



**ВИКТОРИЯ ТАЗАРЕТОВНА МОРОЗОВА (к 90-летию со дня рождения)**



8 февраля 2017 г. исполняется 90 лет со дня рождения **Виктории Тазаретовны Морозовой**.

Морозова Виктория Тазаретовна — доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования, заслуженный деятель науки и техники РФ. В 1976—1992 гг. Виктория Тазаретовна возглавляла кафедру клинической лабораторной диагностики Центрального института усовершенствования врачей, имела высокий авторитет среди специалистов клинической лабораторной диагностики, поэтому не случайно была главным специалистом Минздрава СССР. Она широко известна среди различных медицинских специалистов, поскольку проявляет интерес ко всему, что связано со специальностью клиническая лабораторная диагностика. Особый интерес к гематологии привел к развитию на кафедре направления, посвященного изучению морфофункциональных характеристик опухолевых клеток при различных лейкозах, отсюда и создание плеяды учеников, защитивших кандидатские и докторские диссертации, издание книг и статей по данной тематике. Сложно подсчитать, сколько специалистов в области клинической лабораторной диагностики Виктория Тазаретовна обучила, а скольким, будучи неравнодушным человеком, дала правильное направление и совет! По ее инициативе создан первый в России Диссертационный ученый совет по специальности клиническая лабораторная диагностика, с 1997 г. она была его ученым секретарем. В течение долгих лет Виктория Тазаретовна является членом редколлегии журнала «Клиническая лабораторная диагностика», в жизни которого принимает самое активное участие.

*Сотрудники кафедры клинической лабораторной диагностики, редакционная коллегия журнала «Клиническая лабораторная диагностика» от всей души поздравляют Викторию Тазаретовну Морозову с юбилеем и желают здоровья, благополучия ее близким. Глубокоуважаемая Виктория Тазаретовна, оставайтесь образцом служения медицинскому образованию и науке!*

<b>Извещение</b>	Форма № ПД-4
	ОАО «Издательство «Медицина» (наименование получателя платежа) ИНН 7709437273 р/с 40702810438120106547 в ОАО Сбербанк России, г. Москва_ кор./сч. 3010181040000000225 БИК 044525225
<b>Кассир</b>	Подписка на журнал: <b>КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА (на полугодие)</b>
	на 2017 год на 1-е полугодие
	Куда:
	(почтовый индекс) (адрес)
	Кому:
	(фамилия, инициалы)
Тел. E-mail:	
Стоимость: <b>5088</b> (руб.)	Подпись _____
<b>Извещение</b>	Форма № ПД-4
	ОАО «Издательство «Медицина» (наименование получателя платежа) ИНН 7709437273 р/с 40702810438120106547 в ОАО Сбербанк России, г. Москва_ кор./сч. 3010181040000000225 БИК 044525225
<b>Кассир</b>	Подписка на журнал: <b>КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА (на полугодие)</b>
	на 2017 год на 1-е полугодие
	Куда:
	(почтовый индекс) (адрес)
	Кому:
	(фамилия, инициалы)
Тел. E-mail:	
Стоимость: <b>5088</b> (руб.)	Подпись _____

**Бланк заявки**

Куда:	
(почтовый индекс)	(адрес)
Кому:	
(фамилия, инициалы)	

Квитанцию можно оплатить в любом отделении Сбербанка РФ. Разборчивым почерком впишите в квитанцию и бланк заявки свои личные данные: Ф.И.О. получателя, электронный адрес, контактный телефон. Подтвердите оплату по факсу +7 495 678 80 95 или по электронной почте **e-mail: strashko.mila@yandex.ru**, выслав копию оплаченной квитанции и заполненный бланк заявки.

В случае возникновения вопросов, касающихся Вашей подписки, позвоните нам по тел. +7 495 678 65 62 . Мы ответим на все Ваши вопросы.

**Примечание. Срок подтверждения Вами оплаты – строго до 15 декабря 2016 г.**

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»

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

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

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ И ДИАГНОСТИКА

Том 62

1 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ЯНВАРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**

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

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

**Зав. редакцией Л. А. Шанкина**

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. 8-495-678-64-84

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

Художественный редактор

*М. Б. Белякова*

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 15.11.2016.

Подписано в печать 11.01.2017.

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

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 011.

