромбоцитов в периферической крови при рождении $80 \cdot 10^9/\text{л}$, на 4-й день жизни — $85 \cdot 10^9/\text{л}$. Уровень гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в норме. При объективном осмотре клинических проявлений тромбоцитопении нет, очагов инфекции не выявлено, стигмы дизэмбриогенеза отсутствуют. Число тромбоцитов в периферической крови матери $85 \cdot 10^9/\text{л}$. Клинический диагноз: «тромбоцитопения неясной этиологии».

Образцы крови матери и ребенка направлены в лабораторию для проведения иммуногематологического и молекулярно-генетического анализа. Результаты исследований: HPA-генотип матери: *HPA-1aa, 2aa, 3bb, 4aa, 5ab, 15ab*. HPA-генотип ребенка: *HPA-1aa, 2aa, 3bb, 4aa, 5aa, 15aa*.

Коэффициент аутоенсибилизации к тромбоцитам у матери — 6,3%, у ребенка — 1,8% (в норме не более 5%).

Методом проточной цитометрии в сыворотке крови матери выявлены антитела, адсорбирующиеся на 10,3% тромбоцитов ребенка (в норме не более 3%).

Заключение. HPA-генотипы матери и ребенка иммунологически совместимы. В сыворотке крови матери выявлены антитела, реагирующие как с собственными тромбоцитами, так и с тромбоцитами ребенка.

Лабораторный диагноз: «трансиммунная тромбоцитопения новорожденного».

Пример 3. Новорожденный Н., 3-й день жизни, родился от первой беременности, первых родов. Срок гестации 34 нед. Масса тела при рождении 2020 г. Число тромбоцитов в периферической крови при рождении $70 \cdot 10^9/\text{л}$, на 4-й день жизни — $55 \cdot 10^9/\text{л}$. Уровень гемоглобина и эритроцитов ниже нормы, лейкоцитов — в норме. При объективном осмотре выявляется петехиальная сыпь на нижних конечностях, очагов инфекции не обнаружено. Число тромбоцитов в периферической крови матери $145 \cdot 10^9/\text{л}$.

Клинический диагноз: «тромбоцитопения неясной этиологии».

Образцы крови матери и ребенка направлены в лабораторию для проведения иммуногематологического и молекулярно-генетического анализа. Результаты исследований: HPA-генотип матери: *HPA-1ab, 2aa, 3ab, 4aa, 5ab, 15ab*. HPA-генотип ребенка: *HPA-1ab, 2aa, 3ab, 4aa, 5aa, 15aa*.

Коэффициент аутоенсибилизации к тромбоцитам у матери — 0,3%, у ребенка — 0,8% (в норме не более 5%).

Методом проточной цитометрии в сыворотке крови матери антитела к тромбоцитам ребенка не выявлены — 0,3% (в норме не более 3%).

Заключение. HPA-генотипы матери и ребенка иммунологически совместимы. Антитромбоцитарные ауто- и аллоантитела не выявлены.

Лабораторный диагноз: «данных за иммунную тромбоцитопению не получено».

Таблица 2

Алгоритм диагностики иммунной тромбоцитопении новорожденного

Диагностический критерий	Возможный диагноз в соответствии с полученными лабораторными данными					
	Да	Нет	Нет	Нет	Да	Нет
HPA-генотипы матери и ребенка несовместимы*	Да	Нет	Нет	Нет	Да	Нет
В крови матери присутствуют антитромбоцитарные аутоантитела	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Нет
В крови ребенка присутствуют антитромбоцитарные аутоантитела	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
В сыворотке крови матери выявлены аллоантитела к тромбоцитам ребенка	Да	Да	Нет	Да/нет	Нет	Нет
Заключение	1	2	3	4	5	6

Примечание. * — генотипы расцениваются как несовместимые при выявлении одного или нескольких сочетаний генов HPA у матери и ребенка: *HPA-1bb/HPA-1ab*; *HPA-5aa/HPA-5ab*; *HPA-15aa/HPA-1ab*.

Обсуждение. Важность своевременной и правильной диагностики иммунной тромбоцитопении неоспорима. Анализ полученных результатов позволяет назначить ребенку адекватную медикаментозную терапию, выбрать совместимые компоненты крови для трансфузий, определить возможность грудного вскармливания, установить риск развития иммунной тромбоцитопении у следующих детей в семье.

Представленный в данной работе алгоритм диагностики включал:

1. Определение совместимости HPA-генотипов матери и ребенка.
2. Исследование аутоенсибилизации у матери для определения возможности влияния материнских аутоантител на число тромбоцитов у ребенка.
3. Диагностика аутоиммунной тромбоцитопении у ребенка.
4. Определение антител в сыворотке крови матери к тромбоцитам ребенка — диагностика НАИТ.

Оценка результатов исследования представлена в табл. 2.
Выводы

1. Диагностирована аллоиммунная тромбоцитопения новорожденного.
2. Диагностирована трансиммунная тромбоцитопения новорожденного.
3. Диагностирована аутоиммунная тромбоцитопения у ребенка.
4. Диагностирована аутоенсибилизация к антигенам тромбоцитов у матери.
5. Диагностирован генетически обусловленный риск развития АИТН без выявленных антитромбоцитарных антител. Исследование антител следует повторить через 2—6 нед.

6. Данных за иммунную тромбоцитопению новорожденного не получено.

Представленный алгоритм исследований апробирован в лаборатории иммуногематологии Кировского НИИ гематологии и переливания крови при диагностике причин тромбоцитопении. Полученные лабораторные данные соответствуют клинической картине заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 4, 6—10, 12—23 см. REFERENCES)

1. Масчан А.А., Румянцев А.Г. Иммуно-опосредованные тромбоцитопении новорожденных: дифференциальный диагноз и принципы терапии. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2010; 9(3): 13—8.
3. Закиров И.И., Сафина А.И. Тромбоцитопении новорожденных. Вестник современной клинической медицины. 2013; 6(6): 102—7.
5. Головкина Л.Л., Кутьина Р.М. Влияние различий донора и реципиента по тромбоцитспецифическим антигенам на длительность нейтропении и тромбоцитопении у больных после алломиелотрансплантации. Онкогематология. 2009; (1): 39—43.
11. Масчан А.А., Румянцев А.Г. Иммунная тромбоцитопения у детей: от консенсуса в терминологии к консенсусу в лечении. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2010; 9(1): 5—13.
24. Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Исаева Н.В., Васкина Е.А., Докшина И.А. Способ определения аутоантител к тромбоцитам. Патент РФ № 2488114; 2013.
25. Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Исаева Н.В. Определение IgG, связанного с тромбоцитами, у пациентов с тромбоцитопенией. Клиническая лабораторная диагностика. 2014; 59(10): 23—5.
26. Головкина Л.Л. Антигены тромбоцитов и их значение в медицине (обзор литературы). Гематология и трансфузиология. 2010; (4): 24—31.

27. Минеева Н.В., Кробинец И.И., Блинов М.Н., Капустин С.И. Антигены и антитела к тромбоцитам (обзор литературы). Онкогематология. 2013; 8(3): 60—8.

Поступила 12.04.16

REFERENCES

1. Maschan A.A., Rumyantsev A.G. Immune-mediated thrombocytopenia newborns: differential diagnosis and treatment principles. Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii. 2010; 9(3): 13—8. (in Russian)
2. Skogen B., Killie M.K., Kjeldsen-Kragh J., Ahlen M.T., Tiller H., Stuge T.B. et al. Reconsidering fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia with a focus on screening and prevention. Expert Rev. Hematol. 2010; 3(5): 559—66.
3. Zakirov I.I., Safina A.I. Neonatal thrombocytopenia. Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny. 2013; 6(6): 102—7. (in Russian)
4. Bassler D., Greinacher A., Okascharoen C., Klenner A., Ditomasso J., Kiefel V. et al. A systematic review and survey of the management of unexpected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion. 2008; 48(1): 92—8.
5. Golovkina L.L., Kut'ina R.M. Effect of donor and recipient differences in platelet specific antigens on the duration of neutropenia and thrombocytopenia in patients after allomyelotransplantation. Onkogematologiya. 2009; (1): 39—43. (in Russian)
6. Arnold D.M., Smith J.W., Kelton J.G. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfus. Med. Rev. 2008; 22(4): 255—67.
7. Kjeldsen-Kragh J., Skogen B. Mechanisms and prevention of alloimmunization in pregnancy. Obstet. Gynecol. Surv. 2013; 68(7): 526—32.
8. Sainio S., Javela K., Tuimala J., Koskinen S. Usefulness of maternal anti-HPA-1a antibody quantitation in predicting severity of foetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Transfus. Med. 2013; 23(2): 114—20.
9. Kjeldsen-Kragh J., Ni H., Skogen B. Towards a prophylactic treatment of HPA-related foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Curr. Opin. Hematol. 2012; 19(6): 469—74.
10. Porcelijn L., Van den Akker E.S., Oepkes D. Fetal thrombocytopenia. Semin. Fetal. Neonatal. Med. 2008; 13: 223—30.
11. Maschan A.A., Rumyantsev A.G. Immune thrombocytopenia in children: from consensus on the terminology to the consensus in the treatment. Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii. 2010; 9(1): 5—13. (in Russian)
12. Kjeldsen-Kragh J., Kim M., Killie M.K., Husebekk A., Freedman J. In HPA 1a-immunized women the decrease in anti-HPA 1a antibody level during pregnancy is not associated with anti-idiotypic antibodies. Haematologica. 2009; 94(3): 441—3.
13. Wu G.G., Kaplan C., Curtis B.R., Pearson H.A. Report of the 14th international society of blood transfusion platelet immunology workshop. Vox Sang. 2010; 99(4): 375—81.
14. Kamphuis M.M., Paridaans N., Porcelijn L., De Haas M., Van Der Schoot C.E., Brand A. et al. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. BJOG. 2010; 117(11): 1335—43.
15. Killie M.K., Husebekk A., Kjeldsen-Kragh J., Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. Haematologica. 2008; 93: 870—7.
16. Ghevaert C., Campbell K., Walton J. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion. 2007; 47: 901—10.
17. Serrarens-Janssen V.M., Semmekrot B.A., Novotny V.M. Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT): past, present and future. Obstet. Gynecol. Surv. 2008; 63: 239—52.
18. Vinograd C.A., Bussell J.B. Antenatal treatment of fetal alloimmune thrombocytopenia: a current perspective. Haematologica. 2010; 95: 1807—11.
19. Espinoza J.P., Caradeux J., Norwitz E.R., Illanes S.E. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Rev. Obstet. Gynecol. 2013; 6(1): 15—21.
20. Kaplan C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. Haematologica. 2008; 93: 805—7.

