

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.

# Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66  
1 • 2021

## 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

ЯНВАРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**

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

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

**Зав. редакцией Л.А. Шанкина**

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

Художественный редактор  
*Е.М. Архилова*

Сдано в набор 10.01.2021.  
Подписано в печать 25.01.2021.  
Формат 60 × 88½.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 8,00  
Уч.-изд. л. 9,67.

**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 Micrology, 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.

**Индекс 71442 — для подписчиков**

**Подписка через Интернет: [www.aks.ru](http://www.aks.ru),  
[www.pressa-rt.ru](http://www.pressa-rt.ru)**  
**Подписка на электронную версию:  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru)**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2021. № 1. 1–64.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ**

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), 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 (*Кишинёв*), 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*), 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*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 66  
1 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JANUARY

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:**  
**Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:  
8-495-430-03-63,  
E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

**Managing editor L.A. Shankina**

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV**

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY, V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA (executive editor), 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*), 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*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОХИМИЯ

*Булгакова С.В., Тренева Е.В., Захарова Н.О.*

Гиповитаминоз D у пожилых: связь с саркопенией и деменцией (обзор литературы) . . . . . 5

*Молодовская И.Н.*

Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы у здоровых мужчин с разным адаптационным потенциалом . . . . . 10

### ГЕМАТОЛОГИЯ

*Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Сытов А.В.*

Морфологические и функциональные особенности нейтрофилов периферической крови у онкологических больных с сепсисом в раннем послеоперационном периоде (обзор литературы и результаты собственных исследований) . . . . . 15

*Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Белов А.А., Петров В.А.*

Диагностические возможности анализа эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии . . . . . 22

*Кузьменко Г.Н., Харламова Н.В., Назаров С.Б., Матвеева Е.А., Иваненкова Ю.А.*

Возможности современного клинического анализа крови для оценки эритропоэза у глубоко недоношенных новорожденных . . . . . 26

### КОАГУЛОЛОГИЯ

*Огуркова О.Н., Сулова Т.Е., Баталов Р.Е.*

Исследование спонтанной и стимулированной агрегации тромбоцитов у пациентов с разными типами фибрилляции предсердий . . . . . 35

### МИКРОБИОЛОГИЯ

*Гординская Н.А., Борискина Е.В., Кряжев Д.В.*

Видовое разнообразие и антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных у детей первого месяца жизни в детских стационарах Нижнего Новгорода . . . . . 42

*Червинец В.М., Червинец Ю.В., Леонтьева А. В., Козлова Е. А., Стулов Н. М., Беляев В. С., Григорьянц Э. О., Миронов А. Ю.*

Микробиом полости рта у больных пародонтитом, адгезивные и биоплёнкообразующие свойства . . . . . 45

### ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

*Пименова А. С., Борисова А. Б., Гадуа Н. Т., Борисова О. Ю., Афанасьев С. С., Петрова М. С., Афанасьев М. С.,*

*Миронов А. Ю., Алёшкин В. А.*

Применение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в Российской Федерации . . . . . 52

### КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю. В., Тотолян Арег А.*

Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени . . . . . 59

---

## CONTENTS

### BIOCHEMISTRY

- Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O.*  
Hypovitaminosis D in the elderly: relationship with sarcopenia and dementia ( review of literature) ..... 5
- Molodovskaya I.N.*  
Functional state of the hypothalamus-pituitary-gonad axis in healthy men with various adaptation potential ..... 10

### HEMATOLOGY

- Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Sytov A.V.*  
Morphological and functional features of peripheral blood neutrophils in oncologic patients with sepsis in the early postoperative period (review of literature and results of ownership) ..... 15
- Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S. , Belov A.A. , Petrov V.A.*  
Diagnostics possibilities of erythrocytes analysis by the method of laser interference microscopy. .... 22
- Kuzmenko G.N., Kharlamova N.V., Nazarov S.B., Matveeva E.A, Ivanenkova Yu.A.*  
Features of modern clinical research blood analysis in the assessment of erythropoiesis in deep-premature newborns. .... 26

### COAGULOGY

- Ogurkova O.N., Suslova T.E., Batalov R.E.*  
Research of spontaneous and stimulated aggregation of platelets in patients with different types of atrial fibrillation ..... 35

### MICROBIOLOGY

- Gordinskaya N.A., Boriskina E. V., Kryazhev D.V.*  
Species diversity and antibiotic resistance of staphylococci, allocated in children of the first month of life in children's hospitals Nizhny Novgorod. .... 42
- Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Leonteva A.V., Kozlova E.A. , Stulov N.M., Belyaev V.S., Grigoryants E.O., Mironov A.Yu.*  
The microbiome of oral cavity patients with periodontitis, adhesive and biofilm forming properties ..... 45

### ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

- Pimenova A. S., Borisova A. B., Gadua N. T., Borisova O. Yu., Afanasiev S. S., Petrova M. S., Afanasiev M. S., Mironov A. Yu., Aleshkin V. A.*  
PCR-based diagnosis of whooping cough in the Russian Federation. .... 52

### CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Serikova E.N., Semenov A. V. , Ostankova Yu. V., Totolian Areg A.*  
Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. .... 59

## БИОХИМИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Булгакова С.В., Тренева Е.В., Захарова Н.О.

### ГИПОВИТАМИНОЗ D У ПОЖИЛЫХ: СВЯЗЬ С САРКОПЕНИЕЙ И ДЕМЕНЦИЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

*Рост численности в мировой популяции людей пожилого и старческого возраста провоцирует интерес к процессам и механизмам, ведущим к старению и возраст-ассоциированным заболеваниям. Гиповитаминоз D распространен у гериатрических пациентов и предложен рядом авторов в качестве причины таких заболеваний, как деменция и саркопения. Данный обзор литературы посвящен анализу роли витамина D в развитии вышеуказанных заболеваний, их профилактике и лечению.*

Ключевые слова: витамин D; головной мозг; саркопения; деменция; старение, обзор.

**Для цитирования:** Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О. Гиповитаминоз D у пожилых: связь с саркопенией и деменцией (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (1): 5-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-5-9>

*Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O.*

HYPOVITAMINOSIS D IN THE ELDERLY: RELATIONSHIP WITH SARCOPENIA AND DEMENTIA  
(REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

*The growth in the world population of elderly and senile people provokes interest in the processes and mechanisms leading to aging and age-associated diseases. Hypovitaminosis D is common in geriatric patients and has been suggested by a number of authors as a cause of diseases such as dementia and sarcopenia. This literature review is devoted to the analysis of the role of vitamin D in the development of the above diseases, their prevention and treatment.*

Key words: vitamin D; brain; sarcopenia; dementia; aging; review.

**For citation:** Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O. Hypovitaminosis D in the elderly: relationship with sarcopenia and dementia (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 5-9. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-5-9>

**For correspondence:** Treneva E.V., Ph.D. (Medicine), assistant of professor of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: [eka1006@yandex.ru](mailto:eka1006@yandex.ru)

#### Information about authors:

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>;

Treneva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-0097-7252>;

Zakharova N.O., <http://orcid.org/0000-0001-7501-830X>.

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

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

Received 28.08.2020

Accepted 25.11.2020

Ввиду увеличения ожидаемой продолжительности жизни, старение и приводящие к нему механизмы, стали центральной проблемой научных исследований. Наряду с физиологическими изменениями, вызванными старением, существуют и патологические, увеличивающие риск развития заболеваний, инвалидности и смерти.

В процессе старения все органы и системы физиологически снижают свои функции. Поддержание здоровья в пожилом и старческом возрасте является одной из важнейших задач современной медицины. Среди хронических состояний, серьезно влияющих на качество жизни

ни пациентов, наиболее частыми являются заболевания, нарушающие подвижность и когнитивные функции, а именно саркопения и деменция, входящие в синдром старческой астении (ССА) [1-3]. В связи с этим, выявление факторов риска, ведущих к «здоровому» или «патологическому (хрупкому)» старению, имеет основополагающее значение для понимания физиопатологических механизмов, приводящих к ССА и разработки профилактических и лечебно-диагностических мероприятий.

Термин «саркопения» характеризуется снижением как мышечной массы, так и мышечной силы («динапе-

**Для корреспонденции:** Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, доц. каф. гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: [eka1006@yandex.ru](mailto:eka1006@yandex.ru)

ния»), что приводит к ухудшению физической работоспособности [2]. В литературе представлены различные диагностические критерии саркопении. Тем не менее, одним из наиболее часто используемых в клинической практике критериев диагностики является алгоритм, разработанный Европейской рабочей группой по саркопении у пожилых людей (EWGSOP) [4].

Согласно данным EWGSOP, предполагаемая распространенность саркопении у пожилых людей мировой популяции составляет 10–40% [5]. Ожидается, что, из-за увеличения продолжительности жизни, число пациентов с саркопенией вырастет до более чем 200 миллионов в следующие 40 лет [6].

Саркопения снижает качество жизни лиц пожилого и старческого возраста и увеличивает расходы на здравоохранение [2]. В связи с чем, правильная идентификация факторов риска, приводящих к данной патологии, важна для выявления этих пациентов и организации профилактических мероприятий.

Кроме того, у людей гериатрического возраста отмечен рост распространенности когнитивных нарушений [3]. Наиболее частой формой деменции является болезнь Альцгеймера (БА). Во Всемирном отчете по болезни Альцгеймера за 2018 г. говорится о том, что почти 50 млн человек во всем мире страдают деменцией, а в эпидемиологическом прогнозе ожидается, что к 2050 г. эти цифры возрастут до 152 миллионов [7].

Гиповитаминоз D широко распространен среди лиц пожилого и старческого возраста и был предложен в качестве одного из причинных механизмов развития саркопении и деменции [6]. Тем не менее, диагностические критерии определения уровня витамина D, как низкого, неодинаковы у различных научных обществ и стран. Большинство ученых и клиницистов считает адекватным уровень витамина D выше 75 нмоль/л [6]. В Российской Федерации выраженным дефицитом витамина D принято считать при показателях менее 10 нг/мл (менее 25 нмоль/л), дефицитом витамина D – 10–20 нг/мл (25–50 нмоль/л), недостаточностью витамина D – 20–30 нг/мл (50–75 нмоль/л), адекватными уровнями витамина D – 30 нг/мл и более (75 нмоль/л и более) [8].

Метаболизм витамина D регулируется кожей, печенью и почками. Роль солнечного света в этом процессе играет важную роль, так как на выработку витамина D<sub>3</sub> в коже, вызванную ультрафиолетовым излучением (UVB), приходится 80–90%, тогда как с пищей (жирная рыба, яйца, обогащенное молоко и растительные продукты) поступает лишь 10–20% витамина D<sub>3</sub> от его суточной потребности. UVB превращает 7-дегидрохолестерин в превитамин D, который затем переходит в холекальциферол (или витамин D<sub>3</sub>). Холекальциферол впоследствии связывается с витамином D-связывающим глобулином, и этот комплекс транспортируется в печень, где гидроксигируется в 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> (или 25(OH) витамин D) – основную циркулирующую форму. 25(OH) витамин D подвергается окончательному гидроксигированию в проксимальных канальцах почки с образованием 1,25 дигидроксивитамина D<sub>3</sub> или кальцитриола, биологически активной формы. Кальцитриол взаимодействует с рецепторами витамина D (VDR) в ядрах клеток с последующей активацией кальциевых каналов [9].

Синтез витамина D зависит от ряда факторов таких, как воздействие солнечного света, применение солнцезащитного крема, пигментация кожи, функция почек и

печени. У людей пожилого и старческого возраста гиповитаминоз D обусловлен снижением способности кожи синтезировать холекальциферол из его предшественника 7-дегидрохолестерина и низкой экспрессией VDR, что играет взаимно отягощающую роль [6]. В связи с этим, статус витамина D в этой группе населения и возможность его влияния на развитие возраст-ассоциированных заболеваний, являются актуальными для исследований. Данный обзор литературы посвящен анализу взаимосвязи гиповитаминоза D и развитием саркопении и когнитивных нарушений у лиц старших возрастных групп.

**Витамин D и мышечная ткань.** VDR экспрессируются в мышечных волокнах человека, особенно на ранних стадиях их развития, и снижаются при созревании. *In vitro* было продемонстрировано, что витамин D играет важную роль в развитии мышечной ткани, поскольку миобласты могут дифференцироваться в миоциты благодаря сигналу, поступающему с VDR. Помимо геномных эффектов, витамин D обладает негеномными эффектами, играющими непосредственную роль в сокращении мышц, в связи с его участием в регуляции работы мембранных кальциевых каналов [10]. Так, витамин D, в зависимости от своего уровня, увеличивает приток кальция в цитоплазму мышечных клеток в течение нескольких минут [11] путем активации двух киназ, а именно c-Src и PI3K [12]. Активация PI3K приводит к повышению уровня инозитолтрифосфата (IP3) и диацилглицерина (DAG). IP3 индуцирует вытеснение кальция из саркоплазмы, в то время как DAG в цитозоле, наряду с кальцием, является ключевым компонентом активации протеинкиназы C (PKC). PKC взаимодействует с кальциевыми каналами, расположенными на клеточной мембране, приводя к большему притоку кальция в цитозоль. Кальций связывается с комплексом тропонин-тропомиозин, что вызывает сокращение мышечных клеток [13].

Влияние витамина D на мышечную ткань подтвердили экспериментальные модели мышей, нокаутированные по VDR. Так, у нулевых VDR мышей мышечная масса уменьшается, а волокна имеют меньший диаметр по сравнению с однопометными животными дикого типа [14].

Кроме того, развитие мышечной ткани нарушено у VDR нулевых мышей. Эти мышцы экспрессируют транскрипционные факторы, характерные для ранней стадии развития мышечных волокон, такие как *myf5*, *E2A* и *миогенин* в течение более длительного периода, что позволяет предположить, что VDR является ключевым фактором правильного роста и созревания мышечных клеток. Кроме того, действие витамина D на развитие мышечной ткани не зависит от его влияния на уровень кальция в крови, что было продемонстрировано у нулевых по VDR мышей с нормальным содержанием кальция в крови [14].

Помимо участия в развитии мышечной ткани, витамину D отводится роль в контроле мышечной атрофии. Так, витамин D участвует в деградации мышечного белка посредством контроля АТФ-убиквитин-зависимой системы. У крыс было продемонстрировано значительное увеличение убиквитинирования белка при дефиците витамина D [15].

У людей роль витамина D в нормальном функционировании мышечной ткани подтверждается рядом исследований. Так, С.М. Giris и соавт. [16] показали, что

у пациентов с мутациями VDR или тяжелой недостаточностью витамина D наблюдаются генерализованная мышечная атрофия и мышечная недостаточность, которые появляются даже до изменений костного метаболизма. Ряд авторов обнаружили, что в более старшем возрасте дефицит витамина D тесно связан со снижением мышечной массы и функции, что позволяет предположить роль гиповитаминоза D в развитии саркопении [17, 18]. Исследование с участием более 4000 лиц пожилого возраста показало, что у пациентов с уровнем витамина D ниже, чем 30 нмоль/л имеются более вероятные нарушения мышечной функции со снижением физической работоспособности и мышечной силы, но без повышенного риска падений [19]. D.K. Houston и соавт. [20] в исследовании *Invecchiare in Chianti (InCHIANTI)* с участием 966 человек (средний возраст 75 лет) показали достоверную связь между уровнем витамина D, мышечной силой (определена с помощью динамометрии) и физической активностью (оценена с использованием теста *timed up and go*, тестов на равновесие). У лиц с уровнем витамина D в сыворотке крови ниже 25 нмоль/л, показатели физической активности были ниже, чем у лиц с уровнем выше 25 нмоль/л. Мышечная сила по данным динамометрии была также значительно выше у пациентов с уровнем витамина D выше 50 нмоль/л, чем у пациентов с уровнем ниже этого порога [20].

Исследование *Progetto Veneto Anziani (Pro. VA)* с участием 2694 пожилых пациентов, из которых 1597 женщин и 1097 мужчин, средний возраст 74 года, показало, что у 40% женщин и 20% мужчин уровень витамина D в сыворотке крови был ниже 50 нмоль/л, который ассоциировался с низкой скоростью ходьбы и мышечной силой независимо от пола [21].

Доказано, что повышенная мышечная атрофия, связанная с дефицитом витамина D, характеризуется снижением толерантности к физической нагрузке, нарушением морфологии мышечной ткани, что проявляется в низкой площади поперечного сечения мышечных волокон и нарушении сокращения быстрых волокон [22].

В связи с тем, что экспрессия VDR увеличивается после мышечного повреждения, было высказано предположение о том, что витамин D может играть роль в регенерации мышечной ткани, что особенно важно у пациентов с саркопенией [16].

Таким образом, приведенные выше данные убедительно доказывают исключительно важную роль витамина D в нормальном функционировании мышечной ткани.

Тем не менее, роль препаратов витамина D в восстановлении мышечной массы и функций еще предстоит доказать. Мета-анализ и систематические обзоры литературы позволили обнаружить лишь незначительное, часто статистически не значимое, улучшение мышечной силы при добавлении витамина D, совместно с препаратами кальция и физическими упражнениями [23].

Анализ рандомизированных, плацебо-контролируемых клинических исследований показал значительную гетерогенность пациентов, исходных уровней витамина D, доз препаратов витамина D и методов, используемых для измерения мышечной силы и массы, что затрудняет сравнение научных работ. Хотя возрастное население само по себе является очень разнородной группой, более точный отбор лиц для исследования позволит выяснить роль препаратов витамина D в профилактике и лечении саркопении у лиц пожилого и старческого возраста.

Более того, в ряде исследований были высказаны предположения, свидетельствующие о том, что введение большого болюса холекальциферола в прерывистом режиме (150 000 МЕ каждые 3 месяца) не только не предотвращает падения, но, напротив, повышает их риск, а также является неэффективным для улучшения минеральной плотности костной ткани и ее метаболизма [24, 25]. Данные факты можно объяснить тем, что люди, включенные в эти исследования, были без гиповитаминоза D и получали лечение в дозах, значительно превышающих рекомендованные в стандартах [26]. Следовательно, из этих работ можно сделать выводы о том, что большие дозы витамина D, вводимые без показаний, могут нанести вред.

Роль кальция в мышечных сокращениях сомнения не вызывает. Тем не менее, рандомизированные клинические исследования не показали влияния препаратов кальция на мышечную силу у молодых спортсменов женского и мужского пола [27]. Кроме того, у пожилых женщин прием йогуртов, обогащенных витамином D (200 МЕ) и кальцием (400 мг), два раза в день, не увеличивал скорость ходьбы [28].

**Витамин D и когнитивные функции.** Доказательства того, что VDR также экспрессируется в центральной нервной системе (ЦНС) и ЦНС сама способна синтезировать кальцитриол благодаря экспрессии 25-гидроксилазы и 1 $\alpha$ -гидроксилазы, выдвинули предположение о том, что витамин D может играть роль в сохранении и улучшении когнитивных функций [29].

Крысы с БА и низким уровнем витамина D теряли свои когнитивные способности быстрее, чем группа контроля. Более того, у мышей с низким уровнем витамина D увеличивается выработка амилоида- $\beta$  (A $\beta$ ), образование амилоидных бляшек, как это обычно наблюдается у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера [30]. У трансгенных мышей, которые самопроизвольно накапливают A $\beta$  и страдают БА, диета с дополнительным включением холекальциферола, способна уменьшить образование амилоидных бляшек за счет усиления клиренса амилоида и таким образом улучшить когнитивные функции [31].

Механизмы, с помощью которых витамин D уменьшает накопление A $\beta$  и образование амилоидных бляшек, не совсем ясны. Было высказано предположение о том, что витамин D увеличивает клиренс A $\beta$  через гематоэнцефалический барьер, увеличивая его отток от головного мозга, как при геномном, так и при негеномном действии [32]. Более того, на культурах корковых нейронов *in vitro* показано, что витамин D непосредственно участвует в продукции A $\beta$  и может подавлять его экспрессию. Ряд генов, играющих роль в патогенезе БА, содержат в своих последовательностях элемент, отвечающий на витамин D [33]. Эти гены не активируются, если дефицит витамина D возникает во время роста [34]. Тем не менее, не было доказано, что гиповитаминоз D во время роста может влиять на когнитивные способности во взрослой жизни [6].

Несмотря на данные, полученные *in vitro* и на животных моделях, влияние витамина D на когнитивные функции остается до конца не ясным. Предполагается, что эта взаимосвязь сложна и опосредована через взаимодействие витамина D с другими гормонами, такими, как эстроген и инсулин [31]. Транскриптомный анализ неокортекса у мышей, здоровых и больных БА, показал, что лечение витамином D влияет на процессы воспали-

ния, иммунный ответ, нейротрансмиссию, сосудистые и гормональные изменения, что свидетельствует о плейотропных эффектах витамина D [31].

Ряд исследований показал, что более низкие уровни витамина D связаны с ухудшением когнитивных функций у пациентов, страдающих когнитивными нарушениями [32, 33]. Кроме того, у пожилых людей, предъявляющих жалобы на дефицит памяти без диагноза деменции, гиповитаминоз D был связан с более низкой умственной гибкостью [34]. С другой стороны, J. Maddock и соавт. [35] не выявили никаких доказательств того, что гиповитаминоз D может быть причиной когнитивного дефицита в среднем или более позднем возрасте.

Тем не менее, из-за гетерогенности анализируемых групп и используемых методов оценки когнитивных функций сложно провести сравнительный анализ исследований.

Данные о взаимосвязи витамина D и когнитивных функций, полученные в исследованиях на животных и людях, спровоцировали интерес к анализу возможности применения препаратов витамина D для предотвращения снижения когнитивных функций. Тем не менее, результаты различных научных работ трудно сравнивать в связи с тем, что используемые протоколы исследований (группы пациентов, препараты витамина D, схемы лечения от одной дозы до 18 недель) в значительной степени разнородны, не дают четкого представления о роли витамина D в патогенезе и лечении деменции Так, J.K. Dhese и соавт. [36] использовали эргокальциферол в качестве одной внутримышечной инъекции 600 000 МЕ, R. Przybelski и соавт. [37] применяли пероральный эргокальциферол по 50 000 МЕ три раза в неделю в течение четырех недель, A.J. Dean и соавт. [38] – пероральный холекальциферол по 5000 МЕ ежедневно, тогда как J.A. Pettersen и соавт. [39] использовали пероральный холекальциферол в двух разных дозах 4000 МЕ и 400 МЕ ежедневно в течение 18 недель. Кроме того, численность, возрастной состав (пожилые и молодые), социальный статус (проживающие дома в семье и в домах престарелых) групп были разными. Статус витамина D у людей, включенных в исследование, также отличался: в исследовании J.K.Dhese и соавт. [36] пациенты были только с дефицитом витамина D, в то время как в других работах – с дефицитом и без [37, 38]. Кроме того, дизайн исследований различен: так, в двух работах использовалась плацебо-контролируемая группа [36, 38], а в других – нет [37, 39].

A.M. Goodwill и соавт. [40] в систематическом обзоре отметили, что у 314 пациентов не обнаружено значительных улучшений когнитивных функций на фоне приема витамина D. С другой стороны, исследование J.A. Pettersen и соавт. [39] показало эффект высоких доз холекальциферола (4000 МЕ/сут) для улучшения зрительной памяти у пожилых с низким уровнем витамина D.

Кроме того, рандомизированное плацебо-контролируемое клиническое исследование применения витамина D вместе с кальцием у здоровых пожилых женщин показало, что йогурты, обогащенные низкими дозами витамина D (200 МЕ) и кальция (400 мг), съедаемые два раза в день, помогают в поддержании когнитивных функций [28].

Таким образом, хотя витамин D может играть роль в развитии мозга и в поддержании когнитивных функций, данных, полученных в ходе интервенционных исследований, недостаточно для указания того, что прием

витамина D, даже в высоких дозах, может быть полезен для пациентов с нарушением когнитивных функций. Данные о совместном применении препаратов кальция и витамина D недостаточны для включения в рекомендации. Необходимы дальнейшие исследования.

Прогрессивное увеличение продолжительности жизни связано с постоянным увеличением числа возраст-ассоциированных заболеваний, оказывающих большое влияние на качество жизни пациентов и постоянно увеличивающиеся расходы системы здравоохранения. Гиповитаминоз D связан со старением и с возраст-ассоциированными заболеваниями. Несмотря на то, что четкий патогенетический механизм все еще до конца не ясен, связь между низким уровнем витамина D и саркопенией и деменцией в настоящее время бесспорна. Тем не менее, имеющихся исследований недостаточно, чтобы рекомендовать витамин D для лечения этих двух заболеваний.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (pp. 1, 4-7, 9-40 см. REFERENCES)

2. Булгакова С.В., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Труханова И.Г., Нестеренко С.А., Лебедева Е.А. Саркопения: многокомпонентная стратегия диагностики и терапии (обзор литературы). *Успехи геронтологии*. 2019; 32 (3): 405-14.
3. Романчук Н.П., Пятин В.Ф., Волобуев А.Н., Булгакова С.В., Тренева Е.В., Романов Д.В. Мозг, депрессия, эпигенетика: новые данные. *Бюллетень науки и практики*. 2020; 6 (5): 163-83.
8. Пигарова Е.А., Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е., Дзеранова Л.К., Каронова Т.Л., Ильин А.В. и др. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике, лечению и профилактике дефицита витамина D у взрослых. *Проблемы эндокринологии*. 2016; 62(4): 60-84.

#### REFERENCES

1. Ruan Q., Yu Z., Chen M., Bao Z., Li J., He W. Cognitive frailty, a novel target for the prevention of elderly dependency. *Ageing Res. Rev.* 2015; 20: 1–10.
2. Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Trukhanova I.G., Nesterenko S.A., Lebedeva E.A. Sarcopenia: a multi-component strategy for diagnosis and therapy (literature review). *Uspekhi gerontologii*. 2019; 32(3): 405-14. (in Russian)
3. Romanchuk N.P., Pyatin V.F., Volobuev A.N., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Romanov D.V. Brain, depression, epigenetics: new data. *Byulleten' nauki i praktiki*. 2020; 6(5): 163-83. (in Russian)
4. Cruz-Jentoft A.J., Bahat G., Bauer J., Boirie Y., Bruyère O., Cederholm T. et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019; 48: 16–31.
5. Mayhew A.J., Amog K., Phillips S., Parise G., McNicholas P.D., de Souza R.J. et al. The prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults, an exploration of differences between studies and within definitions: a systematic review and meta-analyses. *Age Ageing*. 2019; 48: 48–56.
6. D'Amelio P., Quacquarelli L. Hypovitaminosis D and aging: is there a role in muscle and brain health? *Nutrients*. 2020; 12(3): 628.
7. World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: new frontiers. *Alzheimer's disease international*. [(accessed on 28 January 2020)]; Available online: <https://www.alz.co.uk/news/world-alzheimer-report-2018-state-of-art-of-dementia-research-new-frontiers>.
8. Pigarova E.A., Rojinskaya L.Ya., Belaya Zh.E., Dzeranova L.K., Karonova T.L., Ilin E.A. Clinical recommendations of the Russian association of endocrinologists for the diagnosis, treatment and prevention of vitamin D deficiency in adults. *Problemy Endokrinologii*. 2016; 62(4): 60-84. (in Russian)



9. Halfon M., Phan O., Teta D. Vitamin D: a review on its effects on muscle strength, the risk of fall, and frailty. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 953241-53.
10. Tanaka M., Kishimoto K.N., Okuno H., Saito H., Itoi E. Vitamin D receptor gene silencing effects on differentiation of myogenic cell lines. *Muscle Nerve.* 2014; 49: 700–708.
11. Santillán G., Katz S., Vazquez G., Boland R.L. TRPC3-like protein and vitamin D receptor mediate 1 $\alpha$ , 25(OH)2D3-induced SOC influx in muscle cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 1910–18.
12. Buitrago C., Vazquez G., De Boland A.R., Boland R.L. Activation of Src kinase in skeletal muscle cells by 1,25-(OH(2))-vitamin D(3) correlates with tyrosine phosphorylation of the vitamin D receptor (VDR) and VDR-Src interaction. *J. Cell. Biochem.* 2000; 79: 274–81.
13. Buitrago C., González Pardo V., de Boland A.R. Nongenomic action of 1 $\alpha$ , 25(OH)(2)-vitamin D3 activation of muscle cell PLC gamma through the tyrosine kinase c-Src and PtdIns 3-kinase. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269: 2506–15.
14. Endo I., Inoue D., Mitsui T., Umaki Y., Akaike M., Yoshizawa T. et al. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology.* 2003; 144: 5138–44.
15. Bhat M., Kalam R., Qadri S.S., Madabushi S., Ismail A. Vitamin D deficiency-induced muscle wasting occurs through the ubiquitin proteasome pathway and is partially corrected by calcium in male rats. *Endocrinology.* 2013; 154: 4018–29.
16. Girgis C.M., Clifton-Bligh R.J., Turner N., Lau S.L., Gunton J.E. Effects of vitamin D in skeletal muscle: falls, strength, athletic performance and insulin sensitivity. *Clin. Endocrinol.* 2014; 80: 169–81.
17. Lappe J.M., Binkley N. Vitamin D and sarcopenia/falls. *J. Clin. Densit.* 2015; 18: 478–82.
18. Verde Z., Giaquinta A., Sainz C.M., Ondina M.D., Araque A.F. Bone Mineral Metabolism Status, Quality of Life, and Muscle Strength in Older People. *Nutrients.* 2019; 11: 2748-55.
19. Aspell N., Laird E., Healy M., Lawlor B., O'Sullivan M. Vitamin D Deficiency Is Associated With Impaired Muscle Strength And Physical Performance In Community-Dwelling Older Adults: Findings From The English Longitudinal Study Of Ageing. *Clin. Interv. Aging.* 2019; 14: 1751–61.
20. Houston D.K., Cesari M., Ferrucci L. Association between vitamin D status and physical performance: the InCHIANTI study. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 2007; 62(4): 440–6.
21. Toffanello E.D., Perissinotto E., Sergi G. Vitamin D and physical performance in elderly subjects: the Pro.VA study. *PLoS ONE.* 2012; 7(4): e34950-e34955.
22. Sleeman I., Aspray T., Lawson R., Coleman S., Duncan G., Khoo T.K. et al. The role of vitamin D in disease progression in early Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 2017; 7: 669–75.
23. Tabrizi R., Hallajzadeh J., Mirhosseini N., Lankarani K.B., Maharlouei N., Akbari M. et al. The effects of vitamin D supplementation on muscle function among postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *EXCLI J.* 2019; 18: 591–603.
24. Bischoff-Ferrari H.A., Dawson-Hughes B., Orav E.J., Staehelin H.B., Meyer O.W., Theiler R. et al. Monthly high-dose vitamin D treatment for the prevention of functional decline: a randomized clinical trial. *JAMA Intern. Med.* 2016; 176: 175–83.
25. Glendenning P., Zhu K., Inderjeeth C., Howat P., Lewis J.R., Prince R.L. Effects of three-monthly oral 150,000 IU cholecalciferol supplementation on falls, mobility, and muscle strength in older postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012; 27(1): 170–6.
26. Cesareo R., Attanasio R., Caputo M., Castello R., Chiodini I., Falchetti A. et al. Italian association of clinical endocrinologists (AME) and Italian chapter of the American association of clinical endocrinologists (AACE) position statement: clinical management of vitamin D deficiency in adults. *Nutrients.* 2018; 10: 546-8.
27. Saha S., Goswami R., Ramakrishnan L., Vishnubhatla S., Mahtab S., Kar P. et al. Vitamin D and calcium supplementation, skeletal muscle strength and serum testosterone in young healthy adult males: Randomized control trial. *Clin. Endocrinol.* 2018; 88: 217–26.
28. Beauchet O., Launay C.P., Galery K., Vilcoq C., Dontot-Payen F., Rousseau B. et al. Effects of vitamin D and calcium fortified yogurts on gait, cognitive performances, and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in older community-dwelling females: results from the gait, memory, dietary and vitamin D (GAME-D2) randomized controlled trial. *Nutrients.* 2019; 11: 2880-8.
29. Garcion E., Wion-Barbot N., Montero-Menei C.N., Berger F., Wion D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002; 13: 100–5.
30. Grimm M.O.W., Lehmann J., Mett J., Zimmer V.C., Grösgen S., Stahlmann C.P. et al. Impact of vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid- $\beta$  peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 2014; 13: 75–81.
31. Landel V., Millet P., Baranger K., Llorca B., Féron F. Vitamin D interacts with Esr1 and Igf1 to regulate molecular pathways relevant to Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 2016; 11: 22-5.
32. Van Schoor N.M., Comijs H.C., Llewellyn D.J., Lips P. Cross-sectional and longitudinal associations between serum 25-hydroxyvitamin D and cognitive functioning. *Int. Psychogeriatr.* 2016; 28: 759–68.
33. Gschwind Y.J., Bischoff-Ferrari H.A., Bridenbaugh S.A., Härdi I., Kressig R.W. Association between serum vitamin D status and functional mobility in memory clinic patients aged 65 years and older. *Gerontology.* 2014; 60: 123–9.
34. Annweiler C., Maby E., Meyerber M., Beauchet O. Hypovitaminosis D and executive dysfunction in older adults with memory complaint: a memory clinic-based study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2014; 37: 286–93.
35. Maddock J., Zhou A., Cavadino A., Kužma E., Bao Y., Smart M.C. et al. Vitamin D and cognitive function: a Mendelian randomisation study. *Sci. Rep.* 2017; 7: 13230-4.
36. Dhesi J.K., Jackson S.H.D., Bearne L.M., Moniz C., Hurley M.V., Swift C.G. et al. Vitamin D supplementation improves neuromuscular function in older people who fall. *Age Ageing.* 2004; 33: 589–95.
37. Przybelski R., Agrawal S., Krueger D., Engelke J.A., Walbrun F., Binkley N. Rapid correction of low vitamin D status in nursing home residents. *Osteoporos Int.* 2008; 19: 1621–8.
38. Dean A.J., Bellgrove M.A., Hall T., Phan W.M.J., Eyles D.W., Kvaskoff D. et al. Effects of vitamin D supplementation on cognitive and emotional functioning in young adults – a randomised controlled trial. *PLoS ONE.* 2011; 6: e25966-70.
39. Pettersen J.A. Does high dose vitamin D supplementation enhance cognition? A randomized trial in healthy adults. *Exp. Gerontol.* 2017; 90: 90–7.
40. Goodwill A.M., Szoek C. A systematic review and meta-analysis of the effect of low vitamin D on cognition. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017; 65: 2161–8.

© МОЛОДОВСКАЯ И.Н., 2021

Молодовская И.Н.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ СИСТЕМЫ У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН С РАЗНЫМ АДАПТАЦИОННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лавёрова Уральского отделения РАН, 163000, г. Архангельск, Россия

*Характеристика функции системы кровообращения организма с точки зрения его способности адаптироваться к условиям среды включает определение адаптационного потенциала. Цель исследования – дополнить представление об адаптационном потенциале в аспекте его сопряжённости с показателями системы гипоталамус-гипофиз-гонады у здоровых мужчин, проживающих в климатических условиях Арктической зоны Российской Федерации. В исследовании участвовали 94 практически здоровых мужчины. Сывороточные уровни гормонов системы гипоталамус-гипофиз-гонады определяли методом иммуноферментного анализа. Доля мужчин с удовлетворительной адаптацией составила 67%. К маркерам роста напряжения адаптационных механизмов можно отнести понижение уровней тестостерона, секс-стероидсвязывающего глобулина и значения индекса тестостерон/эстрадиол. Показано, что у лиц с 4-й степенью адаптационного потенциала происходит подавление активности систем гипофиз-гонады и гипофиз-кора надпочечников, участвующих в поддержании системы кровообращения, что может быть связано со снижением резервов синтеза гормонов данных систем. Рост напряжения адаптационных механизмов системы кровообращения происходит при снижении уровней анаболических гормонов и одновременном повышении уровня эстрадиола в качестве компенсаторной реакции для сохранения функции сердечно-сосудистой системы. Установлено, что при продвижении на север, за границу полярного круга у мужчин, проживающих в экстремальных климатических условиях, отмечается рост напряжения адаптационных механизмов системы кровообращения. Результаты исследования показывают отрицательную корреляцию адаптационного потенциала со значениями тестостерона, секс-стероидсвязывающего глобулина и индекса тестостерон/эстрадиол. Напряжение адаптационных механизмов системы кровообращения при снижении уровня половых гормонов можно рассматривать как маркер дизадаптационных изменений при нарушении экологического благополучия.*

**Ключевые слова:** адаптационный потенциал; тестостерон; секс-стероид-связывающий глобулин; индекс тестостерон/эстрадиол; мужчины.

**Для цитирования:** Молодовская И.Н. Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы у здоровых мужчин с разным адаптационным потенциалом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (1): 10-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-10-14>

*Molodovskaya I.N.*

### FUNCTIONAL STATE OF THE HYPOTHALAMUS-PITUITARY-GONAD AXIS IN HEALTHY MEN WITH VARIOUS ADAPTATION POTENTIAL

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, 163000, Arkhangelsk, Russia

*The characterization of the functioning of the blood circulatory system of the organism in terms of its ability to adapt to environmental conditions includes the definition of adaptive potential (AP). The purpose of the study is to supplement the idea of adaptive potential in the aspect of its association with indicators of the hypothalamus-pituitary-gonadal system in healthy men living in the climatic conditions of the Arctic zone of the Russian Federation. The study involved 94 apparently healthy men. Serum hormone levels of the hypothalamus-pituitary-gonadal system were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Percent of men with satisfactory adaptation was 67%. Markers of increased tension in adaptive mechanisms include a decrease in values of testosterone, sex hormone-binding globulin, and testosterone / estradiol ratio. It has been shown that in individuals with a 4-th degree of adaptive potential, the activity of the pituitary-gonadal and the pituitary-adrenal cortex systems participating in the maintenance of the circulatory system is suppressed. That may be associated with a decrease in the reserves of hormone synthesis in these systems. An increase in the tension of the adaptive mechanisms of the circulatory system occurs with a decrease in the levels of anabolic hormones and a simultaneous increase in the level of estradiol as a compensatory reaction to maintain the function of the cardiovascular system. It is established that when moving northward beyond the border of the Arctic Circle an increase in the tension of the adaptive mechanisms of the circulatory system is noted for men living in extreme climatic conditions. The results of the study show a negative correlation of adaptive potential with the values of testosterone, sex hormone-binding globulin and the testosterone / estradiol ratio. The tension of the adaptive mechanisms of the blood circulatory system occurs with decreased sex hormones levels, which can be considered as a marker of disadaptation changes amid the risk of the ecological well-being of the population.*

**Key words:** adaptation potential; testosterone; sex hormone-binding globulin; ratio testosterone/estradiol; men.

**For citation:** Molodovskaya I.N. Functional state of the hypothalamus-pituitary-gonad axis in healthy men with various adaptation potential. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 10-14 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-10-14>

**For correspondence:** *Molodovskaya I.N.*, candidate of biological sciences, research scientist; e-mail: [pushistiy-86@mail.ru](mailto:pushistiy-86@mail.ru)

#### **Information about author:**

*Molodovskaya I.N.*, <http://orcid.org/0000-0003-3097-9427>.