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

**WWW страница: www.medlit.ru**

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

**Индекс 71442 — для подписчиков**

**Подписка через Интернет: [www.aks.ru](http://www.aks.ru),**

**[www.pressa-ef.ru](http://www.pressa-ef.ru)**

**Подписка на электронную версию:**

**[elibrary.ru](http://elibrary.ru)**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2017. № 1. 1—64.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 62  
1 • 2017

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**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.A. Zyukina*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

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

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Салтыкова М.М.* Становление на ступенях филогенеза функции и метаболизма подкожных инсулин-зависимых адипоцитов. Этиологический фактор и патогенез ожирения как пандемической пандемии. . . . . 4
- Береснева Е.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Карпукхин А.В., Брага Э.А., Кушлинский Н.Е.* Гиперметилированные гены микроРНК как потенциальные маркеры светлоклеточного рака почки. . . . . 13

## ГЕМАТОЛОГИЯ

- Иванец Т.Ю., Кесслер Ю.В., Колодько В.Г.* Референсные интервалы для основных параметров клинического анализа крови в динамике физиологической беременности. Сравнительный анализ с беременностью после ЭКО и ПЭ . . . 18

## КОАГУЛОЛОГИЯ

- Антропова И.П., Рейно Е.В., Юшков Б.Г.* Клоттинговые тесты и молекулярные маркеры в оценке коагуляционных изменений на фоне антитромботической профилактики дабигатраном после крупных ортопедических операций 25

## ИММУНОЛОГИЯ

- Смирнова Д.Н., Крупина К.А., Богачева Н.В., Дармов И.В.* Сравнительная оценка компонентов иммунохроматографических тест-систем, используемых для их разработки 30
- Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д., Красногорова Н.В., Шумилова С.В., Луковникова Л.Б., Новиков В.В., Караулов А.В.* Корреляция экспрессии MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3 в опухолевых очагах больных раком молочной железы. . . . . 35
- Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Мазинг А.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А.* Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител . . . . . 40
- Карзакова Л.М., Мучукова О.М., Борисова Л.В., Кудряшов С.И.* Исследование HLA-ассоциаций хронической обструктивной болезни легких в условиях кремнийорганического производства. . . . . 44
- Исмаилова А.А., Уралова Ш.А., Нигматова Л.М., Адылов Д.Г., Петрова Т.А., Набиева У.П., Авазова Т.А.* Оптимизация метода определения криоглобулинов в условиях клинико-диагностической лаборатории. . . . . 50

## ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А.* Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация . . 52

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Гизингер О.А., Заручейнова О.В., Зима М.А., Шеметова М.А., Закревская А.В., Вербов В.Н., Куляшова Л.Б., Зиганшин О.Р., Францева О.В.* Оценка частоты выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* культуральным методом и полимеразной цепной реакцией. . . . . 60

## ЮБИЛЕЙ

- Морозова Виктория Тазаретовна* (к 90-летию со дня рождения) . . . . . 2-я пол. обл.

## BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Saltykova M.M.* The becoming of function and metabolism of subcutaneous insulin-dependent adipocytes on stages of phylogenesis. The etiologic factor and pathogenesis of obesity as a pandemic
- Beresneva E.V., Loginov V.I., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Karpukhin A.V., Braga E.A., Kushlinskii N.E.* The hyper-methylated genes microRNA as potential markers of clear-cell carcinoma of kidney

## HEMATOLOGY

- Ivanetz T.Yu., Kessler Yu. V., Kolodko V.G.* The reference ranges for min parameters of clinical blood analysis in dynamics of physiological pregnancy. A comparative analysis with pregnancy after extra corporal fertilization and embryo transfer into uterine cavity

## COAGULOGY

- Antropova I.P., Reino E.V., Yushkov B.G.* The clotting tests and molecular markers in evaluating of coagulation alterations against the background of anti-thrombotic prevention by Dabigatran after large orthopedic operations

## IMMUNOLOGY

- Smirnova D.N., Krupina K.A., Bogacheva N.V., Darmov I.V.* The comparative evaluation of components used in development of immune chromatographic test-systems
- Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., Krasnogorova N.V., Shumilova S.V., Lukovnikova L.B., Novikov V.V., Karaulov A.V.* The correlation of expression of MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3 in tumor niduses of patients with breast cancer
- Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovieva L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian A.A.* The comparative analysis of immunologic techniques of detection of anti-phospholipid antibodies
- Karzakova L.M., Muchukova O.M., Borisova L.V., Kudryashov S.I.* The study of HLA-associations of chronic obstructive disease of lungs in conditions of organic-silicon manufacture
- Ismailova A.A., Uralova Sh.A., Nigmatova L.M., Adylov D.G., Petrova T.A., Nabieva U.P., Avazova T.A.* The optimization of technique of detection of cryoglobulins in conditions of clinical diagnostic laboratory

## CLINICAL METHODS

- Don E.S., Tarasov A.V., Epshtein O.I., Tarasov S.A.* The biomarkers in medicine: search, choice, study and validation

## MICROBIOLOGY

- Gizinger O.A., Zarucheynova O.V., Zima M.A., Shemetova M.A., Zakrevskaya A.V., Verbov V.N., Kulyashova L.B., Ziganshin O.R., Frantseva O.V.* The evaluation of detection rate of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp.* using cultural technique and polymerase chain reaction

## JUBILEE

- Morozova Viktoria Tazaretovna* (on the occasion of ninetieth anniversary)

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-056.257-092:612.014.1

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

### СТАНОВЛЕНИЕ НА СТУПЕНЯХ ФИЛОГЕНЕЗА ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМА ПОДКОЖНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫХ АДИПОЦИТОВ. ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР И ПАТОГЕНЕЗ ОЖИРЕНИЯ КАК МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ПАНДЕМИИ