21. Bakchoul T., Bertrand G., Krautwurst A., Kroll H., Bein G., Sachs U.J. et al. The implementation of surface plasmon resonance technique in monitoring pregnancies with expected fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2013; 53(9): 2078—85.
22. Knight M., Pierce M., Allen D. The incidence and outcomes of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: a UK national study using three data sources. *Br. J. Haematol.* 2011; 52: 460—8.
23. Scheffer P., Soussan A., Verhagen O. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a. *BJOG*. 2011; 118: 1392—5.
24. Butina E.V., Zaytseva G.A., Isaeva N.V., Vaskina E.A., Dokshina I.A. Method for Detection of Platelet Autoantibodies. Patent RF № 2488114; 2013. (in Russian)
25. Butina E.V., Zaytseva G.A., Isaeva N.V. The detection of thrombocytebound IgG in patients with thrombocytopenia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(10): 23—5. (in Russian)
26. Golovkina L.L. Platelet antigens and their importance in medicine (literature review). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2010; (4): 24—31. (in Russian)
27. Mineeva N.V., Krobinets I.I., Blinov M.N., Kapustin S.I. Platelet antigens and antibodies (literature review). *Onkogematologiya*. 2013; 8(3): 60—8. (in Russian)

Received 12.04.16

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.313-006.04-07:616.31-022

Червинец В.М.¹, Червинец Ю.В.¹, Лебедев С.Н.¹, Беляева Е.А.¹, Трошин А.В.¹, Червинец А.В.¹, Миронов А.Ю.²

АДГЕЗИВНАЯ И АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯЗЫКА

¹ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Тверь;

²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва, Российская Федерация

Представлены данные о степени адгезии и антагонизма микроорганизмов полости рта больных злокачественными новообразованиями языка. Установлено, что патогенная и условнопатогенная микрофлора обладает в основном высокой и реже средней степенью адгезии, нормальная — средней и низкой; 90% лактобацилл полости рта не проявляют антагонизма в отношении патогенных и условнопатогенных микроорганизмов. Антагонизм энтеробактерий, стафилококков к лактобациллам отсутствует. Стафилококки, в том числе продуцирующие β-лактамазы и метициллинрезистентные, в 95% случаев являются антагонистами стрептококков. Клинические изоляты Candida albicans оказывают антагонистическую активность в отношении 90% лактобацилл, 20% стрептококков.

Ключевые слова: полость рта; рак языка; микрофлора; адгезия; антагонизм.

Для цитирования: Червинец В.М., Червинец Ю.В., Лебедев С.Н., Беляева Е.А., Трошин А.В., Червинец А.В., Миронов А.Ю. Адгезивная и антагонистическая активность микрофлоры полости рта больных злокачественными новообразованиями языка. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (10): 719-722. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-719-722

Tchervinets V.M.¹, Tchervinets Yu.V.¹, Lebedev S.N.¹, Belyaeva E.A.¹, Troshin A.V.¹, Tchervinets A.V.¹, Mironov A.Yu.²

THE ADHESIVE AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MICROFLORA OF ORAL CAVITY IN PATIENTS WITH MALIGNANT NEOPLASMS OF TONGUE

¹The Tverskoi state medical university of Minzdrav of Russia, Tver, Russia;

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

The data concerning the degree of adhesion and antagonism of microorganisms of oral cavity in patients with malignant neoplasms of tongue is presented. it is established that pathogenic and conditionally pathogenic microflora has more mainly high and less infrequent degree of adhesion. the normal microflora has average and low degree of adhesion. About 90% of lactobacilla of oral cavity manifest no antagonism concerning pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms. The antagonism of enterobacteria, staphylococci and lactobacilla is absent. The staphylococci, including producing β-lactamase and methicillin-resistant ones, in 95% of cases are antagonists to streptococci. The clinical isolates Candida albicans show antagonistic activity related to 90% of lactobacilli and 20% of streptococci.

Key words: oral cavity; cancer of tongue; microflora; adhesion; antagonism

For citation: Tchervinets V.M., Tchervinets Yu.V., Lebedev S.N., Belyaeva E.A., Troshin A.V., Tchervinets A.V., Mironov A.Yu. The adhesive and antagonistic activity of microflora of oral cavity in patients with malignant neoplasms of tongue. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10):719-722 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-719-722

Для корреспонденции: Червинец Вячеслав Михайлович, д-р мед.наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России, 170100, Тверь, e-mail: chervinets@mail.ru

For correspondence: *Tchervinets V.M.*, doctor of medical sciences, professor, head of the chair of microbiology and virology with course of immunology. e-mail: *tchervinets@mail.ru*

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

Financing. *The study had no sponsor support Expression of gratitude.*

Received 01 April 2016
Accepted 15 April 2016

Введение. В полости рта встречаются более 300 видов микроорганизмов. Их количество в слюне достигает 10^9 КОЕ на 1 мл, а соотношение анаэробов и аэробов составляет 10: 1. В соскобах с десны концентрация бактерий может составлять 10^{12} КОЕ на 1 г, при этом указанное выше соотношение сдвигается и становится 1000:1 [1].

До 20% всех онкологических заболеваний человека ассоциированы с патогенами, которые увеличивают риск развития злокачественной опухоли и изменяют клиническую симптоматику [2—5]. У пациентов со злокачественными новообразованиями слизистой оболочки полости рта под влиянием неблагоприятных внешних и внутренних факторов (иммунодефицит, химиотерапия, лучевая терапия) возникают изменения количественных и видовых характеристик микробиоценоза полости рта, ведущие к нарушению динамического равновесия в экологической системе этой области и ухудшению состояния [6—11].

В литературе недостаточно данных для оценки факторов персистенции, адгезивной способности на эпителиальных клетках слизистой оболочки и степени антагонизма условнопатогенной и аутохтонной микрофлоры полости рта у онкологических больных.

Цель исследования — определить средний показатель адгезии микрофлоры полости рта у больных раком языка на эпителиальных клетках и ее антагонистическую активность.

Материал и методы. Анализ видового и количественного состава микрофлоры выполнен у 56 больных злокачественной опухолью подвижной части языка (30 мужчин и 26 женщин в возрасте 45—64 лет) с установленной II—III стадией рака. Обследованы три биотопа полости рта: поверхность опухоли, окружающие здоровые ткани языка, ротовая жидкость до начала противоопухолевой химиотерапии.

Во всех обследуемых группах материал забирали утром (8—9 ч) до приема пищи. С поверхности слизистой оболочки материал брали стерильным ватным тампоном, помещали в транспортную среду Эймса без угля. Ротовую жидкость собирали в стерильные пробирки. В бактериологическую лабораторию доставляли в течение 2 ч. В лаборатории тампон помещали в 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, затем готовили разведения до 10^{-3} и засеивали на плотные питательные среды из разных разведений. Ротовую жидкость титровали до 10^{-3} . Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий использовали среду Эндо, стафилококковый агар, стрептококковый агар, лактоагар, среду Сабуро. Для культивирования анаэробов использовали среды Колумбия и бифидоагар. Все среды фирмы HiMedia (Индия). Анаэробные условия создавали в анаэростатах при помощи газогенераторных пакетов BBL (Oxoid). Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 24—48 ч. Количество колоний выражали в lg КОЕ/см² или lg КОЕ/мл. Группу контроля составили 15 добровольцев без онкопатологии, в возрасте 40—52 лет, у которых материал забирали с интактной слизистой оболочки полости рта: поверхность языка, поверхность щеки, ротовая жидкость.

Степень адгезии микроорганизмов определяли, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) по методу Брилис В.И. (1986), но не на эритроцитах человека О (I) группы Rh+, а на клетках культуры ткани эпителиального типа линии Нер-2 (рак горлани) и на клетках слизистой оболочки полости рта.

Антагонистическую активность определяли методом отсроченного антагонизма, методом двухслойного агара и по капельной методике [12].

Результаты и обсуждение. У обследованных здоровых лиц контрольной группы в ротовой жидкости выявлены микроорганизмы, относящиеся к 5 родам. В 60% случаев высевались стрептококки (4,8 lg КОЕ/мл), в 40% — стафилококки (4,6 lg КОЕ/мл), в 30% — нейссерии (3,6 lg КОЕ/мл), в 20% — коринебактерии (3,6 lg КОЕ/мл) и грибы рода *Candida* (3,3 lg КОЕ/мл). Микроорганизмы обнаруживали в ассоциациях от двух до четырех культур в исследуемой жидкости. Признаки патогенности микрофлоры не выражены, гемолитические ферменты обнаружены у 10 и 20% изолятов стафилококков и стрептококков соответственно, лецитиназную, плазмокоагулазную, РНК-азную, ДНК-азную активность не выявили.

До начала противоопухолевой химиотерапии у обследованных пациентов с поверхности опухоли выделены бактерии 13 родов и представители семейства энтеробактерий. В 87,5% случаев высевались *Peptostreptococcus spp.*, в 62,5% — *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.*, в 50% — *Candida*

Таблица 1

Адгезия микроорганизмов полости рта на эпителиальных клетках полости рта

№ п/п	Микроорганизмы	Средний показатель адгезии
1	<i>Streptococcus bovis</i>	6,06
2	<i>Streptococcus spp.</i>	3,78
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7,88
4	<i>S. aureus</i>	7
5	<i>Staphylococcus spp.</i>	4,29
6	<i>Enterococcus aerogenes</i>	5,15
7	<i>Lactobacillus spp.</i>	2,844
8	<i>Bacillus spp.</i>	2,26
9	<i>Bacillus subtilis</i>	4,7
10	<i>Micrococcus spp.</i>	3,2
11	<i>Enterobacteriaceae</i>	4,16
12	<i>Enterobacter sacazaki</i>	4,32
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,7
14	<i>Citrobacter freundii</i>	2,9
15	<i>Candida spp.</i>	1,8
16	<i>C. albicans</i>	2,31
17	<i>Porphyromonas spp.</i>	3,6
18	<i>Peptococcus spp.</i>	5,8
19	<i>Peptostreptococcus spp.</i>	4,54
20	<i>Bacteroides spp.</i>	2,3
21	<i>Actinomyces spp.</i>	2
22	<i>Fusobacterium spp.</i>	4,04
23	<i>Veillonella spp.</i>	2,5

Таблица 2

Средний показатель адгезии микроорганизмов полости рта больных раком языка

№ п/п	Культуры микроорганизмов	Эпителиальные клетки полости рта	HEP-2
1	<i>Streptococcus bovis</i> 53	10,6	5,36
2	<i>Streptococcus bovis</i> 45	11,7	7,72
3	<i>Streptococcus intermedius</i> 11	12	3,56
4	<i>Streptococcus intermedius</i> 5	11,9	5,48
5	<i>Streptococcus oralis</i> 23	12,04	2,6
6	<i>Streptococcus suis</i> 301	10,6	17,84
7	<i>Streptococcus suis</i> 259	8,9	8,32
8	<i>Enterococcus sacazakii</i> 14	5,2	3,72
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 239 Lecit +	10,72	6,25
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 228 Lecit +	9,64	5,96
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 77	5,9	7,48
12	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 216 Lecit +	7,5	11,04
13	<i>Staphylococcus xylosum</i> 8	5,4	7,36
14	<i>Staphylococcus xylosum</i> Lecit + 219	7,9	8,44
15	<i>Staphylococcus aureus</i> 3002	7,0	4,16
16	<i>Staphylococcus aureus</i> 3004	10,1	3,12
17	<i>Staphylococcus spp.</i> 303	7,4	5,88
18	<i>Enterococcus aerogenes</i>	5,9	5,28
19	<i>Lactobacillus fermentum</i> 300	7,8	4,61
20	<i>Lactobacillus fermentum</i> 185	6,44	5,64
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 197	4,08	4,9
22	<i>Lactobacillus salivarius</i> 259	6,5	5,68
23	<i>E. coli</i> 254	7,04	4,36
24	<i>Citrobacter freundii</i> 31	11,1	9,64
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 41	6,52	2,8
26	<i>Candida albicans</i> 57	6,92	4,96
27	<i>Candida albicans</i> 155	8,1	5,24
28	<i>Candida albicans</i> 111	7,2	4,77

albicans, в 37,5% — *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus spp.*, в 25% — *Streptococcus bovis*, *Enterococcus sacazakii*, *Peptococcus spp.*, в 12,5% — стрептобациллы, энтеробактерии, цитробактерии, вейлонеллы, бактероиды, бифидобактерии, лептотрихии. Микроорганизмы выделялись в ассоциации от 4 до 7 видов. Преобладали ассоциации пептострептококков со стрептококками, стафилококками, *C. albicans*, бациллами. Наибольшее количество микроорганизмов (от 5,17 до 5,76 lg КОЕ/см²) обнаруживали у самой многочисленной группы бактерий пептострептококков и стрептококков. В больших количествах (5,17 lg КОЕ/см²) встречали редкие микроорганизмы — стрептобациллы, вейлонеллы, бактероиды, бифидобактерии, лептотрихии. Количество остальных бактерий составило 2—4 lg КОЕ/см².