**Acknowledgment.** *The study was carried out in accordance with the R&D financing plan of the FCIARctic on the topic «Determination of the modulating effect of the blood content of catecholamines on the hormonal profile in humans and hydrobionts of the European North» (state number AAAA-A19-119120990060-0).*

**Conflict of interest.** *The author declare absence of conflict of interests.*

Received 18.03.2020  
Accepted 29.11.2020

**Введение.** Настоящая работа является продолжением исследований адаптационного потенциала и функциональной активности системы гипоталамус-гипофиз-гонады у здоровых мужчин, постоянно проживающих на разных территориях Европейского севера [1, 2]. Изучение адаптационных реакций различных систем организма человека, проживающего в дискомфортных условиях Европейского Севера и подвергающегося воздействию неблагоприятных климатических факторов окружающей среды, остается актуальной темой экологической физиологии. Адаптация к климатогеографическим условиям севера достигается путём перестроек таких функциональных систем, как эндокринная и система кровообращения. Важным индикатором адаптационных реакций является состояние системы кровообращения, для оценки которого используют предложенное Р.М. Баевским [3] определение адаптационного потенциала (АП) – комплексного показателя, основанного на регрессивных взаимоотношениях частоты сердечных сокращений (ЧСС), систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления, возраста (В), массы тела (МТ) и роста (Р). Интерес представляет определение уровней половых гормонов, обладающих ангиопротекторными свойствами, у людей, проживающих на севере в зависимости от уровня АП.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из наиболее распространенных причин смерти среди населения экономически развитых стран мира. Хотя сердечно-сосудистые заболевания затрагивают оба пола, они чаще встречаются у мужчин и приводят к сокращению их средней продолжительности жизни. В течение многих лет это различие ошибочно приписывалось негативным эффектам тестостерона. Тем не менее, в настоящее время имеется большое количество фактических данных, свидетельствующих о том, что этот гормон может оказывать защитное действие на сердечно-сосудистую систему, и что низкие уровни тестостерона могут быть связаны с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний и увеличением заболеваемости и смертности у мужчин [4, 5]. Низкий уровень общего тестостерона в сыворотке является обычным явлением среди стареющего мужского населения и связан с неблагоприятными сердечно-сосудистыми факторами риска, включая атерогенный липидный профиль, ожирение и инсулинорезистентность, а его распространенность составляет 30% среди мужчин в возрасте старше 60 лет [6]. На молекулярном уровне тестостерон модулирует экспрессию регуляторных белков, участвующих в гликолизе, синтезе гликогена и метаболизме липидов и холестерина [7]. Ряд клинических исследований свидетельствует о том, что тестостерон может обеспечивать защитную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин [8 – 10]. Ранние работы, посвященные изучению механизмов адаптации организма к суровым климатическим условиям высоких широт, сообщают о повышении уровней анаболических половых стероидов (тестостерона, прогестерона) с увеличением длительно-

сти проживания на севере [11]. Известно, что прогестерон снижает кровяное давление, ингибирует коронарную гиперактивность и обладает мощными сосудорасширяющими и натрийуретическими эффектами [12, 13].

Согласно литературным данным, основным стероидом, обладающим ангиопротекторными свойствами, является эстрадиол, синтезируемый из тестостерона с помощью фермента ароматазы, чью активность в тканях описывают индексом тестостерон/эстрадиол. Защитные эффекты эстрадиола для сердечно-сосудистой системы опосредованы не только биологическими эффектами самого эстрадиола, воздействующего на ядерные рецепторы сердечных клеток (миоциты, фибробласты), эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, но также и эффектами его биологически активных метаболитов [14]. Хотя эстрадиол индуцирует вазопротекторные эффекты по нескольким механизмам, включая изменения концентрации липопротеинов в плазме (снижение уровней липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), уменьшение образования окисленных ЛПНП, повышение уровней липопротеинов высокой плотности), гемостатические факторы, наиболее важным эффектом эстрадиола является сосудорасширяющее действие на сосудистую сеть, приводящее к снижению артериального давления [15].

Цель работы – дополнить представление об АП в аспекте его сопряженности с показателями системы гипоталамус-гипофиз-гонады у здоровых мужчин, проживающих в климатических условиях Арктической зоны Российской Федерации.

**Материал и методы.** Проведено аналитическое поперечное неконтролируемое исследование с участием 94 мужчин, постоянно проживающих в г. Архангельске (Архангельская область 64°32'с.ш.), в возрасте от 22 до 60 лет, средний возраст мужчин составил  $36,7 \pm 1,03$  лет (среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего). Анкетирование, забор крови из локтевой вены и врачебный осмотр, на основании которого делали вывод о состоянии здоровья обследуемых, проводили в утренние часы. Исследование проводилось в соответствии с документом «Этические принципы медицинских исследований с участием людей», указанном в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г., которая была пересмотрена в 2013 году. Все обследованные лица заполняли стандартный опросник для сбора сведений о возрасте, образовании, профессии, национальности, употреблении табачных и алкогольных изделий, занятиях спортом, уровне доходов, благоустроенности жилья, перенесенных заболеваниях. Письменное информированное согласие было получено от всех участников исследования.

Чтобы получить комплексное представление о функциональной активности эндокринной системы в условиях холодного климата, методом иммуноферментного анализа на планшетном автоматическом анализаторе «ELISYS Uno» (Human, Германия) в сыворотке крови определяли содержание лютропина (ЛГ), фоллитропина

(ФСГ), пролактина, тестостерона, эстрадиола, прогестерона, кортизола с использованием наборов фирмы «Human GmbH» (Германия) и секс-стероидсвязывающего глобулина (СССГ) – «DRG Instruments GmbH» (Германия). За физиологически оптимальные значения принимали предлагаемые нормативы для соответствующих коммерческих тест-наборов. Для оценки ароматазной активности в периферических тканях рассчитывали индекс тестостерон/эстрадиол.

Было выдвинуто предположение о том, что реактивность изучаемого звена эндокринной системы будет изменяться в зависимости от напряжённости системы кровообращения, определяемой путём расчета адаптационного потенциала с использованием формулы, предложенной Р.М. Баевским и А.П. Берсеновой [3]:

$$АП = 0,011(ЧСС) + 0,014(САД) + 0,008(ДАД) + 0,014(В) + 0,009(МТ) - 0,009(Р) - 0,27.$$

Согласно данным Р.М. Баевского выделяют следующие степени АП:

- 1) хорошая адаптация (АП < 2 усл. ед.);
- 2) удовлетворительная адаптация (АП=2,10 усл. ед.) – достаточные функциональные возможности системы кровообращения;
- 3) функциональное напряжение механизмов адаптации (АП = 2,11–3,20 усл. ед.);
- 4) неудовлетворительная адаптация (АП = 3,21–4,30 усл. ед.) – снижение функциональных возможностей системы кровообращения с недостаточной, приспособляемой реакцией к нагрузкам;
- 5) срыв адаптации (АП > 4,30 усл. ед.) – резкое снижение функциональных возможностей системы кровообращения с явлением срыва механизмов адаптации целостного организма.

Для выявления клинических признаков андрогенного дефицита использовали опросник симптомов старения мужчины (AMS – Aging Males' Symptoms), согласно которому выраженность андрогенного дефицита синхронно возрастает с повышением тяжести субъективно воспринимаемых жалоб, указанных в 17 вопросах [16]. Симптомы дефицита андрогенов считаются невыраженными при суммарном количестве баллов от 17 до 26, слабовыраженными – от 27 до 36 баллов, средней выраженности – от 37 до 49 баллов, выраженными – при сумме баллов более 50.

Статистический анализ собранных данных проводили с применением пакета прикладных программ STATISTICA 10.0. Полученные выборки проверялись на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. В связи с тем, что была установлена частичная асимметрия рядов распределения, использовались методы непараметрической статистики с определением медиан и 10-90 процентильных интервалов изучаемых признаков в группах. Проводили сравнение групп с использованием U-критерия Манна-Уитни и исследование связей признаков с применением рангового коэффициента корреляции Спирмена. Статистически значимыми считались изменения при вероятности ошибочного принятия нулевой гипотезы  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Анализ состояния адаптации системы кровообращения показал, что для обследованной части мужской популяции г. Архангельска медиана значений АП составила 2,8 (2,3-3,2) усл. ед., что соответствует функциональному напряжению механизмов адаптации и относится к донологическим состояниям. Вторая степень АП (удовлетворительная адаптация) характер-

на для 2-х обследованных лиц, третья (функциональное напряжение механизмов адаптации) – 78-ми, четвёртая (неудовлетворительная адаптация) – 14-ти, при этом отсутствуют лица с хорошей адаптацией и срывом адаптации.

Распространённость симптомов андрогендефицита в г. Архангельске по данным опросника AMS составила 56%, при этом среднее значение баллов согласно опроснику AMS для обследованной выборки мужчин составило 29,8, что соответствует слабовыраженным симптомам андрогендефицита. У лиц с удовлетворительной адаптацией (2 степень АП) симптомы дефицита андрогенов не выражены, в то время как для мужчин с 3 и 4 степенью напряжения адаптационного потенциала характерны слабовыраженные симптомы андрогендефицита.

Интерес представляло определение отличий эндокринного профиля у мужчин в зависимости от степени АП. В группе лиц с неудовлетворительной адаптацией (4-й степенью АП) по сравнению с группой лиц с функциональным напряжением механизмов адаптации (3-й степенью АП) статистически значимо ниже значения ЛГ, прогестерона, кортизола, тестостерона, СССР, индекса тестостерон/эстрадиол (см.таблицу).

В результате корреляционного анализа установлено, что АП мужчин г. Архангельска отрицательно коррелирует со значениями тестостерона ( $r=-0,4$ ;  $p<0,01$ ), СССР ( $r=-0,4$ ;  $p<0,01$ ), тестостерон/эстрадиол ( $r=-0,4$ ;  $p<0,01$ ).

**Обсуждение.** Учитывая защитные эффекты анаболических стероидов прогестерона и тестостерона в деятельности сердечно-сосудистой системы [7], снижение их уровней у лиц с 4-й степенью АП следует рассматривать как неблагоприятный признак, сочетающийся с напряжением механизмов адаптации. Таким образом, можно предположить, что напряжение адаптационного потенциала системы кровообращения соотносится со снижением уровней мужских половых гормонов при одновременном нарастании ароматазной активности в тканях, приводящей к повышению уровня эстрадиола в периферической крови. В то же время снижение уровня кортизола при повышении АП может указывать на снижение резервов и синтеза стероидных гормонов.

Корреляционный анализ позволяет предположить, что напряжение адаптационных механизмов системы кровообращения, происходящее при снижении уровней тестостерона и СССР, можно рассматривать в качестве маркера дизадаптационных изменений не только со стороны сердечно-сосудистой, но и со стороны эндокринной системы на фоне повышения риска нарушения экологического благополучия населения, что может быть проявлением «биологической платы» при проживании в экстремальных условиях севера. В то же время, напряжение АП происходит сонаправленно с повышением ароматазной активности тканей, на что указывает отрицательная корреляционная связь АП с индексом тестостерон/эстрадиол. Такая повышенная ароматизация тестостерона в эстрадиол приводит к естественному повышению уровня последнего, играющего ключевую роль в обеспечении защиты от сердечно-сосудистых заболеваний.

Ранее исследование адаптационного потенциала у мужчин с. Несь (Ненецкий автономный округ, 66°39' с.ш.), расположенного на границе Северного полярного круга в 298 километрах от г. Архангельска, продемонстрировало похожий результат снижения уровня про-

**Уровни гормонов, индекс тестостерон/эстрадиол и показатели опросника AMS у мужчин г. Архангельска в зависимости от степени адаптационного потенциала, Ме (10%-90%)**

Показатель	Степень АП (количество человек)					p-уровень
	1 (n = 0)	2 (n = 2)	3 (n = 78)	4 (n = 14)	5 (n = 0)	
AMS	-	23,5 (18,0; 29,0)	27,0 (18,0; 45,0)	30,0 (20,0; 44,0)	-	p>0,1
ЛГ (0,7-7,4 МЕ/л)	-	3,2 (1,8-4,5)	3,4 (1,8-6,0)	1,6 (0,8-4,2)	-	p <sub>2-3</sub> =0,005
Прогестерон (0,32-3,18 нмоль/л)	-	1,8 (1,0-2,6)	1,8 (0,9-3,1)	0,9 (0,6-2,0)	-	p <sub>2-3</sub> =0,01
Кортизол (150-660 нмоль/л)	-	519,9 (504,3-535,6)	506,7 (346,7-847,4)	438,6 (327,8-595,3)	-	p <sub>2-3</sub> =0,03
Тестостерон (12,15-29,8 нмоль/л)	-	17,4 (16,3-18,4)	16,5 (9,6-29,0)	11,4 (8,2-18,0)	-	p <sub>2-3</sub> =0,007
Эстрадиол (0,06-0,22 нмоль/л)	-	0,05 (0,02-0,07)	0,08 (0,04-0,16)	0,09 (0,05-0,21)	-	p>0,1
СССГ (15-100 нмоль/л)	-	43,3 (43,0-43,6)	41,9 (23,3-84,3)	32,1 (17,9-42,3)	-	p <sub>2-3</sub> =0,02
Тестостерон/эстрадиол, усл. ед.	-	576,4 (232,9-920,0)	208,5 (95,6-616,6)	169,7 (68,7-372,0)	-	p <sub>2-3</sub> =0,03

Примечание. Ме – медиана значений признака; 10%-90% – перцентильный интервал; p – уровень значимости различий.

гестерона в крови при повышении АП [1]. В сравнении с настоящим исследованием, в более ранней работе было показано значительное напряжение АП среди обследованных представителей мужской популяции Заполярного района. Так, для 35 обследованных мужчин с. Несь характерно функциональное напряжение механизмов адаптации, для 14 – неудовлетворительная адаптация, для 2 – срыв адаптации, при этом отсутствовали лица с хорошей и удовлетворительной адаптацией. Подобные отличия распространённости различных степеней АП у представителей Заполярного (п. Несь) и Приполярного (г. Архангельск) районов могут указывать на рост напряжения адаптационных механизмов системы кровообращения у мужчин, проживающих в экстремальных климатических условиях, при продвижении на север.

**Выводы**

1. У лиц с 4-й степенью АП происходит подавление активности систем гипофиз-гонады и гипофиз-кора надпочечников, участвующих в поддержании системы кровообращения, что может быть связано со снижением резервов синтеза гормонов данных систем.

2. Яркими маркерами роста напряжения адаптационных механизмов являются понижение уровней тестостерона, СССГ и значения индекса тестостерон/эстрадиол.

3. Напряжение АП приводит к снижению уровней анаболических гормонов при одновременном повышении уровня эстрадиола в качестве компенсаторной реакции для сохранения функции сердечно-сосудистой системы.

4. При продвижении на север за границу полярного круга у мужчин, проживающих в экстремальных климатических условиях, отмечается рост напряжения адаптационных механизмов системы кровообращения.

**Финансирование.** Работа выполнена в соответствии с планом ФНИР ФГБУН ФИЦКИА РАН по теме «Выяснение модулирующего влияния содержания катехоламинов в крови на гормональный профиль у человека и гидробионтов Европейского Севера» (номер гос. регистрации АААА-А19-119120990060-0).

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

**ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-10, 12-16 см. REFERENCES)**

- Горенко И.Н., Киприянова К.Е., Типисова Е.В. Адаптационный потенциал и его взаимосвязь с половыми гормонами и дофамином у мужчин с. Несь (Ненецкий автономный округ). *Журнал медико-биологических исследований*. 2018; 6(2): 105–14. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.105.
- Типисова Е.В., Горенко И.Н., Попкова В.А., Попов А.И., Андронов С.В. Соотношение дофамина, половых гормонов, антиспермальных антител, секс-стероид-связывающего глобулина, цАМФ у коренного и местного мужского населения Арктической Зоны РФ. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2018; 15(2): 218–28.
- Баевский Р.М., Берсенева А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риска развития заболеваний. М.: Медицина; 1997.
- Шварева Н.В., Ткачев А.В. Содержание гонадотропных гормонов и кортизола у женщин в процессе адаптации к условиям высоких широт. *Физиология человека*. 1983; 9(4): 537–41.

**REFERENCES**

- Gorenko I.N., Kipriyanova K.E., Tipisova E.V. Adaptive potential and its correlation with sex hormones and dopamine in men from Nes village (Nenets Autonomous Area). *Zhurnal Mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2018; 6(2): 105–14. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.105. (in Russian)
- Tipisova E.V., Gorenko I.N., Popkova V.A., Popov A.I., Andronov S.V. The correlation of dopamine, sex hormones, antisperm antibodies, sex hormone binding globuline, cAMP in aboriginal and local male population of the Arctic Zone of the RF. *Vestnik Ural'skoi Meditsinskoy Akademicheskoy Nauki*. 2018; 15(2): 218–28. (in Russian)
- Baevskiy R.M., Berseneva A.P. Assessment of the body's adaptive capacity and of the risk of developing diseases. [Otsenka adaptatsionnykh vozmozhnostey organizma i riska razvitiya zaboolevaniy]. Moscow: Meditsina; 1997. (in Russian)
- Yeap B.B. Androgens and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes*. 2010; 17(3): 269–76.
- Tirabassi G., Gioia A., Giovannini L., Boscaro M., Corona G., Carpi A. et al. Testosterone and cardiovascular risk. *Internal and Emergency Medicine*. 2013; 8(1): 65–9.
- Harman S.M., Metter E.J., Tobin J.D., Pearson J., Blackman M.R. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2001; 86: 724–31.

BIOCHEMISTRY

7. Kelly D.M., Jones T.H. Testosterone: A Metabolic Hormone in Health and Disease. *J. Endocrinol.* 2013; 217(3): 25–45.
8. Phillips G.B., Castelli W.P., Abbot R.D., McNamara P.M. Association of hyperestrogenemia and coronary heart disease in men in the Framingham cohort. *Am. J. Med.* 1983; 74: 863–9.
9. Muller M., den Tonkelaar L., Thijssen J.H., Grobbee D.E., van der Schouw Y.T. Endogenous sex hormones in men aged 40–80 years. *Eur. J. Endocrinol.* 2003; 149: 583–9.
10. Akishita M., Hashimoto M., Ohike Y., Qgawa S., Iijima K., Eto M. et al. Low testosterone level as a predictor of cardiovascular events in Japanese men with coronary risk factors. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 232–6.
11. Shvareva N.V., Tkachev A.V. The content of gonadotropic hormones and cortisol in women in the process of adaptation to high latitude conditions. *Human Physiology.* 1983; 9(4): 537–41. (in Russian)
12. Oettel M., Mukhopadhyay A.K. Progesterone: The Forgotten Hormone in Men? *Aging Male.* 2004; 7(3): 236–57.
13. Thomas P., Pang Y. Protective Actions of Progesterone in the Cardiovascular System: Potential Role of Membrane Progesterone Receptors (mPRs) in Mediating Rapid Effects. *Steroids.* 2013; 78(6): 583–8.
14. Dubey R.K., Jackson E.K. Invited Review: Cardiovascular protective effects of 17 $\beta$ -estradiol metabolites. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 1868–83.
15. Dubey R.K., Jackson E.K., Rupperecht H., Sterzel R.B. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1997; 6(1): 88–105.
16. Daig I., Heinemann L.A.J., Kim S., Leungwattanakij S., Badia X., Myon E. et al. The Aging Males' Symptoms (AMS) Scale: Review of Its Methodological Characteristics. *Health. Qual. Life Outcomes.* 2003; 1: 77–89.

Поступила 28.03.20  
Принята к печати 29.11.20

## ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Сытов А.В.

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С СЕПСИСОМ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва

*Исследование выполнено у 9 онкологических больных с сепсисом. Клинический анализ крови больных с сепсисом сопровождался лейкомоидной реакцией нейтрофильного типа, с появлением в дифференциальном счёте лейкоцитов молодых клеток (миелоцитов, метамиелоцитов). По литературным данным показано, что при тяжёлом сепсисе локальная инфекция сопровождается системной активацией нейтрофилов (НФ). При этом чрезмерная активация и расположение НФ в микроциркуляторном русле, особенно ее молодых форм и образования внеклеточных сетей-ловушек (NETs), может способствовать патологическим проявлениям полиорганной недостаточности и тромбозам.*

**Ключевые слова:** онкологические больные; сепсис; нейтрофилы; фагоцитоз; адгезия; агрегация.

**Для цитирования:** Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Сытов А.В. Морфологические и функциональные особенности нейтрофилов периферической крови у онкологических больных с сепсисом в раннем послеоперационном периоде (литературный обзор и результаты собственных исследований). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 15-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-15-21>

*Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Sytov A.V.*

#### MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN ONCOLOGIC PATIENTS WITH SEPSIS IN THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD (REVIEW OF LITERATURE AND RESULTS OF OWNERSHIP)

FSBI «National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhin» Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow

*The study was performed in 9 cancer patients with sepsis. A clinical blood test of patients with sepsis was accompanied by a neutrophilic leukemoid reaction, with the appearance in the differential count of white blood cells of young cells (myelocytes, metamyelocytes). According to the literature, it is shown that in severe sepsis, a local infection is accompanied by systemic of neutrophil activation (NF). Moreover, excessive activation and location of NF in the microvasculature, especially its young forms and the formation of extracellular trap networks (NETs), can contribute to pathological manifestations of multiple organ failure and thrombosis.*

**Key words:** cancer patients; sepsis; neutrophils; phagocytosis; adhesion; aggregation

**For citation:** Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Sytov A.V. Morphological and functional features of peripheral blood neutrophils in cancer patients with sepsis in the early postoperative period (review of literature and results of our own studies). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 15-21 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-15-21>

**For correspondence:** *Blindar Valentina Nikolaevna*, Dr. biol. sciences, leading scientific staff; e-mail: [bld51@list.ru](mailto:bld51@list.ru)

#### Information about authors:

Blindar V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>;

Zubrikhina G.N., <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>;

Sytov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-6426-3200>.

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

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Received 27.03.2020  
Accepted 27.05.2020

**Введение.** Сепсис характеризуется системной воспалительной реакцией на инфекцию с признаками полиорганной недостаточности [1,2]. Полиорганная недостаточность является серьезной угрозой выживанию пациентов с сепсисом и активным воспалением [3]. В

последнее время в качестве одного из ведущих патогенетических факторов развития сепсиса рассматриваются дисфункция клеток иммунной системы и дисбаланс цитокинов, приводящие к повреждению эндотелия и обуславливающие развитие синдрома системного вос-

**Для корреспонденции:** *Блиндарь Валентина Николаевна*, д-р. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: [bld51@list.ru](mailto:bld51@list.ru)

палительного ответа. При тяжелом сепсисе локальная инфекция сопровождается системной активацией нейтрофилов (НФ) [4]. НФ крови играют важную роль в формировании противоинфекционного иммунитета. Они являются активным и многочисленным эффективным звеном врожденной иммунной системы, который защищает организм от инфицирования патогенными микроорганизмами [5].

В то же время чрезмерная активация НФ на фоне воспаления при сепсисе в микроциркуляторном русле, подавление НФ адаптивного иммунитета может способствовать развитию синдрома полиорганной недостаточности (Multiple organ dysfunction) и вызвать выраженную иммуносупрессию [6, 7].

Целью работы явилось исследование лейкоцитарной формулы, морфологических особенностей НФ периферической крови, анализ основных функций на основе собственных исследований, проведенных ранее, и данных литературы у онкологических больных в процессе развития гнойно-септических инфекций.

**Материал и методы.** Проведено исследование клинического анализа крови: WBC; дифференциальный счет НФ; детальный анализ морфологии НФ. Исследование выполнено у 9 онкологических больных: рак желудка – 3; рак поджелудочной железы – 3; рак почки – 1 и рак легкого – 2. Больные госпитализированы с сепсисом в отделение реанимации клиники Центра в 2019 г. повторно, после проведения экстренной операции (7-11 сутки). Диагноз соответствовал международным критериям тяжелого сепсиса. Исследование проведено в 1-3-и сутки после установления сепсиса. У больных выявлена II-, III- и IV-я стадии заболевания, в каждой группе по 3 человека. Возраст 46-75 лет (медиана 70 лет), из них 3 женщины и 6 мужчин. В качестве контрольной группы исследование аналогичных показателей крови проведено у 25 здоровых лиц. (сотрудники, доноры). Лейкоцитарную формулу и анализ морфологии НФ исследовали с помощью микроскопа фирмы LEICA (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов MS-EXCEL, BIostat, Version 4.03. Для оценки достоверности результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Проведенные исследования выполнялись в соответствии с принципами Хельсинской Декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

**Результаты и обсуждение.** Известно, что в нормальной лейкоцитарной формуле, при дифференциальном подсчете НФ периферической крови составляют 48-78%, и это самая многочисленная часть лейкоцитарной фракции. Жизненный цикл НФ начинается в костном мозге, где происходит дифференцировка и созревание НФ до зрелых форм. Перед поступлением в кровь, зрелые НФ проводят до 5 дней в синусах костного мозга, где происходит их дозревание и формирование костномозгового резерва. Клеточность которого чрезвычайно высокая и превышает количество НФ в периферической крови в 10-20 раз. Для НФ костный мозг не только орган репродукции – это и депо, где сосредоточен огромный резерв зрелых НФ, готовых по первому требованию выйти в кровеносное русло (при острых бактериальных инфекциях, токсическом, септическом, лучевом воздействиях [8, 9].

В норме в сосудистое русло выходят немногочисленные палочкоядерные формы (1-6%) и большое количество сегментоядерных НФ (48-72%). Они отличаются

друг от друга только морфологическим строением ядра. Следует отметить, что продолжительность существования НФ именно в виде их палочкоядерной разновидности невелика – они быстро превращаются в зрелые сегментоядерные элементы в сосудистом русле. В процессе созревания НФ меняется их иммунофенотипическая характеристика. На поверхности мембран появляются макромолекулы, выявляемые МКА: CD33, CD13, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD16 и т.д. [10]. Более молодые клетки (бласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты) в периферической крови не встречаются, они не могут пройти через костномозговой барьер. Появление в кровеносном русле единичных промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов у больных с сепсисом может свидетельствовать или о снижении запаса зрелых НФ в депо костного мозга, или об угнетении функциональной активности костного мозга на фоне бактериальной инфекции [11].

В отсутствии инфекции НФ не активны, они находятся в состоянии покоя, циркулируя в крови и формируя два пула: пристеночный и сосудистый. При этом длительность жизни циркулирующих НФ в крови составляет от нескольких часов до нескольких суток. При появлении воспалительного сигнала от бактерий и цитокинов (интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухолей), НФ активируются и быстро, в массовом количестве, покидают кровоток, преодолевая барьер из эндотелиальных клеток сосудов, и колонизируют очаг инфекции в тканях [9, 10, 12].

Нейтрофилез с ядерным сдвигом вправо (увеличение сегментоядерных НФ, уменьшение или исчезновение палочкоядерных НФ), как правило, говорит о хорошей, адекватной защитной реакции костномозгового кроветворения на инфекцию или воспалительный процесс и о благоприятном течении заболевания. Появление нейтропении и иммунодефицитных состояний у пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями является иллюстрацией и доказательством важности антимикробной функции НФ. В современной клинической практике диагностика и лечение тяжелых инфекций осложняются генерализацией течения, сопровождающейся системными реакциями и сепсисом [9, 11, 13].

В нашем исследовании клинический анализ крови больных с сепсисом сопровождался лейкомоидной реакцией нейтрофильного типа (см. таблицу). Количество WBC значительно превышало норму у большинства из них, с колебаниями в широких пределах от 2,5 до 41,9  $\times 10^9/\text{л}$ , среднее значение составило  $(21,2 \pm 4,3) \times 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,001$ ). В лейкоцитарной формуле отмечался как относительный, так и абсолютный нейтрофилез ( $p < 0,01$ ). У одного больного (рак легкого; III стадия; метастазы в лимфоузлы средостения; 71 год) выявлена лейкопения ( $\text{WBC} = 2,5 \times 10^9/\text{л}$ ), с абсолютной нейтропенией ( $1,7 \times 10^9/\text{л}$ ), что свидетельствовало о снижении костномозгового резерва НФ в синусах костного мозга этого больного. Среди НФ отмечалось значительное количество молодых форм (миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных). Нейтрофилез с выраженным сдвигом формулы крови влево в сочетании с небольшим лейкоцитозом или лейкопенией, как правило, свидетельствует о тяжелом течении патологического процесса и плохой сопротивляемости организма.

При оценке диагностической и прогностической значимости нейтрофильного сдвига важно определить процентное соотношение незрелых и зрелых форм НФ.



Для этого рассчитывают ядерный индекс сдвига НФ— отношение содержания миелоцитов, метамиелоцитов и палочкоядерных к сегментоядерным НФ. В норме ядерный индекс сдвига НФ равен 0,05–0,1. У онкологических больных с сепсисом ядерный сдвиг влево был значительно выше нормы и в среднем по группе, составлял  $0,53 \pm 0,08$  с колебаниями значений от 0,2 до 0,9. (см. таблицу). В современных гематологических анализаторах (типа Sysmex ХЕ-2100) он определяется автоматически, обозначается IG (Immature Granulocytes) и в норме равен 0,1–0,4 [11].

Нейтрофилез с дегенеративным ядерным сдвигом влево, который проявляется увеличением незрелых форм НФ и появлением в периферической крови, как в нашем случае, у пациентов с сепсисом, дегенеративно измененных сегментоядерных НФ (токсогенная зернистость, пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы). Это свидетельствует об эндогенной интоксикации и указывает на угнетение функциональной активности костного мозга на фоне бактериальной инфекции у больных с сепсисом [11].

Свое название НФ получили вследствие наличия в цитоплазме гранул, компоненты которых играют основную роль в эффекторных функциях НФ. Гранулы разделяются на четыре типа: первичные (азурофильные), появляющиеся в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), появляющиеся на стадии превращения в миелоциты; третичные или желатиновые гранулы и секреторные (везикулы), появляющиеся в зрелых сегментированных формах. Все типы гранул НФ различаются составом и обеспечивают антимикробную функцию НФ [8, 10].

Зрелые первичные гранулы, в основном содержат миелопероксидазу (МП). МП – специфический маркер, преобразующий перекись водорода в хлорноватистую кислоту, обладающую мощной антимикробной активностью. МП является аутокринным регулятором активации НФ. МП, по мнению многих авторов [8, 14, 15], принимает активное участие в фагоцитозе. МП оказывает непосредственное действие на микроорганизм, являясь катионным белком, она связывается с отрицательно заряженным компонентом оболочки бактерий и нарушает ее проницаемость. МП обладает сильным микробицидным свойством, кроме того МП усиливает функции других микробицидных систем, особенно при воспалительных процессах [8, 14, 15]. Как показало наше исследование, активность МП в группе больных с гнойно-септическими осложнениями оказалась достоверно ниже ( $-7,1 \pm 4,2$ ) по сравнению с группой без осложнений ( $3,6 \pm 2,8$ ) ( $p > 0,05$ ) [14, 16]. Некоторые авторы считают, что по мере развития сепсиса МП может резко снижаться в НФ [14].

Механизм действия щелочной фосфатазы (ЩФ), которая выявляется в зрелых НФ, на бактерии заключается

в гидролизе нуклеиновых кислот и фосфопротеинов. О большом значении ЩФ [17, 14] в осуществлении фазы переваривания реакции фагоцитоза свидетельствуют данные о высокой корреляции между активностью фермента и завершенностью фагоцитоза. У больных с сепсисом, по данным литературы, ЩФ превышает норму в десятки раз [18, 19].

Развитие сепсиса на фоне выраженного нейтрофи- леза указывает на наличие дисфункции НФ, что может способствовать увеличению восприимчивости к инфекциям. В нормальных условиях НФ – эффекторные клетки врожденной иммунной системы – циркулируют в состоянии покоя и служат первой линией защиты от вторжения патогенных микроорганизмов. При тяжелом воспалении НФ быстро активируются, однако такие показатели, как число лейкоцитов и НФ периферической крови часто не дают четкого представления о полноценном участии их в инфекционном процессе. Функциональное состояние НФ (способность к адгезии или прилипанию, микробицидная функция, межклеточное взаимодействие и фагоцитоз, внутриклеточное уничтожение, NETosis и их способность модулировать адаптивный иммунитет) во многом определяет возможность локализации возбудителя в месте его инвазии. Дефект одной из функций НФ может привести к увеличению предрасположенности к инфекции [14, 15].

Известно, что у онкологических больных ослаблен иммунитет. Все виды традиционной противоопухолевой терапии оказывают выраженное угнетающее действие на уже неполноценную иммунную систему онкологического больного [20]. При этом система кроветворения, в том числе, ее гранулоцитарный росток, является объектом интенсивных, и в ряде случаев, неблагоприятных воздействий. В их числе химиотерапия, облучение и оперативное вмешательство, которое является значительным стрессом [14, 16, 20] для ослабленного организма, что способствует росту гнойно-септических осложнений в процессе лечения [21].

Ранее нами проведено исследование адгезии НФ периферической крови к пластику у 126 первичных онкологических больных с различными локализациями опухоли (рак легкого, поджелудочной железы, молочной железы, яичников). Среди них преобладали больные с III стадией заболевания [16,22]. Было показано, что эта функция зрелых НФ была значительно снижена у всех онкологических больных, независимо от локализации опухоли, в ряде случаев, на 30-40% по сравнению с группой контроля. В среднем по группе показатели адгезии составили  $41,5 \pm 3,1\%$ , в группе контроля  $72,3 \pm 2,6\%$  ( $p < 0,01$ ).

Снижение адгезии к пластику сопровождалось статистически значимым снижением экспрессии молекул адгезии CD11b, CD18. Отмечено уменьшение экс-

**Дифференциальный подсчет нейтрофилов периферической крови у онкологических больных с сепсисом в раннем послеоперационном периоде ( $X \pm m$ )**

Группы	Показатели					
	WBC, 10 <sup>9</sup> /л	МЦ+МЕТА,	П/Я, %	С/Я, %	АБС, 10 <sup>9</sup> /л	ЯД/ИНД
Контроль (n=25)	$6,7 \pm 0,13$	0	$3,1 \pm 0,08$	$59,2 \pm 5,8$	$3,9 \pm 0,7$	$0,07 \pm 0,01$
Больные (n =9)	$21,2 \pm 4,3^*$	$5,8 \pm 1,2^*$	$23,9 \pm 3,7^*$	$61,1 \pm 5,1$	$19,4 \pm 4,2^*$	$0,53 \pm 0,08^*$

Примечание. WBC–лейкоциты; МЦ + МЕТА–миелоциты + метамиелоциты; П/Я–палочкоядерные НФ; С/Я–сегментоядерные НФ; АБС–абсолютное количество НФ, содержащихся в 1 литре крови; ЯД/ИНД–ядерный индекс сдвига НФ. \* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p < 0,01$ ).

прессии и других исследуемых антигенов CD16, CD24, CD95. Отмечена тесная корреляционная связь экспрессии антигенов CD11b и CD18 с функцией адгезии НФ к пластику, коэффициенты корреляции составили 0,67 и 0,72 соответственно, не отмечено корреляции с антигенами CD16, CD24, CD95 [22,14].

Для выяснения зависимости изменения адгезии НФ от стадии заболевания, было проведено исследование этой функции у 176 больных с опухолями молочной железы. У 153 первичных больных раком молочных желез с I-IV стадиями заболевания и у 23 пациенток с доброкачественными опухолями молочной железы. Уровень снижения ее у больных раком молочной железы зависел от стадии, максимальное снижение отмечено при IV стадии заболевания. Различия оказались статистически значимыми как по отношению к группе доноров, так и больными раком молочной железы с IIIa стадией ( $p < 0,01$ ) [20].

У больных раком яичников с диссеминированными формами, с явлениями асцита, отмечались более низкие показатели адгезии НФ еще до лечения, при этом у больных без асцита эта функция была ближе показателям контроля. Такая же закономерность прослеживалась и на 7-е сутки после операции.

Большое значение для понимания регуляторной роли НФ, имеют немногочисленные, но весьма убедительные данные об их способности *in vitro* представлять антиген лимфоцитам, макрофагам, что характеризует НФ как антигенпрезентирующие клетки [15,19, 21]. На это также указывают сведения об экспрессии HLA-DR-антигенов (аналогов Ia-антигенов) на человеческих НФ на ранних этапах дифференцировки в костном мозге НФ, несущие Ia-рецепторы, способны обеспечить пролиферативный ответ лимфоцитов в аллогенной смешанной культуре. Необходимость Ia-антигенов для включения клеток в иммунологические реакции, заканчивающиеся продукцией антител и образованием Т-клеток-эффекторов, является общепризнанной. О значении НФ для нормального функционирования иммунокомпетентных клеток говорят многочисленные факты. Так, например, искусственная нейтропения приводит к резкому снижению накопления моноцитов в очаге воспаления [23]. Нарушение функций НФ, развитие хронической нейтропении ведет к снижению активности естественных киллеров, реакции гиперчувствительности замедленного типа, пролиферации тимоцитов, сопровождается развитием иммунодефицитного состояния и инфекционных процессов [15, 19, 21].

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что НФ занимают ключевые позиции в регуляции иммунокомпетентных клеток. Она может осуществляться, как за счет прямого контакта его с иммунокомпетентными клетками, так и опосредованно, путем секреции регуляторных факторов.

НФ обладают способностью передвигаться по направлению к очагу инфекции, поглощать и переваривать бактериальные микроорганизмы. Сложный процесс фагоцитоза является многоэтапным и включает хемотаксис или движение по направлению к фагоцитируемому объекту, поглощение и переваривание микробов [15]. Реализация этих процессов происходит с помощью рецепторов адгезии на мембране клеток. Эти белки, относящиеся к семейству интегринов, формируются в третичных гранулах и выявляются МКА CD11a, CD11b и CD11c [24,14]. Миграция лейкоцитов в ткани процесс,

опосредованный взаимодействием лейкоцитов и клеток эндотелия. Связывание НФ с сосудистым эндотелием контролируется последовательной активностью двух групп молекул адгезии – селектинами и интегриннами. Селектины вызывают первичное прикрепление НФ к эндотелию, тогда как интегрины вызывают плотную адгезию [24,14].

Исследование экспрессии антигенов на НФ с помощью МКА, проведенное у 9 больных раком яичников до лечения, выявило снижение показателей почти всех исследуемых маркеров. Экспрессия CD11b антигена была снижена у 6 из 9 (66,6%), у трех пациентов она оказалась в пределах нормы. Среднее значение было достоверно ниже, чем в контроле и составило  $55,2 \pm 10,7\%$ . Такие же закономерности получены и при анализе показателей экспрессии антигена CD18 [14,22], средний уровень, которого был равен  $71,8 \pm 3,7\%$ , что достоверно ниже, чем в контроле  $90,4\% \pm 4,2\%$  ( $p < 0,01$ ). Аналогичные результаты были получены другими исследователями [25]. Ряд авторов считают, что лейкоциты крови онкологических больных с сепсисом характеризуются повышенной экспрессией CD11b и CD11c в сочетании с понижением экспрессии CD95, что может рассматриваться как возможные маркеры развития синдрома системной воспалительной реакции [25, 26].

Исследовали спонтанную агрегацию НФ у 398 онкологических больных, которая, была разработана Д.К. Новиковым в 1978 [27]. Анализ средних показателей агрегации, на различных этапах клинического течения заболевания, не выявил существенного отличия от показателей доноров у большинства из них. Однако отмечена значительная вариабельность показателей. Усиление агрегации НФ выявлено у больных раком яичников с диссеминацией по брюшине и накоплением асцита в брюшной полости, начиная с 1-х суток послеоперационного периода, агрегационная способность НФ резко возросла к 7 суткам. Отмечено статистически значимое отличие не только по сравнению с контролем и показателями больных до лечения, но и группой больных без асцита. Это, скорее всего можно объяснить активацией НФ в ответ на воспалительную реакцию в асцитической жидкости, которая накапливается у больных и после оперативного вмешательства. Усиление агрегации НФ отмечено у онкологических больных в раннем послеоперационном периоде, у которых развились гнойно-септические осложнения. Показатели агрегации НФ у больных с осложнениями достоверно ( $p < 0,01$ ) были выше, чем в группе без осложнений ( $134,1 \pm 10,1$ ) и ( $97,1 \pm 10,9$ ) усл.ед. соответственно [14, 20].