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

<sup>2</sup>Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва

*Висцеральные жировые клетки сальника и инсулинзависимые подкожные адипоциты (ИПА) реализуют одновременно три биологические реакции: а) биологическая реакция экзотрофии — поглощение жирных кислот (ЖК) в форме неполярных триглицеридов (ТГ); б) активное депонирование ЖК в ТГ и в) освобождение ЖК в плазму крови только в форме неэтерифицированных ЖК. Единый пул межклеточной среды — кусочек третьего мирового океана, который: а) приватизировала каждая особь при выходе на сушу и в котором б) как и миллионы лет в океане, продолжают жить клетки. На уровне паракринных сообществ клеток отработана регуляция: а) единого пула межклеточной среды; б) локальных пулов среды; в) размеров (число клеток) и органов. С увеличением числа ИПА, при ожирении: а) возрастает объем дистального отдела артериального русла; б) замедляется кровоток, нарушается биологическая реакция метаболизм ↔ микроциркуляция (М ↔ М), снижается клиренс O<sub>2</sub>, нарушена экскреция катаболитов; в) снижена кратность обмена крови в капиллярах; г) нарушена реализации биологических функции гомеостаза, трофологии, биологической функции эндоэкологии и адаптации. Компенсация in vivo биологической реакции М ↔ М при ожирении, включает: а) уменьшение числа ИПА; б) объема дистального отдела артериального русла и в) снижение объема циркулирующей крови. Уменьшение объема крови в артериолах мышечного типа происходит путем активации секреции раннего в филогенезе мозгового натрийуретического пептида (НУП), далее желудочкового и предсердного НУП. В биологической функции гомеостаза, НУП являются синергистами с действием гуморального медиатора альдостерона. Вместе они поддерживают постоянство параметров единого пула межклеточной среды: альдостерон призван не допускать его уменьшения, а НУП — увеличения его.*

**Ключевые слова:** ожирение, подкожные адипоциты, межклеточная среда, натрийуретические пептиды, альдостерон, обзор.

**Для цитирования:** Титов В.Н., Салтыкова М.М. Становление на ступенях филогенеза функции и метаболизма подкожных инсулинзависимых адипоцитов. Этиологический фактор и патогенез ожирения как метаболической пандемии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 4-12. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-4-12>  
Titov V.N.<sup>1</sup>, Saltykova M.M.<sup>2</sup>

THE BECOMING OF FUNCTION AND METABOLISM OF SUBCUTANEOUS INSULIN-DEPENDENT ADIPOCYTES ON STAGES OF PHYLOGENESIS. THE ETIOLOGIC FACTOR AND PATHOGENESIS OF OBESITY AS A PANDEMIC

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

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

*The visceral fatty cells of omentum and insulin-depended subcutaneous adipocytes implement simultaneously three reactions: a) biological reaction of exotrophy - absorption of fatty acids in the form of non-polar triglycerides; b) active depositing of fatty acids in non-polar triglycerides and c) releasing of fatty acids in blood plasma only in the form of unesterified fatty acids. The single pool of intercellular medium is a little bit of the third world ocean that: a) was privatized by every entity in the moment of going out to dry land and in which b) as millions years in ocean before, continue to live cells. At the level of paracrin cenosis of cells regulation is worked out related to: a) a single pool of intercellular medium; b) local pools of medium; c) size (number of cells) and organs. Under obesity, increasing of number of insulin-depended subcutaneous adipocytes results in: a) increasing of volume of distal part of arterial channel; b) slowing down of bloodstream, biological reaction metabolism-micro-circulation is disturbing, O<sub>2</sub> clearance decreases, excretion of catabolites is deranged; c) multiplicity of blood turnover in capillaries is decreased; d) implementation of biological functions of homeostasis, trophology, biological function of endoecology and adaptation are disordered. The compensation in vivo of biological reaction of metabolism-micro-circulation at obesity includes: a) decreasing of number of insulin-depended subcutaneous adipocytes; b) decreasing of volume of distal part of arterial channel and c) decreasing of volume of circulating blood. The decreasing of volume of blood in arterioles of muscular type occurs by means of activation of secretion of early in phylogenesis brain natriuretic peptide, then ventricle and atrium natriuretic peptide. In biological function of homeostasis, natriuretic peptides are synergists with action of humoral mediator of aldosterone. Jointly, they support constancy of parameters of single pool on intercellular medium: aldosterone is called to exclude pool's decreasing and natriuretic peptides to exclude its increasing.*

**Для корреспонденции:** Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. клин. биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ; e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

**Key words:** *obesity; subcutaneous adipocytes; intercellular medium; natriuretic peptides; aldosterone; review*

**For citation:** Titov V.N., Saltykova M.M. The becoming of function and metabolism of subcutaneous insulin-dependent adipocytes on stages of phylogenesis. The etiologic factor and pathogenesis of obesity as a pandemic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 4-12. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-4-12>*