Из окружающей опухоль слизистой оболочки языка у пациентов выделены бактерии 12 родов и представители семейства энтеробактерий. В 75% случаев обнаруживали стрептококки, в 62,5% — *S. aureus*, в 50% — пептострептококки и порфиромонады, в 37,5% — *S. epidermidis*, *C. albicans*, в 25% — *S. bovis*, в 12,5% — энтерококки, стрептобациллы, энтеробактерии, цитробактер, пептококки, бациллы, микрококки, лактобациллы, фузобактерии. Микроорганизмы выделяли в ассоциациях от 4 до 6 штаммов, преобладали ассоциации стрептококков с золотистыми стафилококками, пептострептококками, псевдомонадами, *C. albicans*, эпидермальными стафилококками. В наибольшем количестве (5,17—5,92 lg КОЕ/см²) изолировались стрептококки, пептострептококки, порфиромонады, пептококки, фузобактерии. В меньшем количестве (2,94—3,88 lg КОЕ/см²) встречались золотистые и эпидермальные стафилококки, энтеробактерии, кандиды, бациллы, микрококки, лактобациллы.

В ротовой жидкости первичных больных выделялись 10 родов микроорганизмов. В 75% высевались стрептококки, в 62,5% — пептострептококки, в 50% — стафилококки, кандиды, в 37,5% — стрептобациллы, пептококки, в 25% — порфиромонады, бациллы, в 12,5% — энтеробактерии, вейлонеллы, бактероиды, микрококки, лактобациллы. Бактерии изолировали в ассоциации 4—8 культур: стрептококки с пептострептококками, стафилококками, кандидами, стрептобациллами, порфиромонадами, бациллами и др. Все микроорганизмы выделялись в больших количествах (от 4 lg КОЕ/мл до 7,17 lg КОЕ/мл). Установлено нарастание как видового состава микрофлоры, так и ее количества на 1—3 порядка логарифма по сравнению с микробиоценозом здоровых людей.

Адгезивная способность микроорганизмов, выделенных

Таблица 3

Антагонистическая активность лактобацилл полости рта больных раком языка к тест-культурам

Штаммы лактобацилл	Тест-культуры микроорганизмов, зоны задержки роста, мм						
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i> ATCC 885—653	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	<i>Salmonella typhimurium</i> 5715	<i>Shigella sonnei</i> III № 1908
<i>Lactobacillus spp.</i> 225	0	0	0	0	0	0	0
304/4	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. rhamnosus</i> 197	29	29	0	27	30	0	30
303/3	0	0	0	0	0	0	0
304/3	0	0	0	0	0	0	0
196	0	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0
259	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0

из полости рта здоровых людей на эпителиальных клетках, представлена в табл. 1.

Как следует из табл. 1, патогенная и условнопатогенная микрофлора обладает высокой и реже средней степенью адгезии, нормальная — средней и низкой. У патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* СПА — 7, *Streptococcus bovis* — 6,06. У условнопатогенных *Staphylococcus epidermidis* СПА — 7,88, *Enterococcus aerogenes* — 5,15, *Peptococcus spp.* — 5,8, *Peptostreptococcus spp.* — 4,54, факультативно-анаэробные *Staphylococcus spp.* — 4,29, *Klebsiella pneumoniae* — 4,7, *Enterobacter sacazaki* — 4,32, *Citrobacter freundii* — 2,9, другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — 4,16, *Fusobacterium spp.* — 4,04, *Porphyromonas spp.* — 3,6, *Candida albicans* — 2,31.

У представителей нормальной микрофлоры чаще отмечали среднюю и низкую адгезивность: у *Bacillus spp.* — 2,26, *Lactobacillus spp.* — 2,84, *Actinomyces spp.* — 2, *Veillonella spp.* — 2,5, *Bacteroides spp.* — 2,3, *Micrococcus spp.* — 3,2, *Candida spp.* — 1,8.

Средний показатель адгезии микроорганизмов

Как следует из табл. 2, СПА микроорганизмов высокий. Адгезивная способность условнопатогенной микрофлоры отличается на эпителиальных клетках слизистой оболочки полости рта и на перевиваемой культуре клеток НЕР-2. Отмечается более высокая степень адгезии к нормальным клеткам слизистой оболочки, чем к раковым. Только у штаммов *Streptococcus suis* 301, *Staphylococcus epidermidis* 216 с лецитиназной активностью, *Staphylococcus xylosus* СПА выше на культуре клеток НЕР-2.

Не проявляют антагонизма в отношении тест-культур 90% лактобацилл полости рта (табл. 3). Антагонистическая активность лактобацилл к условнопатогенным микроорганизмам, выделенным от больных раком языка, отсутствует. Только 10% изолятов лактобацилл проявляют высокий антагонизм в отношении стрептококков, стафилококков, включая резистентные к β-лактамам и метициллину, кандид, кроме *Candida albicans*, энтеробактерий. Зона задержки роста составляет 25—30 мм. Антагонизм энтеробактерий, стафилококков к лактобациллам отсутствует. Стрептококки оказывают в 10% случаев незначительный антагонизм к лактобациллам (10—12 мм зоны задержки роста). Стафилококки, в том числе продуцирующие β-лактамазы и метициллинрезистентные, в 95% случаев являются антагонистами стрептококков. Клинические изоляты *Candida albicans* оказывают антагонистическую активность в отношении 90% лактобацилл (16—35 мм), 20% стрептококков (11—20 мм).

Выводы

1. Высокий средний показатель адгезии к эпителиальным клеткам слизистой оболочки полости рта и к раковым клеткам линии Нер-2 свидетельствует о способности микрофлоры больных раком языка к образованию биопленок, в которых они проявляют свой патогенный потенциал, способствуя поддержанию воспалительного процесса.

2. Антагонистическая активность лактобацилл, выделенных из полости рта больных раком языка, практически отсутствует, условнопатогенные стафилококки антагонистически активны в отношении стрептококков, кандиды угнетают лактобациллы.

3. Выделен штамм *Lactobacillus rhamnosus*, обладающий высокой антагонистической активностью к резистентным к β-лактамам и метициллину стафилококкам, стрептококкам, энтеробактериям, который целесообразно использовать для создания пробиотика, используемого в коррекции дисбиоза полости рта больных раком языка.

4. Для подавления роста *Candida spp.* можно применить кислоторастворимый хитозан, к которому они чувствительны в 95—99% случаев [13].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п 2—5, 9—11 см. REFERENCES)

1. Шендеров Б.А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья. *Метаморфозы*. 2014; 5: 72—80.
2. Бобров А.П., Ткаченко Т.Б. Изменения слизистой оболочки полости рта у онкологических больных на фоне проводимой химиотерапии. *Стоматология*. 2006; 85(6): 70—2.
3. Бочкарева О.П., Красноженов Е.П., Гольдберг В.Е., Попова Н.О. Микрофлора полости рта как индикатор дисбиотических расстройств у больных раком молочной железы. *Сибирский онкологический журнал*. 2013; 5(59): 24—6.
4. Лебедев С.Н., Червинец В.М., Богатов В.В., Червинец Ю.В., Червинец А.В., Трошин А.В. Микробиоценоз основных биотопов полости рта у пациентов с карциномой языка на этапах комплексного лечения. *Стоматология*. 2015; 1: 30—4.
5. Глушанова, Н.А. *Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника*: Дисс. ... докт. мед. наук. М.; 2006.
6. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Беляева Е.А., Чаркова А.Р. Анализ чувствительности микроорганизмов, выделенных от больных с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей, к противомикробным препаратам. *Современные проблемы науки и образования*, 2015; (1). (электронный журнал URL: www.science-education.ru/121-17918).

Поступила 01.04.16

REFERENCES

1. Shenderov B.A. Microbial ecology of man and its role in health maintainance. *Metamorfozy*. 2014; 5: 72—80 (in Russian).
2. Alibek K., Kakpenova A., Baiken Y. Role of infectious agents in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. *Infect Agent Cancer*. 2013; 8(1): 7.
3. Van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med. Oral Patol. Oral. Cir. Bucal*. 2013; 18(1): 33—7.
4. Vladimirov B.S., Schiodt M. The effect of quitting smoking on the risk of unfavorable events after surgical treatment of oral potentially malignant lesions. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2009; 38(11): 1188—93.
5. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl*. 2009; 48(32): 5798—808.
6. Bobrov A.P., Tkachenko T.B. Changes in the mucous membrane of the oral cavity in cancer patients due to chemotherapy. *Stomatologiya*. 2006; 85(6): 70—2 (in Russian).
7. Bockhareva O.P., Crasnojenov E.P., Goldberg V.E., Popova N.O. Microflora of the oral cavity as an indicator of dysbiotic disorders in patients with breast cancer. *Sibirskij onkologicheskij journal*. 2013; 5(59): 24—6 (in Russian).
8. Lebedev S.N., Chervinets V.M., Bogatov V.V., Chervinets Yu. V., Chervinets A.V., Troshin A.V. Microbiocenosis of major biotopes of the oral cavity in patients with tongue carcinoma during complex treatment. *Stomatologiya*. 2015; 1: 30—4 (in Russian).
9. Ganjre A., Kathariya R., Bagul N., Pawar V. Anti-carcinogenic and anti-bacterial properties of selected spices: implications in oral health. *Clin. Nutr. Res*. 2015; 4: 209—15.
10. Olszewska K., Mielnik-Blaszczak M. An assessment of the number of cariogenic bacteria in the saliva of children with chemotherapy-induced neutropenia. *Adv. Clin. Exp. Med*. 2016; 25 (1): 11—9.
11. Sintim H.O., Gyrsoy U.K. Biofilms as «connectors» for oral and systems medicine: a new opportunity for biomarkers, molecular targets, and bacterial eradication. *OMICs*, 2016; 20(1): 3—11.
12. Glushanova, N.A. *Experimental Substantiation of New Approaches to the Correction of Intestinal Microbiocenosis*: Diss. Moscow; 2006 (in Russian).
13. Chervinets Yu. V., Chervinets V.M., Belyaeva E.A., Charkova A.R. Analysis of the antibiotic sensitivity of microorganisms isolated from patients with chronic upper respiratory tract diseases. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; (1). Available at: Electronic Medical Journal URL: www.science-education.ru/121-17918. (in Russian)

Received 01.04.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.34-008.8:616-092

Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Богородская С.Л.