По данным А. Miles [28], замедление нейтрофильной мобилизации из сосудистого русла нарушает развитие эффективной воспалительной реакции, дает возможность бактериям бесконтрольно размножаться и развиваться инфекционному процессу. Он показал, что существует критический период (2-4 ч) после бактериальной инвазии, во время которого правильный противовоспалительный ответ может способствовать замедлению или отсутствию развития инфекционного процесса.

Как показало наше исследование, проведенное ранее, показатели фагоцитарной активности НФ до лечения у онкологических больных ( $n=52$ ), особенно при часовой инкубации (ФИ60), значительно превышали норму ( $p < 0,001$ ) [16]. Однако при индивидуальном анализе оказалось, что в начальной стадии фагоцитоза (ФИ5мин, ФЧ5мин) у одной трети больных (рак легкого-  $n=10$  ;

рак пищевода –  $n=5$  и рак желудка –  $n=4$ ) эти показатели были ниже нормы (ФИ5мин менее 10%, ФЧ5мин менее 2,0), т.е. в первые минуты у части больных отмечалось значительное замедление фагоцитарной активности НФ [14, 16].

Среди больных, прослеженных в динамике ( $n=19$ ), у 57,9% ( $n=11$ ) возникли гнойно-септические осложнения (сепсис у 5, пневмонии у 3, перитонит у 3). Количество лейкоцитов и НФ в группах не различалось. Абсолютные показатели НФ, в группе с гнойно-септическими осложнениями до лечения, было равно  $(4,7 \pm 0,5) \times 10^9$  /л, без осложнений –  $(5,9 \pm 0,8) \times 10^9$  /л. Другими авторами было установлено, что такие индикаторы функциональной деятельности НФ, как фагоцитарный индекс (ФИ40) и фагоцитарное число (ФЧ40) были значительно выше у больных сепсисом, чем те же показатели для контрольной группы [29].

Как было сказано выше, НФ у больных с сепсисом при дифференциальном подсчете состояли из двух популяций. Это – незрелые формы нейтрофильного ряда (миелоциты, метамиелоциты), которые обладают высокой адгезивной способностью и слабым фагоцитозом [19]. Второй пул – палочкоядерные и сегментоядерные формы НФ, которые окончательно формируют в синусах костного мозга зрелую популяцию НФ. У онкологических больных адгезия зрелых НФ снижена, при этом фагоцитарные функции активизированы, особенно при максимальной инкубации (ФИ60 мин.) с частицами латекса, как показало наше исследование [14].

Имеются данные, что большую роль при тяжелом сепсисе играет особая популяция НФ, которая обладает значительной адгезией к капиллярам сосудов и выраженной агрессивностью, уровень активности которых может вызывать повреждение тканей и связывают с неблагоприятным прогнозом [30-32]. Так, было показано на животных моделях сепсиса, что незрелые формы НФ накапливаются в микрососудах легких, где их активация стимулирует повреждение тканей через высвобождение протеолитических ферментов. Исследование аутопсических образцов от пациентов с полиорганной недостаточностью показывает локализацию НФ, варьирующую от секвестрации и агрегации в почечных кровеносных сосудах до широкой тканевой инфильтрации легкого [33,34]. При остром респираторном дистресс-синдроме, который может сопровождать сепсис, плотность нейтрофильных инфильтратов соотносится с нарушенной функцией легких и с высокими концентрациями в бронхоальвеолярной жидкости протеолитических ферментов, источником которых являются НФ [35].

НФ участвуют и в реологических изменениях, связанных с закупоркой сосудов в результате формирования лейкоцитарных скоплений. Имеются факты, показывающие, что активность НФ может быть причиной нарушения некоторых функций почек, о чем свидетельствует повышение респираторной и почечной функции у пациентов с системным воспалением при удалении НФ из сосудов почек [36].

В настоящее время, показано, что кроме фагоцитоза и внеклеточной дегрануляции, НФ проявляют антибактериальную активность посредством образования внеклеточных сетей-ловушек (neutrophil extracellular traps – NETs). Эти образования были впервые описаны V. Brinkmann и соавт. [37]. При формировании NETs происходит выбрасывание на скопление бактерий сетчатых структур, состоящих из нитей нуклеиновых кислот,

связанных с гистонами, а также гранулярными антимикробными пептидами и ферментами. Этот процесс позднее получил название «нетоз» (NETosis) и стал рассматриваться в качестве новой формы программируемой гибели клеток [38].

При ряде воспалительных заболеваний бактериальной этиологии, в том числе при сепсисе, септическом шоке может происходить чрезмерное образование «ловушек», что может привести к эпителиальной дисфункции и тромбозам [39]. Эти структуры, называемые нейтрофильными внеклеточными ловушками (NET), захватывают и поглощают бактерии и циркулирующие клетки крови в своей паутине. NET таким образом участвует в иммунной защите организма. Они также образуют большую прокоагулянтную поверхность, активируя контактную фазу коагуляции [4, 40-42].

Наконец, цитокины и провоспалительные медиаторы, секретируемые НФ, изменяют мембранный профиль сосудистых клеток, в частности эндотелиальных, тем самым способствуя клеточной дисфункции и септической коагулопатии. Таким образом, через явление NETosis НФ могут играть фундаментальную роль во взаимодействиях между иммунитетом и тромбозом. Термин «иммунотромбоз» был введен для описания этого взаимодействия. «Имунотромбоз» относится к врожденному внутрисосудистому иммунному ответу, ответственному за образование тромбина и образование тромбов, особенно в микрососудах. Он представляет собой независимый защитный механизм, который позволяет распознавать, сдерживать и впоследствии уничтожать патогенные микроорганизмы посредством активации коагуляции и рекрутирования иммунных клеток. Хотя «иммунотромбоз» участвует в распознавании бактерий и защите организма, не контролируемая активация во время септического шока может быть вредной для организма. В результате происходит чрезмерное образование тромбина и фибрина в микроциркуляции, вызывая кровотечение, тромбоз и потребление факторов свертывания, что приводит к диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (ДВС-синдром) [4]. Таким образом, лучшее понимание механизмов дисфункции НФ и их взаимодействия с другими сосудистыми клетками вовремя ДВС-синдрома и септического шока может открыть новые терапевтические возможности [4].

**Заключение.** Таким образом, злокачественная опухоль приводит к перестройке в системе иммунитета, особенно у пациентов с распространенным опухолевым процессом. Все виды традиционной противоопухолевой терапии оказывают выраженное угнетающее действие на уже неполноценную иммунную систему онкологического больного. Как свидетельствуют литературные данные и наше исследование, иммунная система борется с микробными инфекциями, но при тяжелом сепсисе, ее чрезмерная активация и расположение НФ в микроциркуляторном русле, особенно незрелых форм НФ, может способствовать патологическим проявлениям полиорганной недостаточности и тромбозам. Коррекция функций НФ при их взаимодействии со стенками кровеносных сосудов может быть полезной терапевтической стратегией для сепсиса.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 6, 9, 12, 13, 19, 21, 23, 24, 26, 28, 30-34, 36, 37, 40, 41 см. REFERENCES)

1. Сепсис: избранные вопросы диагностики и лечения. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Громова Е.Г., ред. М.: ИД «АБВ-пресс»; 2018.
3. Устьянцева И.М., Хохлова О.И. Роль нейтрофилов в развитии полиорганной недостаточности при сепсисе. *Политравма*. 2008; 2: 71-4.
5. Маянский Д.Н. Хронические воспаления. М.: Медицина; 1991.
7. Киселевский М.В., Ситдикова С.М., Абдуллаев А.Г., Шляпников С.А., Чикилева И.О. Сепсис-индуцированная иммуносупрессия. *Вестник хирургии*. 2018; 177 (5): 105-7.
8. Пигаревский В.Е. Полиморфоядерный лейкоцит и макрофаг в реакции воспаления и гиперчувствительности. *Архив патологич.* 1983; 11: 14—22.
10. Френкель М.А. Костномозговое кроветворение. В кн: Клиническая онкогематология. Волкова М.А., ред. М.: Медицина; 2007.
11. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Кушлинский Н.Е. Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови. Руководство для врачей. 2-е издание. М.: МИА; 2020.
14. Блиндарь В.Н. Функциональные особенности нейтрофилов крови онкологических больных. Дисс. докт. биол. наук. М.; 2003.
15. Хайтов Р.В., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина; 2000.
16. Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Юдичева Т.В., Нехаев И.В., Буйденко Ю.В., Свиридова С.П. Функциональная характеристика нейтрофилов периферической крови при хирургическом лечении онкологических больных. *Вестник РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН*. 2002; 3: 3-10.
17. Шубич М.Г., Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина; 1980.
18. Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина; 1983.
20. Блиндарь В.Н., Юдичева Т.В., Зубрихина Г.Н., Крохина О.В., Летыгин В.П. Функциональное состояние нейтрофилов периферической крови у больных со злокачественными и доброкачественными заболеваниями молочной железы. Сборник научных трудов «Новое в онкологии». Поддубная И.В., ред. Воронеж: Воронежский медицинский институт; 2001; 5: 217-24.
22. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Зарядьева Е.А., Заботина Т.Н., Лазарева Н.И., Михайлова И.Н., Барышников А.Ю. Адгезивная способность нейтрофилов периферической крови и экспрессия дифференцировочных антигенов у доноров и больных раком яичника. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1998; 12: 3-4.
25. Анисимова Н.Ю., Плужникова Н.А., Громова Е.Г. Кузнецова Л.С., Цветков Д.С., Киселевский М.В. Рецептор апоптоза и молекулы адгезии лейкоцитов – перспективные маркеры сепсиса у онкологических больных. *Российский иммунологический журнал*. 2011; 5(14): 3-4: 262-5.
27. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. Витебск: Витебский медицинский институт; 1996.
29. Анисимова Н.Ю., Громова Е.Г., Кузнецова Л.С., Титов К.С., Антонов А.К., Киселевский М.В. Фагоцитарная активность нейтрофилов у онкологических больных с сепсисом. *Вестник службы крови России*. 2011; 1: 31-3.
35. Магруппов Б.А., Вервекина Т.А., Убайдуллаева В.У., Юлдашев Ф.А. Морфологические аспекты респираторного дистресс-синдрома взрослых. *Вестник экстренной медицины*. 2014; 4: 96-9.
38. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН; 2009.
39. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2012; (4): 23-32.
42. Матосова Е.В., Андриков Б.Г. Морфофункциональная характеристика защитных сил нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вклад в патогенез провоспалительных реакций. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(4): 223-9.

REFERENCES

1. Sepsis: selected issues of diagnosis and treatment. Dmitrieva N.V., Petuhova I.N., Gromova E.G., eds. Moscow: ID «ABV-press»; 2018. (in Russian)
2. Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D., Lewis S.M., Treacher D.F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006; 368: 157-69.
3. Ust'yantseva I.M., Hokhlova O.I. The role of neutrophils in the development of multiple organ failure in sepsis. *Politravma*. 2008; 2: 71-4. (in Russian)
4. Steil L., Meziani F., Helms J. Neutrophil activation during septic shock. *Shock*. 2018; 49(4): 371-84.
5. Mayanskiy D.N. Chronic inflammation. Moscow: Meditsina; 1991. (in Russian)
6. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2013; 13: 862-74.
7. Kiselevskiy M.V., Sitdikova S.M., Abdullaev A.G., Shlyapnikov S.A., Chikileva I.O. Sepsis-induced immunosuppression. *Vestnik khirurgii*. 2018; 177 (5): 105-7. (in Russian)
8. Pigarevskiy V.E. Polymorphonuclear leukocyte and macrophage in the reaction of inflammation and hypersensitivity. *Arkhiv Patologii*. 1983; 11: 14-22. (in Russian)
9. Summers C, Rankin S.M, Condliffe A.M, Singh N, Peters M, Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*. 2010; 31: 318-24.
10. Frenkel' M.A. Bone marrow hematopoiesis. V kn: *Klinicheskaya onkogematologiya*. Volkova M.A., ed. Moscow: Meditsina; 2007 (in Russian)
11. Blindar' V.N., Zubrikhina G.N., Kushlinskii N.E. Hematological research methods. The clinical significance of blood counts [Rukovodstvo dlya vrachey]. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: MIA; 2020. (in Russian)
12. Fernandez-Borja M., van Baal J.D., Hordijk P.L. The regulation of leukocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovasc. Res*. 2010; 86: 202-10.
13. Brown K.A., Brain S.D., Pirson J. D., Ajwort J. D., J. D. Levis J. D., Traicher D.F. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical. Care*. 2016; 20(1): 1250-4.
14. Blindar' V.N. Functional features of blood neutrophils in cancer patients. Dis. Moscow; 2003. (in Russian)
15. Khaitov R.V., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
16. Zubrikhina G.N., Blindar' V.N., Yudicheva T.V., Nekhaev I.V., Bujdenok Yu.V., Sviridova S.P. Functional characteristics of peripheral blood neutrophils in the surgical treatment of cancer patients. *Vestnik RONC im N.N. Blokhina RAMN*. 2002; 3: 3-10. (in Russian)
17. Shubich M.G., Nagoev B.S. Alkaline leucocyte phosphatase is normal and pathological. Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)
18. Hejhou F.G., Kvagliano D. Hematological cytochemistry. Moscow: Meditsina; 1983. (in Russian)
19. Taneja R. Sharma A.P, Hallet M.B, Findlay G.P, Morris M.R. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock*. 2008; 30: 618-22.
20. Blindar' V.N., Yudicheva T.V., Zubrikhina G.N., Krokhina O.V., Letyagin V.P. The functional state of peripheral blood neutrophils in patients with malignant and benign diseases of the mammary gland [Sbornik nauchnykh trudov Novoe v onkologii]. Poddubnaya I.V., ed. Voronezh: Voronezhskiy meditsinskiy Institut; 2001; 5: 217-24. (in Russian)
21. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2013; 218: 1402-10.
22. Blindar' V.N., Zubrikhina G.N., Zaryad'eva E.A., Zabotina T.N., Lazareva N.I., Mikhaylova I.N., Baryshnikov A.Yu. Adhesive ability of peripheral blood neutrophils and expression of differentiation antigens in donors and patients with ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 1998; 12: 3-4. (in Russian)

23. Hietbrink F., Koenderman L., Althuisen M., Pillay J., Kamp V., Leenen LPH. Kinetics of the innate immune response after trauma: implications for the development of late onset sepsis. *Shock*. 2013; 40: 21-7.
24. Lobb R.R., Chi-Rosso G., Leone D.R. Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial leucocyte adhesion molecule. *J. Immunol.* 1991; 147: 124-9.
25. Anisimova N.Yu., Pluzhnikova N.A., Gromova E.G., Kuznetsova L.S., Tsvetkov D.S., Kiselevskiy M.V. Apoptosis receptor and leukocyte adhesion molecules – promising markers of sepsis in cancer patients. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2011; 5(14); 3-4: 262-5. (in Russian)
26. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2013; 218: 1402-10.
27. Novikov D.K., Novikova V.I. Immune Status Assessment. Vitebsk: Vitebskiy meditsinskiy institut; 1996. (in Russian)
28. Miles A.A., Miles E.M., Burke J. The value and duration of defence reactions of the skin to the primary lodgement of bacteria. *Br.J. Exp. Pathol.* 1957; 38: 79-96.
29. Anisimova N.Yu., Gromova E.G., Kuznetsova L.S., Titov K.S., Antonov A.K., Kiselevskiy M.V. Phagocytic activity of neutrophils in cancer patients with sepsis. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2011; 1: 31-3. (in Russian)
30. Summers C, Rankin S.M, Condliffe A. M, Singh N, Peters M, Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31: 318-24.
31. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90: 271-84.
32. Mare T.A, Treacher D.F, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis S.M, Chambers D. J, et al. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit. Care*. 2015; 19: 1-11.
33. Zhang J., Chu X.Y., Liu Y., Wang Y.X. Treatment of 336 cases of chest trauma. *Chin. J. Traumatol.* 2012; 15 (3): 182-6.
34. Hinson Jr J.M., Hutchison A.A., Ogletree M.L., Brigham K.L., Snapper J.R. Effect of granulocyte depletion on altered lung mechanics after endotoxemia in sheep. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 1983; 55 (1): 92-9.
35. Magrupov B.A., Vervekina T.A., Ubaydullaeva V.U., Yuldashev F.A. Morphological aspects of adult respiratory distress syndrome. *Vestnik ekstrennoy meditsiny*. 2014; 4: 96-9. (in Russian)
36. Peter H. C. Lelieveld, Catherine M. Wessels, Luke P. H. Liene, Leo Koenderman. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical. Care*. 2016; 20: 235-44.
37. Brinkmann V., Goosmann C., Kühn L.I., Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 2013; 3: 413.
38. Dolgushin I.I. Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophilic extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. Moscow: Izd-vo RAMN; 2009. (in Russian)
39. Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophil Extracellular Traps: mechanisms of formation, function. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya*. 2012; 4: 23-32. (in Russian)
40. Barnado A., Crofford L.J., Oates J.C. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 99(2): 265-78. doi: 10.1189/jlb.SBT0615-234R.
41. Kumar S., Gupta E., Kaushik S., Srivastava V. K. Saxena J., Mehta S., Gyot A. Quantification of NETs Formation in Neutrophil and Its Correlation with the Severity of Sepsis and Organ Dysfunction. *Clin. Chem. Acta*. Aug. 2019; 495: 606-10.
42. Matosova E.V., Andryukov B.G. Morphofunctional characteristic of the protective forces of neutrophils in bacterial infections and their contribution to the pathogenesis of pro-inflammatory reactions. *Hematologiya i transfusiologiya*. 2017; 62(4): 223-229. (in Russian)

Поступила 27.03.20  
Принята к печати 27.05.20

Дерюгина А.В.<sup>1</sup>, Иващенко М.Н.<sup>2</sup>, Игнатьев П.С.<sup>3</sup>, Белов А.А.<sup>2</sup>, Петров В.А.<sup>2</sup>

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра физиологии и анатомии, 603950, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, кафедра физиологии и биохимии животных, 603107, Нижний Новгород, Россия;

<sup>3</sup> АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», 620100, Екатеринбург, Россия

*Морфофункциональное состояние эритроцитов значительно изменяется при возникновении и прогрессировании различных заболеваний, а также при критических состояниях, травмах, сопровождающихся сильным повреждением тканей, что приводит к нарушению не только микроциркуляции, но и оказывает влияние на гемореологию в целом. В связи с этим возникают вопросы о потребности в развитии адекватных методов оценки функциональной активности эритроцитов. Цель работы – исследование возможностей лазерной интерференционной микроскопии при анализе функционального состояния эритроцитов. Получены экспериментальные данные, которые позволили в количественном отношении оценить состояние фазовой высоты и фазового диаметра, а анализ наноструктуры поверхности – функциональную активность клеток. Выявлена следующая закономерность: появление эхиноцитов при действии адреналина, который сопровождается увеличением фазовой высоты и уменьшением фазового диаметра с появлением на поверхности клеток спикул. Действие кортизола приводит к уменьшению фазовой высоты и фазового диаметра с появлением многочисленных разрыхлений структуры клеточной поверхности. При этом традиционный метод анализа распределения эритроцитов в популяции по морфологии (дискоциты, стоматоциты и дегенеративно-измененные формы клеток) не выявил статистически значимых различий. Таким образом, результаты свидетельствуют, что применение метода лазерной интерференционной микроскопии позволяет проводить качественную оценку морфофункциональной активности нативных клеток, что повышает информативность анализа и приводит к объективизации данных по функциональным возможностям эритроцитов.*

**Ключевые слова:** лазерная интерференционная микроскопия; эритроциты; морфология; наноструктура.

**Для цитирования:** Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Белов А.А., Петров В.А. Диагностические возможности анализа эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1): 22-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-22-25>

*Deryugina A.V.<sup>1</sup>, Ivashchenko M.N.<sup>2</sup>, Ignatyev P.S.<sup>3</sup>, Belov A.A.<sup>2</sup>, Petrov V.A.<sup>2</sup>*

### DIAGNOSTICS POSSIBILITIES OF ERYTHROCYTES ANALYSIS BY THE METHOD OF LASER INTERFERENCE MICROSCOPY

<sup>1</sup> Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «National Research Lobachevsky State University», 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Nizhny Novgorod State Agricultural Academy» Ministries of Agriculture of the Russian Federation, 603107, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>3</sup> Production Association «E.S. Yalamov Urals Optical and Mechanical Plant», 620100, Ekaterinburg, Russia

*The morphofunctional state of erythrocytes significantly changes by the onset and progression of various diseases, as well as in critical conditions, injuries, accompanied by severe tissue damage. This leads to a violation of microcirculation and has an effect on hemorheology in general. In connection with this, there is a need for the development of adequate methods for assessing the functional activity of erythrocytes.*

*The aim of the work was to study the possibilities of laser interference microscopy in the analysis of the functional state of erythrocytes. The results allowed us to quantify the state of the phase height and phase diameter of erythrocytes. Analysis of the surface nanostructure gave a qualitative assessment of the functional activity of cells. The following patterns were revealed: the action of adrenaline causes the appearance of echinocytes with an increase in phase height and decrease phase diameter and the appearance of spicules on the surface of cells. The action of cortisol leads to a decrease in the phase height and the phase diameter with the appearance of numerous loosening of the structure of the cell surface. Moreover, the traditional method of analyzing the distribution of erythrocytes in a population by morphology (discocytes, stomatocytes, and degeneratively altered cell forms) did not reveal statistically significant differences. Thus, the results indicate that the interference microscopy method allows a qualitative assessment of the morphofunctional activity of native cells. This increases the information content of the analysis and leads to the objectification of data on the functional capabilities of erythrocytes.*

**Key words:** laser interference microscopy; erythrocytes; morphology; nanostructure.

**For citation:** Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Belov A.A., Petrov V.A. Diagnostics possibilities of erythrocytes analysis by the method of laser interference microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(1): 22-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-22-25>

**For correspondence:** *Ivashchenko M.N.*, associate Professor of the Department physiology and biochemistry of animals; e-mail: [kafedra2577@mail.ru](mailto:kafedra2577@mail.ru)

**Information about authors:**

Deryugina A.V., <http://orcid.org/0000-0001-8812-8559>;  
Ivashchenko M.N., <https://orcid.org/0000-0001-6642-8518>;  
Ignatyev P.S., <https://orcid.org/0000-0001-5075-7034>;  
Belov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4869-5054>;  
Petrov V.A. <https://orcid.org/0000-0002-9190-0914>.

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

**Acknowledgment.** *The research was carried out with the financial support of the RFBR in the framework of scientific project №19-316-90066.*

Received 09.07.2020  
Accepted 26.07.2020

**Введение.** Эритроциты, будучи наиболее многочисленной фракцией клеточных элементов крови, являются основным фактором, определяющим ее реологию. Возникающие ухудшения реологических свойств крови создают условия для развития расстройств микроциркуляции - в зоне, где осуществляется газообмен. Определяют способность эритроцитов к микроциркуляции такие показатели как их агрегация и деформируемость, которые зависят от структурной организации мембран эритроцитарных клеток [1]. Жесткие, плохо поддающиеся деформации эритроциты не только блокируют микроциркуляторное русло, но и повреждают интиму сосудов, особенно крупных артерий, где скорость кровотока достаточно высока [2]. При возникновении и прогрессировании различных заболеваний, а так же при критических состояниях, травмах, сопровождающихся сильным повреждением тканей происходит нарушение мембранных структур эритроцитов и, как следствие, их функционирование [3]. В связи с этим возникает потребность в развитии адекватных методов оценки функциональной активности эритроцитов, внедрении новых способов получения информации о физиологическом состоянии клеток в целом и в условиях изменения гомеостаза. В литературе имеется сравнительно мало работ, посвященных анализу свойств нефиксированных эритроцитов, что объясняется трудностями исследования живых клеток. Одним из эффективных современных высокоинформативных методов определения состояния биологических объектов является лазерная интерференционная микроскопия. Этот метод, без изменения нативных свойств клеток, наряду с построением изображения образца, позволяет изучать клеточные процессы, выяснять такие важнейшие свойства, как эластичность, мобильность поверхностных слоев, адгезия, молекулярное связывание и электростатичность.

Цель работы – исследование возможностей лазерной интерференционной микроскопии при анализе функционального состояния эритроцитов.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили эритроциты периферической крови человека. Исследование проведено с разрешения локального этического комитета при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского. Информированное согласие доноров на участие в исследовании получено.

Кровь забирали утром натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки, после чего из венозной крови получали эритроцитарную взвесь.

Интерференционную микроскопию эритроцитов проводили при модификации клеток в экспериментах *in vitro*. Было проведено несколько серий по 20 опытов.

Исследовали эритроциты, преинкубированные с адреналином ( $1 \cdot 10^{-9}$  г/мл) в течение 15 мин (1 серия), кортизолом ( $5 \cdot 10^{-7}$  г/мл) в течение 30 минут (2 серия).

Структурные изменения в эритроцитах изучали методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) на лазерном интерференционном микроскопе МИИ-340 (Екатеринбург, Россия) с объективом 30x (NA=0.65),  $\lambda$  лазера=650 нм. Для захвата изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscan, Russia) с разрешением 782x582 пикселей.

В ходе исследования биологические объекты размещались на зеркальной подложке, от которой отражается проходящий через клетку свет. В результате фиксируется двойной сдвиг фазы луча когерентного источника света в каждой точке объекта, а с помощью дополнительной волны от того же источника формируется интерференционное изображение клетки. Для исследования получали изображения 10 участков с монослойным расположением клеток в интерференционном канале и отраженном свете в каждой пробе.

Состояние эритроцитов человека оценивали, регистрируя среднюю величину оптической разности хода и площадь фазового изображения эритроцита. Для получения достоверного результата показатели рассчитывали, используя не менее 100 клеток от каждого образца.

Математическая обработка проведена методом вариационной статистики с расчетом среднего значения (M), ошибки средней (m) и определением достоверности различий по t-критерию Стьюдента. Статистический анализ полученных результатов выполняли с использованием программы Microsoft Exel и пакета прикладных программ Statistika версия 6.0.

**Результаты.** Анализ результатов по морфологическим критериям, таким как распределение эритроцитов в популяции по форме показал, что инкубация эритроцитов с кортизолом и адреналином не вызывала значимого различия при действии данных веществ в отношении количества дискоцитов, стоматоцитов и дегенеративно-измененных форм клеток относительно интактной группы (табл. 1). Регистрировалось только статистически значимое увеличение количества эхиноцитов при действии адреналина.

При этом следует отметить, что тенденция в изменении морфологии при действии адреналина и кортизола была разнонаправленной, но статистически значимых изменений не регистрировалось. Следовательно, традиционный метод анализа морфологии эритроцитов позволяет получать усредненные данные, что не всегда дает истинную информацию о воздействии и делает невозможным объективную оценку состояния эритроцитов.

Таблица 1

Изменение численности морфологических форм эритроцитов в зависимости от воздействия, %

Показатели	Эхиноциты	Стоматоциты	Дегенеративно-измененные формы	Дискоциты
Интактные	1,45±0,4	0,70±0,4	3,10±0,8	94,75±2,2
Адреналин	3,18±1,0*	0,98±0,1	3,70±0,2	92,14±1,3
Кортизол	1,30±0,5	0,43±0,2	2,08±0,7	96,20±1,9

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* – достоверность различий между значениями с интактными клетками по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

Воздействие исследованных веществ *in vitro* на фазовый диаметр и фазовую высоту эритроцитов (M±m)

Показатели	Фазовый диаметр эритроцитов, мкм	Фазовая высота эритроцитов, нм
Интактные	7,55±0,03	216,8±4,66
Адреналин	7,39±0,06*	225,4±4,62*
Кортизол	7,37±0,03*	177,8±6,09*

Анализ наноструктуры эритроцитов показал, что интактные эритроциты имели типичную форму двояковогнутых дискоцитов, на поверхности выделялась незначительная неоднородность, обусловленная присутствием мембранно-связанных белков. Оценка распределения оптической плотности показала равномерное распределение гемоглобина.

Учитывая, что повышение функциональной деятельности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы является своего рода пусковым механизмом для сложной перестройки организма при развитии стрессового состояния, возникающего под воздействием различных неблагоприятных факторов [4], нами были проведены исследования действия адреналина и кортизола на эритроциты. Для количественной оценки морфофункционального состояния живых эритроцитов использовали параметр, называемый фазовой высотой клетки, который определяли как максимальную высоту профиля относительно уровня подложки. По фазовому профилю эритроцита можно измерить фазовый диаметр клетки.

Регистрация фазовой высоты эритроцитов выявила, что после инкубации клеток с адреналином фазовая высота увеличивалась на 4%, после инкубации с кортизолом — снижалась на 18% относительно интактных значений (табл. 2). Фазовый диаметр эритроцитов после инкубации эритроцитов с адреналином, кортизолом достоверно снизился на 2% и 3% соответственно, по сравнению со значениями интактной группы клеток.

Таким образом, лазерная интерференционная микроскопия позволяет очень точно оценить изменения фазовой высоты, которые связаны с изменениями показателя преломления клеток и, таким образом, зависит от концентрации и соотношения количества веществ в растворе. Полученное различие в величинах фазовой высоты обусловлено наличием воды и, следовательно, меньшим изменением фазовой высоты образца [5].

Фазовое изображение эритроцитов, инкубированных с адреналином, кортизолом, имело «шероховатую» форму с выпуклостями и выростами, резко контрастирующими по отношению к поверхности образца. Менялась геометрия клетки, изменялось соотношение «поверхность/объем», происходила сферуляция эритроцитов.

При инкубации эритроцитов с кортизолом на поверхности клеток появлялись многочисленные разрыхления структуры клеточной поверхности. Инкубация клеток

с адреналином вызывала больший эффект деформации эритроцитарных мембран, который выражался появлением на поверхности выпуклых уплотнений и спикул.

Наблюдаемые эффекты, возможно, вызваны перенасыщением адреналином гормональных рецепторов с последующей модификацией свойств мембран и функционального состояния клеток [6]. Вполне вероятно и то, что обнаруженные изменения при инкубации клеток с адреналином частично опосредуются и через активацию свободнорадикального окисления, интенсификация процессов перекисного окисления липидов влечет за собой нарушение структуры и свойств эритроцитарных мембран. Данные процессы могут опосредовать увеличение количества гемина, о чем свидетельствуют образование спикул и формирование эхиноцитов, что так же отмечено в ряде исследований [7].

При действии стероидных гормонов на эритроцитарные мембраны изменяются механизмы их структурной самоорганизации, активные группы гормона взаимодействуют с СО- и NH-группами белков, и фосфолипидов мембраны. Это приводит к образованию в мембране сложных белок-липидных доменов, вытеснению диполи воды из доменов и как результат разрыхлению мембраны [8].

**Заключение.** По результатам работы показано, что на основе простого способа пробоподготовки можно получать интерференционное изображение живых эритроцитов с детализацией морфологических параметров и использовать их для качественной оценки морфофункциональной активности клеток. При этом анализ наноструктуры мембраны эритроцитов, являющейся их специфической реакцией на внешнее воздействие, повышает информативность анализа и приводит к объективизации данных по функциональным возможностям эритроцитов.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90066.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012; 8(1): 52.



2. Соколова И.А. Агрегация эритроцитов. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2010; 9 (4): 4-26.
3. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнат'ев П.С., Лодяной М.С., Самоделькин А.Г. Изменение фазового портрета и электрофоретической подвижности эритроцитов при различных видах заболеваний. *Современные технологии в медицине*. 2019; 11(2): 63–8.
4. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнат'ев П.С., Самоделькин А.Г., Белов А.А., Гушин В.А. Оценка генотоксических эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (5): 290-2.
5. Юсипович А.И., Берестовская Ю.Ю., Шутова В.В., Левин Г.Г., Герасименко Л.М., Максимов Г.В., Рубин А.Б. Новые возможности исследования микробиологических объектов методом лазерной интерференционной микроскопии. *Биофизика*. 2011; 56 (6): 1091-8.
6. Голанда И.Л., Казин Э.М., Галеев А.Р. Поиск взаимосвязей между параметрами кинетики кислотного гемолиза эритроцитов и функциональным состоянием организма. *Физиология человека*. 1996; 4: 130-6.
7. Сергунова В.А., Черняев А.П., Козлов А.П., Близнюк У.А., Борщеговская П.Ю., Козлова Е.К., Черныш А.М. Наноструктура мембран эритроцитов при интоксикации крови. Исследование с помощью атомной силовой микроскопии. *Альманах клинической медицины*. 2016; 44 (2): 234-41.
8. Панин Л.Е., Мокрушников П.В., Куницын В.Г., Панин В.Е., Зайцев Б.Н. Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса. *Физическая мезомеханика*. 2011; 14: 5-17.
- the red blood cell in normal and critical conditions. *Obshchaya reanimatologiya*. 2012; 8(1): 52. (in Russian)
2. Sokolova I.A. Aggregation of red blood cells. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyatsiya*. 2010; 9 (4): 4-26. (in Russian)
3. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Lodyanoy M.S., Samodelkin A.G. Alterations in the phase portrait and electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases. *Sovremennye tekhnologii v medicine*. 2019; 11(2): 63–8. (in Russian)
4. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignat'ev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. Assessment of genotoxic effects in buccal epithelium in disorders of the adaptive status of the organism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (5): 290-2. (in Russian)
5. Yusipovich A.I., Bepestovskaya Yu.Yu., Shutova V.V., Levin G.G., Gerasimenko L.M., Maksimov G.V., Pubin A.B. New possibilities for studying microbiological objects by laser interference microscopy. *Biofizika*. 2011; 56 (6): 1091-8. (in Russian)
6. Golenda I.L., Kazin E.M., Galeev A.R. Search for relationships between the parameters of the kinetics of acid hemolysis of red blood cells and the functional state of the body. *Fiziologiya cheloveka*. 1996; 4: 130-6. (in Russian)
7. Sergunova V.A., Chernyaev A.P., Kozlov A.P., Bliznyuk U.A., Borshchegovskaya P.Yu., Kozlova E.K., Chernysh A.M. Nanostructure of erythrocyte membranes in blood intoxication. Research using atomic force microscopy. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2016; 44 (2): 234-41. (in Russian)
8. Panin L.E., Mokrushnikov P.V., Kunitsyn V.G., Panin V.E., Zaytsev B.N. Fundamentals of multilevel mesomechanics of nanostructured transitions in erythrocyte membranes and their destruction in interaction with stress hormones. *Fizicheskaya mezomekhanika*. 2011; 14: 5-17. (in Russian)

## REFERENCES

1. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanas'ev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. Structure and function of

Поступила 09.07.20  
Принята к печати 26.07.20

Кузьменко Г.Н., Харламова Н.В., Назаров С.Б., Матвеева Е.А., Иваненкова Ю.А.

## ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННОГО КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭРИТРОПОЭЗА У ГЛУБОКОНЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

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

*Одной из актуальных проблем выхаживания недоношенных детей является своевременное прогнозирование, диагностика и лечение анемии, частота которой достигает 90%. Особое значение приобретает изучение ретикулоцитарных показателей крови у глубоконедоношенных новорожденных, так как правильная оценка гемограмм имеет решающее значение в тактике ведения данной категории детей.*

*Цель: определение особенностей эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей гемограммы венозной крови у недоношенных новорожденных 24-32-х нед гестации в динамике неонатального периода.*

*Обследовано 111 новорожденных 24-32-х нед гестации в раннем неонатальном периоде (на 3-7-е сут) и в возрасте 1 месяца жизни. Наряду со стандартными диагностическими процедурами в соответствии с действующими клиническими рекомендациями и стандартами детям выполнено определение 28 параметров эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей гемограммы. Исследовалась венозная кровь на автоматическом гематологическом анализаторе ADVIA 2120i, Siemens, USA. У глубоконедоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде существует высокая активность эритропоэза соответственно выраженности респираторных и метаболических нарушений с омоложением ретикулоцитарных субпопуляций. Установлены отрицательные значения дельта гемоглобина на фоне снижения среднего количества гемоглобина в ретикулоцитах у детей 24-27 нед гестации, что характеризует наиболее низкие значения доступности железа для эритропоэза у данной категории новорожденных. Показано, что снижение показателей ретикулоцитов и нормохромия у всех обследованных новорожденных к месячному возрасту сопровождаются высокими уровнями фракции незрелых ретикулоцитов, при этом у трети детей сохраняется ограничение доступности железа для эритропоэза.*

**Ключевые слова:** *глубоконедоношенные новорожденные; гемограмма; ретикулоциты; эритропоэз.*

**Для цитирования:** Кузьменко Г.Н., Харламова Н.В., Назаров С.Б., Матвеева Е.А., Иваненкова Ю.А. Возможности современного клинического анализа крови для оценки эритропоэза у глубоконедоношенных новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 26-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-26-34>

*Kuzmenko G.N., Kharlamova N.V., Nazarov S.B., Matveeva E.A., Ivanenkova Yu.A.*

### FEATURES OF MODERN CLINICAL RESEARCH BLOOD ANALYSIS IN THE ASSESSMENT OF ERYTHROPOIESIS IN DEEP-PREATURE NEWBORNS

Federal state budgetary institution «Ivanovo research Institute of maternity and childhood named after V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 153045, Ivanovo, Russia

*One of the urgent problems of nursing premature babies is the timely prediction, diagnosis and treatment of anemia, the frequency of which reaches 90%. Of particular importance is the study of reticulocytic blood parameters in deep-premature newborns, since the correct assessment of hemograms is crucial in the management of this category of children. To determine the characteristics of red blood cells and reticulocyte parameters of venous blood hemogram in premature newborns 24-32 weeks of gestation in the dynamics of the neonatal period. 111 newborns were examined at 24-32 weeks of gestation in the early neonatal period (on day 3-7) and at the age of 1 month of life. Along with standard diagnostic procedures, in accordance with current clinical recommendations and standards, 28 parameters of erythrocyte and reticulocyte hemogram parameters were determined for children. Venous blood was examined using an automatic hematological analyzer ADVIA 2120i, Siemens, USA. In deep-premature newborns in the early neonatal period, there is a high activity of erythropoiesis, respectively, the severity of respiratory and metabolic disorders with rejuvenation of reticulocytic subpopulations. Negative values of Delta hemoglobin were found against the background of a decrease in the average amount of hemoglobin in reticulocytes in children 24-27 weeks of gestation, which characterizes the lowest values of iron availability for erythropoiesis in this category of newborns. It is shown that a decrease in reticulocyte counts and normochromia in all examined newborns by the age of one month are accompanied by high levels of immature reticulocyte fraction, while a third of children still have limited iron availability for erythropoiesis.*

**Key words:** *extremely premature newborns; blood counts; reticulocytes; erythropoiesis.*

**For correspondence:** *Kuzmenko Galina Nikolaevna, doctor of medicine, leading researcher at the laboratory of clinical biochemistry and genetics; e-mail: kuzmenko\_gnk@mail.ru*

#### **Information about authors:**

*Kuzmenko G.N., <http://orcid.org/0000-0001-5772-9271>;  
Kharlamova N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2867-1693>;  
Nazarov S.B., <http://orcid.org/0000-0003-1545-7655>;  
Matveeva E.A., <http://orcid.org/0000-0002-3266-610X>;  
Ivanenkova Yu.A., <http://orcid.org/0000-0001-6504-2664>.*

**For citation:** *Kuzmenko G.N., Kharlamova N.V., Nazarov S.B., Matveeva E.A., Ivanenkova Yu.A. Features of modern clinical research blood analysis in the assessment of erythropoiesis in deep-premature newborns. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 26-34 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-66-1-26-34>*

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

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

Received 05.08.2020  
Accepted 06.08.2020

**Введение.** Одной из актуальных проблем выхаживания недоношенных детей является своевременное прогнозирование, диагностика и лечение анемии, частота которой достигает 90%. Особое значение приобретает изучение ретикулоцитарных показателей крови у глубоконедоношенных новорожденных, так как правильная оценка гемограмм имеет решающее значение в тактике ведения данной категории детей. Ранняя анемия новорожденных (РАН) развивается у 16,5 – 91,5% глубоконедоношенных детей и является фактором риска ухудшения показателей физического и интеллектуального развития в дальнейшем [1 – 4]. У недоношенных новорожденных с анемией тяжелее протекают такие заболевания, как бронхолегочная дисплазия, ретинопатия недоношенных, некротизирующий энтероколит [5].