**For correspondence:** Titov V.N., doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of clinical biochemistry of lipoproteins of Institute of clinical cardiology of the Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia. e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

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

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

Received 20.05.2016  
Accepted 01.06.2016

Секрецию клетками жировой ткани гуморальных медиаторов авторы оценивают как что-то из ряда вон выходящее; именуют адипокинами, говоря чуть ли не об эндокринной функции жировых клеток. Согласно же филогенетической теории общей патологии [1], паракриния — биологический процесс локальной, гуморальной регуляции метаболизма, синтеза и секреции гуморальных медиаторов на втором уровне филогенеза, на уровне паракринно регулируемых сообществ (ПС) функционально разных клеток, на уровне органов, систем органов. Гуморальные медиаторы, которые регулируют метаболизм в ПС, мы полагаем, обоснованно называть паракринами: это десятки гуморальных, локальных медиаторов, регуляторов метаболизма.

Согласно филогенетической теории общей патологии, единой технологии становления в филогенезе функциональных систем, количество гуморальных медиаторов, которые синтезирует пул клеток рыхлой соединительной ткани (РСТ) в каждом ПС *in vivo* является единым. И если отдельные медиаторы оказывают действие за пределами ПС клеток, это те, которые связывают регуляцию метаболизма в ПС с более поздней, более совершенной биологической реакцией метаболизм ↔ микроциркуляция (М ↔ М) на уровне организма. Медиаторы, которые регулируют метаболизм в ПС, инициируют постепенное превращение их в функциональные, структурные единицы органов. И если какой-то гуморальный медиатор характеризует короткий период действия (в течение секунд), он является гуморальным медиатором ПС клеток, паракрином.

На ступенях филогенеза, регуляция метаболизма *in vivo* сформировалась последовательно, на принципе преемственности, но все-таки раздельно на трех уровнях относительно биологического совершенства: а) на аутокринном уровне, в клетках; б) на уровне ПС клеток, позже в органах, системах органов и в) на уровне организма. В ПС, клетки РСТ отработали синтез всех гормонов — паракринов; происходило это за миллионы лет до становления единой системы желез внутренней секреции. В ПС клетки РСТ начали синтез всех гормонов, включая инсулиноподобный фактор роста; миллионы лет в филогенезе не было только синтеза инсулина. Инсулиноподобный же фактор роста проявлял, главным образом, анаболическое действие. Из всех гормонов в ПС клетки не синтезируют только инсулин; становление биологической функции локомоции и экспрессия инсулина началась миллионами лет позже [2].

Становление в филогенезе функционально разных пулов жировой ткани; пул инсулинзависимых подкожных адипоцитов. Все жировые клетки — производные РСТ, мезодермы. Увеличение их числа происходит за счет повышения митотической активности клеток предшественников. Зрелые инсулиннезависимые висцеральные жировые клетки (ВЖК) сальника, инсулинзависимые подкожные адипоциты (ИПА), бурые жировые клетки (БЖК) имеют свои клетки — предшественники и не реализуют биологическую функцию митоза. Образуются жировые клетки из предшественников, из

бластных клеток [3]. Это стволовые клетки, которые дифференцируются с образованием специфичных белых и бурых жировых клеток. Это клетки, в отличие от плюрипотентных стволовых клеток имеют биологические маркеры; они позволяют отличить дифференцированные клетки от иных пулов *in vivo*. Стволовые клетки *in vivo* пополняют пул специализированных белых и бурых жировых клеток [4].

Все жировые клетки запасают жирные кислоты (ЖК) в каплях липидов цитоплазмы в форме неполярных триглицеридов (ТГ) — эфиров ЖК с трехатомным спиртом глицерином; размеры жировых клеток увеличиваются за счет реализации биологической реакции гипертрофии. У крыс первые 4 нед эмбриональной жизни, число ВЖК и ИПА возрастает за счет деления предшественников. Взрослые особи при переедании быстро прибавляют в весе, в первую очередь, при активации биологической реакции гипертрофии, за счет увеличения размера клеток. В сроки 4—14 нед, повышение массы жировой ткани определено увеличением как числа ВЖК и ИПА (гиперплазия), так и размеров при реализации биологической реакции гипертрофии. После рождения увеличение ВЖК происходит только при реализации биологической реакции гипертрофии. Одновременно ИПА сохраняют способность увеличивать число клеток за счет дифференцировки бластных клеток — предшественников [5].

Очертить периоды увеличения числа и параметров жировых клеток у человека сложнее. В отличие от многих видов животных, ребенок рождается: а) имея запас ЖК в специализированных жировых клетках в форме ТГ; б) определено это активацией биологических реакции гипертрофии и в) гиперплазии ИПА в третьем триместре беременности. В этот период внутриутробное перекармливание плода увеличивает число ИПА, определяя этим склонность особи к полноте. Число ВЖК после рождения ребенка практически не меняется. Одновременно все клетки сохраняют филогенетически раннюю (с аутокринного уровня) биологическую реакцию наполнения «капель» липидов, формируя депо ЖК [6].