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА. РОЛЬ В РАЗВИТИИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», 664003, г. Иркутск

Микробиота кишечника является неотъемлемой частью каждого индивидуума. Она характеризуется сложной иерархической структурой, различными межвидовыми соотношениями. Микрофлора кишечника выполняет ряд жизненно важных функций, обеспечивая гомеостаз организма. Анализ цитируемых работ показал, что изменение количественного и видового состава микробиоты может приводить к возникновению различных патологических состояний (воспалительные заболевания кишечника, атеросклероз, метаболический синдром, ожирение, сахарный диабет 2-го типа). При дисбалансе для коррекции метаболических нарушений необходимо учитывать состояние защитных сил организма, а также воздействовать на микрофлору кишечника.

Ключевые слова: микрофлора кишечника; микробиота; воспалительные заболевания кишечника; атеросклероз; метаболический синдром; ожирение; сахарный диабет 2-го типа.

Для цитирования: Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Богородская С.Л. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10): 723-726. DOI:10.18821/0869-2084-2016-61-10-723-726
Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Bogorodskaya S.L.

THE MICROBIOTA OF INTESTINE. THE ROLE IN DEVELOPMENT OF VARIOUS PATHOLOGIES

The Irkutskii research center of surgery and traumatology, 664003 Irkutsk, Russia

The microbiota of intestine is an integral part of every individual. The microbiota is characterized by convoluted hierarchic structure and various inter-species relationships. The microflora of intestine implements number of vitally important functions, maintaining homeostasis of organism. The analysis of quoted publications demonstrated that alteration of qualitative and species-specified compound of microbiota can result in development of various pathologic conditions (inflammatory diseases of intestine, atherosclerosis, metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus type II). Under imbalance and adjustment of metabolic disorders the conditions of defence forces of organism are to be counted and effecting on microflora of intestine as well.

Key words: microflora of intestine; microbiota; inflammatory diseases of intestine; atherosclerosis; metabolic syndrome; obesity; diabetes mellitus type II

For citation: Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Bogorodskaya S.L. The microbiota of intestine. The role in development of various pathologies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 723-726 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-723-726

For correspondence: Bogorodskaya S.L., candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of cellular pathophysiology and biochemistry, e-mail: sbogorodskaya@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsor support

Received 10.02.2016
Accepted 15.03.2016

Важнейшее значение в состоянии здоровья и самочувствии человека имеет микрофлора кишечника. Изучение микрофлоры (правильнее — микробиоты) кишечника и ее симбиотических и патогенных взаимодействий с организмом человека является одной из важнейших областей биомедицинской науки. Не вызывает сомнения, что микробиота человека — метаболический «орган», который не только участвует в переваривании пищи, но и выделяет различные биологически активные вещества, стимулирует функции врожденного и приобретенного иммунитета, препятствует инвазии патогенных микроорганизмов, выполняет детоксикационную, антиканцерогенную, синтетическую функции [1].

Традиционно считалось, что колонизация желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) микроорганизмами происходит после рождения. Исследования последних лет показали, что

микроорганизмы присутствуют в плаценте, амниотической жидкости, пуповинной крови, меконии [2, 3].

Неправильное питание матери во время беременности или ребенка в раннем детском возрасте может привести к обеднению и дефекту микробиоты кишечника. Предполагают, что окончательное становление так называемого энтеротипа или феко типа начинается с 18 мес. Примерно к 2—3 годам микрофлора претерпевает последние изменения, формируется «взрослая» микробиота, 60—70% которой будет мало варьировать на протяжении всей жизни [4].

Предложено выделить определенные энтеротипы по составу микрофлоры [5]. Всех людей можно разделить на три энтеротипа, каждый из которых включает множество видов бактерий, вне зависимости от места проживания, состояния здоровья или возраста. Исследователи объединили популяции бактерий в кластеры, названные согласно доминирующим в них родам.

Первый тип — *Bacteroides*. Он отличается активностью в отношении разложения углеводов, способствует выработке витаминов С, В₂, В₅, Н. Предполагают, что этот энтеротип будет реже страдать атеросклерозом или он проявится в более поздние сроки.

Для корреспонденции: Богородская Светлана Леонидовна, канд. биол. наук, ст.науч. сотр. лаб. клеточной патофизиологии и биохимии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: sbogorodskaya@mail.ru

Второй тип — *Ruminococcus*. Данные бактерии повышают эффективность всасывания углеводов, а также уровень сахара в крови. Представители этого энтеротипа синтезируют фолиевую кислоту и витамин B₁.

Третий тип — *Prevotella*. Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности разрушают защитный слизистый покров, что, вероятно, предрасполагает к дефектам слизистой оболочки кишечника [5].

Идентификация определенного энтеротипа позволяет учитывать особенности обмена веществ и выявлять склонность к тем или иным заболеваниям. При этом необходимо учитывать, что микрофлора кишечника каждого человека индивидуальна и постоянна [6].

Микробиота является высокостабильной экосистемой в отсутствие серьезных внешних факторов. По мере старения человека стареет и его микрофлора. Недостаточное усвоение питательных веществ, связанное с возрастными физиологическими изменениями, может вести к нарушению состава микрофлоры. Снижение всасывания витамина B₁₂, кальция, ионов железа способствует развитию атрофического гастрита. Снижение моторики ведет к копростазу, запорам, увеличению времени прохождения кала по кишечному тракту, накоплению белков бактерий и их брожению [7]. Дисбаланс между про- и противовоспалительными элементами у пожилых людей ведет к неспецифическому вялотекущему воспалению, называемому inflammaging (возрастное воспаление). Оно является основой развития онкологических, аутоиммунных, хронических неинфекционных заболеваний, болезни Альцгеймера, атеросклероза, остеоартрита, инсулинорезистентности, сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [8]. Возрастные изменения характеризуются количественным увеличением факультативных анаэробов и оппортунистических патогенов, повышение числа которых ассоциировано с неспецифическим воспалением. При этом уменьшается разнообразие микрофлоры, снижается продукция короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), секреция муцина, повышается проницаемость слизистой оболочки для патогенов [9].

Микробиота кишечника может различаться в зависимости от половых гормонов, что, возможно, опосредованно влияет на большой риск развития ССЗ у мужчин [7].

Повышение проницаемости кишечной стенки является одним из триггерных факторов развития метаболической эндотоксемии. Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий (эндотоксин) попадает в кровь пассивно — через ослабленные связи плотных белковых контактов — и активно, связываясь с хиломикронами. Потребление жирной пищи способствует такому же механизму развития эндотоксемии [10, 11]. Эндотоксемия поддерживает вялотекущее воспаление в организме, влияет на развитие ожирения и других факторов риска ССЗ [12]. На развитие ожирения может также влиять уровень КЦЖК. Последние продуцируются некоторыми бактериями и воздействуют на проницаемость кишечной стенки. Физиологические концентрации КЦЖК поддерживают трансэпителиальное электрическое сопротивление (ТЭС), улучшают барьерную функцию кишки. Увеличение их продукции снижает ТЭС, нарушает проницаемость эпителия, оказывает цитотоксическое влияние [13].

Повышенная проницаемость кишечной стенки связана с увеличением уровня зонулина — белка, влияющего на плотные контакты, а также участвующего в механизмах ожирения и хронического неспецифического воспаления.

Изменения микробиоты кишечника, в частности под действием факторов внешней среды, возраста, пищи, приема антибиотиков, могут вести к серьезным последствиям, которые трудно предсказать. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что нарушения баланса микрофлоры кишечника играют большую

роль в развитии воспалительных заболеваний кишечника, атеросклероза, ожирения, метаболического синдрома (МС), сахарного диабета (СД) 2-го типа [14].

Представляет интерес изучение влияния микробиоты на липидный и углеводный обмен. Состояние микрофлоры кишечника воздействует на липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) через индукцию неспецифического воспаления. Одним из механизмов этого может быть повышение в крови уровня сывороточного амилоидного белка (SAA), который является медиатором воспаления. Клеточными источниками SAA служат эпителиальные клетки и макрофаги толстой кишки. Выявлено, что он частично регулируется через сигнальные пути Toll-подобных рецепторов четвертого типа. Лигандами последних являются ЛПС грамотрицательных бактерий, пептидогликан, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий и другие их компоненты. Взаимодействие SAA с ЛПВП усиливает захват холестерина из ЛПВП макрофагами и ведет к утрате антиатерогенных свойств данными липопротеидами [15].

Предполагают, что в процесс регуляции углеводного обмена могут быть вовлечены КЦЖК, участвующие в метаболизме глюкагонподобного пептида грелина. Последний подавляет хроническое неспецифическое воспаление за счет активации глюконеогенеза в кишечнике ц-АМФ-зависимым путем [16].

В регуляции обмена углеводов участвуют и желчные кислоты. Первичные синтезируются в печени и в составе желчи поступают в кишечник, часть из них трансформируется микробиотой во вторичные желчные кислоты. Последние активируют секрецию глюкагонподобного пептида-1 L-клетками кишечника, который наряду с триглицеридами и глюкозой химуса повышает секрецию инсулина, ингибирует секрецию соматостатина и глюкагона, усиливает реакцию β-клеток на глюкозу. В результате длительности и выраженности указанных процессов снижается чувствительность инсулинзависимых тканей к действию инсулина, развивается инсулинорезистентность, в ходе прогрессирования заболевания снижается биосинтез инсулина β-клетками поджелудочной железы, развивается СД 2-го типа.

Еще одним фактором, связывающим изменение состава микробиоты кишечника, является физиологическая активность эндоканнабиноидной системы (ЭКБС). Она играет ключевую роль в метаболизме липидов, глюкозы, жировой ткани. Чрезмерная активация ЭКБС ведет к нарушению толерантности к глюкозе, инсулинорезистентности и дислипидемии [15].

При МС происходят существенные изменения в составе кишечного микробиома: увеличивается соотношение *Firmicutes/Bacteroides*, снижается количество бактерий рода *Bifidobacterium*. В возникновении МС большую роль играет компонент клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий ЛПС, являющийся эндотоксином и одним из самых мощных индукторов воспаления [17].

В экспериментах на мышах обнаружена прямая связь между жировой и высокожировой диетой, ведущей к ожирению, и повышением содержания ЛПС в плазме крови. Это подтверждено в различных экспериментальных моделях ожирения и СД 2-го типа [18] и при обследовании людей, страдающих ожирением и СД 2-го типа [19]. В организме человека ЛПС проникает через слизистую оболочку кишечника в ткани и кровь, где распознается иммунокомпетентными клетками и вызывает неспецифический иммунный ответ. ЛПС активирует альтернативный путь активации компонента, взаимодействует с рецепторами на макрофагах и клетках эндотелия, стимулирует выработку цитокинов острой фазы воспаления [20].

В обзоре [17] приведена база данных, подтверждающих

взаимосвязь нарушений в кишечной микробиоте с развитием МС, однако многие вопросы требуют дальнейшего изучения, такие как влияние диеты на изменение микробиоты, причинно-следственные отношения, корреляция между составом микрофлоры тонкой кишки и фекальных образцов и др.