Ранняя анемия недоношенных детей (РАН) развивается на 3-8 неделе жизни, и является самой частой причиной гемотрансфузий у детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела [6]. Это – полиэтиологическое заболевание со сложными механизмами патогенеза, которые еще до конца не изучены. Основными причинами развития РАН у глубоконедоношенных детей считаются незрелость гемопоэза, низкие уровни эндогенного эритропоэтина, замедленное переключение синтеза с фетального гемоглобина на гемоглобин А, недостаточное поступление нутриентов, ятрогенная потеря крови, большие темпы прироста массы тела, а следовательно, и ОЦК, более короткий срок циркуляции незрелых эритроцитов, дефицит витамина Е и т.д. [7].

На современном этапе все больше внимания уделяется автоматизированному анализу ретикулоцитов, который открывает большие перспективы для оценки состояния эритропоэза. Преимущество показателей ретикулоцитов заключается в том, что они позволяют оценить меру гемоглобинизации в реальном времени [8]. Референсные интервалы показателей гемограммы у здоровых новорожденных в раннем неонатальном периоде достаточно освещены в специальной литературе, тогда как исследования, посвященные анализу ретикулоцитарных параметров недоношенных новорожденных, немногочисленны [9-13]. Имеются лишь единичные исследования, касающиеся изучения ретикулоцитарных показателей у недоношенных новорожденных [14].

В настоящее время имеется ряд сообщений об использовании современной лазерной технологии для исследования ретикулоцитарных показателей у глубоконедоношенных новорожденных и их применении в клинике. Однако, конкретные характеристики показателей ретикулоцитов, выполненные на современном техническом уровне при различной неонатальной патологии, практически отсутствуют. Имеются различия в показателях крови, взятой из разных сосудистых источников, которые наиболее отличаются в неонатальном периоде. Образцы крови, полученные из артерий, вен и капилляров, имеют разный состав и не могут считаться эквивалентными. Капиллярная кровь содержит смесь неопределенной доли крови из артериол, венул, интерстициальных и внутриклеточных жидкостей [15], имеет более высокие параметры гемоглобина (Hb), гематокрита (Hct), эритроцитов (RBC), лей-

коцитов (WBC), отмечается повышение среднего объема эритроцитов в венозной крови. Имеются значительные различия показателей гематокрита, MCV и MCH в венозной и капиллярной крови: выявлены корреляции этих показателей и гемоглобина и методом взятия образца крови (капиллярными и венозными) ( $r = 0,877$ ) [16]. Кроме того, при тяжелых состояниях новорожденных, сопровождающихся анемией и полицитемией, нарушениями микроциркуляции, могут быть существенные ошибки при исследовании капиллярной крови [17]. Поэтому в сомнительных случаях, особенно у тяжелобольного пациента важно определять гематологические показатели, в том числе гемоглобин, гематокрит, из центральной вены, при этом установлено, что венозный гематокрит на 2-5%, а гемоглобин на 25-50 г/л ниже капиллярного [18]. Определение динамики указанных показателей ретикулоцитов и эритроцитов в течение неонатального периода у глубоконедоношенных новорожденных необходимо для оценки состояния эритроцитарного звена и раннего прогнозирования нарушений.

В связи с этим нами выполнено исследование показателей эритроцитов и ретикулоцитов венозной крови у глубоконедоношенных детей в раннем неонатальном периоде и в месячном возрасте, в том числе в зависимости от их гестационного возраста. Для оценки показателей ретикулоцитов глубоконедоношенных новорожденных мы использовали «референсные диапазоны», состоящие из значений 5-го и 95-го перцентилей.

Цель исследования – определение особенностей эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей гемограммы венозной крови у недоношенных новорожденных 24-32-х недель гестации в динамике неонатального периода.

**Материал и методы.** Работа выполнена на базе ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России в лаборатории клинической биохимии и генетики. Дети наблюдались в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТН), в дальнейшем – в отделении второго этапа выхаживания недоношенных детей.

Основу работы составил анализ клинико-anamnestических наблюдений и данных лабораторно-инструментального обследования недоношенных новорожденных, родившихся при сроке гестации 24-32 нед с массой тела менее 1500 г, в раннем неонатальном периоде (3—7-е сут жизни) и в возрасте 1 месяца жизни. У всех детей было проведено полное клиническое, лабораторное и инструментальное обследование, в соответствии с имеющимся основным заболеванием и соответствующими ему клиническими рекомендациями. Осуществлялась выкопировка данных из истории развития новорожденного ребенка (форма №097/у) и «Медицинская карта стационарного больного» (форма №003/у).

В исследование не были включены новорожденные с выявленными врожденными пороками развития и хромосомными аномалиями, сепсисом, гемолитической болезнью новорожденных, острой кровопотерей, в том числе вследствие фето-фетального трансфузионного синдрома, и нарушениями системы гемостаза (геморра-

гическая болезнь новорожденных, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания).

В исследование включены 111 новорожденных, родившиеся при сроке гестации 32 нед и менее, обследование проводилось в раннем неонатальном периоде и к концу первого месяца жизни. В дальнейшем дети были разделены на группы в зависимости от срока гестации при рождении: 22 ребенка родились при сроке гестации 24-27 нед (1-я группа), 79 новорожденных – 28-32 нед (2 группа).

Исследования гемограммы проводились на гематологическом анализаторе экспертного класса ADVIA 2120i Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY (США), основой работы которого являлась детекция параметров эритроцитов и ретикулоцитов с помощью лазера и окраски РНК ретикулоцитов красителем Oxazin 750. Рекомендуемые производителем процедуры контроля качества проводились ежедневно. Для взятия крови использовались пластиковые одноразовые пробирки VACUETTE Greiner Bio-One (Австрия) с  $K_2$ ЭДТА 1,5-2,2 мг/мл, исследования проводились из 135 мкл венозной крови. У законных представителей новорожденных были взяты информированные согласия на участие в исследовании.

Проводился анализ следующих параметров эритроцитов и ретикулоцитов: эритроциты (RBC,  $10^{12}/л$ ), гемоглобин (HGB, г/дл), гематокрит (HCT, %), RDW% – показатель гетерогенности эритроцитов по объему, средний объем эритроцита, измеряемый цитометрически (MCV, фл). Анализировали расчетные показатели – средний эритроцитарный HGB (MCH, пг), среднюю концентрацию эритроцитарного HGB (MCHC, г/дл), а также измеряемые показатели – концентрацию HGB в эритроцитах в среднем (CHCM, г/дл), измеряемую по средним значениям HС гистограммы RBC (гистограммы распределения эритроцитов в зависимости от концентрации HGB); вариацию CHCM в популяции эритроцитов – HDW; показатели анизоцитоза, макро- и микроцитоза, гипо- и гиперхромии; CH – содержание HGB в эритроците – среднее значение по RBC CH гистограмме, которая отображает распределение эритроцитов в зависимости от содержания HGB в каждой клетке, независимо от ее объема. Клеточный HGB (Cellular HGB, г/дл) измеряли с помощью проточной цитометрии. Исследовали параметры ретикулоцитов: относительное (RET%) и абсолютное количество ( $RET\# \times 10^9 /л$ ); средний объем (MCVr, фл); популяцию зрелых ретикулоцитов с низким содержанием РНК – L-Ret., %, со средней абсорбцией (M-Ret., %) и незрелых, с высоким содержанием РНК (H-Ret., %); фракцию незрелых ретикулоцитов (IRF), индекс IRF m+n (ретикулоцитов со средним и высоким поглощением); среднюю концентрацию (CHCMr) и среднее содержание (CHr) гемоглобина в ретикулоцитах по гистограмме; дельта-гемоглобин ( $\Delta Hb$ , пг) – разность между содержанием HGB в ретикулоците и эритроците.

Статистическую обработку материала выполняли с использованием пакета прикладных лицензионных программ «Microsoft Office 2007», «Statistica for Windows 13.0», «MedCalc 7.4.4.1». Межгрупповые различия и их достоверность анализировали на основе параметрического *t*-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна-Уитни и Вилкоксона при уровне значимости  $p < 0,05$ . Анализировали коэффициенты корреляции по Пирсону (*r*), среднюю арифметическую (*M*),

среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ) и среднюю ошибку средней величины (*m*). Референсные интервалы – 5 и 95 процентиля (СI).

**Результаты.** Данные клинического обследования новорожденных показали, что масса тела новорожденных при рождении составила  $1116,5 \pm 23$  граммов, длина тела –  $35,0 \pm 0,42$  см, окружность головы –  $27,0 \pm 0,23$  см, окружность груди –  $24,0 \pm 0,24$  см. 22 ребенка имели экстремально низкую массу тела (ЭНМТ), 32 – очень низкую массу тела (ОНМТ), у остальных масса тела была низкой. Синдром задержки внутриутробного развития диагностирован у трети (34 – 30,6%) новорожденных, у всех детей зарегистрирован вариант «маловесный к сроку гестации». Антенатальная профилактика респираторного дистресс-синдрома (РДС) была проведена большинству – 85 (76,7%) новорожденным. В тяжелой асфиксии родились 26 (23,5 %) детей, в асфиксии средней тяжести – 85 (73,9 %) новорожденных. В структуре заболеваемости отмечена сочетанная патология, представленная преимущественным поражением центральной нервной и дыхательной систем. На момент рождения у большинства детей имел место респираторный дистресс-синдром, врожденные пневмонии. В раннем неонатальном периоде у всех детей сформировалось гипоксически-ишемическое поражение ЦНС. Все дети получали ту или иную респираторную поддержку: искусственная вентиляция легких проводилась 26% новорожденным, остальным детям респираторную поддержку осуществляли методом СРАР. Обследование, проведенное в дальнейшем, показало, что ранняя анемия недоношенных была диагностирована у 81 ребенка, что составило 73,3%, причем у 50 (45,9%) была выявлена анемия тяжелой степени, потребовавшая переливания препаратов крови.

Всем пациентам в возрасте 3-5 дней и в 1-й месяц жизни проводилось исследование показателей венозной крови на гематологическом анализаторе ADVIA 2120i. Гематологический анализатор позволяет при исследовании небольшого объема крови (135 мкл) получить развернутую гемограмму, в том числе эритроцитограмму и ретикулоцитограмму.

Проведен анализ эритроцитограммы и ретикулоцитограммы у новорожденных в раннем неонатальном периоде и в месячном возрасте (табл. 1).

Количество эритроцитов, уровень гемоглобина и показатель гематокрита имели наибольшие значения в раннем неонатальном периоде и достоверно снижались к месячному возрасту. Такие же тенденции были отмечены по уровням объема эритроцитов (MCV) и количества гемоглобина в эритроците (MCH).

Гематологический анализатор ADVIA 2120i измеряет содержание гемоглобина непосредственно во всех эритроцитах, создавая светорассеяние под большим углом. На основании степени рассеяния света анализатор получает показатель средней концентрации эритроцитарного гемоглобина (CHCM) и среднего количества гемоглобина (CH). Эти значения более точные, чем традиционные методы измерения гемоглобина (с использованием лизиса эритроцитов цианидом).

По нашим данным, показатель среднего количества гемоглобина (CH) достоверно снижался, что свидетельствует о снижении гемоглобинизации эритроцитов к месяцу жизни.

Средняя концентрация эритроцитарного Hb (MCHC) – расчетный показатель, который отражает среднее зна-

Таблица 1

**Показатели эритроидного роста гемограммы венозной крови у глубококондоношенных новорожденных в динамике наблюдения**

Показатели	Новорожденные в раннем неонатальном периоде, n = 111		Новорожденные к концу первого месяца жизни, n = 84		Достоверность различий, p
	Mean±m	5%-95% CI	Mean±m	5%-95% CI	
RBC, 10 <sup>12</sup> /л	3,94±0,08	3,78-4,10	2,97±0,06	2,86-3,08	<0,001
HGB г/дл	14,6±0,25	14,2-15,2	9,81±0,21	9,40-10,2	<0,01
HTC %	42,5±0,84	40,9-44,2	28,3±0,60	27,1-29,5	<0,001
MCV фл	111,6±0,95	109,7-113,5	95,5±0,67	94,1-96,8	<0,001
MCH пг	38,2±0,88	36,5-40,0	33,1±0,30	32,5-33,7	<0,001
MCHC г/дл	34,6±0,70	33,2-36,0	34,7±0,20	34,3-35,1	>0,05
CHCM г/дл	32,6±0,15	32,3-33,0	34,1±0,13	33,8-34,3	<0,001
CH пг	35,9±0,29	35,3-36,5	32,0±0,32	31,3-32,6	<0,001
RDW%	18,5±0,14	18,2-18,8	18,2±0,32	17,9-19,1	>0,05
Hypochr. %	8,08±1,11	0,8-24,4	3,77±0,50	0,6-11,4	<0,01
Cellular HGB г/дл	13,6±0,32	13,0-14,2	9,80±0,26	9,28-10,3	<0,001
HDW г/дл	3,49±0,04	3,40-3,57	3,61±0,05	3,50-3,71	>0,05
% Retic	4,90±0,28	4,34-5,46	2,83±0,19	2,46-3,21	<0,001
# Retic. x10 <sup>9</sup> /л	185,2±10,4	164,6-206,0	82,4±5,09	72,2-92,5	<0,001
L-Ret.%	62,9±2,22	58,4-67,3	58,2±2,02	54,2-62,3	>0,05
#L-Ret. x10 <sup>9</sup> /л	1013,9±70,7	871,7-1156,0	521,9±37,2	447,1-596,7	<0,001
M-Ret.%	20,9±0,99	18,8-22,8	21,8±0,69	20,4-23,2	>0,05
#M-Ret.	395,0±40,8	313,0-477,0	200,2±17,0	166,0-234,5	<0,001
H-Ret.%	16,2±1,45	13,3-19,2	18,2±1,37	15,4-21,0	>0,05
#H-Ret. x10 <sup>9</sup> /л	320,2±40,1	239,4-400,9	184,1±24,3	135,1-233,0	<0,01
IRFH %	16,7±1,58	13,5-19,9	18,2±1,27	15,4-20,9	>0,05
IRF M+H %	36,4±2,22	31,9-40,8	40,5±1,56	37,4-43,7	>0,05
MCVR фл	116,7±1,90	112,9-120,4	108,6±0,76	107,1-110,2	<0,001
CHCMR г/дл	30,3±1,06	28,3-32,4	30,4±0,20	30,0-30,8	>0,05
CHR пг	34,6±0,30	34,0-35,2	32,7±0,23	32,2-33,1	<0,01
Δ Hb пг	-3,27±0,38	-4,03- -2,52	-0,40±0,28	-0,97-0,16	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: n – количество исследований, Mean – средняя арифметическая величина, m – средняя ошибка средней величины, 5%-95% CI – референсный интервал. Жирным шрифтом выделено  $p < 0,05$  – различия достоверны.

чение концентрации Hb в эритроцитах, основывается на анализе общего гемоглобина, определяемого колориметрически. У обследованных новорожденных в динамике месяца жизни показатель не изменялся. При этом показатель CHCM (средней концентрации эритроцитарного гемоглобина) у детей в раннем неонатальном периоде был ниже, чем в месячном возрасте, а показатель CH – прогрессивно снижался в динамике к месяцу. Значения HDW в динамике неонатального периода практически не изменялись, отмечена тенденция к их повышению к концу первого месяца жизни. Количество гипохромных эритроцитов (CHCM <28 г/дл) в раннем неонатальном периоде у детей было выше, чем в месячном возрасте. Показатель CHCM – более точно измеренный эквивалент MCHC, более чувствителен к дефициту железа и уменьшается при развитии гипохромии. В раннем неонатальном периоде у детей эти показатели различаются, очевидно, из-за гемолиза фетальных эритроцитов. Проведенный корреляционный анализ показал значимую

положительную связь степени перенесенной асфиксии при рождении (оценка по шкале Апгар) с уровнем CHCM  $r=0,26$ ,  $p<0,001$ , а также MCV  $r=-0,26$   $p<0,01$ , что подтверждает негативное влияние гипоксии на показатели красной крови.

Анализ ретикулоцитарных показателей (Retic.% и Retic.#) показал, что у детей к концу 1-го мес жизни показатели уменьшались в 1,7 и в 2,2 раза соответственно ( $p<0,0001$ ), и к концу первого месяца жизни приближались к нормативам для взрослых пациентов (для анализатора ADVIA 2120i уровни ретикулоцитов у взрослых составляют 0,8 – 2,1%). Известно, что абсолютное количество ретикулоцитов отражает скорость их продукции. У глубококондоношенных новорожденных ориентировочные диапазоны ретикулоцитов в возрасте первой недели жизни указывают на интенсивный эритропоэз, который значительно замедляется к месячному возрасту.

У большинства новорожденных 1-й недели жизни процент ретикулоцитов составлял более 2% (87,8%), в

том числе от 2% до 4% – у 30,6%, от 4 до 6% – у 23,4% детей, 6-8% – у 16,3%, 8-10% – у 8,2%, более 12% – у 2% детей; менее 2% регистрировался у 12,2% детей. В месячном возрасте увеличивалось число детей с числом ретикулоцитов менее 2%: 39,7% детей (в 3,2 раза чаще, чем в первые дни жизни), 38,6% – от 2% до 4%, 18,1% – от 4% до 6%. Показатели % RETIC в раннем неонатальном периоде имели отрицательную корреляционную связь с гестационным возрастом ( $r=-0,24$ ,  $p<0,01$ ) и массой тела при рождении ( $r=-0,20$ ,  $p<0,05$ ), положительную корреляционную связь с рН крови –  $r=0,26$ ,  $p<0,01$  и оценкой по шкале Апгар  $r=0,28$ ,  $p<0,01$ . Таким образом, процент ретикулоцитов в динамике неонатального периода снижался, и имел самые низкие значения при ацидозе и асфиксии при рождении.

Показатель СНг (среднее содержание гемоглобина в ретикулоците) у глубоконедоношенных новорожденных при рождении был выше, чем в возрасте 1 месяца жизни, что связано со снижением доступности железа для эритропоэза в динамике неонатального периода. Индивидуальный анализ показал, что у 45,8% новорожденных в возрасте до 1 недели жизни показатель СНг был в пределах 33-36 пг, у 32,3% – выше 36 пг, у 21,9% детей – ниже 33 пг. Показатели СНг позитивно коррелировали с уровнями ДНб ( $r=0,41$ ,  $p<0,001$ ) и MCVr ( $r=0,25$ ,  $p<0,0001$ ). К месячному возрасту у большинства детей показатель СНг был выше 32 пг, однако у 43,3% детей показатель продемонстрировал значения менее 32 пг, в том числе менее 30 пг – у 9,6%. Таким образом, снижение доступности железа для эритропоэза к концу неонатального периода сохранялось почти у половины глубоконедоношенных новорожденных.

Уровни ДНб практически у всех глубоконедоношенных новорожденных имели в первые дни отрицательные значения и только к месячному возрасту у части детей зарегистрированы положительные значения. Сниженная гемоглобинизация ретикулоцитов в сравнении с эритроцитами у глубоконедоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде отражает характерное для незрелых недоношенных новорожденных состояние постнатального эритропоэза. Индивидуальный анализ показал, что только у 18% детей в первую неделю жизни значения ДНб были положительным, у остальных 82% показатель находился в интервале от – 10 до 0 пг. В возрасте 1 месяца жизни показатель ДНб стал положительным у 38,5% детей, что может быть обусловлено уменьшением пула циркулирующих ранее фетальных эритроцитов с высокой гемоглобинизацией.

Абсолютное количество субпопуляции зрелых ретикулоцитов с низким содержанием РНК (#L-Ret) у новорожденных существенно изменялись к месячному возрасту, снижаясь в 2,5 раза, ретикулоцитов со средним содержанием РНК (средней зрелости, #M-Ret) – в 1,9 раза, незрелых ретикулоцитов с высоким содержанием РНК (H-Ret) – в 1,7 раза. Однако, относительное содержание отдельных субпопуляций в динамике наблюдения у новорожденных достоверно не различался. Популяция незрелых H-Ret ретикулоцитов в первые дни у 36,7% детей была выше 20%, к месяцу – у 35,4%. Показатели H-Ret.% в первые дни отрицательно коррелировали с оценкой по шкале Апгар ( $r=-0,37$ ,  $p<0,01$ ) и рН крови – ( $r=-0,36$ ,  $p<0,0001$ ). Параметр ретикулоцитов средней зрелости #M-Ret. после рождения также был взаимосвязан с оценкой по шкале Апгар ( $r=-0,31$ ,  $p<0,01$ ), кроме того, выявлена взаимосвязь #M-Ret со степенью

дыхательной недостаточности после рождения ( $r=0,29$ ,  $p<0,05$ ). В месячном возрасте у детей выявлены корреляции M-Ret.% с содержанием кислорода в дыхательной смеси при проведении респираторной терапии ( $r=-0,65$ ,  $p<0,001$ ) и рН крови ( $r=0,58$ ,  $p<0,0001$ ), определяемыми в первые дни жизни.

У детей высокие значения среднего объема ретикулоцитов (MCVr), определяемые в первые дни, уменьшались к месяцу ( $p<0,001$ ). Индекс созревания ретикулоцитов IRF m+H в первые дни после рождения коррелировал с оценкой по шкале Апгар ( $r=-0,34$ ,  $p<0,01$ ), а также со всеми показателями ретикулоцитов, кроме СНг и Delta Hb. Средняя концентрация гемоглобина в ретикулоцитах (CHCMr) к месячному возрасту не изменялась.

Следовательно, особенности динамики эритроцитарного и ретикулоцитарного звена гемограммы, выявленные при использовании автоматического анализатора показывают, что наибольшие значения количества эритроцитов, уровня гемоглобина и показатель гематокрита в раннем неонатальном периоде, достоверно снижаются к месячному возрасту. Такие же тенденции отмечены по объему эритроцитов и количеству гемоглобина в эритроците. Высокие показатели относительного и абсолютного количества ретикулоцитов и их популяций достоверно снижаются к месячному возрасту. При этом относительное содержание незрелых популяций в динамике наблюдения к месяцу достоверно увеличивается, что свидетельствует об активности эритропоэза. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах в динамике неонатального периода снижается, что связано со снижением доступности железа для эритропоэза при его активном процессе.

Мы разделили новорожденных детей на 2 группы в зависимости от их гестационного возраста: в 1-ю группу вошли 22 ребенка, родившиеся при сроке гестации 24-27 нед, во вторую группу – 79 новорожденных, родившихся при сроке гестации 28-32 недели. Достоверных различий в состоянии здоровья новорожденных в зависимости от срока гестации не выявлено. У всех детей имелись респираторные нарушения, все дети в раннем неонатальном периоде получали респираторную поддержку (ИВЛ или СРАР), антибактериальную терапию, инфузионную терапию, согласно существующим нормативным документам.

Исследование ретикулоцитарных и эритроцитарных показателей в зависимости от гестационного возраста показало, что уровень гемоглобина (HGB) в раннем неонатальном периоде (на 3-5 сут жизни) в группах не различался и составил у детей рожденных ранее 28 нед и в 28-32 нед гестации  $14,4\pm 0,53$  г/дл и  $14,7\pm 0,30$  г/дл, соответственно ( $p>0,05$ ). В табл. 2 представлены показатели, имеющие достоверные различия в группах. У детей, рожденных в 28-32 нед гестации, показатели анизоцитоза эритроцитов были значимо выше в количественных (RDW) и в качественных критериях. Следует отметить менее выраженную гиперхромии (% клеток с CHCM > 41 г/дл -1,11%) у менее зрелых детей. В раннем неонатальном периоде количество микроцитов у детей обеих групп было незначительным, однако, число микроцитов было значимо выше у более зрелых детей. Корреляционный анализ показал достоверно значимую связь гестационного возраста и массы тела с MCV ( $r=-0,23$   $p<0,05$ ,  $r=-0,40$ ,  $p<0,001$ ), CHCM ( $r=0,30$ ,  $p<0,01$ ,  $r=0,34$ ,  $p<0,001$ ) и наличием гиперхромии эритроцитов ( $r=0,38$ ,  $p<0,001$ ,  $r=0,29$ ,  $p<0,01$ ).

Таблица 2

**Показатели эритроидного роста гемограммы венозной крови у глубоконедоношенных новорожденных на 3-5 сутки жизни**

Показатель	ГВ до 28 нед, n=22		ГВ 28-32 нед, n=79		p
	Mean±m	5%-95% CI	Mean±m	5%-95% CI	
RDW %	17,5±0,29	16,9-18,1	18,7±0,17	18,3-19,0	<0,01
Гиперхромия %	1,5±0,16	1,17-1,25	2,43±0,15	2,12-2,74	<0,01
Микроциты %	1,11±0,12	0,85-1,37	1,49±0,08	1,33-1,65	<0,05
Выраженность анизоцитоза +	1,21±0,11	0,97-1,46	1,68±0,06	1,56-1,81	<0,05
Ретикулоциты %	6,27±0,85	4,46-8,08	4,72±0,31	4,11-5,33	<0,05
СНг, пг	33,2±0,56	32,0-34,4	35,0±0,32	34,4-35,6	<0,05
Δ Hb, пг	-5,28±1,17	-7,77- -2,77	-2,71±0,36	-3,44- -1,98	<0,02

Таблица 3

**Показатели эритроидного роста гемограммы венозной крови у глубоконедоношенных детей в возрасте 1 месяца жизни**

Показатель	ГВ до 28 недель, n=22		ГВ 28-32 недель, n=79		p
	Mean±m	5%-95% CI	Mean±m	5%-95% CI	
RBC, x10 <sup>12</sup> /л	3,26±0,12	2,99-3,53	2,89±0,07	2,76-3,03	<0,05
MCV, фл	91,4±0,25	88,7-94,1	95,4±1,44	92,5-98,3	<0,05
MCH, пг	31,1±0,56	29,9-32,3	33,6±0,36	32,9-34,3	<0,01
HDW, г/дл	4,01±0,11	3,77-4,26	3,57±0,06	3,46-3,69	<0,01
Δ Hb, пг	1,18±0,67	-0,29+0,66	-0,72±0,34	-1,4- -0,05	<0,05

В группе детей 24-27 нед гестации выявлен более высокий уровень ретикулоцитов, чем у детей 28-32 недель (табл. 2). Показатель содержания гемоглобина в ретикулоцитах (СНг) дает представление о запасах железа в костном мозге, при этом не зависит от характера питания и наличия или отсутствия инфекционно-воспалительных заболеваний [8, 19], по этому показателю можно судить о доступности железа для эритропоэза [20]. В нашем исследовании значения СНг в венозной крови у детей 1 группы были значимо ниже, чем у детей более высокого гестационного возраста,  $p < 0,05$ . Кроме того, уровни ΔHb также имеют достоверные различия в группах, что указывает на сниженную гемоглобинизацию ретикулоцитов в сравнении с эритроцитами, что наиболее характерно для детей, рожденных до 28 недель гестации. Уровни Δ Hb коррелировали с массой тела новорожденных ( $r=0,35$ ,  $p < 0,01$ ), а также с гестационным возрастом ( $r=0,21$ ,  $p < 0,05$ ), оценкой по шкале Апгар на 1-й и 5-й мин ( $r=0,26$ ,  $p < 0,05$ ;  $r=0,27$ ,  $p < 0,05$ ), соответственно.

О нарушениях гемоглобинизации ретикулоцитов и эритроцитов, возникающих в условиях гипоксии и при воспалительных процессах, свидетельствуют негативные корреляции между показателем СНг и С-реактивным белком ( $r=-0,49$ ,  $p < 0,05$ ), СНСМ и содержанием кислорода в дыхательной смеси (FiO<sub>2</sub>) ( $r=-0,24$ ,  $p < 0,001$ ) и позитивные корреляции между уровнями Δ Hb и оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте ( $r=0,27$ ,  $p < 0,05$ ). Индекс созревания ретикулоцитов IRF M+H % у новорожденных сравнимых групп в раннем неонатальном периоде не различался, тогда как регенераторные процессы (согласно уровням ретикулоцитов) больше выражены у детей, рожденных до 28 нед гестации.

Обследование гемограммы детей в динамике к месячному возрасту в зависимости от гестационного возраста показало, что по большинству показателей различия в группах не регистрируются. Однако у детей, родившихся до 28 нед гестации, остается более выраженная

гипохромия и анизохромия эритроцитов, сниженный MCV ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). В табл. 3 представлены только значения, значимо различающиеся в группах.

Значимо ниже у детей 2 группы были показатели количества эритроцитов, HDW г/дл, Δ Hb пг, значимо выше – показатели MCH и MCV.

Таким образом, имеются достоверно значимые различия по количественным и качественным характеристикам анизоцитоза в зависимости от гестационного возраста: в группе менее зрелых новорожденных показатель, характеризующий анизоцитоз, был значимо меньше, чем у более зрелых новорожденных. По остальным характеристикам эритроцитов значимых различий не получено. При этом, в группе детей гестационного возраста менее 28 нед имеются различия по характеристике ретикулоцитов: относительное количество этих клеток больше, при этом содержание гемоглобина в ретикулоците меньше, чем у более зрелых детей. Установлена взаимосвязь показателей ретикулоцитарного звена с тяжестью перенесенной гипоксии и проявлениями системной воспалительной реакции, о чем свидетельствуют достоверные корреляционные связи показателей ретикулоцитарного звена и оценкой по шкале Апгар, уровнем СРБ. К концу месяца жизни у менее зрелых детей количество эритроцитов было значимо больше, при достоверном различии по большему показателю анизоцитоза и достоверно меньшему показателю объема эритроцита и среднему содержанию гемоглобина в эритроците.

**Обсуждение.** Анализ гемограмм у глубоконедоношенных новорожденных, полученных с помощью гематологического анализатора ADVIA, выявил существенные различия в показателях эритроцитарного и ретикулоцитарного звеньев в динамике неонатального периода и в зависимости от гестационного возраста.

Наибольшие значения количества эритроцитов, уровня гемоглобина и показатель гематокрита у новорожден-

ных, родившихся до 33 нед гестации, достоверно снижаются к месячному возрасту, что характерно для всех новорожденных детей в первый месяц жизни. Такие же тенденции зарегистрированы по объему эритроцитов и количеству гемоглобина в эритроците. Также, выявленные высокие показатели относительного и абсолютного количества ретикулоцитов и их популяций, достоверно снижаются к месячному возрасту, и эта динамика также характерна для всех новорожденных. При этом имеется различие циркуляции незрелых популяций ретикулоцитов в динамике наблюдения: к месяцу жизни их относительное содержание достоверно увеличивается, что свидетельствует об активности эритропоэза. Активный эритропоэз, характерный для глубоконеодоношенных новорожденных и обусловленный перенесенной гипоксией, и проявляющийся увеличением незрелых форм ретикулоцитов сопровождается при этом снижением содержания гемоглобина в ретикулоцитах в динамике неонатального периода, что связано со снижением доступности железа для эритропоэза.

Регистрируемые на анализаторе показатели имеют различные тенденции, так показатель концентрации гемоглобина в эритроците (измеряемый СНСМ) у детей был ниже в раннем неонатальном периоде, чем в месячном возрасте, при этом средняя концентрация эритроцитарного гемоглобина в крови не изменялась в динамике неонатального периода. Проведенный анализ показал присутствие эритроцитарной нормохромии в конце неонатального периода, было выявлено незначительное количество гипохромных эритроцитов. Однако, расчетный параметр средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСН) и показатель содержания гемоглобина в каждом эритроците (СН) по данным гистограммы снижались к концу неонатального периода. Первый показатель (МСН) зависит от среднего объема эритроцита, второй показатель (СН) – не зависит от объема эритроцита. Гистограмма содержания гемоглобина в эритроците показывает распределение эритроцитов в зависимости от содержания гемоглобина (по эритроцитарному гемоглобину) и измеряет распределение эритроцитов по количеству гемоглобина в каждой клетке независимо от объема. Необходимо отметить, что в первые дни жизни ребенка и в месячном возрасте показатель СН не различался. СН – показатель, измеряемый по гистограмме СН, более информативен, чем расчетный. Уменьшение показателя СН у детей к месяцу жизни может быть связано с показателями содержания гемоглобина в ретикулоцитах (СНг), которые в этом возрасте снижаются.

Количественный и качественный анализ ретикулоцитов в гемограммах новорожденных в динамике неонатального периода показывает значимое снижение показателей, означающее снижение активности эритропоэза у глубоконеодоношенных новорожденных к концу неонатального периода. При этом среднее значение клеточного гемоглобина в ретикулоцитах, большее в раннем неонатальном периоде, снижается к месячному возрасту, что обусловлено расходом запасов железа при рождении к месяцу жизни. Большой процент фракции незрелых ретикулоцитов может свидетельствовать об ускоренном выбросе клеток из костного мозга, как компенсаторной реакции в ответ на гипоксию в первые дни жизни детей. К месяцу жизни отмечается значительное замедление эритропоэза, о чем свидетельствуют снижение абсолютного количества как незрелых ретикулоцитов с высоким и средним содержанием РНК,

так и зрелых форм ретикулоцитов. Индекс созревания ретикулоцитов (IRF M+H) повышается раньше, чем количество ретикулоцитов в крови на несколько дней [21], это ранний и чувствительный параметр эритропоэтической активности костного мозга [22-24]. У здорового взрослого человека IRF M+H составляет от 20% до 30%, у новорожденного от 30% до 40% [25]. Наши данные указывают, что к месячному возрасту снижение количества эритроцитов и ретикулоцитов, как относительного, так и абсолютного, не сопровождается снижением IRF M+H, что указывает на омоложение субпопуляций ретикулоцитов у глубоконеодоношенных новорожденных и сохранение напряженности эритропоэза как ранний ответ на терапию. Однако, несмотря на омоложение субпопуляций ретикулоцитов, у глубоконеодоношенных новорожденных происходящее снижение уровня эритроцитов и гемоглобина в конце неонатального периода сопровождается значительным замедлением эритропоэза и снижением доступности железа для эритропоэза, о чем свидетельствуют снижение показателей содержания гемоглобина в ретикулоцитах.

Анализируя показатели гемограммы в зависимости от гестационной зрелости, можно отметить, что в раннем неонатальном периоде у детей, рожденных в 24-27 нед гестации, гиперхромия и показатели анизоцитоза менее выражены, чем у более зрелых детей (28-32-недельного гестационного возраста). Выявленные корреляции СНСМ со сроком гестации и массой тела подтверждают, что средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах при рождении ниже у менее зрелых детей, что может быть связано с крайней незрелостью детей и особенностями их эритропоэза.

Среднее количество гемоглобина в ретикулоцитах (СНг) – ранний маркер, который из-за короткого срока циркуляции ретикулоцитов, точно отражает доступность железа для эритропоэза [26, 27]. Этот параметр является «золотым стандартом» диагностики функционально активного железа, доступного для эритропоэза [28]. Имеются единичные сообщения об уровнях СНг у доношенных новорожденных, которые составляют 35,3–36 пг [29]. М. Rachel и соавт. [30] определили уровни СНг в пуповинной крови у детей, рожденных до 24 мес гестации – 23–35 пг. У доношенных новорожденных, по данным L. Lorenz [26] СНг составило  $32 \pm 3,2$  пг, у недоношенных с ГВ менее 30 нед –  $30,7 \pm 3$  пг. Наши данные указывают на снижение гемоглобинизации ретикулоцитов у детей, рожденных ранее 28 нед гестации, в сравнении с группой более зрелых новорожденных. Повышение ретикулоцитов (%) и активности эритропоэза у крайне незрелых новорожденных сочетается со снижением гемоглобинизации ретикулоцитов. Такие различия СНг могут быть связаны с усиленным эритропоэзом и истощением гемоглобинсинтетической функции, повышенным разрушением эритроцитов, а также снижением железа, доступного для эритропоэза, у менее зрелых детей. Если гемоглобинизация эритроцитов у новорожденных отражает «историю» 30-50-ти дневной давности (факторы внутриутробного развития плода), то ретикулоциты – доступность железа для эритропоэза в течение последних 3-х дней [9]. Отрицательные показатели  $\Delta Hb$  на фоне высокой активности эритропоэза появляются, когда циркулируют фетальные эритроциты с высокой гемоглобинизацией, а скорость поступления ретикулоцитов на периферию превышает возможности их гемоглобинизации. Эти изменения регистрируются



у крайне незрелых новорожденных в первые дни после рождения на фоне гипоксии и инфекционно-воспалительных процессов, каковыми являются асфиксия, респираторный дистресс-синдром, инфекция, специфичная для перинатального периода, врожденная пневмония и т.д.. Эти состояния сопровождаются и могут быть дополнены с ранним прекращением плацентарного поступления железа в связи с преждевременными родами. Функциональный дефицит железа, на что указывает показатель  $\Delta Hb$ , может быть связан также с блокированием выделения железа из макрофагов и гепатоцитов при инфекционно-воспалительных состояниях [31].

Выявленные корреляции уровней  $CHg$  и  $СРБ$ ,  $\Delta Hb$  и оценкой по шкале Апгар, показателей ретикулоцитов с  $pH$  крови и оценкой по шкале Апгар, подтверждают связь с гипоксией и инфекционно-воспалительными состояниями, когда изменения эритропоза соответствуют выраженности респираторных и метаболических нарушений в раннем неонатальном периоде. При воспалительных процессах, инфекционных состояниях, а также после перенесенной асфиксии (гипоксии) в основе анемии может быть уменьшение его поступления в места кроветворения, и секвестрация железа в макрофагах.

В месячном возрасте на фоне снижения эритроцитов, у более зрелых детей показатели  $MCH$  и  $MCV$  были выше, что обусловлено большими запасами фетального железа к моменту рождения. Показатели  $MCHC$  г/дл и  $CHCM$  г/дл в первые дни жизни у детей внутри групп различались, поскольку имелись признаки разрушения эритроцитов, тогда как в месячном возрасте различий не было выявлено. По-видимому, в раннем неонатальном периоде информативнее определять  $CHCM$ , поскольку он измеряется цитометрически. Показатель  $CHCM$  – измеренный эквивалент  $MCHC$ , у обследованных новорожденных повышался в динамике, что указывает на развитие нормохромии. К месячному возрасту уровни  $\#M-Ret.$  были взаимосвязаны со степенью кислородозависимости ребенка и  $pH$  крови, определяемыми при рождении. Уровни  $M-Ret.\%$  взаимосвязаны с содержанием кислорода в дыхательной смеси ( $FiO_2$ ) и  $pH$  крови, когда увеличение менее зрелых популяций ретикулоцитов, согласно выявленным корреляциям, соответствует степени дыхательной недостаточности и ацидоза, взаимосвязано со степенью кислородозависимости.

### Выводы

1. У глубоконедоношенных новорожденных высокие уровни эритроцитов,  $HGB$ ,  $HTC$ ,  $MCV$ , выраженность гипохромии (по показателям  $CHCM$  и количества гипохромных эритроцитов) в венозной крови снижаются в динамике к месячному возрасту, регистрируется снижение среднего содержания  $HGB$  в эритроците –  $CH$ .