Все жировые клетки (ВЖК, ИПА и БЖК) реализуют одновременно три биологических реакции:

а) биологическая реакция экзотрофии — поглощения ЖК в форме ТГ в составе липопротеинов (ЛП), вначале в филогенезе в ЛП низкой плотности (ЛПНП) путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза, позже в филогенезе — в ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) путем апоЕ/В-100 эндоцитоза;

б) активное депонирование ЖК в форме, главным образом, олеиновых, пальмитиновых и стеариновых ТГ последовательно в малых → больших → малых каплях неполярных липидов при действии специфичных белков перилипинов; активно реакции метаболизма ЖК происходят в малых каплях ТГ и в) биологическая реакция эндотрофии — пассивное (по градиенту концентрации) освобождение ЖК из жировых клеток в кровотоке, в межклеточную среду в форме полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК) [7].

Второй период активного увеличения числа ИПА приходится на пубертатный период; в это время происходит опти-

мальное распределение *in vivo* жировой ткани, которое характерно для взрослых особей. Перекармливание подростков в это время формирует повышение числа гипертрофированных ВЖК. Активация биологической реакции гиперплазии ИПА всегда нежелательна; это может быть следствием:

а) нарушения функции желез внутренней секреции на втором уровне регуляции метаболизма, на уровне органов и систем (синдром Иценко—Кушинга — локальная гиперсекреция глюкокортикоидов в корковом слое надпочечников) или

б) на третьем уровне — активация нейросекреторных ядер гипоталамуса (болезнь Иценко—Кушинга — гиперсекреция адренокортикотропного гормона базофилами аденогипофиза.

Согласно филогенетической теории общей патологии, для понимания биологической роли ИПА и их регуляции *in vivo*, важно проследить становление регуляции на ступенях филогенеза. Это важно сделать в условиях: а) афизиологичности воздействия факторов внешней среды, нарушения состава ЖК в пище, преобладании насыщенных ЖК (НЖК), главным образом С16:0 пальмитиновой; б) усиленной индукции экзогенными субстратами (при перекармлении); в) формирования нарушения биологической функции гомеостаза, биологической реакции экзотрофии и г) активной пролиферации ИПА. Важно понять какие механизмы, начиная с ПС, могут противостоять накоплению в цитоплазме ТГ, которое приводит к постоянному увеличению числа ИПА. Каковы же механизмы, которые ограничивают накопления *in vivo* ЖК, ТГ в каплях липидов, противостоят афизиологичному увеличению числа ИПА на уровне ПС, органов, систем органов и в организме?

В филогенезе образование специализированных жировых клеток, депонирование ЖК произошло, мы полагаем, в ПС энтероцитов. ПС энтероцитов реализуют: а) гидролиз ТГ пищи, пассивное всасывание НЭЖК, ди-, моноглицеридов и спиртов (ХС и глицерин), ресинтез экзогенных ТГ при сохранении количества олеиновых, пальмитиновых, линолевых и линоленовых ТГ таким, как оно было в пище; б) этерификацию ненасыщенных ЖК (ННЖК) с двумя-тремя двойными связями (ДС), полиеновых ЖК (ПНЖК) с четырьмя-шестью ДС со спиртом глицерином с образованием полярных фосфолипидов (ФЛ); в) этерификацию основной массы НЖК + мононенасыщенной ЖК (МЖК) с одной ДС пищи с глицерином и образование ТГ. В энтероцитах полярные ФЛ связывает ранний в филогенезе аполипопротеин (апо) — апоА-I, образуя липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Клетки всех ПС поглощают ФЛ из ЛПВП, пассивно, по градиенту концентрации (ННЖК и ПНЖК) путем переэтерификации ЖК между ФЛ в ЛПВП и ФЛ наружного монослоя мембраны клеток.

В канальцах эндоплазматической сети энтероцитов, неполярные ТГ (экзогенные и эндогенные) связывает микросомальный белок, переносящий триглицериды (МБПТ); он формирует, мы полагаем, ранние хиломикроны (ХМ). Перемещение их по каналам эндоплазматической сети энтероцитов, далее по соединенным каналам сети уже в жировых клетках происходит в рамках ПС. При этом жировые клетки (производные РСТ) депонируют НЖК и МЖК в форме ТГ в каплях липидов в цитоплазме. Так, мы полагаем, сформировались клетки, которые стали поглощать ЖК не в форме полярных НЭЖК, как это происходило в течение миллионов лет, а в форме неполярных ТГ в составе ЛП.