Представляют интерес механизмы влияния кишечной микробиоты на прогрессирование атеросклероза [21]. Рассматриваются два пути этого влияния. При ускоренной транслокации бактерий кишечника в кровяное русло происходит взаимодействие ЛПС бактерий с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП), в результате чего изменяется липопротеиновый метаболизм. ЛПС индуцирует повреждение эндотелиальных клеток, стимулирует продукцию и освобождение супероксидного аниона, окисление ЛПНП. Окисленные ЛПНП способствуют выходу цитокинов, таких как интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли, из макрофагов, стимулируя их трансформацию в пенные клетки, а также накоплению в интиме сосудов и в последующем — формированию атеросклеротической бляшки.

Другой путь — образование триметиламин-N-оксида (ТМАО) в процессе метаболизма фосфатидилхолина, поступающего с пищей (яйца, печень, говядина, свинина). В кишечнике последний под действием липаз превращается в различные метаболиты, в том числе в глицерофосфохолин, фосфохолин, холин. В тонкой кишке из холинсодержащих питательных веществ под действием микроорганизмов образуется триметиламин, который быстро окисляется до ТМАО печеночными флавиносодержащими монооксигеназами. В экспериментальных исследованиях ТМАО повышал способность макрофагов аккумулировать холестерин, формировать пенные клетки, т. е. вызывал изменения, ассоциирующиеся с атеросклерозом [22].

Пока недостаточно данных, подтверждающих роль микробиоты кишечника в развитии атеросклероза [23]. Если определять микроорганизмы только в кале, можно упустить из виду очень важную популяцию бактерий, которые адгезируются на слизистой оболочке. В состав микробиоты человека входят некультивируемые микроорганизмы, которые не могут быть выявлены общепринятыми методами. Считаем, что участие микробиоты в развитии сердечно-сосудистых заболеваний заслуживает пристального внимания и требует дальнейшего тщательного изучения.

Необходимо остановиться на нарушениях микробиоценоза кишечника, часто развивающихся у пациентов с хроническими заболеваниями печени. Микрофлора ЖКТ и печень неразрывно взаимодействуют в процессах детоксикации. Микробиота в составе биопленки первой контактирует со всеми субстанциями, попадающими в организм с водой, пищей, атмосферным воздухом. Она трансформирует химические вещества или промежуточные нетоксичные соединения, разрушаемые в печени и удаляемые из организма. Сниженная детоксикационная функция микрофлоры при дисбиозе кишечника увеличивает нагрузку на ферментные системы печени, что способствует возникновению в последней метаболических и структурных изменений [24].

Нарушения процессов синтеза и экскреции компонентов желчи при заболеваниях печени могут вести к изменению видового и количественного состава микробиоты кишечника [25]. Итог этого — нарушение функций внутренних органов и появление клинических признаков микробного дисбаланса.

Результаты экспериментальных исследований и клинических наблюдений свидетельствуют о том, что микробиота кишечника и нарушение ее баланса могут играть роль в развитии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). При изучении микробного профиля кишечника у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом выявили снижение уровня бифидо- и лактобактерий, увеличение количества ми-

кроорганизмов, продуцирующих сероводород (*Fusobacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* и др.). Перечисленные микроорганизмы блокируют процесс окисления жирных кислот, приводя к энергодефициту в эпителиоцитах, стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, ингибируют фагоцитоз и лизис бактериальных клеток [26].

У больных, страдающих ВЗК, отмечается уменьшение содержания в кишечнике *Firmicutes* и *Bacteroides*, которые являются основными продуцентами КЦЖК, необходимых для формирования слизистого барьера, экспрессии плотных контактов (клаудина-2), энергообеспечения колоноцитов и регуляции иммунного ответа [27]. Чаще при ВЗК в фекалиях выявляется инвазивная *E. coli*, стимулирующая выработку молекул адгезии (СЕАСАМ 6) [28]. Способностью к адгезии и инвазии в большей степени отличаются патогенные микроорганизмы за счет наличия у них выростов нитевидной формы, расположенных на полюсах бактериальной клетки, облегчающих проникновение микроорганизмов в слизистые оболочки. Интегрины, обладающие свойством взаимодействовать с матриксными белками (фибринонектином, коллагеном и др.), облегчают «приклеивание» бактерий к клеткам-мишеням хозяина. У 42% больных с синдромом раздраженного кишечника наблюдалось усиление кишечной проницаемости и уменьшение экспрессии глутаминсинтетазы. Последняя катализирует превращение аммиака и глутамата в глутамин, который служит основным источником энергии для быстро делящихся клеток слизистой оболочки кишечника. Истощение глутамин ведет к атрофии эпителия и последующему увеличению проницаемости эпителиального слоя [28].

С целью поддержания стабильности и нормализации состава микробиоты все чаще применяются про- и пребиотики. В последнее время развивается и другое направление — трансплантация фекальной микробиоты от здоровых доноров пациентам с различными заболеваниями, она восстанавливает нарушенный баланс кишечных микроорганизмов. Изучаются возможности аутопробиотической терапии [29, 30].

Проанализированы экспериментальные и клинические исследования, посвященные взаимодействию микробиоты с кишечной стенкой. Кишечная микрофлора является экстракорпоральным органом каждого индивидуума. Она характеризуется сложной иерархической структурой. Микробиота выполняет разнообразные функции, зависящие от ее количественного и видового состава. Нарушение ее баланса может приводить к возникновению различных патологических состояний (атеросклероз, заболевания сердечно-сосудистой системы, ВЗК, СД 2-го типа и др.). При дисбалансе необходимо учитывать защитные силы организма и использовать воздействие на микрофлору кишечника для коррекции метаболических нарушений с целью предотвращения развития патологий.

Финансирование. Бюджетное. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—6, 8—11, 13—14, 16, 18—19, 22, 26—27, см. REFERENCES)

1. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2011; 21(5): 17—27
7. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы сердечно-сосудистого риска. Часть 1. Микробиота кишечника, возраст и пол. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2015; 14(4): 92—5.
12. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы сердечно-сосудистого риска. Часть 2. Микробио-

- та кишечника и ожирение. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015; 14(5): 83—6.
15. Ткачева О.Н., Каитанова Д.А., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 3. Липидный профиль, углеводный обмен и микробиота кишечника. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015; 14(6): 83—6.
 17. Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И. Метаболический синдром и микробиология кишечника. Трансляционная медицина. 2014; (1): 19—28.
 20. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии. Часть 1. Основы общей патофизиологии. СПб.: ЭЛБИ-СПб.; 1999: 624.
 21. Айтбаев К.А., Мураталиев Т.М. Манипуляции с кишечной микрофлорой как новая парадигма для диагностики, терапии и профилактики кардиоваскулярных заболеваний (Обзор литературы). Вестник Кыргызско-Российского Славянского Университета. 2015; 15(7): 10.
 23. Редакция. Микробиота кишечника и атеросклероз. Клиническая фармакология и терапия. 2013; 22(3): 5—11.
 24. Петухов В.А., Стернина Л.А., Травкин А.Е. Нарушения функций печени и дисбиоз при липидном дистресс-синдроме Савельева: современный взгляд на проблему. *Consilium medicum*. 2004; 6(6): 406—9.
 25. Чихачева Е., Селиверстов П., Тетерина Л., Добрица В., Радченко В. Микробиоценоз кишечника при хронических заболеваниях печени: диагностика и лечение. *Врач*. 2011; (7): 18—21.
 28. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В., Шифрин О.С., Ивашкин В.Т. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24(5): 42—53.
 29. Васильев А.Н., Горячев Д.В., Гавришина Е.В., Ниязов Р.Р., Селиверстов Ю.А., Дигтяр А.В. Трансплантация фекальной микробиоты: возможные терапевтические подходы и вопросы правового регулирования. *Биопрепараты, профилактика, диагностика, лечение*. 2015; (2): 15—23.
 30. Барановский А.Ю., Симаненков В.И. Достижения и перспективы изучения функциональных и воспалительных заболеваний кишечника в СПбМАПО. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И.Мечникова*. 2010; 2(2): 121—34.
 10. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57(6): 1470—81.
 11. Ghoshal S., Witta J., Zhong I., de Villiers W., Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid. Res.* 2009; 50(1): 90—7.
 12. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Boytsov S.A. Intestinal microbiota and the factors of cardiovascular risk. Part 2. Intestinal microbiota and obesity. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14(5): 83—6. (in Russian)
 13. Suzuki T., Yoshida S., Hara H. Physiological concentration of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br. J. Nutr.* 2008; 100(2): 297—305.
 14. Blaser M.J., Falkow S. Disappearing microbiota. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2014; 23(4): 7—16. (in Russian)
 15. Tkacheva O.N., Kashtanova D.A., Boytsov S.A. Intestinal microbiota and the factors of cardiovascular risk. Part 3: The lipid profile, carbohydrate metabolism and intestinal microbiota. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14(6): 83—6. (in Russian)
 16. Shen T.Y., Qin H.L., Gao Z.G., Fan X.B., Hang X.M., Jiang Y.Q. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(27): 4352—8.
 17. Borshechev Yu.Yu., Ermolenko E.I. Metabolic syndrome and intestinal microbial ecology. *Translyatsionnaya meditsina*. 2014; (1): 19—28. (in Russian)
 18. Cani P.D., Possemiers S., Van de Wiele T., Guiot Y., Everard A., Rottier O., Geurts L. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58(8): 1091—103.
 19. Creely S.J., McTernan P.G., Kusminski C.M., Fisher F.M., Da Silva N.F., Khanolkar M. et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 292(3): 740—7.
 20. Zaychik A.Sh., Churilov L.P. *Fundamentals of General Pathology. Part 1. Fundamentals of General Pathophysiology [Osnovy obshchey patologii. Chast' 1. Osnovy obshchey patofiziologii]*. St. Petersburg: ELBI-SPb.; 1999: 624. (in Russian)
 21. Aytbaev K.A., Murataliev T.M. Manipulation of intestinal microflora as a new paradigm for the diagnosis, treatment and prevention of cardiovascular disease (Literature review). *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo Slavyanskogo Universiteta*. 2015; 15(7): 10. (in Russian)
 22. Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., Dugar B. et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011; 472(7341): 57—63.
 23. From the Editor. Intestinal microbiota and atherosclerosis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2013; 22(3): 5—11. (in Russian)
 24. Petukhov V.A., Stermina L.A., Travkin A.E. Disorders of the liver and dysbiosis in lipid distress syndrome Saveliev: modern view on the problem. *Consilium medicum*. 2004; 6(6): 406—9. (in Russian)
 25. Chikhacheva E., Seliverstov P., Teterina L., Dobritsa V., Radchenko V. Gut microbiota in chronic liver diseases: diagnosis and treatment. *Vrach*. 2011; (7): 18—21. (in Russian)
 26. Roediger W.E., Duncan A., Kapaniris O., Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1993; 104(3): 802—9.
 27. Krishnan S., Ramakrishna B.S., Binder H.J. Stimulation of sodium chloride absorption from secreting rat colon by short-chain fatty acids. *Dig. Dis. Sci.* 1999; 44(9): 1924—30.
 28. Poluektova E.A., Lyashenko O.S., Korolev A.V., Shifrin O.S., Ivashkin V.T. Mechanisms to ensure the interaction of bacterial cells with the host, and a violation of patients with inflammatory bowel disease patients. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2014; 24(5): 42—53. (in Russian)
 29. Vasil'ev A.N., Goryachev D.V., Gavrishina E.V., Niyazov R.R., Seliverstov Yu.A., Digtar' A.V. Fecal microbiota transplantation: possible therapeutic approaches and legal regulation. *Biopreparaty, profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; (2): 15—23. (in Russian)
 30. Baranovskiy A.Yu., Simanenkova V.I. Achievements and prospects of studying the functional and inflammatory bowel diseases at the Academy of Postgraduate Education of the city of St. Petersburg. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni I.I.Mechnikova*. 2010; 2(2): 121—34. (in Russian)