2. У глубоконедоношенных новорожденных к месячному возрасту показатели ретикулоцитов значительно уменьшаются (в 2,2 раза), у 39,7% детей их относительное количество составляет 2,0%, высокие уровни индекса созревания ретикулоцитов не изменяются, сохраняется напряженность эритропоза и снижение доступности для его железа (по показателю  $CHg$ ) у 33,7% детей. Выявленная динамика показателей гемограммы соответствует по срокам развитию ранней анемии недоношенных детей.

3. В целом, у глубоконедоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде регистрируется омоложение ретикулоцитарных субпопуляций, высокая активность эритропоза, которые изменяются соответственно

выраженности респираторных и метаболических нарушений, при этом скорость поступления ретикулоцитов на периферию ограничивает возможности их гемоглобинизации на фоне перенесенной гипоксии и инфекционно-воспалительных состояний.

4. У детей, рожденных до 28 недель гестации, в сравнении с группой новорожденных с гестационным возрастом 28–32 нед, в раннем неонатальном периоде функциональная доступность железа для эритропоза по показателю дельта гемоглобина и гемоглобинизации ретикулоцитов по параметру  $CHg$  снижены. К месячному возрасту у менее зрелых новорожденных регистрируется более выраженная гипохромия и анизохромия эритроцитов в сравнении с более зрелыми детьми.

5. Полученные при использовании гематологического анализатора данные гемограммы эритроцитарного звена из венозной крови у глубоконедоношенных новорожденных можно использовать для оценки нарушений эритропоза и оценки эффективности проводимой терапии в отделениях реанимации и патологии новорожденных детей.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (pp. 4, 5, 7, 8, 11–16, 20–31 см. REFERENCES)

- Сахарова Е.С., Кешишян Е.С., Алямовская Г.А. Анемия недоношенных детей: патогенез, диагностика, лечение, профилактика. *Медицинский совет.* 2015; 6: 10-6.
- Матвеева Е.А., Назаров С.Б., Иваненкова Ю.А., Харламова Н.В., Кузьменко Г.Н., Филькина О.М. Характеристика эритроцитарных показателей у глубоконедоношенных детей в раннем неонатальном периоде. *Таврический медико-биологический вестник.* 2018; 21 (2-2): 89-93.
- Олс Р., Едер М. Гематология, иммунология и инфекционные болезни. Пер. с англ. М.: Логосфера; 2013.
- Жетишев Р. А. Анемия у новорожденных детей. Руководство по перинатологии. Жетишев Р.А., Иванов Д.О. В 2 томах. Иванов Д.О., ред. Том 2. 2-е изд., испр. и доп. СПб: Информ-Навигатор; 2019.
- Барановская И.Б., Самохина О.Ф., Сысоева И.П. Показатели ретикулоцитарного анализа новорожденных первых дней жизни. *Педиатрия.* 2016; 1-3: 15-8.
- Маянский Н.А., Пономаренко Е.Н., Мельничук О.С., Блинова Т.А., Семкина Е.Л., Одинаева Н.Д. Динамика и референсные интервалы показателей гемограммы у здоровых новорожденных в раннем неонатальном периоде. *Вопросы диагностики в педиатрии.* 2012; 1: 20-3.
- Льюис С. М., Бэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. Перевод с англ. Румянцев А.Г., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
- Румянцев А.Г., Масчан А.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению ранней анемии недоношенных детей, ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
- Мачнева Е.Б., Захарова И.Н., Тарасова И.С., Чернов В.М., Лазарева С.И. Среднее содержание гемоглобина в ретикулоците – точный показатель дефицита железа у подростков. *Педиатрия.* 2015; 94(6): 33-8.

### REFERENCES

- Sakharova E.S., Keshishyan E.S., Alyamovskaya G.A. Anemia of premature infants: pathogenesis, diagnosis, treatment, prevention. *Meditsinskiy sovet.* 2015; 6: 10-6. (in Russian)
- Matveeva E.A., Nazarov S.B., Ivanenkova Ju.A., Kharlamova N.V., Kuz'menko G.N., Fil'kina O.M. Characteristics of erythrocyte indi-

- ces in very premature infants in the early neonatal period. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2018; 21 (2-2) 89-93. (in Russian)
3. Ols R., Eder M. Hematology, immunology and infectious diseases. Transl. from Engl. Moscow: Logosfera; 2013. (in Russian)
  4. Strauss R.G. Anaemia of prematurity: Pathophysiology and treatment. *Blood rev.* 2010; 24(6): 221-5.
  5. Zagol K., Lake D.E., Vergales B., Moorman M.E., Paget-Brown A., Lee H. et al. Anemia, apnea of prematurity, and blood transfusions. *J. Pediatr.* 2012; 161(3): 417-21.
  6. Zhetishchev R. A. Anemia in newborns. [Rukovodstvo po perinatologii. Zhetishchev R.A., Ivanov D.O. Volume 2]. Ivanov D.O., ed. Tom 2. 2<sup>nd</sup> ed. St.Petersburg: Inform-Navigator; 2019. (in Russian)
  7. Yu-Cheng Wang, Oi-Wa Chan, Ming-Chou Chiang, Peng-Hong Yang, Shih-Ming Chu, Jen-Fu Hsu et al. Red blood cell transfusion and clinical outcomes in extremely low birth weight preterm infants. *Pediatrics & neonatology*. 2017; 58 (3): 216-22.
  8. Raeda T. Al-Ghananim, Demet Nalbant, Robert L. Schmidt, Gretchen A. Cress, M. Bridget Zimmerman, John A. Widness. Reticulocyte hemoglobin content during the first month of life in critically ill very low birth weight neonates differs from term infants, children, and adults. *J. Clin. lab. anal.* 2016; 30(4): 326-34.
  9. Baranovskaya I.B., Samokhina O.F., Sysoeva I.P. Indicators of reticulocyte analysis of newborns in the first days of life. *Poliklinika*. 2016; 1-3: 15-8. (in Russian)
  10. Mayanskiy N.A., Ponomarenko E.N., Mel'nichuk O.S., Blinova T.A., Semikina E.L., Odinaeva N.D. Dynamics and reference intervals of hemogram indices in healthy newborns in the early neonatal period. *Voprosy diagnostiki v pediatrii*. 2012; 1: 20-3. (in Russian)
  11. Löfving A., Löfving A., Andersson O., Hellström-Westas L., Domellöf M. Reference limits for reticulocyte haemoglobin content in healthy infants. *Pediatr Res*. 2011; 70: 812.
  12. Maconi M., Formisano D., Cavalca L., Rolfo A., Cardaropoli S., Danise P. Reticulocyte count and reticulocyte maturation profile in human umbilical cord blood from healthy newborns. *Lab. hematology*. 2010; 16(1): 3-7. doi: 10.1532/LH96.09012.
  13. Christensen R. D., Henry E., Bennett S. T., Yaish H. M. Reference intervals for reticulocyte parameters of infants during their first 90 days after birth. *Journal of perinatology*. 2016; 36(1): 61-6.
  14. Lorenz L., Peter A., Arand J., Springer F., Poets C.F., Franz A.R. Reference ranges of reticulocyte haemoglobin content in preterm and term infants: a retrospective analysis. *Neonatology*. 2017; 111: 189-94.
  15. Golder M., Chan C.L.H., O'shea S., Corbett K., Chrystie I.L., French G. Potential risk of crossinfection during peripheral-venous access by contaminated tourniquets. *Lancet*. 2000; 355: 44.
  16. Kim M.J., Jin J.H., Kwon Y.S., Jun Y.H., Kim S.K. Comparison of blood counts in capillary and venous blood in children. *Korean J. hematology*. 2009; 44: 237-43.
  17. L'juis S. M., Bjejn B., Bjejtis I. Practical and laboratory hematology. Trans. from Engl. Rumyantsev A.G., ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
  18. Rumyantsev A.G., Maschan A.A. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of early anemia in premature infants [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu ranney anemii nedonoshennykh detey]. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. (in Russian)
  19. Machneva E.B., Zakharova I.N., Tarasova I.S., Chernov V.M., Lazareva S.I. The average hemoglobin content in the reticulocyte is an accurate indicator of iron deficiency in adolescents. *Pediatrics*. 2015; 94(6): 33-8. (in Russian)
  20. Mast A. E., Blinder M.A., Lu Q. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*. 2002; 99 (4): 1489-91.
  21. Torres G.A., Casaño J., Sánchez J., Madrigal E., Blanco F., Alvarez M.A. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. *Clin. lab. haematol.* 2003; 25: 283-8.
  22. Christensen R. D., Henry E., Bennett S. T., Yaish H. M. Reference intervals for reticulocyte parameters of infants during their first 90 days after birth. *Journal of perinatology*. 2016; 36(1): 61-6.
  23. Schiza V., Giapros V., Pantou K., Theocharis P., Challa A., Andronikou S. Serum transferrin receptor, ferritin, and reticulocyte maturity indices during the first year of life in 'large' preterm infants. *Eur. J. haematol.* 2007; 79(5): 439-46.
  24. Weimann A., Weimann K., Lun A. Laboratory haematological changes in the field of intensive care medicine — the extended differential blood count. *Anesthesiol. intensivmed notfallmed schmerzther*. 2009; 44: 164-70.
  25. Christensen R.D., Jopling J., Henry E., Wiedmeier S.E. The erythrocyte indices of neonates, defined using data from over 12,000 patients in a multihospital health care system. *J. perinatology*. 2008; 28(1): 24-8.
  26. Lorenz L., Peter A., Arand J., Springer F., Poets C.F., Franz A.R. Reference ranges of reticulocyte haemoglobin content in preterm and term infants: a retrospective analysis. *Neonatology*. 2017; 111: 189-94.
  27. Piva E., Brugnara C., Spolaore F., Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin. lab. med.* 2015; 35: 133-63.
  28. Brugnara C. Reticulocyte Cellular Indices: A new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2008; 93-130. doi: [10.1080/10408360091174196](https://doi.org/10.1080/10408360091174196).
  29. Thomas L., Franck S., Messinger M., Linssen J., Thomé M., Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement — Comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin. chem. lab. med.* 2005; 43(11): 1193-1202.
  30. Rachel M. Burke, Juan S. Leon, Parminder S. Suchdev Identification, prevention and treatment of iron deficiency during the first 1000 days. *Nutrients*. 2014; 6(10): 4093-4114. Published online 2014 Oct 10. doi: 10.3390/nu6104093. MCID: PMC4210909.
  31. Danielson K., Beshara S., Quershi A.R. Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients. *Clin. kidney J.* 2014; 7: 275-81.

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Огуркова О.Н., Сулова Т.Е., Баталов Р.Е.

### ИССЛЕДОВАНИЕ СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 634012, Томск, Россия

*Исследование функции тромбоцитов широко используется для диагностики нарушений клеточного звена гемостаза. Изучение агрегационной активности тромбоцитов актуально для предотвращения тромбэмболических осложнений при фибрилляции предсердий и контроля эффективности и безопасности терапии. В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ спонтанной и стимулированной агрегации тромбоцитов в группах пациентов с двумя типами фибрилляции предсердий – пароксизмальная и персистирующая. Также было изучено влияние терапии β-адреноблокаторами на агрегационную активность тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали с помощью метода Г. Борна в модификации З.А. Габбасова на двухканальном лазерном анализаторе 220 LA “НПФ Биола”. В качестве стимулирующих агрегацию агентов были использованы коллаген в концентрации 2 мг/мл и адреналин в диапазоне концентраций 2,5–10 мкг/мл. Установлено, что спонтанный агрегационный потенциал и коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов зависят от типа фибрилляции предсердий, а также от наличия или отсутствия в терапии β-адреноблокаторов. Ответ тромбоцитов на стимуляцию адреналином зависит, прежде всего, от типа фибрилляции предсердий и концентрации адреналина в реакционной среде. Наиболее существенные изменения отмечены в группе пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий, принимающих β-адреноблокаторы.*

**Ключевые слова:** тромбоциты; агрегация; спонтанная; стимулированная; фибрилляции предсердий; адреналин.

**Для цитирования:** Огуркова О.Н., Сулова Т.Е., Баталов Р.Е. Исследование спонтанной и стимулированной агрегации тромбоцитов у пациентов с разными типами фибрилляции предсердий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1): 35–41. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-35-41>

*Ogurkova O.N., Suslova T.E., Batalov R.E.*

#### RESEARCH OF SPONTANEOUS AND STIMULATED AGGREGATION OF PLATELETS IN PATIENTS WITH DIFFERENT TYPES OF ATRIAL FIBRILLATION

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

*Platelet function testing is widely used to diagnose disorders of the cellular link of hemostasis. The study of platelet aggregation activity is relevant for the prevention of thromboembolic complications in atrial fibrillation and monitoring the effectiveness and safety of therapy. In this study, a comparative analysis of spontaneous and stimulated platelet aggregation in groups of patients with two types of atrial fibrillation was performed — paroxysmal and persistent. The effect of β-adrenoblocker therapy on platelet aggregation activity in patients with atrial fibrillation was also studied. Platelet aggregation activity was studied using the method of G. Born in the modification of Z.A. Gabbasov on a two-channel laser analyzer “Biola”. Collagen at a concentration of 2 mg/ml and adrenaline in a concentration range of 2.5–10 μg/ml were used as aggregation-promoting agents. It has been established that spontaneous aggregation potential and collagen-induced platelet aggregation depend on the type of atrial fibrillation, as well as on the presence or absence of β-blockers in therapy. The response of platelets to stimulation with adrenaline depends, first of all, on the type of atrial fibrillation and the concentration of adrenaline in the reaction medium. The most significant changes were noted in the group of patients with a paroxysmal form atrial fibrillation, taking β-blockers in therapy.*

**Key words:** platelets; aggregation; spontaneous; stimulated; atrial fibrillation; adrenalin.

**For citation:** Ogurkova O.N., Suslova T.E., Batalov R.E. Research of spontaneous and stimulated functional activity of platelets in patients with different types of atrial fibrillation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(1): 35–41 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-35-41>

**For correspondence:** *Ogurkova O.N.*, candidate of medical sciences, researcher of the department functional and laboratory diagnostics; e-mail: [ogurkovaon@mail.ru](mailto:ogurkovaon@mail.ru)

#### Information about authors:

*Ogurkova O.N.*, <https://orcid.org/0000-0001-8397-0296>;

*Suslova T.E.*, <https://orcid.org/0000-0001-9645-6720>;

*Batalov R.E.*, <https://orcid.org/0000-0003-1415-3932>.

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

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

Received 20.06.2020  
Accepted 01.09.2020

**Введение.** Медико-социальная значимость фибрилляций предсердий объясняется ее неблагоприятным влиянием на прогноз жизни пациента, повышением риска развития тромбоэмболических осложнений, хронической сердечной недостаточности и снижением качества жизни пациентов [1]. С клинической точки зрения, с учетом течения и длительности аритмии выделяют несколько типов ФП. Пароксизмальная ФП, длительность которой может достигать 7 суток, характеризуется самопроизвольным прекращением, обычно в течение первых 48 часов. При пароксизмальной ФП, длящейся более 48 ч, вероятность спонтанного прекращения аритмии низкая, однако существенно возрастает риск системных тромбоэмболий, что требует рассмотрения возможности проведения антитромботической терапии [1,2]. Персистирующая ФП самостоятельно не прекращается и для ее устранения необходима медикаментозная или электрическая кардиоверсия [1].

При нарушении ритма сердца значимый вклад в патогенез тромбоэмболических осложнений (ТЭО) оказывают факторы, связанные с внутрисердечной гемодинамикой и ремоделированием камер сердца, активацией системы свертывания крови и агрегацией тромбоцитов [3]. Профилактика ТЭО является важной проблемой терапии ФП, однако, невзирая на непрерывный прогресс в подходах к стратификации риска ТЭО, не учитывается индивидуальное состояние гемостаза [4]. Анализ данных современной литературы, касающейся изменений системы гемостаза у пациентов, страдающих ФП и их вклад в риск ТЭО, показывает необходимость детального изучения всех звеньев гемостаза при фибрилляции предсердий [5,6].

В настоящее время показано, что тромбоциты являются метаболически активными клетками и играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов – в ангиогенезе, в реализации воспалительных и репаративных процессов. Дефект функций тромбоцитов

влечёт за собой повышенный риск кровотечения или наоборот – тромбообразования [7,8]. Антитромботическая профилактика при фибрилляции предсердий является наиболее важной задачей для изучения, поскольку проблема ТЭО остается не решенной [9].

В связи с этим, исследование нарушений функций тромбоцитов при фибрилляции предсердий является востребованной и актуальной задачей и представляется актуальным для разработки персонализационного подхода к выбору антитромботической терапии в дальнейшем.

Цель – исследовать спонтанную и стимулированную коллагеном и адреналином агрегацию тромбоцитов для оценки функциональной активности клеток при разных типах фибрилляции предсердий.

**Материал и методы.** В исследование были включены 27 здоровых добровольцев и 30 пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП): пароксизмальная форма и персистирующая формы, с ИБС, гипертонической болезнью I – III стадии, стенокардией напряжения I-III функционального класса, ХСН I-IIА стадии, атеросклерозом сонных артерий. Для верификации диагноза всем пациентам проводили комплексное клинико-инструментальное и лабораторное обследование. Пациентам была проведена операция: CARTO РЧА, изоляция легочных вен. Терапия, принимаемая пациентами на момент включения в исследование, соответствовала современным рекомендациям и включала в себя: антикоагулянты, бета-блокаторы (β-АБ), статины. Клиническая характеристика пациентов с фибрилляцией предсердий на момент включения в исследование представлена в табл.1. Протокол исследования был одобрен Локальным Этическим комитетом № 163 от 08.11.2017 г. Все пациенты дали свое письменное информированное согласие на включение в исследование.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы использовали периферическую венозную кровь, забран-

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с фибрилляцией предсердий

Показатели	Пароксизмальная форма ФП (n=16)	Персистирующая форма ФП (n=14)
Возраст, годы	59,44 ± 14,83	57,50 ± 9,28
Мужчины/женщины	7 / 9	9 / 5
Гипертоническая болезнь, стадия		
I	1	1
II	9	7
III	2	0
Функциональный класс СН (NYHA)		
I	6	7
II	9	6
III	1	1
CARTO РЧА изоляция ЛВ	9	6
CARTO РЧА эндокардиальный MAZE	1	6
Криобаллонная изоляция легочных вен	1	0
РЧА не было	5	2
β-адреноблокаторы	6	5
Антикоагулянты	16	14
Статины	1	2
Общий холестерин, ммоль/л	4,45 ± 0,38	5,23 ± 0,59
Триглицериды, ммоль/л	1,25 ± 0,15	1,2 ± 0,12
ЛПВП, ммоль/л	1,18 ± 0,09	1,25 ± 0,10
ЛПНП, ммоль/л	2,65 ± 0,32	3,01 ± 0,512
ЛПНП/ЛПВП	2,25 ± 0,23	2,41 ± 0,23

ную из локтевой вены утром, натощак в пластиковые пробирки, содержащие антикоагулянт (цитрат натрия 3,8%) в соотношении 1 часть антикоагулянта на 9 частей крови. Плазму, богатую тромбоцитами, получали с использованием центрифуги ОПн-3.02 при 1000 об/мин в течение 10 мин, бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием при 3000 об/мин до 15 минут. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали с помощью метода Г. Борна в модификации З.А. Габбасова [10] на двухканальном лазерном анализаторе 220 LA «НПФ Биола» с компьютерной обработкой по программе AGGR. Метод основан на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов.

Приготовление рабочих растворов индукторов агрегации осуществляли с использованием диагностических наборов фирмы «Технология-стандарт» (Россия). Лиофилизированный коллаген разводили 6 мл дистиллированной воды для получения маточного раствора с концентрацией 20 мг/мл, конечная концентрация в реакционной смеси 2 мг/мл, лиофилизированный адреналин разводили 8 мл растворителя для получения маточного раствора с концентрацией 500 мкг/мл. Из маточного раствора адреналина получались следующие разведения: адреналин 10,0 мкг/мл (100 мкл маточного раствора + 4,9 мл физраствора NaCl), адреналин 5,0 мкг/мл (500 мкл раствора адреналина 10 мкг/мл + 500 мкл физраствора NaCl), адреналин 2,5 мкг/мл (500 мкл раствора адреналина 5,0 мкг/мл + 500 мкл физраствора NaCl). Конечная концентрация индуктора в реакционной смеси рассчитывалась исходя из того, что общий объем смеси составляет 400 мкл, в котором содержится 50 мкл индуктора. Запись кривых агрегации осуществлялась в течение 5 мин, добавление индуктора агрегации производилось через 10 с от начала записи кривой. Оценивали степень агрегации по кривой светопропускания – максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора агрегации (СП), выражается в %. Степень агрегации по кривой среднего размера агрегатов-максимальное значение среднего размера агрегатов после добавления индуктора (CРА), выражается в условных единицах. Скорость агрегации-максимальный наклон кривой светопропускания (%/мин) и кривой среднего размера агрегатов (ед/мин). Показатели спонтанной агрегации регистрировали на 2-й минуте записи.

Достоверность различий средних величин определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и их непараметрических анализов критерия Манна-Уит-

ни, Вилкоксона и непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса. В работе рассчитывались медиана (межквартильный диапазон) и min и max значения. Критическое значение уровня значимости (*p*) принимали равным 0,05, что является достаточным для медико-биологических исследований. Для оценки корреляционных взаимоотношений между изучаемыми показателями применялся линейный корреляционный анализ с расчетом коэффициента линейной корреляции Пирсона (*r*) и Спирмена. Значимость корреляционной связи определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Все обследованные пациенты были разделены на группы по типу фибрилляции предсердий – пароксизмальная и персистирующая, внутри групп было дополнительное деление на группы пациентов, принимающих β-адреноблокаторы (β-АБ) и не принимающих β-АБ. При изучении спонтанной агрегации тромбоцитов было обнаружено увеличение степени агрегации по кривой светопропускания в обеих группах пациентов с ФП, где пациенты не принимали β-АБ. Наиболее выраженное увеличение спонтанной агрегации отмечено в группе с персистирующей формой фибрилляции предсердий без β-АБ (табл.2).

Механизмы спонтанной активации тромбоцитов зависят от многочисленных факторов, Изменение состава плазмы, с повышением в крови уровня биологически активных веществ, метаболические нарушения приводит к повышенной способности тромбоцитов к формированию агрегатов. При проведении корреляционного анализа была получена положительная взаимосвязь между спонтанной степенью агрегации по кривой светопропускания и содержанием общего холестерина в сыворотке крови ( $r=0,80, p=0,002$ ) и уровнем холестерина в липопротеинах низкой плотности ( $r=0,80, p=0,002$ ). Важная роль принадлежит изменениям функционального состояния мембран тромбоцитов, изменениям в системе вторичных мессенджеров, в системе ц-АМФ и ц-ГМФ при метаболических нарушениях [11], увеличению в кровотоке количества старых тромбоцитов, склонных к разрушению и выбросу биологически активных веществ (АДФ, серотонина, адреналина). Значительное воздействие сил сдвига *in vivo* на эндотелий приводит к обнажению коллагена, что также может способствовать увеличению склонности тромбоцитов к спонтанной агрегации [12].

Показатели коллаген-индуцированной агрегации свидетельствуют о функциональном состоянии эндотелия и характеризуют адгезивную сенсibilизированность тромбоцитов. Исследование коллаген-стимулированной агрегации тромбоцитов в нашем исследовании

Таблица 2

**Параметры спонтанной агрегации тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев**

Параметры	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, не принимающие β-АБ (n=10)	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, принимающие β-АБ (n=6)	Пациенты с персистирующей формой ФП, не принимающие β-АБ (n=9)	Пациенты с персистирующей формой ФП, принимающие β-АБ (n=5)	Здоровые добровольцы (n=27)
CРА, ед.	0,97 (0,88;1,15)	0,96 (0,94;1,04)	0,95 (0,92;1,37)	1,01 (0,85;1,36)	1,08 (0,98;1,17)
СП, %	1,07 * (0,76;1,29)	0,83 (0,75;1,43)	1,67 * (0,97;2,13)	0,74 (0,34;3,74)	0,80 (0,50;1,57)

Примечание. Здесь и в табл. 3-6 : Me – медиана (межквартильный диапазон), min (25) и max (75) процентиля. \* -  $p < 0,05$  при сравнении группы с ФП с группой здоровых добровольцев.

COAGULOLOGY

показало, что в группе пациентов с пароксизмальной формой ФП, принимающих β-адреноблокаторы средний размер агрегатов и скорость их образования имеют более низкие значения, сравнению с группой пациентов, не принимающих β-АБ, а так же с группой здоровых добровольцев. При сравнении с группой пациентов с персистирующей формой ФП, отмечена тенденция к снижению значений агрегации ( $p=0,06$ ). В группе пациентов с персистирующей формой ФП, как принимающих, так и не принимающих β-АБ, значения максимального размера агрегатов, степени агрегации и скорости образования агрегатов не отличаются от значений в группе здоровых добровольцев. Данные представлены в табл. 3.

Как видно из полученных результатов, наличие β-адреноблокаторов в терапии приводит к снижению всех параметров коллаген-индуцированной агрегации у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий. Терапия бета-адреноблокаторами применяется в качестве терапии первой линии при ФП, особенно при наличии повышенного тонуса адренергической системы и ишемии миокарда [13]. На своей поверхности тромбоциты экспрессируют α2- и β2-адренорецепторы [13, 14]. Адреналин является слабым индуктором агрегации тромбоцитов, поэтому для полноценной оценки функциональной активности (адренореактивности) тромбоцитов исследование адреналин-индуцированной агрегации было проведено в диапазоне от высокой 10 мкг/мл до низкой 2,5 мкг/мл

концентрации индуктора, результаты представлены в табл. 4-6.

В физиологических условиях адреналин активирует тромбоциты циркулирующей крови, что приводит к секреции АДФ из плотных гранул клеток, и по принципу положительной обратной связи усиливается стимулирующий сигнал [14,15].

При использовании адреналина *in vitro* в высокой концентрации у пациентов с пароксизмальной формой ФП, как принимающих, так и не принимающих β-АБ отмечены более низкие значения среднего размера агрегатов, светопропускания и скорости образования агрегатов по сравнению с группой здоровых добровольцев. Терапия β-адреноблокаторами у пациентов с пароксизмальной формой ФП оказывает влияние на функциональную активность тромбоцитов в ответ на адреналин в концентрации 10 мкг/мл, отмечено снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов. В группе пациентов с персистирующей формой ФП по сравнению с группой пациентов с пароксизмальной формой ФП, не было отмечено различий в параметрах агрегации тромбоцитов и цифровые значения среднего размера агрегатов и светопропускания не отличаются от значений в группе здоровых добровольцев.

Следующим этапом нашей работы было исследование агрегационной активности тромбоцитов в ответ на адреналин в концентрации 5 мкг/мл (табл.5).

В группе пациентов с пароксизмальной формой ФП,

Таблица 3

**Параметры коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев**

Параметры	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, не принимающие β-АБ (n=10)	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, принимающие β-АБ (n=6)	Пациенты с персистирующей формой ФП, не принимающие β-АБ(n=9)	Пациенты с персистирующей формой ФП, принимающие β-АБ(n=5)	Здоровые добровольцы (n=27)
CPA, ед.	12,35 * (9,24;13,01)	9,71 * ** (8,36;12,10)	12,10 (11,20;15,01)	13,10 (9,17;17,80)	13,80 (10,60;16,10)
СП, %	72,55 (70,10;77,01)	66,30 * (54,01;72,10)	72,70 (68,30;74,60)	67,01 (63,40;70,20)	72,00 (64,50;75,10)
CPA, ед/мин	33,40 * (14,40;38,60)	17,20 * ** (11,01;24,01)	40,10 (23,80;41,50)	27,60 (23,10;59,60)	38,80 (31,5;51,20)
СП, %/мин	83,05 (62,70;97,10)	49,55 * (39,30;64,70)	79,01 (75,50;85,50)	71,30 (43,40;94,20)	85,10 (75,80;91,30)

Примечание. \* -  $p<0,05$  при сравнении группы с пароксизмальной формой ФП и группой здоровых добровольцев. \*\* –  $p<0,05$  при сравнении группы пациентов с пароксизмальной формой ФП, не принимающих β-адреноблокаторы с группой пациентов с пароксизмальной формой ФП, принимающих β-адреноблокаторы.

Таблица 4

**Параметры адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, при индукции адреналином в концентрации 10 мкг/мл у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев**

Параметры	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, не принимающие β-АБ (n=10)	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, принимающие β-АБ (n=6)	Пациенты с персистирующей формой ФП, не принимающие β-АБ(n=9)	Пациенты с персистирующей формой ФП, принимающие β-АБ(n=5)	Здоровые добровольцы (n=27)
CPA, ед.	8,52 * (7,68;12,20)	8,98 (7,85;11,10)	12,80 (10,90;13,50)	13,50 (10,60;13,80)	11,40 (10,10;16,10)
СП, %	51,45 (39,70;67,00)	26,25* ** (23,01;67,40)	63,90 (59,70;67,20)	52,80 (49,10;59,20)	63,20 (53,20;68,60)
CPA, ед/мин	8,27 * (6,99;11,80)	9,23 * (4,75;10,70)	12,10 (9,46;16,01)	17,30 (15,30;20,90)	25,30 (8,14;40,60)
СП, %/мин	25,60 * (17,70;37,80)	18,60 * (13,40;31,20)	30,60 * (22,90;33,40)	37,10 (35,50;45,50)	39,50 (32,60;53,80)

Примечание. \* -  $p<0,05$  при сравнении группы пациентов с ФП и группой здоровых добровольцев; \*\* –  $p<0,05$  при сравнении группы пациентов с ФП, не принимающих β-адреноблокаторы с группой пациентов ФП, принимающих β-адреноблокаторы.

как принимающих, так и не принимающих β-АБ отмечено значимое снижение скорости образования агрегатов и скорости агрегации по сравнению с группой здоровых добровольцев. Так же у пациентов в группе с пароксизмальной формой ФП, принимающих β-АБ отмечено снижение всех параметров агрегации тромбоцитов по сравнению с пациентами без терапии β-адреноблокаторов. В группе пациентов с персистирующей формой ФП без терапии β-АБ отмечено значимое снижение скорости образования агрегатов и скорости агрегации по сравнению с группой здоровых добровольцев.

При использовании адреналина в низкой концентрации 2,5 мкг/мл были получены данные, которые представлены в табл. 6.

В данном блоке исследования отмечено снижение степени и скорости агрегации, а также скорости образования агрегатов у пациентов как с пароксизмальной, так и с персистирующей формой ФП, независимо от терапии β-адреноблокаторами по сравнению с группой здоровых добровольцев. Внутригрупповое сравнение не выявило разницы в функциональном ответе тромбоцитов в ответ на низкие концентрации адреналина. Полученные нами результаты исследования показали, что при концентрации адреналина 10-5 мкг/мл отмечается снижение функционального ответа тромбоцитов у пациентов с пароксизмальной формой ФП, наиболее

выраженное снижение выявлено у пациентов, принимающих β-адреноблокаторы. При использовании малых доз адреналина 2,5 мкг/мл отмечается снижение параметров агрегации в обеих группах пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами, и не зависит ни от вида фибрилляции предсердий, ни от терапии β-адреноблокаторами.

Реакция тромбоцитов на внешние стимулы зависит от соотношения внеклеточных сигналов, активирующих и ингибирующих активность клеток. Спонтанная агрегация тромбоцитов зависит от воздействий сил сдвига, изменения состава плазмы, циркулирующих биологически активных веществ [15,16]. В результате нашего исследования отмечено повышение спонтанной агрегации тромбоцитов у всех пациентов с фибрилляцией предсердий по сравнению с группой здоровых добровольцев, наиболее выраженное увеличение функциональной активности клеток наблюдается в группе пациентов с персистирующей формой ФП. Коллаген характеризует адгезивную сенсibilizированность тромбоцитов [7], в нашем исследовании в группе пациентов с пароксизмальной формой ФП, принимающих β-адреноблокаторы отмечено снижение коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов по сравнению со здоровыми добровольцами. Таким образом, на функциональную активность тромбоцитов в ответ на коллаген оказывает влия-

Таблица 5

**Параметры адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, при индукции адреналином в концентрации 5 мкг/мл у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев**

Параметры	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, не принимающие β-АБ (n=10)	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, принимающие β-АБ (n=6)	Пациенты с персистирующей формой ФП, не принимающие β-АБ (n=9)	Пациенты с персистирующей формой ФП, принимающие β-АБ (n=5)	Здоровые добровольцы (n=27)
CPA, ед.	10,32 (6,36;11,90)	9,02 (6,38;12,60)	9,04 (3,49;11,90)	10,60 (9,77;14,40)	11,60 (9,07;13,90)
СП, %	42,60 (35,00;66,90)	25,35 * (19,90;63,90)	55,01 (9,31;59,30)	48,10 (32,40;55,90)	59,50 (57,30;65,10)
CPA, ед/мин	8,54 * (5,75;16,10)	6,11 * (3,78;10,80)	6,97 * (3,21;10,80)	13,20 (13,20;14,90)	11,90 (7,97;24,10)
СП, %/мин	21,85 * (18,01;36,80)	15,25 * (12,30;33,01)	19,80 * (9,63;30,40)	33,90 (24,10;45,20)	37,70 (35,00;48,50)

Примечание. \*- p<0,05 при сравнении группы пациентов с ФП и группой здоровых добровольцев.

Таблица 6

**Параметры адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, при индукции адреналином в концентрации 2,5 мкг/мл у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев**

Параметры	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, не принимающие β-АБ (n=10)	Пациенты с пароксизмальной формой ФП, принимающие β-АБ (n=6)	Пациенты с персистирующей формой ФП, не принимающие β-АБ (n=9)	Пациенты с персистирующей формой ФП, принимающие β-АБ (n=5)	Здоровые добровольцы (n=27)
CPA, ед.	8,57 (6,43;10,40)	7,41 * (6,37;8,22)	9,93 (2,79;12,90)	10,30 (8,68;13,10)	10,60 (8,73;13,70)
СП, %	29,70 * (25,40;60,60)	37,70 (22,70;63,10) P=0,06	27,50 * (8,97;60,70)	22,30 * (20,90;57,30)	61,20 (38,80;64,90)
CPA, ед/мин	7,67 * (4,42;12,80)	4,54 * (3,97;7,18)	5,18 * (2,33;12,90)	11,70 (10,50;13,70)	15,70 (8,04;21,30)
СП, %/мин	18,55 * (12,80;27,90)	18,05 * (13,10;28,80)	13,30 * (7,84;29,60)	22,01 (18,20;26,70) P=0,06	32,30 (29,90;49,40)

Примечание. \*- p<0,05 при сравнении группы пациентов с ФП и группой здоровых добровольцев.

яние тип фибрилляции предсердий, а также получаемая терапия, в частности наличие  $\beta$ -адреноблокаторов.

Одним из механизмов активации агрегационной активности клеток у больных с ФП является активация симпатно-адреналовой системы, при этом избыток катехоламинов напрямую может активировать адгезию и агрегацию клеток [17,18]. Адреноблокаторы замещают собой катехоламины на адренорецепторах и, таким образом, препятствуют активации тромбоцитов, реализуя антиагрегантный эффект назначаемых  $\beta$ -АБ [13]. Происходит снижение катехоламинового повреждение эндотелия, что способствует нормализации эндотелиальной функции, увеличению содержания оксида азота с восстановлением ангиагрегантных свойств [6,19]. Нами обнаружено, что при концентрации адреналина в реакционной среде 2,5 мкг/мл, отмечена выраженная гипoadренореактивность тромбоцитов, как у пациентов с пароксизмальной, так и с персистирующей формой ФП, наличие или отсутствие терапии  $\beta$ -АБ, при этом, не оказывает существенного влияния на агрегацию тромбоцитов. При проведении корреляционного анализа нами была получена отрицательная взаимосвязь между степенью агрегации при спонтанной агрегации и степенью и скоростью агрегации в ответ на индукцию адреналином в концентрации 5 мкг/мл ( $r = -0,73$  и  $r = -0,67$ , соответственно  $p < 0,05$ ), и в концентрации 2,5 мкг/мл ( $r = -0,90$ ,  $p < 0,05$ ) в группе пациентов с пароксизмальной формой ФП, принимающих  $\beta$ -АБ. Однако, данный эффект гипoadренореактивности «исчезает» в группе пациентов с персистирующей формой ФП при действии высоких доз адреналина в реакционной среде. При длительном нарушении ритма сердца начинают оказывать влияние факторы, связанные с внутрисердечной гемодинамикой и активацией системы свертывания крови [4,19]. Возможно, это связано со снижением эффекта назначаемого адреноблокатора, «феномен ускользания рецепторов» от действия препарата при длительном применении, или же существует «критический» диапазон чувствительности адренорецепторов, зависящий от большого количества факторов, включая длительность заболевания и получаемую пациентами терапию [13]. Несомненно, повышенная спонтанная агрегация вносит существенный вклад в изменение функциональной активности тромбоцитов у пациентов с фибрилляцией предсердий [15] и длительное нарушение ритма сердца приводит к нарушению функциональной активности клеток [3].

Важное значение в организме имеет способность адреналина потенцировать действие других агонистов, так как в физиологических условиях катехоламины являются слабыми агонистами агрегации [14]. При воздействии слабых агонистов происходит праймирование тромбоцитов, а далее активация может быть синергично увеличена другими агентами различными путями [12,18]. Адреналин взаимодействует с адренорецепторами на поверхности клеток, происходит секреция АДФ из плотных гранул, который через пуриnergические рецепторы P2Y1 и P2Y12 на поверхности тромбоцита, с участием сопряженности  $\alpha_2$ -адренорецепторов и P2Y12 пуриновых рецепторов с Gi-белком сигнальных путей, приводит к повышению функциональной активности тромбоцитов [14,15]. Возможно, длительность заболевания, метаболические и реологические изменения в крови вносят существенный вклад в изменение функционального состояния мембран тромбоцитов [3,4], что приводит к гиперадренореактивности тромбоцитов в

нашем исследовании при действии высоких концентраций адреналина *in vitro*. При изменении функционального ответа тромбоцитов ключевым вопросом всегда остается установление обратимости реакций, что требует дальнейшего углубленного изучения.