Жировые клетки реализуют биологическую реакцию экзотрофии. В межклеточной среде МЖК и НЖК в форме полярных НЭЖК связывает и переносит белок альбумин; перенос НЖК + МЖК специфичная биологическая его функция. Молекула специфично связывает две С16 и С18 НЖК

и МЖК; альбумин не переносит ННЖК, тем более ПНЖК. В пренатальном периоде у плода, при отсутствии синтеза альбумина, ННЖК и ПНЖК в межклеточной среде переносят иной фетальный блок —  $\alpha$ -фетопротеин. На депонировании ЖК в каплях ТГ в ПС, биологическая реакция экзотрофии заканчивается [6].

*Реализация каждой из клеток in vivo одновременно двух биологических реакций.* Этими биологическими реакциями являются:

1. Филогенетически ранняя функция жизнеобеспечения клетки; она едина для всех клеток; это реализации на аутокринном уровне биологических функций трофологии и гомеостаза, биологической функции эндоекологии и функции адаптации; реализуют они и биологические реакции гипертрофии и гиперплазии. Число клеток *in vivo*, в органе, ткани может быть увеличено за счет деления зрелых клеток и дифференцировки новых клеток из специфичных предшественников.

2. «Производственные» функции клеток в ПС и на уровне организма являются специфичными; формируются они порой на разных ступенях филогенеза; бывают они и не столь совершенными.

3. Нарушение поздних в филогенезе «производственных» функций — частая причина гибели клеток. Если *in vivo* в ПС, в органе или на уровне организма нарушена производственная функция клеток, все они, согласно методологическим приемам биологической преемственности и единой технологии становления в филогенезе функциональных систем, погибают по типу апоптоза.

*Широкое толкование биологической функции гомеостаза in vivo.* Гомойотермность — постоянная температура тела является важным достижением эволюции. Благодаря этому организмы совершенствуют биологическую реакцию термогенеза, регуляцию метаболизма путем поддержания температуры тела и далее рассеивают тепло в окружающую среду. Температура тела человека соответствует изоволюметрическому интервалу воды, 36—42°C. Это температура оптимальна для физиологичной функции плазматических мембран клеток, функции ферментов, реализации физико-химических реакций *in vivo*. Вязкость крови и внеклеточной жидкости, поверхностное натяжение сурфактанта в альвеолах легких, набухание коллоидов (матрикса) интерстициального пространства, процесс возбуждения клеток, сокращение мышечных волокон, биологическая реакция секреции, всасывания, активность биологической функции локомоции и фагоцитоз нейтрофилами и моноцитами также определены температурой внутренней среды [8].

Для того чтобы на ступенях филогенеза, согласно биологической функции гомеостаза, для каждой из клеток *in vivo* всего, всего было достаточно, важно чтобы: а) число клеток *in vivo* не было больше оптимального и б) этому соответствовал бы объем межклеточной среды. Эти условия в ранних ступенях филогенеза, с ПС клеток и органов, регулируют гуморальные медиаторы и нейро-гормональные биологические реакции. Поддержание стабильности единого пула межклеточной среды, является основной задачей биологических функций гомеостаза и адаптации на всех уровнях регуляции всех биологических реакций, в частности  $M \leftrightarrow M$  [9].

Единый пул межклеточной среды *in vivo* — это кусочек мирового океана, который: а) приватизировала каждая особь при выходе кистеперых рыб на сушу и в котором б) как и миллионы лет ранее в океане, продолжают жить все клетки. Самая ранняя физиологичная регуляция объема цитоплазмы и размеров клеток происходит на аутокринном уровне. На уровне ПС отработан контроль *in vivo* объема: а) единого пула межклеточной среды; б) локальных пулов среды; в) размеров (число клеток) и самих органов. Так, относительные

размеры столь важного органа как почки составляют всего-то 0,7% массы тела. Столь же невелико в процентном отношении к массе тела и масса центрального насоса сосудисто-сердечной системы, сердца.

На каждом из трех уровней относительного биологического совершенства, осуществлена регуляция биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ ; происходит это на аутокринном, в ПС и на уровне организма; достижение состояния относительно биологического совершенства в филогенезе является началом, основой формирования следующего уровня совершенства. На всех уровнях регуляции биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  функциональные системы регулируют: а) размеры клеток и их органелл; б) три пула функционально разных клеток в каждом ПС (специфичные клетки, которые определяют функцию ПС, локальный перистальтический насос и пул полифункциональных клеток, производных РСТ), включая жировые клетки; в) число функционально разных ПС в сформированном органе [10].

В равной мере регулирован *in vivo* и объем локальных пулов межклеточной среды: 1. большой круг кровообращения; 2. малый, легочный круг кровотока; 3. пул первичной мочи в канальцах нефрона; 4. пул спинномозговой жидкости; 5. пул амниотической жидкости; 6. альвеологематический пул смеси газов в легких — газожидкостный пул, в котором происходит диффузия, газообмен  $O_2$ ,  $CO_2$  и осуществлена биологическая реакция дыхания. К функциональным пулам можно отнести, вероятно, и поздний в филогенезе пул сбора и утилизации эндогенного «биологического мусора», сбор эндогенных флогенов из всех внутрисосудистых пулов межклеточной среды. Локализован этот филогенетически поздний пул в интиме артерий эластического типа.