Поступила 10.02.16

REFERENCES

1. Kuchumova S.Yu., Poluektova E.A., Sheptulin A.A., Ivashkin V.T. The physiological significance of the intestinal microflora. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2011; 21(5): 17—27. (in Russian)
2. Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(237): 237ra65.
3. Dale I., Brandtzaeg P., Fagerhol M.K., Scott H. Distribution of new myelomonocytic antigen (L₁) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Amer. J. Clin. Pathol.* 1985; 84(1): 24—34.
4. Bergstrom A., Skov T.H., Bahl M.L., Roager H.M., Christensen L.B., Ejlerskov K.T. et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(9): 2889—900.
5. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346): 174—80.
6. Budding A.E., Grasman M.E., Lin F., Bogaards J.A., Soeltan-Kaersenhout D.J., Vandenbroucke-Grauls C.M. et al. IS-pro: high-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. *FASEB J.* 2010; 24(11): 4556—64.
7. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Boytsov S.A. Intestinal microbiota and the factors of cardiovascular risk. Part 1. Intestinal microbiota, age and gender. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14(4): 92—5. (in Russian)
8. Haq K., McElhaney J.E. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 29: 38—42.
9. Tiihonen K., Tynkkynen S., Ouwehand A., Ahlroos T., Rautonen N. The effect of ageing with and without non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal microbiology and immunology. *Br. J. Nutr.* 2008; 100(1): 130—7.

Received 10.02.16

© РОЗОВА Л.В., ГОДОВЫХ Н.В., 2016

УДК 616.71-018.46-002.3-078

Розова Л.В., Годовых Н.В.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГНОЙНОГО ОЧАГА ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

ФГБУ «РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», 640014, г. Курган, Российская Федерация

Проанализированы результаты микробиологического исследования патологического материала, взятого из свищей и операционных ран у 155 больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей в стадии обострения в период 2014–2015 гг. Исследовано 126 проб из свищей и 95 проб из ран, выделено соответственно 164 и 102 штамма бактерий. Определена микробная обсемененность ран и свищей. Изучен видовой состав микрофлоры. Установлено, что в исследуемых группах основным возбудителем по-прежнему остается стафилококк, а приоритетным патогеном — *Staphylococcus aureus*, имеющий незначительные отличия по частоте встречаемости и коэффициенту резистентности. MRSA из операционных ран выделялся на 5,6% чаще, чем из свищей. Самое высокое выявление штаммов *S. aureus* и MRSA приходится на 2009–2010 гг. В 2015 г. отмечено самое низкое выявление *S. aureus* при относительно высоком уровне выявления MRSA. С помощью диско-диффузионного D-теста проведено определение резистентности к клиндамицину индуцибельного типа 17 штаммов *S. aureus*, устойчивых к эритромицину и чувствительных к клиндамицину. Индуцибельная резистентность к клиндамицину для штаммов из операционных ран составила 62,5%, что почти в 3 раза выше, чем у штаммов, выделенных из свищей. Важную роль в хронизации остеомиелита длинных трубчатых костей играют грамотрицательные микроорганизмы (*E. coli*, энтеробактеры, *P. aeruginosa* и др.), частота обнаружения которых в операционных ранах составляет 22,5%, в свищах — 17,1%.

Ключевые слова: хронический остеомиелит; стафилококки; коэффициент антибиотикорезистентности; индуцибельная резистентность к клиндамицину; метициллинрезистентные штаммы.

Для цитирования: Розова Л.В., Годовых Н.В. Микробиологическое исследование гнойного очага воспаления у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (10): 727-730. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-727-730

Rosova L.V., Godovykh N.V.

THE MICROBIOLOGICAL STUDY OF PURULENT FOCUS OF INFLAMMATION IN PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS OF LONG BONES

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

The article presents analysis of results of microbiological study of pathologic samples from fistula and surgical wounds of 155 patients with chronic osteomyelitis of long bones in the period of exacerbation of disease during 2014-2015. In totality, 126 samples from fistula and 95 samples from wounds were analyzed. Correspondingly, 164 and 102 strains of bacteria were separated. The microbial contamination of fistula and wounds was established. The species composition of microflora was analyzed. It is established that in the analyzed groups the main agent still continues to be staphylococcus and priority pathogen *Staphylococcus aureus* differing slightly in rate of occurrence and coefficient of resistance. MRSA was separated up to 5.6% more often from surgical wounds than from fistula. The highest detection rate of strains *S. aureus* and MRSA falls on 2009-2010. In 2015, the lowest detection rate of *S. aureus* was marked with relatively high rate of detection of MRSA. The disk diffusion D-test was applied to determine resistance of inducible type to Clindamycin of 17 strains of *S. aureus* resistant to Erythromycin and sensitive to Clindamycin. The inducible resistance to Clindamycin for strains from surgery wounds made up to 62.5% that is three times higher than in case of strains separated from fistula. The important role in development of chronic of osteomyelitis of long bones is played by Gram-negative microorganisms (*E. coli*, Enterobacter, *P. aeruginosa*, etc.). The rate of detection of these microorganisms in surgery wounds makes up to 22.5% and 17.1% in fistula.

Key words: chronic osteomyelitis; staphylococcus; rate of antibiotic resistance; inducible resistance to Clindamycin; methicillin-resistant strains

For citation: Rosova L.V., Godovykh N.V. The microbiological study of purulent focus of inflammation in patients with chronic osteomyelitis of long bones. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 727-730. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-727-730

For correspondence: Godovykh N.V., junior research worker of scientific clinical laboratory of microbiology and immunology. e-mail: natalia_nvn@mail.ru

Information about authors

Rosova L.V., <http://orcid.org/0000-0002-2399-8091>

Godovykh N.V., <http://orcid.org/0000-0001-8512-4165>

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 22.04.2016
Accepted 15.05.2016

Для корреспонденции: Годовых Наталья Викторовна, мл. науч. сотр. научно-клинической лаб. микробиологии и иммунологии, e-mail: natalia_nvn@mail.ru

Введение. Проблема гнойных осложнений в травматологических клиниках продолжает оставаться актуальной. Частым осложнением является развитие остеомиелита (до 15% случаев). Остеомиелит верхних конечностей наблюдается в 9%, нижних конечностей — в 15% случаев, переходя в хроническую форму при неадекватном лечении острой инфекции у 40% больных [1].

После открытых переломов остеомиелит диагностируется в 3—24% наблюдений и в 1—7% случаев после оперативного лечения закрытых переломов. Рецидивы остеомиелита отмечаются у 20—30% больных, приводя к функциональной неполноценности конечности в 10,3—57% наблюдений [2, 3].

В литературе встречаются различные данные об этиологической структуре хронического остеомиелита. Расширение видового спектра микрофлоры, способной играть этиологическую роль в развитии хронического остеомиелита, и повышение антибиотикорезистентности возбудителей указывают на необходимость проведения микробиологического мониторинга, осуществления инфекционного контроля и совершенствования тактики применения антибиотиков в стационарах.

Цель: выявление основных возбудителей и их антибиотикорезистентности у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей в рамках микробиологического мониторинга возбудителей гнойной инфекции.

Материал и методы. Проанализированы результаты микробиологического исследования патологического материала, взятого у 155 больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей в стадии обострения в период 2014—2015 гг. Возраст пациентов составлял от 19 до 76 лет. Среди обследованных больных 129 мужчин и 26 женщин. В качестве объекта исследования использовано отделяемое свищей (в дооперационном периоде) и операционных ран (во время операции). Исследования выполняли культуральным методом на плотных питательных средах: 5% кровяном агаре, желточно-солевом агаре, среде Левина. Посевы инкубировали в течение 20—24 ч в CO₂-инкубаторе.

Микробиологические исследования включали определение общего микробного числа (в КОЕ/мл), видовую идентификацию микроорганизмов и формирование антибиотикограммы, которые проводились в соответствии с общепринятыми рекомендациями при помощи баканализатора «WalkAway-40 Plus» («Siemens»).

Согласно рекомендациям, в набор тестируемых препаратов для стафилококков входили бензилпенициллин, эритромицин, тетрациклин, клиндамицин, оксациллин, гентамицин, ципрофлоксацин, рифампицин, ванкомицин, линкомицин. Анализ данных по антибиотикочувствительности исследуемых штаммов осуществлялся при помощи аналитической компьютерной программы WHONET 5,6. Условный коэффициент резистентности для каждого штамма *Staphylococcus aureus*, выделенного из свищей и очага воспаления, рассчитывали по формуле: $K = R/N$, где K — коэффициент резистентности, R — число антибиотиков, к которым резистентен исследуемый штамм, N — общее количество тестируемых антибиотиков [4]. Для статистической обработки использовали программное обеспечение «AtteStat 1.0» [5].

Результаты и обсуждение. При обследовании больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей взято 126 проб из свищей и 95 проб из ран; выделено соответственно 164 и 102 штамма бактерий. Микробная обсемененность, составляющая $\geq 1 \times 10^5$ КОЕ/мл, выявлена в 74,4% проб из свищей и в 45,3% проб из ран.

Анализ полученных данных показал как сходство, так и различия в составе возбудителей хронического посттравматического остеомиелита в зависимости от места забора материала. В исследуемых группах в настоящее время основным



Рис. 1. Частота выявления различных групп микроорганизмов у больных с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.

возбудителем остается стафилококк, приоритетным патогеном — *S. aureus*.

Наши исследования подтверждаются данными литературы о наибольшей значимости *S. aureus* при инфекции мягких тканей, раневой инфекции, остеомиелите [6—8].

Микробный пейзаж свищей и операционных ран у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей представлен на рис. 1. *S. aureus*, будучи основным патогеном, чаще выявлялся из свищей (59,1%), реже — из операционных ран (55,9%). Коагулазонегативные стафилококки (*S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*) чаще высевались из операционных ран и составляли 18,3% против 14,7% (*S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. cohnii*) — из свищей.

Из операционных ран чаще выявлялись грамотрицательные микроорганизмы, стрептококки, энтерококки. Видовой состав кокков представлен *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*.

Грамотрицательные микроорганизмы, играющие важную роль в хронизации остеомиелита, встречались в отделяе-

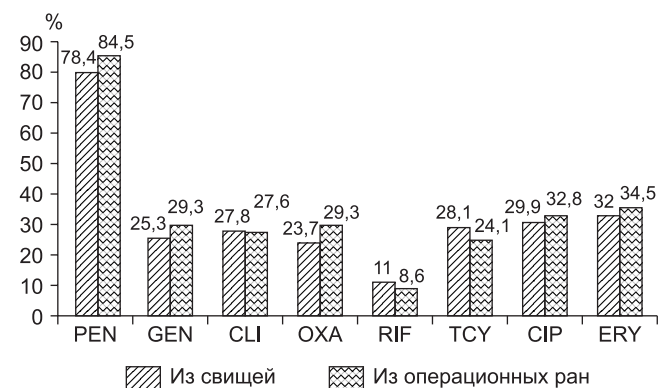


Рис. 2. Резистентность *Staphylococcus aureus* у больных с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.