**Заключение.** Полученные нами результаты исследований позволяют прийти к нескольким выводам. Во-первых, спонтанный агрегационный потенциал тромбоцитов зависит от типа фибрилляции предсердий, а также от наличия или отсутствия в терапии бета-адреноблокаторов, при отсутствии  $\beta$ -АБ отмечено увеличение параметров спонтанной агрегации как при пароксизмальной, так и при персистирующей ФП, что в будущем может создавать условия для гиперреактивности тромбоцитов и возникновению осложнений в виде тромбозов. Во-вторых, коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов также зависит от типа фибрилляции предсердий и от наличия или отсутствия в терапии  $\beta$ -АБ, сниженные показатели параметров агрегации отмечаются у пациентов с пароксизмальной формой и принимающих  $\beta$ -АБ. В-третьих, адренореактивность тромбоцитов *in vitro* зависит от концентрации адреналина в реакционной среде и типа фибрилляции предсердий, наиболее существенные изменения отмечены в группе пациентов с пароксизмальной формой, принимающих  $\beta$ -АБ. Характер выявленных изменений требует дальнейшего изучения агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с различными типами фибрилляции предсердий, что позволит расширить тактику фармакологической коррекции, направленной на профилактику тромбозов.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-6, 12, 17-19 см. REFERENCES)

1. Татарский Б.А., Баталов Р.Е., Попов С.В. Фибрилляция предсердий: патогизиологические подходы к выбору антиаритмической терапии. Томск: СТГ; 2013.
2. Довгалецкий Я.П., Кувшинова Л.Е., Грайфер И.В., Фурман Н.В., Довгалецкий П.Я. Антитромботическая терапия при фибрилляции предсердий: современные подходы и ближайшие перспективы. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2011; 7(5): 628-36.
7. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 1. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток. *Медицинская иммунология*. 2018; 20(6): 785-96.
8. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток. *Медицинская иммунология*. 2019; 21(6): 9-20.
9. Кривошеев Ю.С., Башта Д.И., Красильникова С.Ю., Виленский Л.И., Колесников В.Н., Чуков С.З. и др. Тромбоз ушка левого предсердия при фибрилляции предсердий – современное состояние проблемы. *Вестник аритмологии*. 2019; 4(98): 13-20.
10. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*. 1989; (10): 15-8.
11. Огуркова О.Н., Сулова Т.Е., Ситожевский А.В., Кошельская О.А. Изучение ц-АМФ и ц-ГМФ-зависимых сигнальных систем в инсулинопосредованной агрегации тромбоцитов у пациентов с сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями. *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 11(6): 76-81.
13. Закирова А.Н., Зарудий Ф.С., Гарифуллин Б.Н. Бета-адреноблокаторы и агрегация тромбоцитов. Карведилол. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2008; 4(2): 81-4.



14. Баринов Э.Ф., Мамедалиев С. А., Твердохлеб Т.А., Балькина А.О. Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 51—5.
15. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2013; 12(4): 79-91.
16. Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К. Референсные значения агрегации тромбоцитов у здоровых лиц. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(9): 549-52.
9. Krivosheev Yu.S., Bashta D.I., Krasil'nikova S.Yu., Vilenskiy L.I., Kolesnikov V.N, Chukov S.Z. et al. Left atrial ear thrombosis with atrial fibrillation is the current state of the problem. *Vestnik aritmologii*. 2019; 4(98):13-20. (in Russian)
10. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrilov I.Yu. New highly sensitive platelet aggregation assay. *Laboratornoe delo*. 1989; (10):15-8. (in Russian)
11. Ogurkova O.N., Suslova T.E., Sizochevskiy A.V., Koshel'skaya O.A. The study of c-AMP and c-GMP-dependent signaling systems in the inulin-mediated platelet aggregation in patients with heart failure and metabolic disorders. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2012; 11(6): 76-81. (in Russian)
12. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(8). 1803-25.
13. Zakirova A.N., Zarudiy F.S., Garifullin B.N. Beta-blockers and platelet aggregation. Carvedilol. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2008; 4(2): 81-4. (in Russian)
14. Barinov E.F, Mamedaliev S. A., Tverdokhleba T.A., Balykina A.O. The interaction of adrenaline and ADP in the regulation of the functional activity of platelets in chronic brain ischemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(2): 51-5. (in Russian)
15. Kozlovskiy V.I., Kovtun O.M., Seroukhova O.P., Detkovskaya I.N., Kozlovskiy I.V. Research methods and clinical significance of platelet aggregation. Focus on spontaneous aggregation. *Vestnik Vitebskogo gosudatstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 12(4): 79-91. (in Russian)
16. Mansurova D.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K. Reference values of platelet aggregation in healthy individuals. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(9): 549-52. (in Russian)
17. Kamath S., Blann A. D., Chin B. S. P. et al. A study of platelet activation in atrial fibrillation and the effects of antithrombotic therapy. *European Heart Journal*. 2002; 23(22). 1788-95.
18. Nathan P., Goh V., Mahadevan G., Stewart, Horowitz J. Platelet reactivity is independent of left atrial wall deformation in patients with atrial fibrillation. *Mediators of Inflammation*; 2016; 1-5.
19. Minamino T., Kitakaze M., Sato H. et al. Plasma levels of nitrite/nitrate and platelet cGMP levels are decreased in patients with atrial fibrillation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997; 17: 3191-5.

## REFERENCES

Поступила 20.06.20  
Принята к печати 01.09.20

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Гординская Н. А., Борискина Е. В., Кряжев Д. В.

### ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО МЕСЯЦА ЖИЗНИ В ДЕТСКИХ СТАЦИОНАРАХ НИЖНЕГО НОВГОРОДА

ФБУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И. Н. Блохиной  
Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия

*Проанализированы 1235 штаммов стафилококков, выделенных в многопрофильной детской клинике. Изучена видовая принадлежность и антибиотикорезистентность золотистых и коагулазонегативных стафилококков. Наиболее часто выделялись следующие виды: S. aureus – 36,06%, S. epidermidis – 23,05%, S. haemolyticus – 19,7%, S. hominis – 14,03%. Фенотип метициллинустойчивых штаммов имели 48,9% выделенных штаммов стафилококков, при этом метициллинрезистентных S. aureus (MRSA) выявлено 25,6%, метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков – 63,2%. Частота ассоциированной устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам, макролидам, тетрациклину у метициллинрезистентных штаммов составила 92,7%, 78,3%, 83,4% и 52,05% соответственно, резистентность золотистых и коагулазонегативных стафилококков практически не отличалась. Минимальное количество устойчивых штаммов выявлено в отношении даптомицина, штаммов, устойчивых к ванкомицину и линезолиду не обнаружено. Антибиотикорезистентность стафилококков в детских стационарах определяется наличием гена mecA или чувствительностью к цефокситину и не зависит от видовой принадлежности штаммов.*

**Ключевые слова:** стафилококковая инфекция; коагулазонегативные стафилококки; антибиотикорезистентность; метициллинрезистентные штаммы.

**Для цитирования:** Гординская Н. А., Борискина Е. В., Кряжев Д. В. Видовое разнообразие и антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных у детей первого месяца жизни в детских стационарах Нижнего Новгорода. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 42-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-42-44>

*Gordinskaya N.A., Boriskina E. V., Kryazhev D.V.*

#### SPECIES DIVERSITY AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCI, ALLOCATED IN CHILDREN OF THE FIRST MONTH OF LIFE IN CHILDREN'S HOSPITALS NIZHNY NOVGOROD

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia

*1235 strains of Staphylococci isolated in a multidisciplinary children's clinic were analyzed. The species and antibiotic resistance of Golden and coagulase-negative Staphylococci were studied. The most frequently identified species were: S. aureus-36.06%, S. epidermidis-23.05%, S. haemolyticus-19.7%, S. hominis-14.03%. Phenotype methicillin-resistant strains had 48.9% of the allocated staphylococci, while methicillin-resistant S. aureus was identified in 25.6%, and coagulase-negative staphylococci methicillin-resistant – 63.2 per cent. The frequency of associated resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines have methicillin-resistant strains 92.7%, 78.3%, 83.4% and 52.05% respectively; resistant Staphylococcus and coagulase-negative staphylococci were similar. The minimum number of resistant strains was found in relation to daptomycin, no strains resistant to vancomycin and linezolid were found. Antibiotic resistance of staphylococci in children's hospitals is determined by the presence of the mecA gene or sensitivity to cefoxitin and does not depend on the type of strain.*

**Key words:** staphylococcal infection; coagulase-negative staphylococci; antibiotic resistance; methicillin-resistant strain.

**For citation:** Gordinskaya N.A., Boriskina E.V., Kryazhev D.V. Species diversity and antibiotic resistance of Staphylococci isolated in children of the first month of life in children's hospitals in Nizhny Novgorod. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 42-44 (in Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-42-44>

**For correspondence:** Gordinskaya N.A., doctor of medical Sciences, senior researcher at the laboratory of Microbiology; e-mail: Gordinskaya.nata@yandex.ru

#### Information about authors:

Gordinskaya N. A., <https://orcid.org/0000-0002-4146-0332>;

Boriskina E. V., <https://orcid.org/0000-0001-8889-8801>;

Kryazhev D. V., <https://orcid.org/0000-0002-0517-8065>.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

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

Received 12.08.2020  
Accepted 27.08.2020

**Введение.** Микроорганизмы рода *Staphylococcus spp.* являются одними из самых распространённых возбудителей инфекционных заболеваний, обитателями кожи и слизистых, входя в состав нормальной микрофлоры практически всех людей. Важнейшей функцией нормофлоры считается её участие в формировании колонизационной резистентности, под которой подразумевается совокупность механизмов, придающих стабильность нормальной микрофлоре и обеспечивающих предотвращение колонизации организма человека патогенными микробами, способствующих формированию и поддержанию адекватного иммунного ответа [4,6]. У детей первых месяцев жизни микрофлора кожи, носоглотки, кишечника только формируется и её состав напрямую зависит от окружения: домашние условия или больничная среда [3,8]. Наиболее часто выделяемыми с кожи и слизистых оболочек микроорганизмами у детей, поступивших в стационар в первый месяц жизни, являются коагулазонегативные стафилококки, видовое разнообразие которых в последние годы значительно возросло [1,7]. При этом в экстремальных условиях непатогенные обитатели биологических полостей ведут себя как патогенные бактерии, вызывая различные инфекционные процессы. Наблюдается тенденция к возрастанию роли условно-патогенных коагулазонегативных стафилококков (Coagulase negative *Staphylococcus* – CONS) в развитии внутрибольничных инфекций, их выявляют в 30% случаев катетерассоциированных инфекций хирургических и неонатальных стационаров [2,3]. Особой проблемой становится распространение в стационарах, а также во внебольничной среде, клинических изолятов CONS, устойчивых к цефокситину, которые проявляют резистентность не только ко всем β-лактамам антибиотикам, но и препаратам других классов [5,9].

Цель исследования – изучение видовой принадлежности стафилококков, выделенных у детей первого месяца жизни, поступивших в стационар с различными заболеваниями, и определение частоты обнаружения антибиотикорезистентных штаммов.

**Материал и методы.** В задачи исследования входил анализ частоты обнаружения микроорганизмов рода *Staphylococcus spp.*, определение их видового спектра, изучение фенотипа антибиотикорезистентности выделенных изолятов и детекция гена *mecA* у штаммов, резистентных к цефокситину. Видовая идентификация и определение антибиотикорезистентности проводились на анализаторе WalkAway 96 (Siemens, Германия) с помощью коммерческих планшетов POS Combo Type 20 (Beckman Coulter, США). Чувствительность к цефокситину CONS в связи с отсутствием критериев минимальной подавляющей концентрации определяли диско-диффузионным методом, используя диски произ-

водства Pronadisa (Laboratorios CONDA, Испания). Наличие гена *mecA* у стафилококков определяли методом ПЦР. Амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) в соответствии с методическими указаниями к набору «Амплиценс MRSA-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Детекция продуктов амплификации проводилась гибридационно-флюоресцентным методом в режиме реального времени.

**Результаты и обсуждение.** Проанализированы 1235 штаммов микроорганизмов, выделенных из различных биосубстратов детей первого месяца жизни, лечившихся в стационаре многопрофильной клиники в течение 2019-2020 гг. Ведущим патогеном у детей были стафилококки, которые составили 79,02% (976 штаммов) от всей выделенной микрофлоры. Среди рода *Staphylococcus spp.* 36,06% принадлежали *S. aureus*, 63,9% – CoNS, соответственно. В микробном пейзаже грамотрицательной микрофлоры присутствовали как неферментирующие бактерии, так и представители семейства энтеробактерий без количественного лидерства конкретного вида. CONS представлены в основном тремя видами – *S. epidermidis* (23,05% всей микрофлоры), *S. haemolyticus* (19,7% всей микрофлоры), *S. hominis* (14,03% всей микрофлоры), три другие вида выделены в незначительном количестве (табл. 1).

48,9% всех выделенных стафилококков проявляли устойчивость к цефокситину, т. е. имели фенотип метициллинустойчивых штаммов. При этом метициллинрезистентных *S. aureus* (MRSA) выявлено 25,6%, метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков (MRS CoNS) – 63,2%, т. е. в 2,46 раза больше. Количество метициллинрезистентных штаммов у различных видов коагулазонегативных стафилококков представлено в табл. 2.

С целью подтверждения продукции дополнительно пенициллинсвязывающего белка у 43 фенотипически метициллинрезистентных штаммов стафилококков проводили детекцию гена *mecA*. Результаты ПЦР исследований показали, что все протестированные штаммы обладали геном *mecA*.

Антибиотикограммы метициллинустойчивых и метициллинчувствительных изолятов имели существенные отличия, независимо от видовой принадлежности штаммов (табл. 3).

Большинство MRSA и MRS CoNS штаммов устойчивы к аминогликозидам, фторхинолонам, макролидам, рифампицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, максимально активным препаратом за анализируемый период оказался даптомицин. Устойчивых метициллинрезистентных стафилококков в отношении ванкомицина и линезолида не выявлено. Меньшую резистентность в

Таблица 1

Видовое разнообразие CONS

Микроорганизмы	Процент выделения среди CoNS, %
<i>S. epidermidis</i>	36
<i>S. haemolyticus</i>	31
<i>S. hominis</i>	22
<i>S. warneri</i>	4
<i>S. sciuri</i>	4
<i>S. lugdunensis</i>	3

Таблица 2

Резистентность к цефокситину у различных видов CoNS

Микроорганизмы	Количество резистентных штаммов
<i>S. epidermidis</i>	80 из 225 (62,8%)
<i>S. haemolyticus</i>	59 из 194 (97,3%)
<i>S. hominis</i>	30 из 137 (29,7%)
<i>S. warneri</i>	3 из 25
<i>S. sciuri</i>	4 из 25
<i>S. lugdunensis</i>	2 из 18

Фенотип антибиотикорезистентности золотистых и коагулазонегативных стафилококков (% резистентных штаммов)

Препараты	MRSA	MRS CoNS	MSSA	MSS CoNS
Цефокситин	25,6	63,2	74,4	36,8
Гентамицин	96,4	97,6	52,3	61,7
Амикацин	86,9	89,9	55,8	56,3
Ципрофлоксацин	92,5	93,1	59,3	51,9
Левифлоксацин	66,5	61,2	49,4	54,3
Эритромицин	84,2	82,6	56,6	42,3
Клиндамицин	55,8	57,3	49,2	46,1
Тетрациклин	51,7	52,4	31,2	33,6
Рифампицин	77,2	86,9	27,6	26,4
Триметоприм/сульфаметоксазол	87,3	89,7	26,8	19,5
Даптомицин	14,2	13,9	7,6	6,4
Ванкомицин	0	0	0	0
Линезолид	0	0	0	0

отношении антибиотиков различных классов проявили MSSA и MSS CoNS. Более половины штаммов чувствительны ко всем препаратам, наибольшую активность в отношении метициллинчувствительных штаммов проявили даптомицин и триметоприм/сульфаметоксазол,  $\frac{2}{3}$  штаммов чувствительны к тетрациклину и рифампицину.

**Выводы:**

1. Ведущим патогеном детских стационаров многопрофильной клиники являются стафилококки.

2. Коагулазонегативные стафилококки выделяются у детей первого месяца жизни в 1,7 раза чаще, чем золотистый стафилококк.

3. Метициллинрезистентные штаммы среди CoNS обнаружены в 2,46 раза чаще, чем у *S. aureus*.

4. Антибиотикорезистентность стафилококков в детских стационарах определяется наличием гена *tesA* или чувствительностью к цефокситину и не зависит от видовой принадлежности штаммов.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6–9 см. REFERENCES)

1. Гостев В.В., Калиногорская О.А., Круглов А.Н., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60: 23-8.

2. Граничева Н. В., Зайцева Е. А., Переломова О. В. Резистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных у пациентов кардиохирургического профиля. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019; 2: 38-42.

3. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г., Шварц А.П., Мокрова Е.В. и др. Чувствительность к антибактериальным препаратам стафилококков, циркулирующих в многопрофильном стационаре. *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17(4): 58-62.

4. Маланичева Т.Г., Закирова А.М., Овчинникова А.Г. Терапия рецидивирующих бронхитов у детей с частыми респираторными заболеваниями, имеющих нарушения микробиоценоза носоглотки. *Ремедиум Приволжье*. 2015; 10: 27-30.

5. Черненко Т. В., Евдокимова Н. В. Чувствительность к антибактериальным препаратам метициллинрезистентных стафилококков, выделенных у пациентов стационара скорой медицинской помощи. *Медицинский алфавит*. 2017; 1(7): 32-5.

REFERENCES

1. Gostev V.V., Kalinogorskaja O.A., Kruglov A.N., Sidorenko S.V. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated in hospitals in Saint Petersburg and Moscow. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2015; 60: 23-8. (in Russian)

2. Granicheva N.V., Zaytseva E.A., Perelomova O.V. Resistance of coagulase-negative staphylococci isolated in cardiac surgery patients. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 2: 38-42. (in Russian)

3. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Ivanova L.V., Goik V.G., Shvarc A.P., Mokrova E.P. et al. Sensitivity to antibacterial drugs of staphylococci circulating in a multidisciplinary hospital. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2015; 17(4): 58-62. (in Russian)

4. Malanicheva T.G., Zakirova A.M., Ovchinnikova A.G. Therapy of recurrent bronchitis in children with frequent respiratory diseases that have violations of nasopharyngeal microbiocenosis. *Remedium Privolzh'e*. 2015; 10: 27-30. (in Russian)

5. Chernen'kaya T. V., Evdokimova N. V. Sensitivity to antimicrobial agents of methicillin-resistant staphylococci isolated from emergency hospital patients. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 1(7): 32-5. (in Russian)

6. Becker K., Heilmann C., Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiol. Reviews*. 2014; 27(4): 870-926.

7. Rahman A., Hosaain M. A., Mahmud C., Paul S. K., Sultana S., Haque N. Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens. *Mymensingh Med. J.* 2012; 21(2): 195-9.

8. Rogers K.L., Fey P.D., Rupp M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2009; 23(1): 73-98.

9. Salgueiro V.C., Azevedo M.B., Iorio N.L., Amorum Ede L., don Santos K.R. Staphylococcal cassette chromosome mec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a Brazilian neonatal care unit. *Pediatr Infect. Dis. J.* 2014; 33(10): 1089-90.

Поступила 12.08.20  
Принята к печати 27.08.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Червинец В.М.<sup>1</sup>, Червинец Ю.В.<sup>1</sup>, Леонтьева А.В.<sup>1</sup>, Козлова Е.А.<sup>1</sup>, Стулов Н.М.<sup>1</sup>, Беляев В.С.<sup>1</sup>, Григорьянц Э.О.<sup>1</sup>, Миронов А.Ю.<sup>2</sup>**МИКРОБИОМ ПОЛОСТИ РТА У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ, АДГЕЗИВНЫЕ И БИОПЛЁНКООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА**<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Тверской государственный университет Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия;<sup>2</sup>ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Проанализирован микробиом полости рта у здоровых людей и больных пародонтитом, определены их адгезивные свойства и способность к образованию биоплёнок. В исследовании приняли участие 2 группы: здоровая, 18 человек, и опытная группа, 20 больных с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Средний возраст исследуемых людей составил 35-45 лет. Материал – зубодесневой налёт, соскоб со слизистой оболочки спинки языка, содержимое зубодесневого желобка и пародонтального кармана, ротовая жидкость. Основным методом исследования – культуральный, а также определяли степень адгезии микроорганизмов, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) на клетках слизистой оболочки полости рта и способность формировать биоплёнки на пластике и стекле. Микробиота полости рта больных пародонтитом характеризуется уменьшением частоты встречаемости бактерий родов *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, и увеличением *Staphylococcus aureus*, *Veillonella spp.*, *Bacillus spp.* Микроорганизмы опытной группы обладают большей способностью к адгезии на клетках слизистой оболочки, чем у здоровых людей, при этом усиливается их способность образовывать биоплёнки и проявлять патогенные свойства. Биоплёнкообразование микроорганизмов у здоровых и больных людей отличается как на стекле, так и на пластике.*

**Ключевые слова:** микробиота; полость рта; хронический генерализованный пародонтит; адгезия; биоплёнки.

**Для цитирования:** Червинец В.М., Червинец Ю.В., Леонтьева А.В., Козлова Е.А., Стулов Н.М., Беляев В.С., Григорьянц Э.О., Миронов А.Ю. Микробиом полости рта у больных пародонтитом, адгезивные и биоплёнкообразующие свойства. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 45-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-45-51>

*Chervinets V.M.<sup>1</sup>, Chervinets Yu.V.<sup>1</sup>, Leont'eva A.V.<sup>1</sup>, Kozlova E.A.<sup>1</sup>, Stulov N.M.<sup>1</sup>, Belyaev V.S.<sup>1</sup>, Grigoryants E.O.<sup>1</sup>, Mironov A.Yu.<sup>2</sup>*

**THE MICROBIOME OF ORAL CAVITY PATIENTS WITH PERIODONTITIS, ADHESIVE AND BIOFILM FORMING PROPERTIES**<sup>1</sup>Tver State Medical University, 170100, Tver, Russia;<sup>2</sup>G. N. Gabrichevskogo Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

*The microbiome of oral cavity in healthy people and patients with periodontitis was analyzed to determine their adhesive properties and the ability to form biofilms. The study involved 2 groups: healthy, 18 people, and an experimental group, 20 patients with chronic generalized periodontitis moderate severity of the disease. The average age of the studied people was 35-45 years. Material – dental plaque, scraping from the mucous membrane of the back of the tongue, the contents of the periodontal groove and periodontal pocket, as well as oral fluid. The main method of diagnostic was bacteriological. The average adhesion index (AAI) was used to determine adhesion level of microorganisms to epithelial cells of oral cavity's mucous membrane. The microbiota's ability to form biofilm was tested on glass and plastic surface. The microbiota of oral cavity of patients with periodontitis was characterized by decrease in the frequency of bacteria of the genera: *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, and an increase in *Staphylococcus aureus*, *Veillonella spp.*, *Bacillus spp.* The microbiota of the oral cavity of patients with generalized periodontitis has a greater ability to adhere to the cells of the mucous membrane than in healthy people, while their ability to form biofilms and exhibit pathogenic properties is enhanced. The biofilm formation of microorganisms in healthy and sick people differs both on glass and on plastic surfaces.*

**Key words:** microbiota; oral cavity; chronic generalized periodontitis; adhesion; biofilms.

**For citation:** Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Leont'eva A.V., Kozlova E.A., Stulov N.M., Belyaev V.S., Grigoryants E.O., Mironov A.Yu. The microbiome of oral cavity patients with periodontitis, adhesive and biofilm forming properties. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 45-51 (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-45-51>

**For correspondence:** *Chervinets V. M.*, Doctor of Medical Sciences, professor, head of the department of microbiology and virology with course of immunology; e-mail: [chervinets@mail.ru](mailto:chervinets@mail.ru)

**Information about authors:**Chervinets V. M., <https://orcid.org/0000-0001-6549-0010>;Chervinets Yu. V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839>;Kozlova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-9951-1377>;Grigoryants E.O., <https://orcid.org/0000-0003-4712-3043>;Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1116-867X>.

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

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

Received 20.04.2020

Accepted 27.05.2020

**Введение.** Полость рта по составу микробиологических сообществ представляет сложную систему, изменения в которой способны оказывать влияние не только на здоровье полости рта, но и всего организма в целом. Подчёркивается взаимосвязь разнообразия микробиома полости рта (700 видов) с множеством заболеваний висцеральных систем, например, рак кишечника и др. [1, 2]. Стоматологические заболевания многими авторами рассматриваются в контексте изменения состава биоплёнок [3-5]. Состав биоплёнок влияет на развитие таких заболеваний, как пародонтит, гингивит, кариес [6, 7]; отмечен комменсализм бактерий биоплёнок, который связан с передачей сигнальных молекул в сообществе [8-10].

Многие авторы связывают хронический пародонтит (ХП) с дисбиозом различных биотопов полости рта, самым важным из которых является пародонтальный карман. С развитием периодонтита могут быть связаны мутации, определяющие чувствительность тканей пародонта к колонизации специфическими микроорганизмами [11,12]. В результате комплексного исследования выяснено, что некоторые мутантные аллели связаны с уменьшением *Tannerella forsythia*, *Actinomyces gerencseriae*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella nigrescens*, другие с увеличением *Porphyromonas gingivalis* – ключевого парадонтопатогена [13]. Сравнивали микробиом щеки и пародонтального кармана при различных видах периодонтитов [14]. Среди обнаруженных 195 родов, наиболее часто встречались стрептококки и неспорообразующие анаэробы [15]. Проведён комплексный анализ – сравнение микробиоты языка, слюны, пародонтального кармана, десневого сосочка с пародонтитом [16]. В микробиоте языка преобладали *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, в микробиоте слюны *Streptococcus*, *Veillonella*, пародонтального кармана – *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, десневого сосочка – *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*. Малоизученным остается вопрос изменения адгезивных свойств микроорганизмов полости рта у больных пародонтитом и их способность к образованию биоплёнок.

Цель исследования – провести сравнительный анализ микрофлоры полости рта здоровых людей и больных пародонтитом, определить её адгезивные свойства и образование биоплёнок.

**Материал и методы.** В группе здоровых обследовано 18 человек (9 женщин и 9 мужчин). Средний возраст составил 35-45 лет. В опытной группе было 20 больных с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести (14 женщин, 6 мужчин). Средний возраст исследуемых составил 35-45 лет.

Исследуемый материал – зубодесневой налёт с вестибулярной поверхности резов нижней челюсти площадью 1 см<sup>2</sup>, соскоб со слизистой оболочки спинки языка площадью 1 см<sup>2</sup>, содержимое зубодесневого желобка с одного резца нижней челюсти у здоровой группы и содержимое пародонтального кармана с одного резца нижней челюсти, у больных пародонтитом, взятое с помощью бумажного шпигета, ротовая жидкость объёмом 1 мл. Материал с поверхности слизистой оболочки брали стерильным ватным тампоном.

Во всех обследуемых группах материал забирали утром (в 8-9 ч) до приёма пищи, помещали в транспортную среду Эймса (Amies) без угля. Ротовую жидкость собирали в стерильные пробирки. В бактериологическую лабораторию материал доставляли в течение 2-х

часов. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных бактерий использованы среды – Эндо для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера, M 304 – стрептококковый агар, МРС – лактоагар, Сабуро декстроза агар, Колумбия кровяной агар, хромогенные среды для выявления грибов рода *Candida*, стрептококков и энтерококков (HiMedia). Для культивирования анаэробов использовали среды бифидоагар и кровяной Шедлера агар. Анаэробные условия создавались в анаэротатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Количество колоний выражали в lg КОЕ/см<sup>2</sup> или lg КОЕ/мл. Идентификация осуществлялась по биохимической активности с применением API систем (bioMérieux, Франция).

Степень адгезии микроорганизмов определяли, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) на клетках слизистой оболочки полости рта (Патент РФ № 2630060; 2017). Тестирование микроорганизмов на способность формировать биоплёнку на пластике и стекле проводили в стерильных пластиковых чашках Петри (диаметром 90 мм) со стеклышками по методике [17], по измерению оптической плотности спиртового красителя, окрашившего биоплёнку.

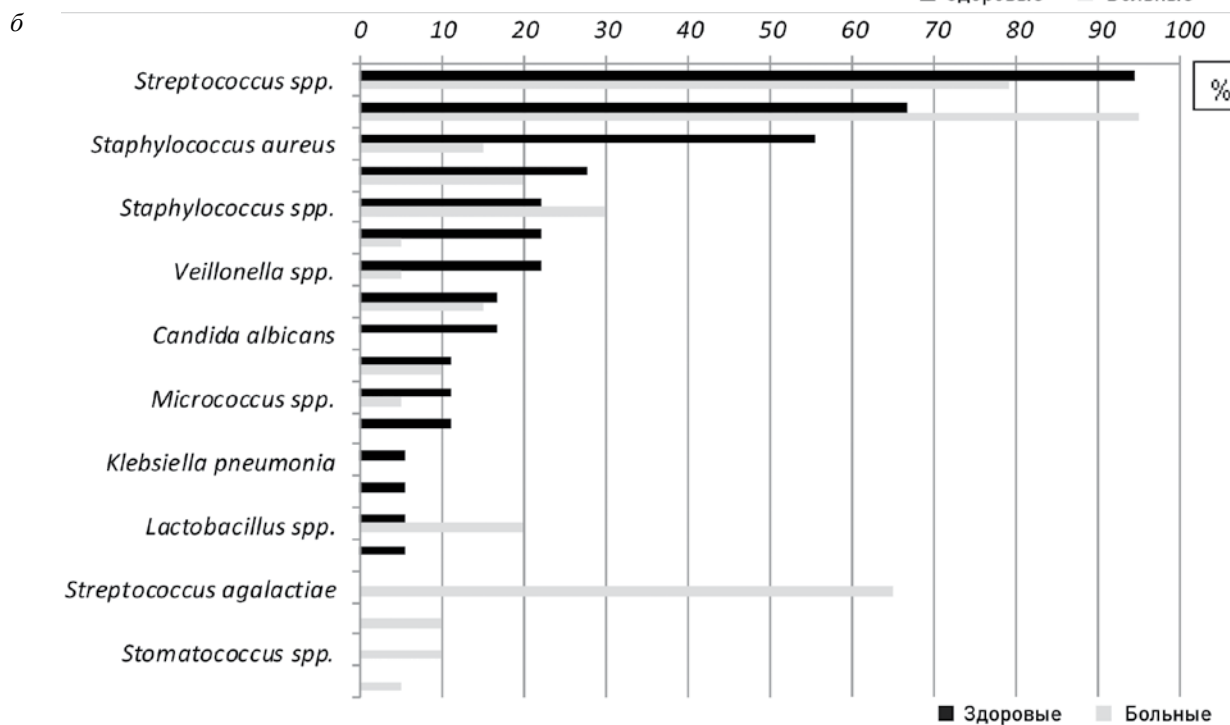
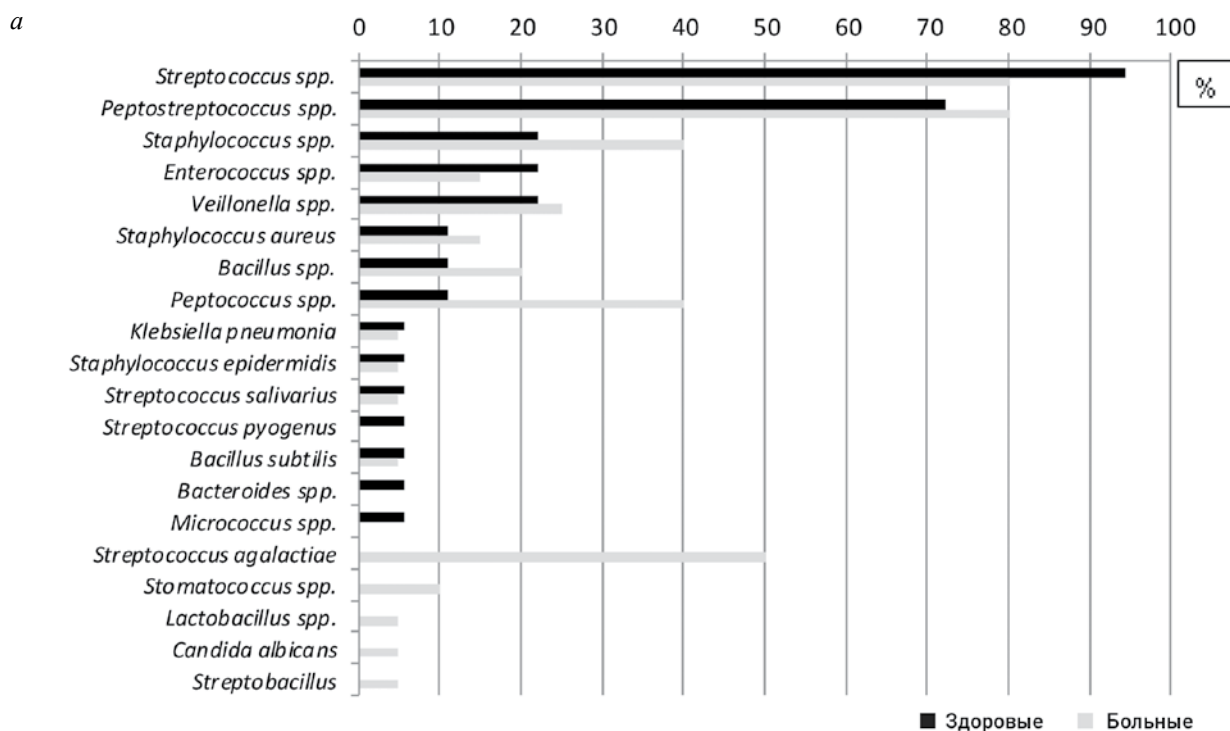
Данные экспериментов обрабатывались с помощью прикладной программы «STATISTICA» (Stat Soft Russia). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Из содержимого зубодесневого налёта здоровых исследуемых (см. рисунок, а) выделялись *Streptococcus spp.* в 94,4% случаев, *Peptostreptococcus spp.* – в 72,2%, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Veillonella spp.* – в 22,2%, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Peptococcus spp.* – в 11,1%, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides spp.*, *Micrococcus spp.* – менее 10%.

Из содержимого зубодесневого налёта больных пародонтитом (см. рисунок, а) в 80% случаев выделялись *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae* – в 50%, *Staphylococcus spp.*, *Peptococcus spp.* – в 40%, *Veillonella spp.* – в 25%, *Bacillus spp.* – в 20%, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* – в 15%, *Stomatococcus spp.* – в 10%, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus spp.*, *Candida albicans* – менее 10%.

В соскобе с языка здоровых людей (см. рисунок, б) в 94,4% случаев выявлялись *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* – в 66,7%, *Staphylococcus aureus* – в 55,55%, *Bacillus spp.* – 27,8%, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Veillonella spp.* – в 22,2%, *Enterococcus spp.*, *Candida albicans* – в 16,7%, *Streptobacillus*, *Micrococcus spp.*, *Peptococcus spp.* – в 11,1%, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.* – менее 10%.

В соскобе с языка больных пародонтитом (см. рисунок, б) выделялись *Peptostreptococcus spp.* в 95% случаев, *Streptococcus spp.* – 79%, *Streptococcus agalactiae* – в 65%, *Staphylococcus spp.* – в 30%, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.* – в 20%, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* – в 15%, *Streptobacillus*, *Bacillus subtilis*, *Stomatococcus spp.* –



Спектр и частота встречаемости микроорганизмов здоровых и больных с пародонтитом.

*а* – зубного налёта; *б* – слизистой оболочки языка; *в* – зубодесневого желобка; *г* – ротовой жидкости.

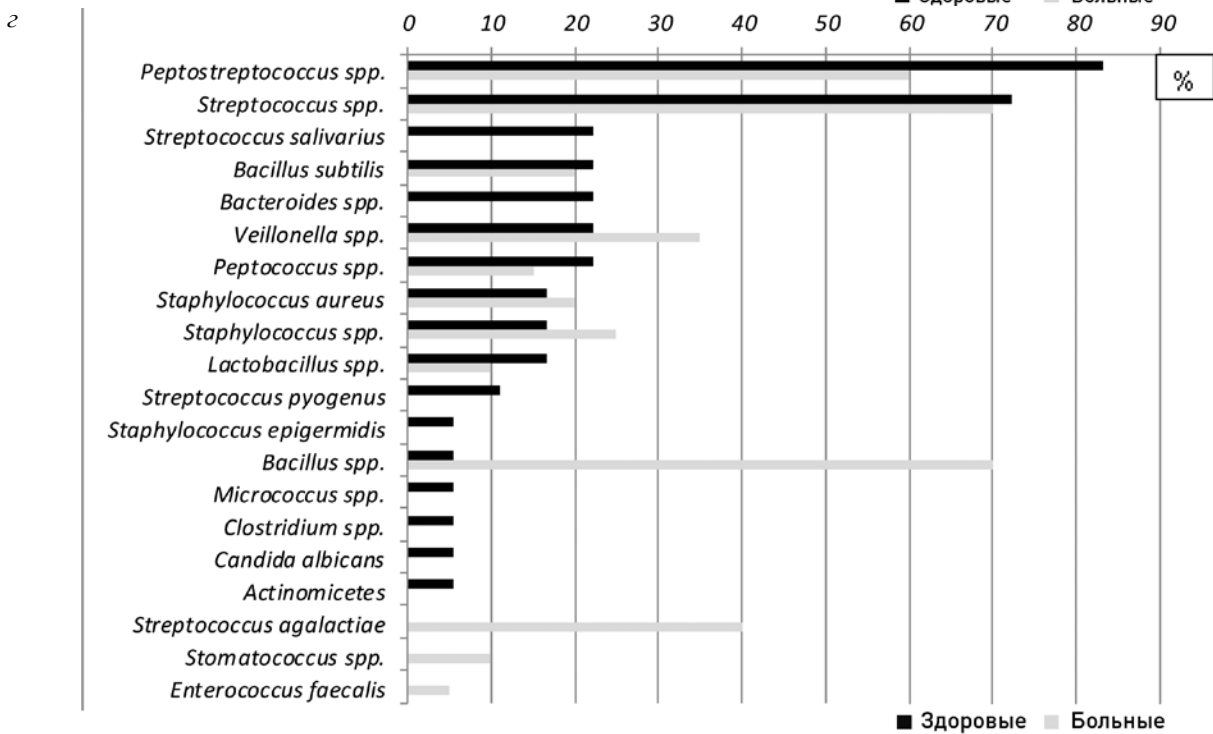
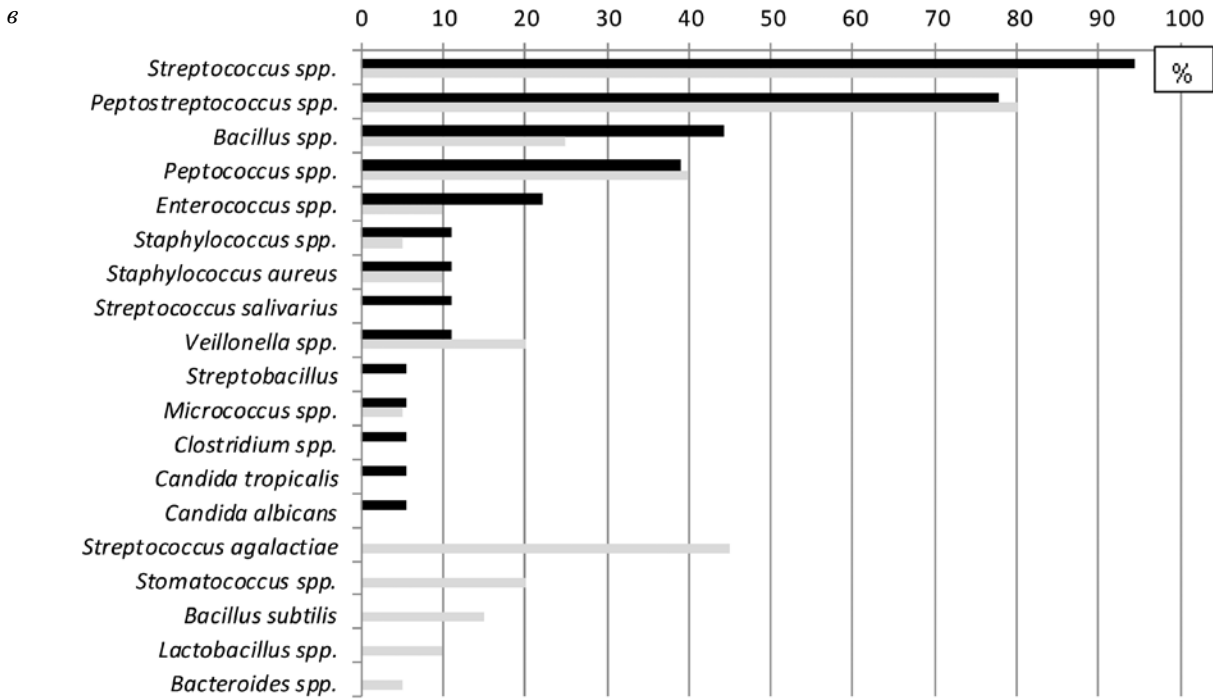
По оси абсцисс – распространённость микроорганизмов (в %); по оси ординат – наименования микроорганизмов. Столбики сверху вниз: верхний – здоровые люди, нижний – больные пародонтитом.