Для реализации биологической функции гомеостаза *in vivo* в равной мере важна как регуляция число клеток *in vivo*, так и поддержание постоянного объема межклеточной среды, в котором и функционируют все клетки. Для этого, мы полагаем, функционируют механизмы, которые: а) отслеживают число клеток *in vivo*; б) число ПС, параметры органов и в) систем органов, которые поддерживают оптимальное отношение число клеток:объем межклеточной среды.

Ожирение и натрийуретические пептиды: липолиз, дистальный отдел артериального русла и число ИПА. Важно познать те функции *in vivo*, которые при афизиологичном воздействии факторов внешней среды (избыточная индукция субстратом, переиздание) противостоят увеличению числа ИПА, повышению объема внутрисосудистой среды и формированию ожирению; ожирение — это патология ИПА, в полной мере как метаболический синдром (МС) является патологией ВЖК. Параллельно увеличению *in vivo* числа ИПА, начальных проявлениях ожирения: а) возрастает объем дистального отдела артериального русла; б) замедляется скорость кровотока, нарушается биологическая реакция  $M \leftrightarrow M$ , снижается клиренс в тканях  $O_2$ , нарушается удаление катаболитов; в) уменьшается кратность обмена крови в обменных капиллярах, более низкими становятся параметры микроциркуляции; г) нарушается реализации биологической функции гомеостаза, трофологии, биологическая функция эндоэкологии и адаптации.

Нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , эндотелий-зависимой вазодилатации, снижение гидродинамического давления в ПС и органах, понижение гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла, призваны воспринимать интеро-, хемо- и барорецепторы. Иницированная ими афферентная сигнализация достигает сосудодвигательного центра продолговатого мозга. Для компенсации нарушения биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  с уровня организма, сосудодвигательный центр, стимулируя сердце как центральный насос, системно повышает АД [11].

Биологическая функция адаптации на уровне организма увеличивает АД в проксимальном отделе и далее гидродинамическое давление в дистальном отделе артериального русла, повышает скорость кровотока, восстанавливает параметры микроциркуляции и нормализует биологическую реакцию  $M \leftrightarrow M$ . В то же время, назвать эту реакцию патогенетической не получается. В ответ на локальное нарушение биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , с уровня организма следует не локальное, как было бы желательно, а системное повышение АД, и не в дистальном, а в проксимальном отделе артериального русла.

Патогенетическая компенсация биологической реакции  $M \leftrightarrow M$  при развитии ожирения, мы полагаем, заключается в: а) уменьшении числа ИПА; б) объема дистального отдела артериального русла и в) снижении объема циркулирующей крови. Уменьшение объема крови в артериолах мышечного типа происходит путем активации секреции филогенетически раннего мозгового натрийуретического пептида (НУП), далее желудочкового и предсердного НУП [12]. В реализации биологической функции гомеостаза НУП являются синергистами с более ранним в филогенезе действием гормонального медиатора альдостерона. Вместе они поддерживают постоянство параметров единого пула межклеточной среды: альдостерон не допускает его уменьшения, а НУП — его увеличения. К действию альдостерона и НУП обоснованно добавить функцию антидиуретического гормона и вазопрессина из нейросекреторных ядер гипоталамуса, локально же их действие локализовано в ПС нефрона.

Биологически альдостерон призван противостоят уменьшению объема единого пула межклеточной среды; действие НУП как синергиста альдостерона, со своей стороны, препятствует увеличению единого пула межклеточной среды *in vivo*. Альдостерон в филогенетически ранних дистальных канальцах нефрона активирует реабсорбцию  $Na^+$  из пула первичной мочи, не допуская экскреции ионов и одновременно воды, которую содержат гидратные оболочки иона (7 молекул воды). Одновременно, более поздние в филогенезе желудочковый и предсердный НУП в начале нефрона активирует секрецию в первичную мочу  $Na^+$ , дополнительно к тем ионам, которые профильтрованы через базальную мембрану клубочков. Можно полагать, что при ожирении, при увеличении числа клеток и объема крови в дистальном отделе артериального русла, активность НУП уменьшает объем циркулирующей крови [13]. Компенсация эта является эффективной, однако она устраняет действие афизиологичного фактора внешней среды (переиздания) лишь частично. Содержание НУП в плазме крови пациентов с ожирением увеличивается пропорционально индексу массы тела. Однако увеличение какого же из трех НУП противостоит ожирению?

*Ожирение, число ИПА, размеры дистального отдела артериального русла и натрийуретические пептиды.* НУП биологически призваны поддерживать постоянство единого пула межклеточной среды *in vivo*. Одновременно НУП стимулируют липолиз, гидролиз ТГ с образованием НЭЖК и глицерина. Вначале они уменьшают размеры ИПА, а позже и их число. Секреция НУП в правом предсердии усиливает липолиз (гидролиз ТГ) в поздних в филогенезе ИПА; активация липолиза не происходит в более ранних в филогенезе ВЖК. При ожирении возрастает число адипоцитов и количество ПС с нарушением биологической функции гомеостаза [14].