Примечание: бензилпенициллин (PEN), эритромицин (ERY), тетрациклин (TCY), клиндамицин (CLI), оксациллин (OXA), гентамицин (GEN), ципрофлоксацин (CIP), рифампицин (RIF).

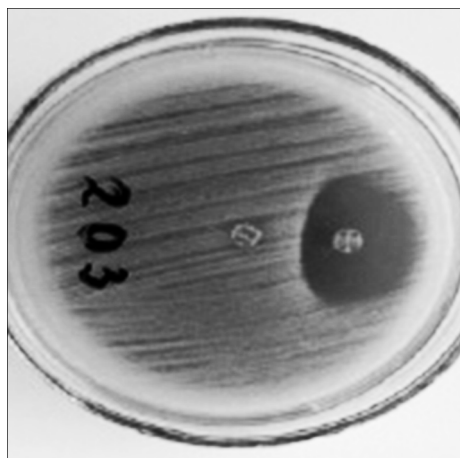


Рис. 3. Д-зона ингибирования вокруг диска с клиндамицином указывает на индуцибельный тип резистентности.

мом свищей в 17,1% случаев, в отделяемом операционных ран — в 22,5%. Неферментирующие бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Moraxella* sp.) чаще высевались из операционных ран (10,8%), чем из свищей (*P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* — 5,5%). Энтеробактерии имели одинаковый процент выявления, их видовой состав в обеих группах представлен *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*. Из отделяемого свищей выявлены *Serratia marcescens*, из операционных ран — *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*.

Антибиотикограммы клинических изолятов *S. aureus* из свищей и операционных ран представлены на рис. 2. Между клиническими штаммами *S. aureus* из свищей и операционных ран имелись незначительные различия в устойчивости к антибактериальным препаратам. Все выделенные штаммы *S. aureus* имели высокий процент резистентности к действию пенициллина (74,8% — из свищей, 84,5% — из операционных ран), низкий процент резистентности к рифампицину (11 и 8,6%, соответственно). Частота встречаемости метициллинрезистентных *S. aureus* (MRSA) составляла 23,7% из свищей и 29,3% из операционных ран. *S. aureus* сохраняет хорошую чувствительность к гентамицину, клиндамицину, эритромицину, тетрациклину, ципрофлоксацину. Резистентных к ванкомицину и линкомицину штаммов не выявлено.

Проведено определение индуцибельной резистентности к клиндамицину у 17 штаммов *S. aureus*, устойчивых к эритро-

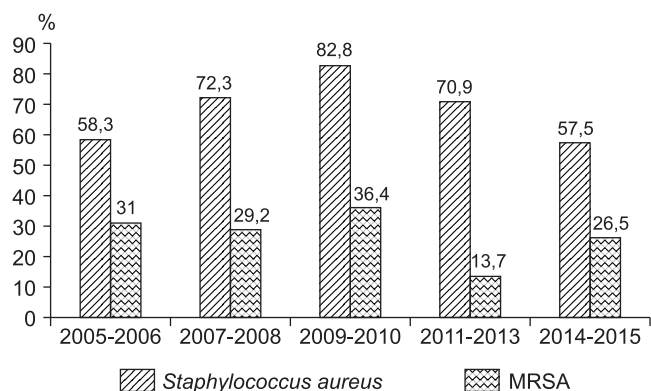


Рис. 4. Мониторинг выявления и метициллинрезистентность *Staphylococcus aureus*.

мицину и чувствительных к клиндамицину индуцибельного типа, с помощью постановки диско-диффузионного D-теста (рис. 3) [9, 10]. Индуцибельная резистентность к клиндамицину составила 22,2% у клинических изолятов из свищей и 62,5% — у изолятов из операционных ран.

С использованием коэффициента резистентности проанализированы изменения антибиотикорезистентности *S. aureus*, выделенных из отделяемого свищей и из операционных ран. Определяя коэффициент резистентности, который варьирует от 0 до 1, можно судить об относительной интегральной резистентности микроорганизма.

Средние коэффициенты показателей резистентности штаммов, выделенных из отделяемого свищей ($0,266 \pm 0,03$) и из операционных ран ($0,265 \pm 0,03$), находились практически на одном уровне. Выявлен невысокий коэффициент резистентности *S. aureus* к исследуемым препаратам, не имеющим между собой достоверных различий.

Проведен мониторинг выделения *S. aureus* из патологического материала свищей и операционных ран и его резистентности к метициллину за период 2005—2015 гг. (рис. 4).

Самый высокий процент выявленных штаммов *S. aureus* и MRSA приходится на 2009—2010 гг. В 2015 г. отмечен самый низкий процент выявления *S. aureus* при относительно высоком уровне MRSA. Мониторинг резистентности к метициллину *S. aureus* у данной категории больных в предшествующий период (1990—2000 гг.) показал, что ее уровень существенно не повысился [11].

Заключение. Как приоритетный патоген для обеих групп пациентов *S. aureus* продемонстрировал незначительные различия по частоте встречаемости и по коэффициенту резистентности. 10-летний мониторинг показал, что самое низкое выявление *S. aureus* приходится на 2015 г. — при относительно высоком уровне MRSA. Микробная обсемененность операционных ран по сравнению со свищами на 29,1% ниже, частота встречаемости MRSA на 5,6% выше. Индуцибельная резистентность к клиндамицину штаммов из операционных ран составила 62,5%, что почти в 3 раза больше, чем у штаммов из свищей.

Важную роль в хронизации остеомиелита играют грамотрицательные микроорганизмы (*E. coli*, энтеробактеры, *P. aeruginosa* и др.), частота обнаружения которых в отделяемом из операционных ран составляет 22,5%, а в отделяемом из свищей — 17,1%.

Изучение этиологической структуры хронического остеомиелита и мониторинг антибиотикорезистентности возбудителя с последующей разработкой схемы антибиотикотерапии помогут принимать обоснованные решения как при консервативном, так и при хирургическом лечении остеомиелита.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 9, 11 см. REFERENCES)

- Благун Л.А. Современные возможности antimicrobial терапии раневых инфекций мягких тканей и остеомиелита. Антибиотики и химиотерапия. 2002; 47(9): 31—6.
- Винник Ю.С., Маркелова Н.М., Шагеев А.А. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика. Сибирское медицинское обозрение. 2009; (6): 12—5.
- Гостев В.В., Науменко З.С., Маргель И.И. Антибиотикорезистентность микрофлоры ран открытых переломов (II сообщение). Травматология и ортопедия России. 2010; (1): 33—7.
- Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб.: Питер; 2001.
- Карташова О.Л., Гандыбин Е.А., Уткина Т.М., Абрамзон О.М.,

- Киргизова С.Б. Биологические свойства микроорганизмов в прогнозировании течения венозно-трофических язв нижних конечностей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009; (4): 111—4.
7. Белобородов В.Б., Митрохин С.Д. Стафилококковые инфекции. Инфекции и антимикробная терапия. 2003; 5(1): 12—8.
 8. Розова Л.В., Лапынин А.И., Ключин Н.М., Дегтярев В.Е. Микробный пейзаж при хроническом остеомиелите в условиях чрескостного остеосинтеза. Геней ортопедии. 2002; (1): 81—4.
 10. Розова Л.В., Годовых Н.В. Индуцибельный тип резистентности к клиндамицину среди стафилококков, выделенных у больных хроническим остеомиелитом. Успехи современного естествознания. 2015; (3): 70—3.

Поступила 22.04.16

REFERENCES

1. Blatun L.A. Modern possibilities of antimicrobial therapy of soft tissue wound infections and osteomyelitis. Antibiotiki i khimioterapiya. 2002; 47(9): 31—6. (in Russian)
2. Wagner C., Kondella K., Bernschneider T., Heppert V., Wentzensen A., Hänsch G.M. Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. Shock. 2003; 20(6): 503—10.
3. Vinnik Yu.S., Markelova N.M., Shageev A.A. Chronic osteomyelitis: diagnosis, treatment, and prevention. Sibirskoe meditsinskoe obozrenie. 2009; (6): 12—5. (in Russian)
4. Gostev V.V., Naumenko Z.S., Martel' I.I. Antibiotic resistance of open fracture wounds microflora (part II). Travmatologiya i ortopediya Rossii. 2010; (1): 33—7. (in Russian)
5. Gaydyshev I.P. Analysis and Processing of Data: Special Manual [Analiz i obrabotka dannykh: spetsial'nyy spravochnik]. St.Petersburg: Piter; 2001. (in Russian)
6. Kartashova O.L., Gandybin E.A., Utkina T.M., Abramzon O.M., Kirgizova S.B. The biological properties of microorganisms in predicting trophic ulcers of lower limb veins. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2009; (4): 111—4. (in Russian)
7. Beloborodov V.B., Mitrokhin S.D. Staphylococcal infections. Infektsii i antimikrobnaya terapiya. 2003; 5(1): 12—8. (in Russian)
8. Rozova L.V., Lapyunin A.I., Klyushin N.M., Degtyarev V.E. Microbial picture in chronic osteomyelitis in the conditions of transosseous osteosynthesis. Geniy ortopedii. 2002; (1): 81—4. (in Russian)
9. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
10. Rozova L.V., Godovykh N.V. Inducible type of resistance to gentamicin of staphylococci isolated from patients with chronic osteomyelitis. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2015; (3): 70—3. (in Russian)
11. Naumenko Z.S., Rozova L.V., Kliushin N.M. Dynamics of antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from chronic osteomyelitis patients. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2003; (2): 70—2.

Received 22.04.16

© МАВЗЮТОВ А.Р., МАВЗЮТОВА Г.А., 2016

УДК 616.36-002-022-078

Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А.

АЛГОРИТМЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450077, г. Уфа, Российская Федерация

Рассмотрены методы лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов. Определены подходы, обеспечивающие однозначное дифференцирование инфицированных. Представлены различные методы оценки активности инфекционного процесса. Предложен алгоритм комплексного лабораторного обследования на парентеральные вирусные гепатиты (В, С, D, G, ТТ, SEN), обеспечивающий максимально информативный минимум лабораторных исследований и позволяющий быстро и однозначно интерпретировать полученные диагностические данные.

Ключевые слова: лабораторная диагностика; вирусные гепатиты В, С, D, G, ТТ, SEN.

Для цитирования: Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А. Алгоритмы этиологической лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(10):730-732. DOI: 10.18821.0869-2084-2016-61-10-730-732.

Mavzyutov A.R., Mavzyutova G.A.

THE ALGORITHMS OF ETIOLOGIC LABORATORY DIAGNOSTIC OF PARENTERAL VIRAL HEPATITIS

The Bashkirskii state medical university of Minzdrav of Russia, 450077 Ufa, Russia

The article considers methods of laboratory diagnostic of parenteral viral hepatitis. The approaches ensuring single-valued differentiation of infected patients are determined. The various methods of evaluation of activity of infection process are presented. The algorithm of complex laboratory analysis concerning presence of parenteral viral hepatitis (B, C, D, G, TT, SEN) was proposed to ensure maximal informative minimum of laboratory analyses permitting fast and single-valued interpretation of received diagnostic data.