в 10%, менее чем в 10% – *Staphylococcus epidermidis*, *Veillonella spp.*, *Micrococcus spp.*

Из содержимого зубодесневого желобка здоровых людей (см. рисунок, *в*) выделялись *Streptococcus spp.* – 94,4% случаев, *Peptostreptococcus spp.* – в 77,8%, *Bacillus*

*spp.* – в 44,4%, *Peptococcus spp.* – в 38,9%, *Enterococcus spp.* – в 22,2%, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Veillonella spp.* – в 11,1%, *Streptobacillus*, *Micrococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* – менее 10%.

MICROBIOLOGY



Спектр и частота встречаемости микроорганизмов здоровых и больных с пародонтитом.

а – зубного налёта; б – слизистой оболочки языка; в – зубодесневового желобка; г – ротовой жидкости.

По оси абсцисс – распространённость микроорганизмов (в %); по оси ординат – наименования микроорганизмов. Столбики сверху вниз: верхний – здоровые люди, нижний – больные пародонтитом.

В содержимом пародонтального кармана больных пародонтитом (см. рисунок, в) в 80% случаев выявлены *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae* – в 45%, *Peptococcus spp.* – в 40%, *Bacillus spp.* – в 25%, *Veillonella spp.*, *Stomatococcus spp.* – в 20%,

*Bacillus subtilis* – в 15%, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus spp.* – в 10%, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacteroides spp.* – менее 10%.

В ротовой жидкости у здоровых людей (см. рисунок, г) в 83,3% случаев выявлены *Peptostreptococcus*



spp., *Streptococcus* spp. - в 72,2%, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp., *Peptococcus* spp. - в 22,2%, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. - в 16,7%, *Streptococcus pyogenes* - в 11,1%, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp., *Candida albicans*, *Actinomycetes* - менее 10%.

Из ротовой жидкости у больных пародонтитом (см. рисунок, з) выделялись *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp. - в 70% случаев, *Peptostreptococcus* spp. - в 60%, *Streptococcus agalactiae* - в 40%, *Veillonella* spp. - в 35%, *Staphylococcus* spp. - в 25%, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* - 20%, *Peptococcus* spp. - в 15%, *Lactobacillus* spp., *Stomatococcus* spp. - в 10%, *Enterococcus faecalis* - менее 10%.

В зубном налёте у здоровых исследуемых определено 5,17 lg КОЕ/мл *Bacteroides* spp., 4,8 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 4,7 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 4,17 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 3,9 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 3,76 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 3,17 lg КОЕ/мл *Streptococcus pyogenes*, 3,14 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp., 3,1 lg КОЕ/мл *Klebsiella pneumonia*, 2,86 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 2,1 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 2 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp., 1,7 lg КОЕ/мл *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus subtilis*.

У больных пародонтитом в зубном налёте выявлено 3,7 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 3,93 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 3,73 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 3,63 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 3,9 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 4,17 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp., 1,7 lg КОЕ/мл *Klebsiella pneumonia*, 2,2 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 2,25 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 2,74 lg КОЕ/мл *Staphylococcus epidermidis*, 3,4 lg КОЕ/мл *Streptococcus salivarius*, 2,6 lg КОЕ/мл *Bacillus subtilis*, 4,17 lg КОЕ/мл *Streptobacillus* spp., 3,24 lg КОЕ/мл *Candida albicans*, 3 lg КОЕ/мл *Streptococcus agalactiae*, 2,7 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 2,63 lg КОЕ/мл *Stomatococcus* spp.

Из соскоба с языка у здоровых исследуемых выделялись 5,18 lg КОЕ/мл *Streptococcus salivarius*, 4,9 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 4,63 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 4,53 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp., 3,67 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp., 3,54 lg КОЕ/мл *Streptobacillus* spp., 3,5 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 3,4 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 2,8 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 2,74 lg КОЕ/мл *Clostridium* spp., 2,69 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 2,65 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 2,4 lg КОЕ/мл *Klebsiella pneumonia*, 2,39 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 2,23 lg КОЕ/мл *Candida albicans*, 2,17 lg КОЕ/мл *Staphylococcus epidermidis*, 1,7 lg КОЕ/мл *Proteus* spp.

В соскобе с языка у больных пародонтитом определено 4,17 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., *Veillonella* spp. и *Streptobacillus* spp. 4,1 lg КОЕ/мл *Streptococcus agalactiae*, 4 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 3,92 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 3,43 lg КОЕ/мл *Bacillus subtilis*, 3,17 lg КОЕ/мл *Staphylococcus epidermidis*, 3 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 2,82 lg КОЕ/мл *Stomatococcus* spp., 2,69 lg КОЕ/мл *Enterococcus faecalis*, 2,61 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 2,6 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 2,5 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp., 2,3 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp.

В материале зубодесневого желобка у здоровых исследуемых определялись 4,8 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 4,2 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 4,17 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 4 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 3,4 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp., 3,3 lg КОЕ/мл *Streptobacillus* spp.,

3,2 lg КОЕ/мл *Streptococcus salivarius*, 3,1 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp. и *Clostridium* spp., 3 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 2,17 lg КОЕ/мл *Candida tropicalis*, 1,9 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 1,85 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 1,7 lg КОЕ/мл *Candida albicans*.

В материале пародонтального кармана у больных пародонтитом определено 4,17 lg КОЕ/мл *Enterococcus* spp. и *Bacteroides* spp., 4,1 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 4 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 3,55 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 3,5 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 3,3 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 3,2 lg КОЕ/мл *Streptococcus agalactiae* и *Stomatococcus* spp., 3 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp., 2,5 lg КОЕ/мл *Stomatococcus* spp., 2,3 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 2,17 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 2,16 lg КОЕ/мл *Bacillus subtilis*.

В ротовой жидкости здоровых исследуемых выявлено 7,9 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 7,6 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 7 lg КОЕ/мл *Bacteroides* spp., 6,8 lg КОЕ/мл *Peptostreptococcus* spp., 6,6 lg КОЕ/мл *Bacillus subtilis*, 6,5 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 6,2 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 6,17 lg КОЕ/мл *Micrococcus* spp., 6,08 lg КОЕ/мл *Actinomycetes*, 6 lg КОЕ/мл *Clostridium* spp., 5,8 lg КОЕ/мл *Streptococcus pyogenes*, 5,77 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 5,7 lg КОЕ/мл *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*, 5,3 lg КОЕ/мл *Candida albicans*, 5,17 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 4,53 lg КОЕ/мл *Streptococcus salivarius*.

В ротовой жидкости у больных пародонтитом определено 7,5 lg КОЕ/мл *Streptococcus agalactiae*, 7 lg КОЕ/мл *Streptococcus* spp., 6,9 lg КОЕ/мл *Peptococcus* spp., 6,7 lg КОЕ/мл *Veillonella* spp., 6,6 lg КОЕ/мл *Bacillus subtilis*, 6,4 lg КОЕ/мл *Bacillus* spp., 6,17 lg КОЕ/мл *Enterococcus faecalis*, 6,1 lg КОЕ/мл *Staphylococcus* spp., 5,6 lg КОЕ/мл *Lactobacillus* spp., 5,55 lg КОЕ/мл *Bacteroides* spp., 5,5 lg КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*, 5,2 lg КОЕ/мл *Stomatococcus* spp.

Адгезивную способность определяли на эпителиальных клетках слизистой оболочки полости рта здоровых людей у 8 культур стафилококков, 13 культур стрептококков, 10 культур анаэробных микроорганизмов. У здоровых людей среднее число адгезированных стафилококков разных видов неодинаково: *Staphylococcus aureus* -  $5,03 \pm 0,4$ , *S. epidermidis* -  $2,62 \pm 0,27$ , *S. xylois* -  $5,83 \pm 0,97$ , *S. scileri* -  $6,2 \pm 1,17$  ( $p < 0,05$ ). У больных людей среднее число адгезированных стафилококков в 2-3 раза выше и варьирует: *S. aureus* -  $13,23 \pm 0,6$ , *S. epidermidis* -  $12,8 \pm 0,43$ , *S. xylois* -  $11,63 \pm 0,66$ , *S. lentus* -  $11,16 \pm 1$  ( $p < 0,05$ ). У здоровых людей среднее число адгезированных стрептококков различалось: *S. mitis* -  $3,06 \pm 0,52$ , *S. uberis* -  $3,06 \pm 0,43$ , *S. bovis* -  $6,88 \pm 0,43$ , *S. oralis* -  $4,44 \pm 0,76$ , *Aerococcus viridans* -  $3,58 \pm 0,61$  ( $p < 0,05$ ). У больных людей среднее число адгезированных стрептококков намного выше. СПА *S. mitis* -  $11,01 \pm 0,57$ , *S. uberis* -  $4,54 \pm 0,76$ , *Gemella haemolysans* -  $9,76 \pm 0,58$ , *Lactococcus lactis* -  $9,31 \pm 0,4$ , *S. salivarius* -  $13 \pm 0,67$ , *S. constellatus* -  $4,8 \pm 0,95$ , *S. sanguis* -  $10,48 \pm 1,04$ , *S. acidominimus* -  $4,34 \pm 1,04$  ( $p < 0,05$ ). Среди анаэробных микроорганизмов у здоровых людей средний показатель адгезии у *Bifidobacterium* spp. -  $5,32 \pm 0,48$ , у *S. intermedius* -  $3,64 \pm 0,75$ , у *Clostridium clostridiforme* -  $5,52 \pm 0,88$ , у *Gemella morbillorum* -  $4,36 \pm 0,46$ , у *Clostridium butyricum* -  $4,4 \pm 0,62$  ( $p < 0,05$ ). У больных людей среди анаэробных микроорганизмов средний показатель адгезии высокий. У *Bifidobacterium* spp. -  $11,17 \pm 0,47$ , у

*S. intermedius* – 11,84±0,71, у *Bacteroides ureolyticus* – 9,4±0,75, у *Actinomyces israelii* – 10,65±1,24, у *Bacteroides disfasonis* – 10,86±0,74 ( $p<0,05$ ).

Способность формировать биоплёнки на пластике и стекле определена для стафилококков, стрептококков, пептострептококков, клостридий, бифидобактерий здоровых людей и больных пародонтитом.

Биоплёнкообразование микроорганизмов у здоровых и больных людей отличается как на стекле, так и на пластике. У больных пародонтитом *Staphylococcus aureus* в 2 раза меньше обладал способностью образовывать биоплёнку на стекле и на пластике в сравнении со здоровыми людьми. Бифидобактерии у больных пародонтитом в этом отношении в 2 раза активнее на стекле и пластике. Пептострептококки вели себя неоднозначно, у больных на стекле активность выше, на пластике в 3 раза ниже. Клостридии здоровых людей на стекле образовывали биоплёнку в 2 раза выше, на пластике в 2 раза ниже, чем у больных. *S. mitis*, *S. salivarius* активнее образовывали биоплёнки на стекле у здоровых людей, на пластике – у больных пародонтитом.

**Заключение.** В содержимом зубодесневого налёта больных пародонтитом, по сравнению со здоровыми людьми, реже изолировались: *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*; в тоже время увеличивалось количество *Peptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* (в том числе *Staphylococcus aureus*), *Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus spp.* В соскобе с языка обследуемых опытной группы, по сравнению с контрольной, реже присутствовали *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, с другой стороны увеличивалось количество *Staphylococcus epidermidis*, *Veillonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.* В содержимом зубодесневого желобка больных пародонтитом, по сравнению со здоровыми людьми, реже выделялись *Staphylococcus spp.* (в том числе *Staphylococcus aureus*), *Streptococcus spp.*; с другой стороны выявлено увеличение количества *Veillonella spp.*, *Peptostreptococcus spp.* и *Peptococcus spp.*, *Bacillus spp.* В ротовой жидкости опытной группы, по сравнению с контрольной, реже изолировались *Lactobacillus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Streptococcus spp.*; в тоже время увеличивалось количество *Veillonella spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* (в том числе *Staphylococcus aureus*).

В опытной группе средний показатель адгезии условно-патогенных бактерий (*S. aureus*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Actinomyces spp.*), так и представителей нормобиоты (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*) был в 2-3 раза выше, чем у контрольной группы. При изучении биоплёнок на стекле отмечено, что у здоровых людей способность образовывать биоплёнки стафилококками, стрептококками, клостридиями в несколько раз выше, чем у больных пародонтитом. У бифидобактерий и пептострептококков биоплёнкообразование на стекле было выше у больных людей. На пластике стафилококки и пептострептококки здоровых людей гораздо лучше образовывали биоплёнки, чем у больных пародонтитом. Бифидобактерии, клостридии и стрептококки больных людей показали большую способность к образованию биоплёнок на пластике, чем у здоровых.

Таким образом, у больных хроническим генерализованным пародонтитом во всех биотопах полости

рта наблюдалась тенденция к уменьшению количества нормобиоты и увеличению условно-патогенных микроорганизмов. Все микроорганизмы в опытной группе обладают большей способностью к адгезии на клетках слизистой оболочки, чем у здоровых людей. Биоплёнкообразование микроорганизмов у здоровых и больных людей отличается как на стекле, так и на пластике.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 6-10, 13-16)  
см. REFERENCES)

3. Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Фролова Я.Н. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.
4. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Миронов А.Ю. Кандида-ассоциированный пародонтит. Диагностика. Лечение. Омск: «Вариант-Омск»; 2012.
5. Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Алиева А.А. Подавление бактериальной адгезии: современные подходы, проблемы и перспективы. *Успехи современной биологии*. 2019; 139 (5): 506-15.
11. Лебедев Д.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю., Червинец Ю.В. Микробиоценозы полости рта у больных генерализованным пародонтитом и их коррекции. *Стоматолог*. 2011; 12: 23-9.
12. Комлева А.С., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Миронов А.Ю., Козуб С.Н. Патогены биотопа пародонта и их чувствительность к антибиотикам у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. *Стоматолог*. 2012; 3: 54-60.
17. Романова Ю.М. Алексеева Н.В., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006; 4: 38-42.

## REFERENCES

1. Asakawa M., Takeshita T., Furuta M. S. Kageyama, K. Takeuchi, J. Hata, et al. Tongue Microbiota and Oral Health Status in Community-Dwelling Elderly Adults. *mSphere*. 2018; 3(4): e00332-18.
2. Maoyang Lu, Song Xuan, Zhao Wang. Oral microbiota: A new view of body health. *Food Science and Human Wellness*. 2019; 8(1): 8-15.
3. Kharseeva G.G., Mironov A.Yu., Frolova Ya.N. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronicity of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)
4. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Yu. Candida-associated periodontitis. Diagnostics. Treatment [Kandidaassotsirovannyi parodontit. Diagnostika. Lechenie]. Омск: "Variant-Omsk"; 2012. (in Russian)
5. Kharseeva G.G., Mironov A.Yu., Alieva A.A. Suppression of bacterial adhesion: current approaches, problems and prospects. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2019; 139(5):506-15. (in Russian)
6. Junges R., Sturød K., Salvadori G., Åmdal H.A., Chen T., Petersen F.C.. Characterization of a signaling system in the oral commensal *Streptococcus mitis* that mediates interspecies communication with the pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019; 85(2): e02297-18.
7. Boutin S., Hagenfeld D., Zimmermann H. et al. Clustering of Subgingival Microbiota Reveals Microbial Disease Ecotypes Associated with Clinical Stages of Periodontitis in a Cross-Sectional Study. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:340.
8. Berger D., Rakhmimova A., Pollack A., Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput*. 2018; 7(3): 24.

9. Velsko I.M., Shaddox L.M. Consistent and reproducible long-term in vitro growth of health and disease-associated oral subgingival biofilms. *BMC Microbiology*. 2018; 18(1):70.
10. Ulvi K. Gürsoy, M. Gürsoy, E. Könönen, H. O. Sintim. Cyclic Dinucleotides in Oral Bacteria and in Oral Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017; 7: 273.
11. Lebedev D. V., Chervinets V. M., Mironov A. Yu., Chervinets Yu. V. Oral microbiocenoses in patients with generalized periodontitis and their correction. *Stomatolog*. 2011; 12: 23-9. (in Russian )
12. Komleva A. S., Chesnokova M. G., Nedoseko V. B., Mironov A. Yu., Kozub S. N. Periodontal biotope pathogens and their sensitivity to antibiotics in patients with chronic generalized periodontitis. *Stomatolog*. 2011; 12: 23-9. (in Russian )
13. Cavalla F., Biguetti C.C., Melchiades J.L. A. P. Tabanez, M. de C. S. Azevedo, A. P. F. Trombone et al. Genetic Association with Subgingival Bacterial Colonization in Chronic Periodontitis. *Genes (Basel)*. 2018; 9(6):271.
14. Pedersen A.M.L., Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*. 2019; 80(1): 3-12.
15. Wei Y., Shi M., Zhen M., Cui W., Wenjie H., Yong N. et al. Comparison of Subgingival and Buccal Mucosa Microbiome in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019; 9:53.
16. Kageyama S., Takeshita T., Asakawa M., Shibata Y., Takeuchi K., Yamana W. et al. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0174782.
17. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Smirnova T.A., Andreev A.L., Didenko L.V., Gunzburg A.L. The ability to form biofilms in artificial systems in various strains of *Salmonella typhimurium*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; 4: 38-42. (in Russian )

Поступила 20.04.20

Принята к печати 25.05.20

## ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Пименова А.С.<sup>1</sup>, Борисова А.Б.<sup>1</sup>, Гадуа Н.Т.<sup>1</sup>, Борисова О.Ю.<sup>1</sup>, Афанасьев С.С.<sup>1</sup>, Петрова М.С.<sup>1</sup>,  
Афанасьев М.С.<sup>2</sup>, Миронов А.Ю.<sup>1</sup>, Алёшкин В.А.<sup>1</sup>

### ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮША В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»  
Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ,  
119991, Москва, Россия

*Цель работы - определить практическую значимость метода ПЦР в лабораторной диагностике коклюшной инфекции в РФ. Референс-центром по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии в 2018 г. в 85 субъектах России проведено анкетирование клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических организаций и Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, осуществляющих ПЦР-исследования по идентификации микроорганизмов рода *Bordetella*. В 2013 г. ПЦР-диагностика коклюша проводилась в 33 (38,8%) субъектах РФ. К 2017 г. их число увеличилось до 64 (75,3%). На территориях 21 (24,7%) региона данный вид исследования в 2013-2017 г.г. не применялся. В субъектах РФ степень внедрения метода ПЦР в практическую работу лабораторий медицинских организаций различна, в связи с чем, объём проводимых тестирований сильно варьирует. В РФ отмечается тенденция к росту числа ПЦР-исследований при обследовании лиц с подозрением на коклюш, осуществляемых как с диагностической целью, так и по эпидемическим показаниям. В ЛПО по сравнению с ЦГиЭ Роспотребнадзора темпы внедрения метода ПЦР для диагностики коклюшной инфекции в работу лабораторий выше. В период 2013-2017 г. г. отмечается уменьшение доли проб, содержащих ДНК *B. pertussis*, и увеличение доли образцов, в которых идентифицируется ДНК других представителей рода *Bordetella*. В случае выделения ДНК *Bordetella* spp. ставится диагноз «Коклюш неуточнённый», поскольку у врача отсутствуют сведения о видовой принадлежности возбудителя. С целью расширения возможностей обследования больных с подозрением на коклюш, целесообразно совершенствовать ПЦР-диагностику путём включения в диагностические тест-системы генов-мишеней, позволяющих идентифицировать ДНК разных представителей рода *Bordetella*, являющимися актуальными на сегодняшний день возбудителями.*

**Ключевые слова:** возбудитель коклюша; метод ПЦР; Российская Федерация.

**Для цитирования:** Пименова А.С., Борисова А.Б., Гадуа Н.Т., Борисова О.Ю., Афанасьев С.С., Петрова М.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Применение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 52-58.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-52-58>

*Pimenova A.S.<sup>1</sup>, Borisova A. B.<sup>1</sup>, Gadua N.T.<sup>1</sup>, Borisova O.Yu.<sup>1</sup>, Afanasiev S.S.<sup>1</sup>, Petrova M.S.<sup>1</sup>, Afanasiev M.S.<sup>2</sup>, Mironov A.Yu.<sup>1</sup>, Aleshkin V.A.<sup>1</sup>*

PCR-BASED DIAGNOSIS OF WHOOPING COUGH IN THE RUSSIAN FEDERATION

<sup>1</sup>G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

*The aim was to determine how often the PCR method is used in different laboratories in Russia. In 2018, we conducted a questionnaire survey in diagnostic laboratories of medical organizations and the Centers of Hygiene and Epidemiology that performed PCR studies to identify microorganisms of the genus *Bordetella* in all 85 Russian regions. We found that in 2013 the PCR was used in 33 (38.8%) regions, but in 2017 the number of regions increased to 64 (75.3%). During 2013-2017 the study has not been applied in 21 regions. The number of PCR tests performed in the laboratories of medical organizations was significantly different. There has been an increase in the number of tests for the diagnosis of pertussis among people with clinical signs of infection and among contact persons in foci of infection. Compared to the Centers of Hygiene and Epidemiology, in medical organizations the rate of introduction of the PCR was higher. Between 2013 and 2017 the proportion of samples containing DNA *B.pertussis* decreased, but the proportion of samples containing DNA of other representatives of the genus *Bordetella* increased. Moreover, in the case of isolation DNA *Bordetella* spp. clinicians diagnose «Whooping cough, other unspecified organism», since there is no information on the species of the pathogen. Thus, in order to improve the diagnosis of pertussis, it is necessary to optimize PCR tests by including target genes that allow to identify of currently relevant DNAs of different representatives of the genus *Bordetella*.*

**Key words:** whooping cough; PCR-based diagnosis; Russian Federation.

**For citation:** Pimenova A.S., Borisova A.B., Gadua N.T., Borisova O.Yu., Afanasiev S.S., Petrova M.S., Afanasiev M.S., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. PCR-based diagnosis of whooping cough in the Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 52-58 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-52-58>

**For correspondence:** Borisova O.Yu., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections; e-mail: [olgborisova@mail.ru](mailto:olgborisova@mail.ru)

**Information about authors:**

Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;  
Borisova A. B., <https://orcid.org/0000-0003-4425-8428>;  
Gadua N. T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;  
Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;  
Afanasiev S. S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>;  
Petrova M. S., <https://orcid.org/0000-0001-6065-2623>;  
Afanasiev M. S., <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>;  
Mironov A. Yu. <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;  
Aleshkin V. A., <https://orcid.org/0000-0002-2701-431X>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsorship.*

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Received 01.08.2020  
Accepted 04.08.2020

**Введение.** Многолетняя специфическая профилактика, проводимая в Российской Федерации, позволила значительно снизить заболеваемость коклюшем и свести до минимума летальность и смертность от этой инфекции [1]. Несмотря на несомненные успехи, проблема коклюшной инфекции остается актуальной, поскольку сохраняются не только основные характеристики эпидемического процесса коклюша, но и замедляются темпы снижения заболеваемости [2, 3]. По данным официальной статистики в 2019 г. отмечался рост заболеваемости коклюшем по сравнению с 2017 г. в 2,6 раза. Показатель заболеваемости в 2019 г. составил 9,8 на 100 тыс. населения против 3,7 в 2017 г. Всего в 2019 г. зарегистрировано 14 406 случаев заболевания коклюшем, из которых 94% выявлены у детей в возрасте до 17 лет. При этом самые высокие интенсивные показатели регистрировались среди детей первого года жизни, что указывает на эпидемиологическую значимость этой возрастной группы [4]. У непривитых и утративших иммунитет с возрастом лиц, восприимчивость к данной инфекции также сохраняется высокой [2, 5-7].

В соответствии с действующими нормативными документами лабораторное обследование лиц с подозрением на коклюш проводят либо с диагностической целью, либо по эпидемическим показаниям для своевременного выявления больных. Начиная с 2013 г. лабораторная диагностика коклюша осуществляется с помощью культурального, молекулярно-генетического, серологического методов исследования, выбор которых определяется сроком заболевания. Культуральное исследование проводят в течение первых 2-3 недель болезни. Молекулярно-генетический метод исследования наиболее эффективен на 1-4-й нед от начала заболевания. Серологическую диагностику коклюша методом ИФА применяют, начиная с 3 нед болезни, для определения уровня специфических противокклюшных антител классов IgA, IgM, IgG.

Наиболее эффективным методом диагностики коклюшной инфекции является молекулярно-генетический. Проведение ПЦР-исследований целесообразно у пациентов с различными формами клинического течения болезни независимо от вакцинального статуса обследуемых и прохождения ими курса антибактериальной терапии [8, 9]. Применение метода ПЦР для иден-

тификации возбудителя коклюша эффективно у детей в возрасте до 1 года, у взрослых со стертой клинической картиной [10, 11], при обследовании очагов с целью установления источника инфекции [12, 13]. В РФ официально зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени [14].

Цель работы - оценить практическую значимость метода ПЦР в лабораторной диагностике коклюша в России с целью разработки перспективных направлений её дальнейшего развития.

**Материал и методы.** В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» Референс-центром по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии, действующим на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, в период с июля по сентябрь 2018 г. в 85 субъектах РФ проведено анкетирование клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦГиЭ), осуществляющих исследования по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР. В рамках выполнения функциональных обязанностей Референс-центром подготовлена аналитическая справка «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2013-2017 гг.» с целью проведения заседания проблемной комиссии Ученого совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики». В работе использовали методы описательной статистики.

**Результаты.** Установлено, что на территории РФ в 2013-2017 гг. внедрение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в рутинную работу КДЛ медицинских организаций (МО) различной ведомственной принадлежности осуществлялось постепенно. В 2013 г. ПЦР-диагностика коклюша проводилась только в 33 (38,8%) субъектах РФ (табл. 1). К 2017 г. их число увеличилось до 64 (75,3%). На территориях 21 (24,7%) субъекта РФ данный вид исследования за анализируемый период не применялся.

Субъекты РФ, на территориях которых с 2013 по 2017 г. г. для видовой идентификации возбудителя коклюша применялся метод ПЦР

Федеральный округ	Всего субъектов РФ		Из них количество субъектов РФ, на территориях которых ПЦР-исследования на коклюш начали проводить				
	абс.	%	в 2013 г.	в 2014 г.	в 2015 г.	в 2016 г.	в 2017 г.
ЦФО	14	77,8	11	1	1	—	1
СЗФО	10	90,9	8	—	1	—	1
ЮФО	5	62,5	2	—	2	—	1
СКФО	3	42,9	1	1	—	1	—
ПФО	12	85,7	4	2	3	3	—
УФО	5	83,3	1	3	—	1	—
СФО	9	75,0	3	2	1	1	2
ДФО	6	66,7	3	2	—	1	—
РФ	64	75,3	33	11	8	7	5

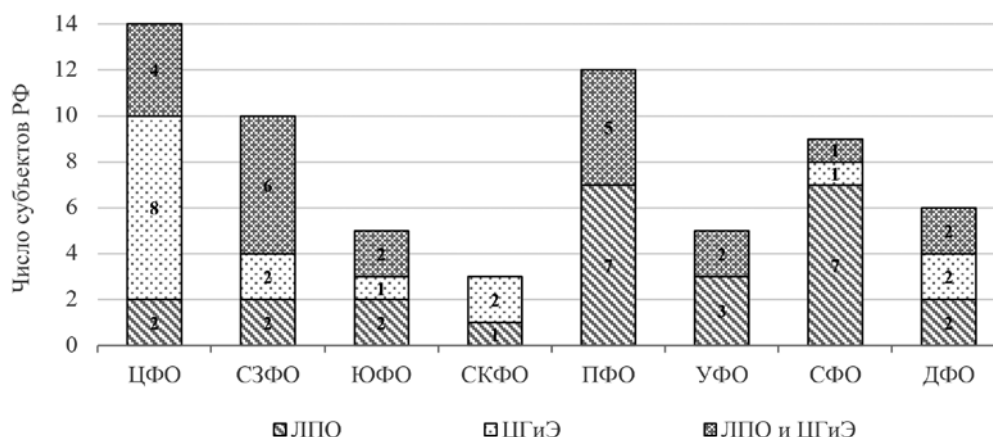


Рис. 1. Число субъектов РФ, на территориях которых в 2013-2017 гг. ПЦР-диагностика коклюша проводилась в лабораториях ЛПО и/или ЦГиЭ.

В РФ в период с 2013 г. по 2017 г. в ЛПО по сравнению с ЦГиЭ темпы внедрения метода ПЦР для диагностики коклюша в практическую работу лабораторий выше. В 2017 г. данный вид исследования в 26 (40,6%) субъектах РФ осуществлялся только в лабораториях ЛПО, в 16 (25,0%) субъектах - только в лабораториях ЦГиЭ, в 22 (34,4%) субъектах - в лабораториях МО различной ведомственной принадлежности. В федеральных округах (ФО) прослеживаются разнонаправленные тенденции (рис. 1).

В Центральном и Северо-Кавказском ФО в период с 2013 по 2017 гг. для видовой идентификации возбудителя коклюша метод ПЦР использовался преимущественно лабораториями ЦГиЭ. В Северо-Западном и Дальневосточном ФО данный вид исследования внедрялся в рутинную работу лабораторий ЛПО и ЦГиЭ в равной степени. В Южном, Приволжском, Уральском, Сибирском ФО отмечается тенденция, аналогичная общероссийской.

В РФ за анализируемый период методом ПЦР всего обследовано 50 860 лиц с подозрением на коклюш и выполнено 62 740 исследований. По сравнению с 2013 годом в 2017 г. на территории РФ отмечалось увеличение числа проведённых тестов в 1,8 раза (рис. 2). В лабораториях ЛПО данный параметр вырос в 2 раза, в лабораториях ЦГиЭ - только в 1,3 раза. В РФ наблюдается тенденция к росту количества исследований по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР.

Данная тенденция отмечается во всех ФО, кроме Уральского, на территории которого в 2017 г. зафиксировано снижение числа тестирований методом ПЦР в 1,4 раза по сравнению с 2013 г. В Сибирском и Дальневосточном ФО объём осуществляемых исследований в период с 2013 г. по 2017 г. увеличился в 12,7 и в 27 раз соответственно (рис. 3).

Проведённый анализ данных показал, что между ФО выявляются выраженные отличия по числу выполненных в период с 2013 по 2017 г. ПЦР-исследований на коклюш. В Центральном ФО выполнено 35,4% анализов от общего количества, в Приволжском - 17,7%, в Южном - 14,5%, в Северо-Западном - 9,6%, в Уральском - 7,8%, в Северо-Кавказском - 5,8%, в Сибирском - 5,4%, в Дальневосточном - 3,8%.

Аналогичная закономерность прослеживается и внутри ФО. В Центральном ФО более 70% от общего объёма исследований проведено в 3 субъектах РФ из 14, в Приволжском - в 3 из 12, в Южном - в 1 из 5, в Северо-Западном - в 2 из 10, в Уральском - в 1 из 5, в Северо-Кавказском - в 1 из 3, в Сибирском - в 3 из 9, в Дальневосточном - в 3 из 6. Из 64 субъектов РФ, на территориях которых осуществляется диагностика коклюша методом ПЦР, лишь в 17 (26,6%) данный вид исследования применяется активно.

Определён процент тестирований, сделанных при обследовании лиц с подозрением на коклюш и при

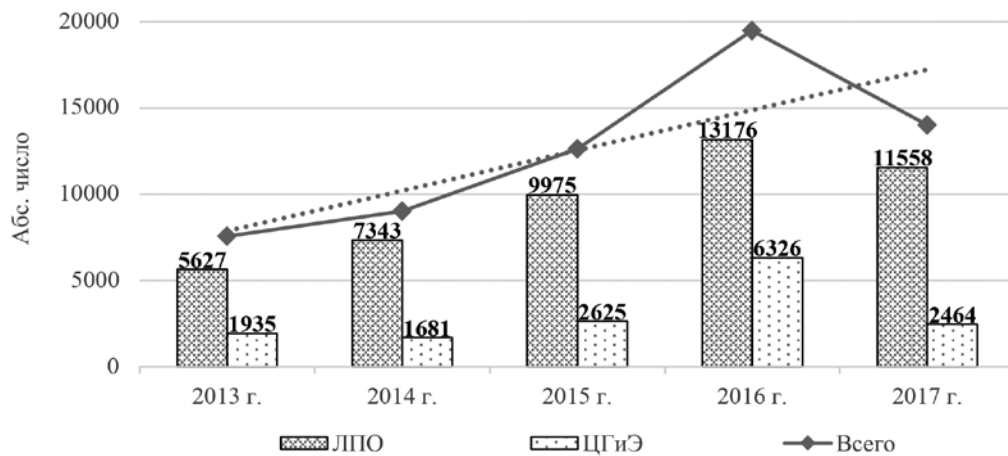


Рис. 2. Количество ПЦР-исследований на коклюш, проведенных на территории РФ в 2013-2017 гг.

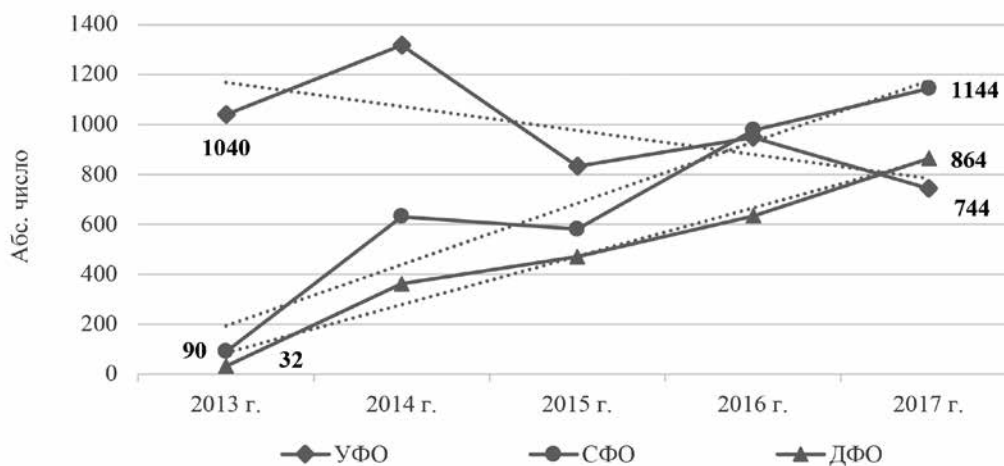


Рис. 3. Количество исследований по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР, выполненных в Уральском, Сибирском, Дальневосточном ФО в 2013-2017 гг.

обследовании контактных в очагах. В 2013-2017 г. г. с диагностической целью проведено 59 790 (95,3%) ПЦР-исследований, из которых 47 377 (79,2%) выполнено в лабораториях ЛПО. По эпидемическим показаниям сделано 2 950 (4,7%) ПЦР-анализов, из них 2 648 (89,8%) протестировано в лабораториях ЦГиЭ. Метод ПЦР чаще всего применяется при обследовании лиц с подозрением на коклюш именно с диагностической целью для верификации клинического диагноза. Подобная ситуация наблюдается и в ФО (рис. 4).

В РФ метод ПЦР при обследовании контактных лиц в очагах коклюша используется ограниченно. За анализируемый период исследования по эпидемическим показаниям проводились только в 17 (26,6%) субъектах РФ из 64. Наибольшее (41,2%) их количество сконцентрировано в Центральном и Северо-Западном ФО. Активное применение метода ПЦР при обследовании контактных отмечается лишь на территории 1 субъекта РФ, входящего в состав Приволжского ФО, в котором в 2013-2017 гг. проведено 948 тестирований, что составило 32,1% от общего количества по РФ. В РФ наблюдается тенденция к росту числа ПЦР-исследований, осуществляемых не только с диагностической целью, но и по эпидемиче-

ским показаниям в лабораториях как ЛПО, так и ЦГиЭ (рис. 5).

За 5-летний период среди протестированных образцов выявлено 11911 (19%) положительных, в которых в 94,4% случаев обнаружена ДНК *B. pertussis* (рис. 6).

С 2013 по 2017 гг. среди положительных образцов доля проб, содержащих ДНК *B. pertussis*, ежегодно уменьшалась на 1-2% (табл. 2). Доля образцов, в которых выявлялась ДНК других представителей рода *Bordetella*, каждый год увеличивалась на 1-2%.

За анализируемый период при обследовании с диагностической целью обнаружено 11781 (98,9%) положительных проб. В этих образцах выделялась ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *Bordetella spp.* (рис. 6). При обследовании контактных лиц в очагах коклюша выявлено 130 (1,1%) положительных проб, в которых в 96,9% случаев детектирована ДНК *B. pertussis* и в 3,1% случаев - ДНК *B. parapertussis*.

**Обсуждение.** К настоящему времени разработано большое количество методик на основе амплификационных технологий, в том числе ПЦР в формате «мультиплекс» с детекцией в режиме реального времени, позволяющих выявлять в биологическом материале и

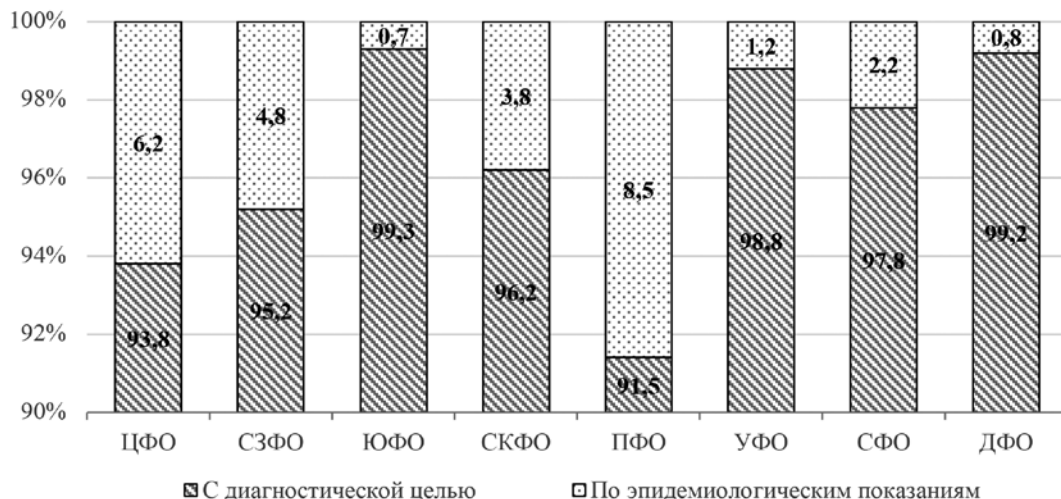


Рис. 4. Соотношение числа ПЦР-анализов на коклюш, проведённых с диагностической целью и по эпидемиологическим показателям в ФО в 2013-2017 гг.