Key words: laboratory diagnostic; viral hepatitis B, C, D, G, TT, SEN/.

For citation: Mavzyutov A.R., Mavzyutova G.A. The algorithms of etiologic laboratory diagnostic of parenteral viral hepatitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (10): 730-732. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-730-732.

Для корреспонденции: Мавзютов Айрат Радикович, д-р мед. наук, зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, проф. каф. лабораторной диагностики ИДПО ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, e-mail: ufalab@mail.ru

Information about authors:

Mavzyutov A.R. — orcid.org/0000-0001-5943-1882

Mavzyutova G.A. — orcid.org/0000-0003-2098-1435

For correspondence: Mavzyutov A.R., doctor of medical sciences, professor, head of the chair of fundamental and applied microbiology, professor, of the chair of laboratory diagnostic, e-mail: ufalab@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 04.05.2016

Accepted 15.05.2016

Актуальность вирусных гепатитов в настоящее время очевидна и практически не нуждается в дополнительной аргументации. Противоэпидемические мероприятия, направленные на профилактику указанных инфекций, реализуются на государственном уровне в соответствии с федеральным законодательством [1] и регламентированы рядом специальных документов [2]. Общее количество публикаций в РИНЦ, посвященных различным аспектам проблемы вирусных гепатитов, только за последние 5 лет достигло 2186. Методологическая база для ранней диагностики вирусных гепатитов более чем внушительна [3]. Однако прогнозы по заболеваемости и смертности от парентеральных вирусных гепатитов на ближайшее десятилетие неутешительны [4].

Вместе с тем в настоящее время в стране созданы практически все условия для существенного улучшения ситуации с ранней диагностикой парентеральных вирусных гепатитов, и прежде всего на уровне поликлинического звена оказания медицинской помощи. Для этого достаточно систематизации накопленных знаний и формирования единого алгоритма этиологической диагностики данной группы заболеваний, которые могут составить основу соответствующих протоколов обследования.

Логику такого алгоритма определяет идеология поэтапного сужения круга поиска изначально неизвестной причины заболевания, которая включает следующие смысловые стадии диагностического процесса:

1. «Гепатит?»
2. «Гепатит вирусный?»
3. «Гепатит вирусный активный?»

Крайне важным для практического применения предлагаемого алгоритма является единая трактовка используемых при этом понятий. В частности:

Таблица 1

Наиболее информативные маркеры для лабораторий, имеющих в своем арсенале как ИФА, так и ПЦР

Заболевание	2-й этап — инфицированность ИФА	3-й этап — активность ПЦР
Вирусный гепатит В	anti-HBe IgG anti-HBc IgG	ДНК
Вирусный гепатит С	anti-HCV IgG	РНК
Вирусный гепатит D	anti-HDV IgG	РНК
Вирусный гепатит G	суммарные anti-HGV (IgG, IgM)	РНК
Вирусный гепатит TT	Валидированные тест-системы отсутствуют	ДНК
Вирусный гепатит SEN	Валидированные тест-системы отсутствуют	ДНК

Примечание. anti-HBe IgG — антитела к HBe-антигену вируса гепатита В; anti-HBc IgG — антитела к HBc-антигену вируса гепатита В; anti-HCV IgG — антитела к вирусу гепатита С (скрининг, подтверждение); anti-HDV IgG — антитела к вирусу гепатита D; суммарные anti-HGV — антитела к вирусу гепатита G.

• «гепатит» — воспалительная патология печени *вне зависимости от этиологии*;

• «вирусный гепатит» (син. «инфицированность») — воспалительная патология печени *лабораторно верифицированной вирусной природы*;

○ «активный вирусный гепатит» (син. «рецидив основного заболевания инфицированного») — воспалительная патология печени, обусловленная репродукцией вируса и сопровождающаяся *лабораторно верифицированной вирусемией*;

○ «неактивный вирусный гепатит» (син. «ремиссия основного заболевания инфицированного») — состояние инфицированного вирусом человека *вне лабораторно верифицированной репродукции вируса и воспалительной активности в печени*.

На первом диагностическом этапе (**1. «Гепатит?»**) для оценки вероятности вирусных гепатитов и степени заинтересованности гепатобилиарной системы учитываются эпидемиологические (переливание цельной крови/плазмы, гемодиализ и др.), клинические (синдромы: астеновегетативный, мезенхимально-воспалительный и др.), лабораторные (уровни сывороточных трансаминаз и др.) и инструментальные (УЗИ печени и др.) данные.

Наличие предварительных данных в пользу гепатита и его эпидемиологически возможной вирусной природы является основанием для установления факта инфицированности

Таблица 2

Наиболее информативные маркеры для ИФА-лабораторий

Заболевание	2-й этап — инфицированность ИФА	3-й этап — активность ИФА
Вирусный гепатит В	anti-HBe IgG anti-HBc IgG	HBsAg или HBeAg или anti-HBc IgM
Вирусный гепатит С	anti-HCV IgG	anti-HCV IgG к неструктурным белкам anti-HCV IgM
Вирусный гепатит D	anti-HDV IgG	HDV Ag
Вирусный гепатит G	суммарные anti-HGV (IgG, IgM)	Валидированные тест-системы отсутствуют
Вирусный гепатит TT	Валидированные тест-системы отсутствуют	Валидированные тест-системы отсутствуют
Вирусный гепатит SEN	Валидированные тест-системы отсутствуют	Валидированные тест-системы отсутствуют

Примечание. anti-HBe IgG — антитела к HBe-антигену вируса гепатита В; HBsAg, HBeAg — антигены вируса гепатита В; anti-HBc IgG/anti-HBc IgM — антитела к HBc-антигену вируса гепатита В; anti-HCV IgG/anti-HCV IgM — антитела к вирусу гепатита С; anti-HDV IgG — антитела к вирусу гепатита D; HDV Ag — антиген вируса гепатита D; суммарные anti-HGV — антитела к вирусу гепатита G.

тем или иным вирусом парентерального гепатита (2-й этап, «Вирусный гепатит (В, С, D, G, ТТ или SEN)»).

На втором диагностическом этапе (2. «Гепатит вирусный?») оптимальным и совершенно достаточным является однократное обнаружение в сыворотке крови обследуемого специфических иммуноглобулинов (Ig) класса G или суммарных иммуноглобулинов (IgG, IgM) иммуноферментным методом (за исключением вирусных гепатитов ТТ и SEN). Достоверность результата подтверждается более чем 3-кратным превышением порогового значения оптической плотности (коэффициент позитивности КП более 3). Выявление на данном этапе иммуноглобулинов класса M нецелесообразно ввиду их низкой аффинности (специфичности) на фоне высокой авидности, что сводит на нет их лабораторное значение в качестве видоспецифичных маркеров инфицированности. Общепринятое мнение о том, что IgM являются самыми ранними маркерами инфицированности, трудно признать верным, поскольку не учитывается инкубационный период заболевания, продолжительность которого — например, при гепатите В, — может достигать 6 мес. В этой связи маловероятна ситуация, когда находящийся в организме инфицированного вирус на протяжении полугодия не инициирует поликлональной активации иммунокомпетентных клеток, в том числе продуцирующих специфические IgG.

На 3-м диагностическом этапе (3. «Гепатит вирусный активный?») у инфицированных оценивается активность вирусного гепатита, которая определяется репродукцией вируса и обязательно сопровождается вирусемией. Наиболее информативным способом обнаружения вирусемии является детекция вируса в плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обязательным условием такого исследования является использование плазмы с ЭДТА [5, 6]. На данном этапе информативность выявления вирусных антигенов в сыворотке крови инфицированного иммуноферментным методом достаточна высока, что также служит безусловным подтверждением вирусемии. Косвенным свидетельством репродукции вируса и активности вирусного гепатита является обнаружение IgM, которые ввиду их низкой специфичности целесообразнее рассматривать в качестве белков острой фазы, аналогичных С-реактивному белку.

Решение задач, определяющих этапность обследования, зависит от инструментальных возможностей диагностической лаборатории и соответственно выявляемых маркеров инфицированности и активности. Перечень лабораторных анализов, обязательных для полноценной лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в лабораториях, имеющих в своем арсенале как ИФА, так и ПЦР, приведен в табл. 1, а в лабораториях, располагающих лишь ИФА, — в табл. 2. Другие иммунологические методы не рассматриваются в связи с технологическими ограничениями (чувствительность, специфичность).

Безусловно, на практике предложенный алгоритм существенно увеличивает продолжительность исследования, хотя на то есть ряд весомых оснований. В частности, пациентам с впервые диагностированными парентеральными вирусными гепатитами крайне необходимо определенное время для психологической адаптации, «привыкания к мысли» о том, что в ближайшем будущем серьезно изменится вся система межличностных взаимоотношений в семье и т.д. Практика

показывает, что в первый момент в таких ситуациях слова врача служат слабым утешением для инфицированного, от желания которого участвовать в процессе реабилитации зависит очень многое, вплоть до эффективности противоэпидемических мероприятий и рисков инфицирования для окружающих.

Вне зависимости от вышесказанного даже в случае одноэтапного комплексного лабораторного обследования на парентеральные вирусные гепатиты предложенный алгоритм позволяет быстро и однозначно интерпретировать полученные диагностические данные и обеспечивает максимально информативный минимум лабораторных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения. М.; 1999.
2. Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1/3.2. 3146—13 (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 16 декабря 2013 года N 65). М.; 2013.
3. Яковлев А.А., Комарова А.Я., Мусатов В.Б., Цинзерлинг В.А., Карнаухов Е.В. Хронические вирусные гепатиты и их исходы: что нас ждет в ближайшее десятилетие. Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2015; (2): 13—21.
4. Подымова С.Д. Парентеральные острые вирусные гепатиты: современная диагностика, профилактика и лечение. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012; (6): 76—85.
5. Мавзютов А.Р., Бондаренко В.М., Латкин А.Т. Ингибиторы полимеразной цепной реакции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003; (3): 93—8.
6. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них. Биомика. 2012; 4(1): 31—47.

Поступила 04.05.16

REFERENCES

1. The federal law from 30.03.1999 N 52-FZ. On the sanitary-epidemiological welfare of population. Moscow; 1999. (in Russian)
2. General requirements for the prevention of infectious and parasitic diseases. Sanitary rules SP 3.1/3.2.3146—13 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of 16 December 2013 № 65). Moscow; 2013. (in Russian)
3. Yakovlev A.A., Komarova A.Ya., Musatov V.B., Tsinzerling V.A., Karnaukhov E.V. Chronic viral hepatitis and their outcomes: what awaits us in the next decade. Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii. 2015; (2): 13—21. (in Russian)
4. Podymova S.D. Parenteral acute viral hepatitis: modern diagnostics, prevention and treatment. Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2012; (6): 76—85. (in Russian)
5. Mavzyutov A.R., Bondarenko V.M., Latkin A.T. Inhibitors of polymerase chain reaction. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2003; (3): 93—8.
6. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and to prevent some of them. Biomika. 2012; 4(1): 31—47. (in Russian)

Received 04.05.16