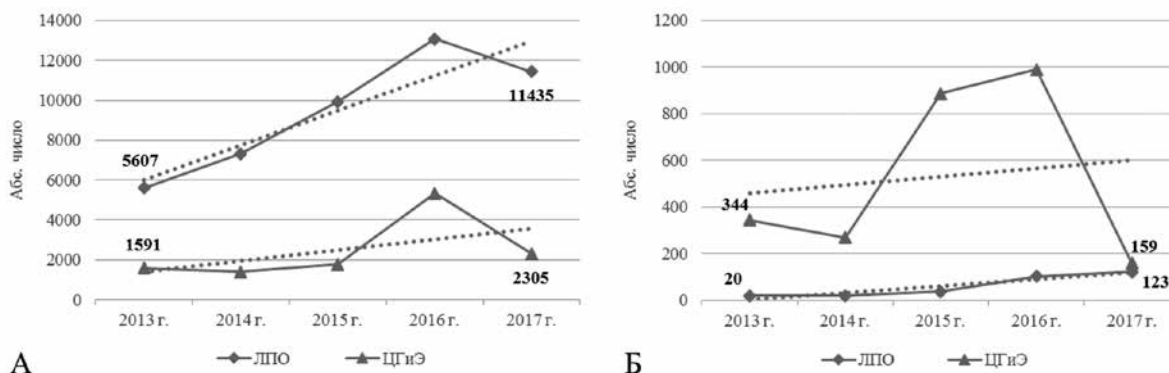


Рис. 5. Количество ПЦР-исследований на коклюш, выполненных в 2013-2017 гг. в лабораториях ЛПО и ЦГиЭ с диагностической целью (А) и по эпидемическим показателям (Б).

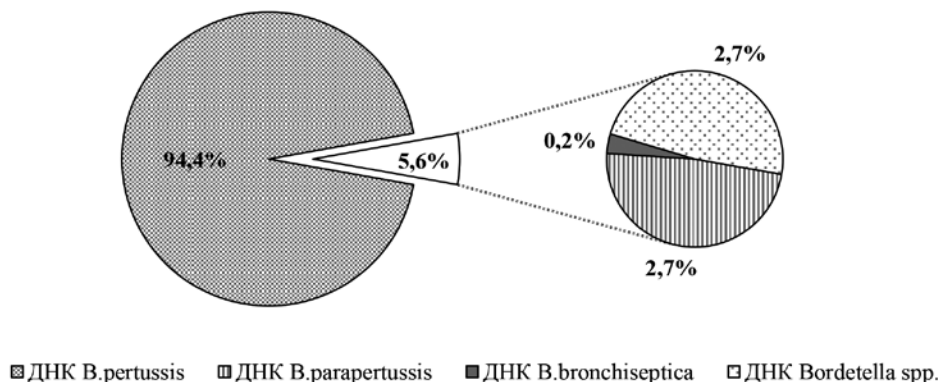


Рис. 6. Частота выявления в биологическом материале больных ДНК возбудителей коклюша и коклюшеподобных заболеваний на территории РФ в 2013-2017 гг.

дифференцировать до вида разных представителей рода *Bordetella* [15-22]. В качестве мишеней предложены специфические участки промоторной области коклюшного токсина, гена порина, гена аденилатциклазы, инсерционных элементов [18, 19, 23-26]. Использование упомянутых в литературе подходов и генов-мишеней сопряжено с рядом трудностей, так как все они наряду с определёнными достоинствами имеют и недостатки.

В последние годы за рубежом появились многочисленные данные, указывающие на увеличение циркуляции штаммов *B. holmesii* в популяции. Случаи заболевания, этиологическим агентом которых является *B. holmesii*, зарегистрированы в Австралии, Северной и Южной Америке, Азии, Африке, Европе [26-33]. Наибольшее число заболевших выявлено в 2010 г. в США в штате Огайо, где примерно у трети обследованных взрослых и детей



**ДНК-положительные образцы, выявленные при обследовании лиц с подозрением на коклюш и контактных в очагах в РФ в 2013-2017 гг.**

Годы	Всего положительных образцов	Из них содержащие ДНК							
		<i>B. pertussis</i>		<i>B. parapertussis</i>		<i>B. bronchiseptica</i>		<i>Bordetella spp.</i>	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
2013	1 582	1 554	98,2	15	0,9	1	0,1	12	0,8
2014	2 104	2 019	96,0	37	1,7	2	0,1	46	2,2
2015	2 806	2 658	94,7	66	2,4	5	0,2	77	2,7
2016	3 372	3 148	93,3	116	3,4	9	0,3	99	3,0
2017	2 047	1 864	91,1	87	4,2	11	0,5	85	4,2

в возрасте 11-18 лет выделен этот возбудитель [26]. Во Франции у подростков и взрослых с коклюшеподобными симптомами в 20% случаев заболевание вызвано инфицированием *B. holmesii* [27]. В Испании за период 2013-2016 гг. среди пациентов с лабораторно подтвержденным коклюшем обнаружено 4,1% больных, в биологическом материале которых выявлена *B. holmesii*, при этом число заражений данным патогенном увеличилось с 3,9% в 2015 г. до 8,8% в 2016 г. [28]. В Марокко описаны случаи выделения *B. holmesii* в семейных очагах у младенцев и их матерей [29], в Японии – у детей, посещавших одно образовательное учреждение [30], что свидетельствует о возможности передачи возбудителя от человека к человеку воздушно-капельным путём при тесном и длительном контакте. В течение последних лет появились сообщения о циркуляции *B. holmesii* среди населения ряда стран, например Нидерландов, где ранее этот возбудитель не выявлялся [31]. По мнению зарубежных авторов, обусловленная *B. holmesii* респираторная инфекция часто классифицируется как «Коклюш, вызванный *B. pertussis*» [34]. При этом опубликованные данные свидетельствуют о том, что в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками подъём заболеваемости может быть связан с циркуляцией *B. holmesii* [26-28, 31]. За рубежом разработано большое количество диагностических тестов на основе метода ПЦР, позволяющих идентифицировать ДНК разных представителей рода *Bordetella*, в том числе и *B. holmesii*, что значительно расширяет возможности ПЦР-диагностики коклюшной инфекции [18, 19, 26, 32, 35].

Проведённый анализ показал, что в РФ наблюдается положительная динамика роста числа лиц с подозрением на коклюшную инфекцию, обследование которых осуществляется методом ПЦР. Большинство исследований выполняется с диагностической целью. При этом отмечается увеличение доли лиц, обследуемых по эпидемическим показаниям. В субъектах РФ степень внедрения метода ПЦР в практическую работу лабораторий МО различна, в связи с чем, объём проводимых исследований сильно варьирует. Выявлены регионы, на территориях которых ПЦР-тестирование на коклюш не осуществляется. Полученные данные показали, что при обследовании лиц с подозрением на коклюшную инфекцию среди обнаруженных положительных образцов наравне с уменьшением доли проб, содержащих ДНК *B. pertussis*, отмечается увеличение доли образцов, в которых идентифицируется ДНК других представителей рода *Bordetella*, в том числе и *Bordetella spp.* Все образцы такого типа выявлялись исключительно при выполнении исследований с диагностической целью. В случае выделения из биологического материала пациента ДНК *Bordetella spp.* у врача отсутствуют сведения о видовой принадлежности возбудителя, в связи

с чем, при наличии характерной клинической картины заболевания ставится диагноз «Коклюш неуточнённый». С целью расширения возможностей обследования больных с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания и повышения информативности ПЦР-исследований в РФ, целесообразно совершенствование ПЦР-диагностики за счёт включения в диагностические тест-системы геномишеней, позволяющих идентифицировать ДНК разных представителей рода *Bordetella*, в том числе и *B. holmesii*. Предлагаемое направление будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения РФ по коклюшной инфекции.

**Заключение.** В РФ наблюдается выраженная тенденция к росту числа исследований методом ПЦР при обследовании лиц с подозрением на коклюшную инфекцию, осуществляемых как с диагностической целью, так и по эпидемическим показаниям. Показана целесообразность совершенствования ПЦР-диагностики в направлении расширения возможностей по идентификации представителей рода *Bordetella*, являющимися актуальными на сегодняшний день возбудителями коклюша и коклюшеподобных заболеваний.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8–10, 15–35 см. REFERENCES)

1. Паньков А. С., Денисюк Н. Б., Кайкова О. В. Эволюция коклюшной инфекции: вопросы профилактики. *Медицинский альманах*. 2015; 5(40): 129-32.
2. Таточенко В. К. Коклюш - недоуправляемая инфекция. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 13(2): 78-82.
3. Михеева И. В., Фомкина Н. Н., Михеева М. А. Современная эпидемиологическая и экономическая характеристика коклюша в Москве. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 84-91.
4. Михеева И. В., Салтыкова Т. С., Михеева М. А. Целесообразность и перспективы вакцинопрофилактики коклюша без возрастных ограничений. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(4): 14-23.
5. Попова О. П., Петрова М. С., Бунин С. В., Персиянцева Е. А. Клинические аспекты эволюции коклюша у детей в современных условиях. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(3): 33-40.
6. Гасилова Е. С., Китайчик С. М., Горелова И. А., Кабанова Н. П., Федосеева О. А., Богоявленская И. Ю. и др. Коклюш у детей - клинико-эпидемиологическая характеристика в Самарской области. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(3): 54-60.
7. Иозефович О. В., Харит С. М., Каплина С. П. Распространённость коклюша у длительно кашляющих детей 6-17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; 66(5): 56-9.
11. Медкова А. Ю., Аляпкина Ю. С., Синяшина Л. Н., Амелина И. П., Алексеев Я. И., Каратаев Г. И. и др. Распространённость стёртых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010; 9(4): 19-22.

12. Пименова А. С., Борисова О. Ю., Цвиркун О. В., Басов А. А., Алёшкин В. А., Афанасьев С. С. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 162-70.
13. Нестерова Ю. В., Медкова А. Ю., Бабаченко И. В., Семин Е. Г., Калисникова Е. Л., Синашина Л. Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17-24.
14. Прадед М. Н., Яцышина С. Б., Селезнёва Т. С., Малинина С. В., Бирюлёва Н. В., Любимова Т. Е. и др. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 53-6.

## REFERENCES

1. Pan'kov A. S., Denisjuk N. B., Kaykova O. V. Evolution of pertussis infection: issues of prophylaxis. *Meditsinskiy Almanakh*. 2015; 5(40): 129-32. (in Russian)
2. Tatochenko V. K. Pertussis - infection not under complete control. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2014; 13(2): 78-82. (in Russian)
3. Mikheeva I. V., Fomkina N. N., Mikheeva M. A. Modern epidemiological and economic characteristics of whooping cough in Moscow. *Zhurnal Infektologii*. 2019; 11(1): 84-91. (in Russian)
4. Mikheeva I. V., Saltykova T. S., Mikheeva M. A. Expediency and prospects of a vaccinal prevention of whooping cough without age restrictions. *Zhurnal Infektologii*. 2018; 10(4): 14-23. (in Russian)
5. Popova O. P., Petrova M. S., Bunin S. V., Persiyantseva E. A. Clinical aspects of evolution of pertussis in children under modern conditions. *Infektsionnye bolezni*. 2017; 15(3): 33-40. (in Russian)
6. Gasilina E. S., Kitaychik S. M., Gorelova I. A., Kabanova N. P., Fedoseeva O. A., Bogoyavlenskaya I. Yu. et al. Pertussis in children - clinical and epidemiological characteristics in the Samara region. *Zhurnal Infektologii*. 2018; 10(3): 54-60. (in Russian)
7. Iozefovich O. V., Kharit S. M., Kaplina S. P., Gostev V. V., Sidorenko S. V., Kalinogorskaya O. S. et al. The prevalence of pertussis in long coughing children 6-17 years old, vaccinated at an early age with DTP-vaccine. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2012; 66(5): 56-9. (in Russian)
8. Kamachi K., Yoshino S., Katsukawa C., Otsuka N., Hiramatsu Y., Shibayama K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes and New Infections*. 2015; 8: 70-4.
9. Martini H., Detemmerman L., Soetens O., Yusuf E., Pierard D. Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175587.
10. Castillo M. E., Bada C., Del Aguila O., Petrozzi-Helassvu V., Casabona-Ore V., Reyes I. Detection of *Bordetella pertussis* using a PCR test in infants younger than one year old hospitalized with whooping cough in five Peruvian hospitals. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 41: 36-41.
11. Medkova A. Yu., Alyapkina Yu. S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev Ya. I., Karataev G.I. et al. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskie infektsii*. 2010; 9(4): 19-22. (in Russian)
12. Pimenova A. S., Borisova O. Y., Tsvircun O. V., Basov A. S., Aleshkin V. A., Afanasiev S. S. et al. Effectiveness of molecular-genetic diagnostics during pertussis infection foci examination. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 162-70. (in Russian)
13. Nesterova Yu. V., Medkova A. Y., Babachenko I. V., Semin E. G., Kalisnikov E. L., Sinyashina L. N. et al. Clinical-diagnostic significance of genetic markers *Bordetella pertussis* in contacts in family centers. *Zhurnal Infektologii*. 2019; 11(1): 17-24. (in Russian)
14. Praded M. N., Yatsyshyna S. B., Selezneva T. S., Malinina S. V., Birulyeva N. V., Lubimova T. Ye. et al. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 1: 53-6. (in Russian)
15. Fry N. K., Duncan J., Wagner K., Tzivra O., Doshi N., Litt D.J. et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(Pt.8): 1023-9.
16. van der Zee A., Schellekens J.F., Mooi F.R. Laboratory diagnosis of pertussis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28(4): 1005-26.
17. Lee A. D., Cassiday P. K., Pawloski L. C., Tatti K. M., Martin M. D., Briere E. C. et al. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). *PLoS One*. 2018; 13(4): e0195979.
18. Guthrie J. L., Robertson A. V., Tang P., Jamieson F., Drews S. J. A novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(4): 1435-7.
19. Roorda L., Buitenwerf J., Ossewaarde J., van der Zee A. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three insertion sequence elements. *BMC Research Notes*. 2011; 4(1): 11.
20. Sloan L. M., Hopkins M. K., Mitchell P. S., Vetter E. A., Rosenblatt J. E., Harmsen W. S. et al. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(1): 96-100.
21. Templeton K. E., Scheltinga S. A., van der Zee A., Diederer B. M., van Kruijssen A., Goossens H. et al. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(9): 4121-6.
22. Kosters K., Reischl U., Schmetz J., Riffelmann M., Wirsing von Konig C.H. Real-time LightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(5): 1719-22.
23. Glare E. M., Paton J. C., Premier R. R., Lawrence A. J., Nisbet I. T. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(9): 1982-7.
24. van der Zee A., Agterberg C., van Agterveld M., Peeters M., Mooi F.R. Characterization of IS1001, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. *Journal of Bacteriology*. 1993; 175(1): 141-7.
25. Tatti K. M., Sparks K. N., Boney K. O., Tondella M. L. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(12): 4059-66.
26. Rodgers L., Martin S.W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A. et al. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* - Ohio, 2010-2011. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; 56(3): 322-31.
27. Njamkepo E., Bonacorsi S., Debruyne M., Gibaud S.A., Guillot S., Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(12): 4347-8.
28. Mir-Cross A., Codina G., Martin-Gomez T.M., Fabrega A., Martinez X., Jane M. et al. Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 23(11): 1856-9.
29. Katfy K., Guiso N., Diawara I., Zerouali K., Slaoui B., Jouhadi Z. et al. Epidemiology of pertussis in Casablanca (Morocco): contribution of conventional and molecular diagnosis tools. *BMS Infectious Diseases*. 2017; 17(1): 348.
30. Kamiya H., Otsuka N., Ando Y., Odaira F., Yoshino S., Kawano K. et al. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18(7): 1166-9.
31. Mooi F. R., Bruisten S., Linde I., Reubsaeft F., Heuvelman K., van der Lee S. et al. Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in Netherlands. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2012; 64(2): 289-91.
32. Fong W., Timms V., Holmes N., Sintchenko V. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia. *Pathology*. 2018; 50(3): 322-6.
33. Bottero D., Griffith M.M., Lara C., Flores D., Pianciola L., Gaillard M.E. et al. *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiology and Infection*. 2013; 141(4): 714-7.
34. Pittet L.F., Posfay-Barbe K.M. *Bordetella holmesii*: still emerging and elusive 20 years on. *Microbiology Spectrum*. 2016; 4(2).
35. Reischl U., Lehn N., Sanden G.N., Loeffelholz M.J. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5): 1963-6.

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Серикова Е.Н.<sup>1</sup>, Семенов А. В.<sup>1,2,3</sup>, Останкова Ю. В.<sup>1</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>

### МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

*Разработан метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке с помощью ПЦР в режиме реального времени и оценена его значимость при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В. При разработке метода использованы образцы плазмы крови и биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в странах Средней Азии. Использованы также образцы плазмы крови от 96 беременных женщин и 37 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, 199 иностранных граждан, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, 397 условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам. ВГВ выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК ВГВ с использованием на первом этапе олигонуклеотидов, фланкирующих участок генома 2932-3182...1-1846 нт., а на втором этапе двух пар олигонуклеотидов к двум регионам (ген S и ген X) генома вируса и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, комплементарных участкам амплифицируемых фрагментов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители. По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ S-региона, а по каналу, соответствующему флуорофору ROX, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ X-региона. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 10 МЕ/мл, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору FAM или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл). Разработанный метод позволяет идентифицировать различные геноварианты ВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.*

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; низкая вирусная нагрузка; метод идентификации.

**Для цитирования:** Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю. В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 59-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>

*Serikova E.N.<sup>1</sup>, Semenov A.V.<sup>1,2,3</sup>, Ostankova Yu.V.<sup>1</sup>, Totolian Areg A.<sup>1,2</sup>*

**METHOD FOR DETECTING HEPATITIS B VIRUS IN BLOOD PLASMA AT LOW VIRAL LOAD USING REAL-TIME PCR**

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia

*A method for detecting HBV DNA in peripheral blood at low viral load using real-time PCR was developed and its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B was evaluated. When developing the method, blood plasma samples and liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in St. Petersburg, in various regions of the Russian Federation, as well as in the Central Asia countries. We also used blood plasma samples from 96 pregnant women and 37 hemodialysis center patients living in Northwestern Federal District, 199 foreign citizens undergoing medical examination to obtain work permits at the Directorate for Migration in the Northwestern Federal District, 397 conditionally healthy people living in the Socialist Republic of Vietnam. HBV was detected by nested PCR. Analytical sensitivity was tested using the stepwise dilution method. According to the method developed by us, at the first stage, the HBV DNA is amplified using at the first stage oligonucleotides flanking the genome region 2932-3182 ... 1-1846 nt., and at the second stage two oligonucleotides pairs to the genome virus regions (gene S and gene X) and corresponding oligonucleotide fluorescently labeled probes complementary to the amplified fragments regions carrying fluorophores at the 5'-end, and non-fluorescent quenchers at the 3'-end. The channel corresponding to the FAM fluorophore detects the HBV DNA S-region amplification product, and the channel corresponding to the ROX fluorophore detects the HBV DNA X-region amplification product. The method sensitivity for DNA extraction from plasma with a 100 µl volume was 10 IU/ml.*

*Obtaining a threshold cycle Ct for only one FAM or ROX fluorophore may indicate the HBV DNA presence in a sample at a load of less than 10 IU / ml, HBV detection in this case is possible with a repeated PCR study of the corresponding sample with HBV DNA extraction from an increased plasma volume (200-1000 µl). The developed method makes it possible to identify various HBV genovariants, both characteristic and rare in the Russian Federation, circulating in other world regions. The method can be used to detect HBV in risk groups, in the population, as well as in screening blood donors in order to ensure the blood transfusions safety.*

**Key words:** *chronic hepatitis B; occult hepatitis B; low viral load; identification method.*

**For citation:** Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 59-64 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>

**For correspondence:** *Ostankova Yu.V.*, PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: [shenna1@yandex.ru](mailto:shenna1@yandex.ru)

**Information about authors:**

Serikova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>;  
Semenov A.V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>;  
Ostankova Yu.V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;  
Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

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

**Acknowledgment.** *Branch research work «Study of the viral hepatitis epidemiological process modern features».*

Received 06.08.2020  
Accepted 20.08.2020

**Введение.** Ежегодно от цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), явившихся следствием заражения вирусом гепатита В (ВГВ), умирают примерно 887 000 человек, в то время как более 240 миллионов человек больны хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) [1].

Серологическая выявляемость поверхностного антигена гепатита В (НВsAg) обычно используется для определения распространенности активной инфекции ВГВ в различных географических регионах по всему миру. Распространенность НВsAg  $\geq 8\%$ , 5-7%, 2-4% и  $<2\%$  определяется как высокоэндемичные, высокопромежуточные, низкопромежуточные и низкоэндемичные районы, соответственно [2]. Лабораторное подтверждение диагноза инфекции ВГВ зависит от обнаружения серологических маркеров, например, антител анти-НВсCore IgG и IgM, анти-НВs IgG, анти-НВе IgG и других, которые могут использоваться для мониторинга инфекции и оценки иммунного ответа. Однако одной из форм естественного течения ХВГВ является скрытый или оккультный ХВГВ (окГВ), который определяется как наличие репликативно компетентной ДНК вируса, то есть ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК) в печени при недетектируемом уровне НВsAg в периферической крови вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в периферической крови [3]. При этом встречается как серопозитивный, так и серонегативный по другим маркерам инфицирования НВsAg-негативный ВГВ. Более того, скрытая инфекция ВГВ может быть выявлена у пациентов с серологическими маркерами реконвалесценции, свидетельствующими о перенесенной инфекции [4]. Несмотря на то, что элиминация вируса не происходит, экспрессия генов и репликация вируса в большинстве случаев подавлены, стандартными методами выявить ВГВ в периферической крови больного не представляется возможным из-за крайне низкой вирусной нагрузки [4].

Таким образом, окГВ не может быть идентифицирован во всех случаях с помощью тестирования на НВsAg и ДНК ВГВ при использовании наиболее распростра-

ненных коммерческих наборов с чувствительностью 100 МЕ/мл [5].

Несмотря на низкую вирусную нагрузку, при окГВ сохраняются те же факторы риска, что и при НВsAg-позитивной форме течения ХВГВ [6]. Так, показана роль НВsAg-негативного ВГВ в развитии фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [7]. При ВИЧ-инфекции и других состояниях с подавленным иммунитетом окГВ может ускорить прогрессирование хронического гепатита до цирроза, ГЦК и терминальной стадии поражения печени. Наличие ВГВ при ВИЧ-инфекции связано также с более низким вирусологическим ответом и более частыми побочными эффектами в ходе антиретровирусной терапии (АРВТ) [8]. Необходимо отметить и возможность реактивации ХВГВ при тяжелой иммуносупрессии [9]. Показана возможность внутриутробного инфицирования ребенка НВsAg- и НВеAg-негативной матерью [10], возможность инфицирования реципиента переливанием крови или ее компонентов от донора со скрытым ВГВ, при этом минимальная инфекционная доза составляет приблизительно 16-100 копий [11], а также возможность передачи ВГВ при тесном бытовом контакте от пациента со скрытой формой течения заболевания с дальнейшим проявлением у реципиента НВsAg-позитивной инфекции [12].

ОкГВ зарегистрирован среди здоровых бессимптомных доноров крови, пациентов с хроническим заболеванием печени и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [13]. Распространенность НВsAg-негативного ВГВ в мире варьирует и, вероятнее всего, коррелирует с распространенностью НВsAg-позитивной формы ВГВ в том или ином регионе [14]. При этом общая распространенность окГВ в Западной Европе и Северной Америке достигает 28% среди лиц без хронического заболевания печени и 35% у пациентов с хроническим заболеванием печени, 51% у анти-НВс-позитивных и 19% у анти-НВс-негативных больных [15]. Некоторые группы пациентов – группы риска – подвергаются более высокому риску заражения окГВ вне зависимости от их географического положения, например, лица с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и/или ВИЧ-инфекцией, подвергаю-

шиеся гемодиализу, трансплантации печени, потребители инъекционных наркотиков [16, 17].

Различные данные о встречаемости окГВ в одних и тех же географических регионах и/или сходных группах риска могут быть связаны не только с биологическими особенностями вируса и частотой встречаемости ВГВ на той или иной территории, но и с отличающимися методами выявления вируса, их чувствительностью и специфичностью [18].

Идентификация и количественная оценка кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в ткани печени методом ПЦР или гибридизации *in situ* остается «золотым стандартом» и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики скрытого ВГВ и позволяет не только с высокой точностью обнаружить окГВ, но и предварительно оценить уровень репликации вируса в гепатоцитах [19]. Однако необходимость инвазивного вмешательства позволяет предложить метод только в качестве дополнительной диагностики в случаях, когда пункционная биопсия печени осуществляется по клиническим показаниям, но не дает возможности использовать его для широкого скрининга популяций, доноров крови или отдельных групп пациентов.

Разработанный нами ранее метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови позволяет обнаруживать вирус при низкой вирусной нагрузке, согласно рекомендациям Таорминского консенсуса о необходимости для подтверждения обнаружения скрытого ВГВ выявления как минимум двух участков генома вируса [3]. Однако широкое применение метода затруднительно в связи с необходимостью электрофоретического анализа продуктов амплификации второго этапа ПЦР и дальнейшего секвенирования с последующим использованием генетического анализатора (секвенатора), что требует соответствующей приборной базы и квалификации специалистов.

Целью нашей работы являлось: разработать метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени и оценка его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

**Материал и методы.** В работе были использованы плазма крови и образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в странах Средней Азии без ХВГВ и с ранее подтвержденным ХВГВ, в том числе методом выявления кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в тканях печени [19]. Использованы также образцы плазмы крови от 96 беременных женщин и 37 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, 199 иностранных граждан из стран ближнего зарубежья, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, 397 условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя.

Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

ВГВ при низкой вирусной нагрузке выявляли методом «гнездовой» ПЦР с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1). Регистрировали полученные результаты посредством гибридизационно-флуоресцентной детекции с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 10 пМ каждого олигопраймера и 3 пМ каждого зонда, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (pH 8,8), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

На первом этапе проводили ПЦР с использованием прямого и обратного праймеров HBV SX (табл. 1) при указанных (табл. 2) условиях.

На следующем этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первого этапа, а также внутренних (вложенных, гнездовых) олигонуклеотидов и зондов для двух регионов ВГВ в одной пробирке – HBV SrtF2, HBV SrtR2, HBV Srt-Z, HBV XrtF2, HBV XrtRd2, HBV Xrt-Z (табл. 1) – при указанных в таблице 3 условиях.

Таблица 1

**Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР в режиме реального времени**

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV SXF1	5'-AATCCAGATTGGGACTTCAA-3'
HBV SXR1	5'-AGAGATGATTAGGCAGAGGTG-3'
HBV SrtF2	5'-CACCTGTATTCCCATCCCATC-3'
HBV SrtR2	5'-AGCCCTACGAACCACTGAACA-3'
HBV Srt-Z	5'-FAM - AAACGGACTGAGGCCCACTCCCA - BHQ1/RTQ1-3'
HBV XrtF2	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC-3'
HBV XrtRd2	5'-GTCGGTCGTTGACATTGCAG-3'
HBV Xrt-Z	5'-ROX - TGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC - BHQ2/RTQ2-3'

Таблица 2

**Параметры программы амплификации первого этапа на планшетном амплификаторе CFX96**

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин	1
	95	20 с	
2	50	30 с	20
	72	2 мин 30 с	
3	72	7 мин	1
	95	20 с	
4	50	30 с	20
	72	2 мин 30 с	
5	72	7 мин	1
6	10		Хранение

Таблица 3

**Параметры программы амплификации второго этапа на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).**

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	5 мин		1
	95	10 с		
2	50	20 с		7
	72	40 с		
3	72	7 мин		1
	95	10 с		
4	58	20 с	FAM, ROX	45
	72	40 с		
5	10		Хранение	

Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам: по каналу для флуорофора FAM – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ S-региона, по каналу для флуорофора ROX – о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ X-региона. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

В качестве дополнительного контроля для исключения контаминации секвенировали нуклеотидные последовательности генома ВГВ выявленных анализируемых образцов при помощи генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), использовали набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя.

**Результаты и обсуждение.** Для выявления ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке был разработан способ обнаружения ДНК ВГВ на базе ранее предложенной нами методики [20].

В настоящей работе, согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК ВГВ с использованием на первом этапе олигонуклеотидов, фланкирующих участок генома 2932-3182...1-1846 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [21], а на втором этапе двух пар олигонуклеотидов к двум регионам (ген S и ген X) генома вируса и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, комплементарных участкам амплифицируемых фрагментов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители (см. табл. 1). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ S-региона, а по каналу, соответствующему флуорофору ROX, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ X-региона.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны

10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ следующим образом: аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл ВГВ-негативной плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку и т. д. до получения серии последовательных разведений. После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному методу.

Образцы считались положительным по содержанию ДНК ВГВ, если на каналах FAM и ROX получали значение порогового цикла Ct, отрицательными – если на каналах FAM и ROX отсутствовало значение Ct.

На рисунке представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе второго этапа предложенного метода.

На представленном рисунке обозначены кривые образцов №20, №21, №22. Образец №22 представляет собой отрицательный контрольный образец. №20 и №21 представляют собой результат выявления ДНК ВГВ при предположительной концентрации 4 МЕ/мл и 7 МЕ/мл, соответственно, при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы. При этом не детектировался сигнал по каналу ROX, но был сигнал по каналу FAM. При экстракции ДНК указанных образцов из увеличенного объема плазмы сигналы детектировались и по каналу FAM, и по каналу ROX.

Таким образом, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору FAM или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл).

Для определения специфичности разработанного метода в соответствии с отработанными условиями проведения ПЦР были исследованы предварительно серологически и молекулярно-генетически охарактеризованные по ВГВ с использованием коммерческих тест-систем образцы плазмы крови пациентов 16-70 лет, включая беременных женщин, пациентов гемодиализного центра, иностранных граждан, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам. При добавлении в реакцию амплификации геномной ДНК/кДНК вируса гепатита А, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита E, вируса гепатита G, вируса иммунодефицита человека, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса герпеса 6 и 8 типов, парвовируса В19, вируса клещевого энцефалита, а также геномной ДНК человека.

Оценку специфичности проводили в два этапа. На первом этапе последовательно проводили анализ охарактеризованных образцов. На втором этапе проводили «слепой» анализ, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГВ-позитивную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для кон-

троля анализируемых образцов и исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-положительных образцов использовали плазму, содержащую ВГВ субгенотипов А1, D4, Е, выявление которых в используемых для тестирования специфичности группах маловероятно. Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке представлены в табл. 4.

При использовании предложенного нами метода ДНК ВГВ среди беременных была выявлена у 2 пациенток. В одном случае регистрировались сигналы FAM и ROX, в другом случае регистрировался только сигнал FAM, однако при экстракции ДНК из 200 мкл плазмы регистрировались оба сигнала. Встречаемость ДНК ВГВ среди мигрантов составила 9,04%, при этом 7,5% случаев относятся к скрытому (HBsAg-негативному)

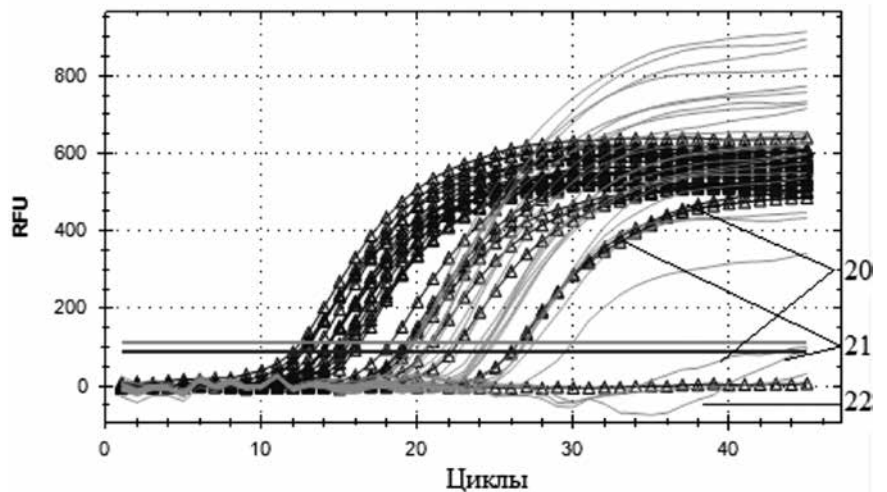
ВГВ, в том числе негативному по всем серологическим маркерам. Среди условно здоровых лиц из Вьетнама с учетом HBsAg-положительных и негативных образцов ДНК ВГВ выявили в 26,95%. В том числе идентифицировали вирус в 58 HBsAg-негативных образцах (в 5 из них при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы регистрировали только сигнал FAM, а в 2 только сигнал ROX, при увеличении объема материала во всех 7 случаях регистрировали оба сигнала).

Для позитивных образцов проводили секвенирование и субгенотипирование ДНК ВГВ. Ни один из амплифицированных фрагментов не относился к ВГВ субгенотипов А1, D4, Е.

При проведении тестирования образцов ДНК/кДНК вышеперечисленных вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было, что является подтверждением специфичности разработанного метода.

Вышеописанный метод был разработан с использованием в качестве образцов ВГВ, циркулирующих на территории РФ и Республики Узбекистан геновариантов (D1, D2, D3, A2). Однако известна тенденция к смещению распределения геновариантов ВГВ в различных географических регионах за счет завозов вируса соответствующих субгенотипов из других стран, в том числе стран Средней Азии [22]. Предложенный метод позволил выявить и охарактеризовать HBsAg-негативный ВГВ среди беременных женщин и пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, а также среди мигрантов из ближнего зарубежья. Метод был апробирован в Социалистической Республике Вьетнам. Было показано, что метод позволяет выявлять различные геноварианты ВГВ, как широко распространенные в Российской Федерации: D1, D2, D3, A2, так и редко встречающиеся в России: А1, В2, В4, С1, С2, Е (полные геномы ВГВ, полученные из образцов с низкой вирусной нагрузкой субгенотипов С2, В2, А2 депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MT740718-MT740720).

Отметим, что пулирование плазмы крови при выявлении оКГВ значительно снижает чувствительность метода. Возможность выявления ВГВ при пулировании оценивали с использованием минипулов, включающих по 100 мкл шести случайных образцов. В каждом случае ДНК



Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе второго этапа амплификации ДНК ВГВ. Треугольниками обозначены сигналы флуорофора FAM, без дополнительных отметок – ROX.

экстрагировали из 100 мкл, 200 мкл и 300 мкл. Анализ проводили слепым методом, при котором исполнитель не знал в какие минипулы входят те или иные образцы. Всего было проанализировано 10 минипулов. Из них в четырех минипулах был показан определяемый предложенным методом уровень ДНК ВГВ, в то время как в двух минипулах ВГВ не удалось обнаружить при объеме экстрагируемой плазмы 100 мкл и удалось при объеме плазмы 300 мкл, в одном минипуле ВГВ не обнаружен даже при увеличении объема плазмы. В указанный минипул были включены пять ДНК ВГВ-негативных образцов и один ДНК ВГВ-положительный образец с предположительной вирусной нагрузкой менее 15 МЕ/мл.

Предложенный метод позволит выявлять ВГВ с низкой вирусной нагрузкой у ВИЧ- и ВГС-инфицированных пациентов, идентифицировать ВГВ у больных с гепатитом неясной этиологии. Посттрансфузионная инфекция ВГВ представляет собой серьезную проблему и является одним из значимых факторов риска инфицирования людей, риск инфицирования ВГВ после трансфузии выше, чем у других передаваемых через кровь вирусов, таких как ВИЧ и ВГС. Таким образом, описанный метод может быть востребован для совершенствования обеспечения инфекционной безопасности крови при трансфузиоло-

Таблица 4

Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке

Наименование группы образцов	Количество образцов	Положительные	Отрицательные	Сомнительные
Беременные женщины (СЗФО)	96	2	94	0
Пациенты гемодиализного центра (СЗФО)	37	1	36	0
Мигранты (страны ближнего зарубежья)	199	18	181	0
Условно-здоровые лица (Вьетнам)	397	107	290	0

гических и иных манипуляциях, включая гемотрансфузии при проведении плановых и экстренных хирургических операций, что является актуальной медицинской проблемой и должно осуществляться в первую очередь с целью предупреждения передачи вирусов.

**Заключение.** Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке на основе технологии ПЦР в режиме реального времени позволяет идентифицировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скрининге доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

**Финансирование.** Отраслевая НИР «Изучение современных особенностей эпидемиологического процесса вирусных гепатитов» №АААА-А16-116061410037-0.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-16, 18, 21  
см. REFERENCES)

- Семенов А.В., Останкова Ю.В. Окультный (скрытый) гепатит В: проблемы лабораторной диагностики. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8(3): 60–9.
- Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Voumbaly S., Balde T.A., Семенов А.В. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинеиской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; (3): 118-24.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64(9): 565-7.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64 (10): 635-40.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Зуева Е.Б., Габдрахманов И. А., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Разнообразие геновариантов вируса гепатита В у военнослужащих. *Журнал инфектологии.* 2019; 11(3): 46-53.

## REFERENCES

- Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>>. Accessed 2020.05.08.
- Guideline for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, World Health Organization, Geneva, 2015. Available at [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059\\_eng.pdf;sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf;sequence=1). Accessed 2020.05.08.
- Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49: 652–7.
- Calux S.J., Silva V.C.M., Compri A.P., Lemos M.F., Santos A.P.T, Oba I.T., Mendes-Correa M.C.J., Moreira R.C. Hepatitis B: Prevalence and occult infection in HIV-infected patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020; 53: e20180533.
- Semenov A.V., Ostantkova Yu.V. Occult (latent) hepatitis B virus: problems of laboratory diagnostics. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye.* 2019; 8(3): 60–9. (in Russian)

- Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology.* 2004; 126(1): 102-10.
- Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46: 160–70.
- Shi Y., Wu Y.H., Wu W., Zhang W.J., Yang J., Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Liver Int.* 2012; 32: 231–40.
- Ryan K., Anderson M., Gyurova I., Ambroggio L., Moyo S., Sebuya T., Makhema J., Marlink R., Essex M., Musonda R., et al. High Rates of Occult Hepatitis B Virus Infection in HIV-Positive Individuals Initiating Antiretroviral Therapy in Botswana. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4: ofx195.
- Gui Q.D., Yue Y.F., Li S.H., Zhang F. Study on intrauterine infection of hepatitis B virus in pregnant women with hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen negative. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2005; 40: 99–102.
- Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313-21.
- Hu L.P., Liu D.P., Chen Q.Y., Harrison T.J., He X., Wang X.Y. et al. Occult HBV Infection May Be Transmitted through Close Contact and Manifest as an Overt Infection. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0138552.
- Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World. J. Gastroenterol.* 2016; 22: 8720–34.
- Minuk G.Y., Sun D., Uhanova J., Zhang M., Caouette S., Nicolle L., Gutkin A., Doucette K., Martin B., Giulivi A. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J. Hepatol.* 2005; 42: 480–5.
- Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Chiodini P., Coppola N. An estimation of the prevalence of occult HBV infection in Western Europe and in Northern America: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2020; 27(4): 415-27.
- Samal J., Kandpal M., Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 142–63.
- Shchemelev A.N., Ostantkova Y.V., Zueva E.B., Voumbaly S., Balde T.A., Semenov A.V. Characterization of Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus among HIV/HBV Co-Infected Patients from the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (3): 118-24. (in Russian)
- Raimondo G., Caccamo G., Filomia R., Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(1): 39-52.
- Ostantkova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64 (9): 565-70. (in Russian)
- Ostantkova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64 (10): 635-40. (in Russian)
- Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94 (Pt 10): 2318-29.
- Ostantkova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Variety of the hepatitis B virus genovariants in the military. *Zhurnal infekologii.* 2019; 11(3): 46-53. (in Russian)

Поступила 06.08.20  
Принята к печати 20.08.20