Регулируя функциональные параметры биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ , НУП во взаимодействии с рецепторами используют сигнальную систему циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ); они же активируют в ИПА и ц-АМФ зависимую протеинкиназу, которая фосфорилирует гормонзависимую липазу, повышая активность гидролиза ТГ и образования полярных НЭЖК. Предсердный НУП активирует

липолиз в ИПА, увеличивает в плазме крови содержание НЭЖК и глицерина, далее поглощение их всеми клетками и усиление синтеза АТФ.

*Взаимодействие НУП, лептина и адипонектина в регуляции числа ИПА при ожирении.* Полагаем, что мозговой НУП с ранних ступеней филогенеза, с незамкнутой системы кровотока регулирует биологическую функцию гомеостаза в ИПА и объем межклеточной среды. Трансгенные мыши при высоком синтезе НУП всегда худые, по сравнению с контрольными животными; они проявляют резистентность к богатой жирами пище; ИПА не формируют ни ожирения, ни синдрома ИР. Для трансгенных мышей характерно: а) малое количество подкожной жировой ткани; б) высокое потребление  $O_2$  и в) увеличенное число митохондрий в цитоплазме миоцитов. При реализации биологической реакции экзотрофии, активность липолиза в адипоцитах трансгенных животных более высока, по сравнению с контролем. При действии НУП уменьшение ТГ в цитоплазме происходит за счет депонирования НЖК + МЖК в ИПА.

У мышей с выбитым геном НУП методом телеметрии показано постоянное повышение АД. При беременности, формировании локального пула амниотической среды, отмечено более выраженное повышение АД и развитие протеинурии [15]. Ни НУП повышает АД; при отсутствии физиологического действия НУП, нарушения в дистальном отделе артериального русла, в артериолах мышечного типа происходят при компенсации повышением АД на уровне организма [16]. Предсердный НУП повышает: а) окисление ЖК в скелетных миоцитах и, вероятно, липогенез в бежевых ИПА; б) биогенез митохондрий, синтез ими АТФ и в) уровень основного обмена. У мышей с гиперфункцией предсердного НУП экспрессировано число рецепторов активации пролиферации пероксисом- $\gamma$  (РАПП- $\gamma$ ); они же инициируют и биогенез митохондрий. Высокое содержание НЖК в пище: а) понижает действие НУП; б) нарушает биогенез митохондрий и в) окисление ЖК с образованием АТФ. Удастся ли эти нарушения корригировать в клинических условиях, покажет время.

При введении НУП в плазме крови увеличивается содержание НЭЖК и концентрация глицерина. При этом отношении НЭЖК : глицерин изменяется от 2,9 до 1,5. Это определено тем, что полный гидролиз ТГ последовательно осуществляют три фермента: а) гормонзависимая липаза жировых клеток; б) ди-глицеролгидролаза и в) 2-моноацилглицеролгидролаза [17]. В экспериментах на мышях НУП выраженно активируют липолиз в ИПА, но не в ВЖК. Значительное повышение содержания НЭЖК в плазме крови является причиной повышения уровня гликемии и формирования синдрома ИР. Высокая концентрация НЭЖК в межклеточной среде сказывается и на секреции альдостерона. Однако каковы же функциональные отношения между нормализацией объема циркулирующей крови, активацией липолиза в ИПА и концентрацией НЭЖК в плазме крови?

Создается впечатление, что адипонектин и НУП являются синергистами в регуляции в ИПА: а) пула межклеточной среды; б) размеров дистального отдела артериального русла; в) числа ИПА и д) их размеров. Филогенетически поздние гуморальные медиаторы НУП, вероятно, задействованы в регуляции массы тела, числа клеток *in vivo*; регулируют они и освобождение из ИПА жирных кислот в форме НЭЖК для разработки митохондриями энергии, для синтеза АТФ.

Можно полагать, что НУП и адипонектин, регулируя ИПА, формируют оптимальные параметры артериального русла. Они включают: а) размеры дистального отдела артериального русла; б) оптимальный объем циркулирующей крови и в) число ИПА. НУП задействованы в регуляции метаболизма ЖК путем изменения активности гормонзависимой липазы в ИПА. Система  $\alpha$ -АМФ передачи в клетку сигнала функционально ассоциирована с активностью се-

мейства белков перилипинов, которые определяют размеры капель ТГ, активность гормонзависимой липазы и освобождение НЭЖК в межклеточную среду [18]. Фосфорилирование перилипина-А, при действии  $\alpha$ -АМФ зависимой протеинкиназы, повышает активность гормонзависимой липазы, ее реакцию с субстратом в малых каплях ТГ, гидролиз ТГ и освобождение из ИПА в кровотоке НЭЖК и глицерина.

Введение фармакологического НУП добровольцам повышает содержание в плазме крови НЭЖК, увеличивает уровень основного обмена и окисление в митохондриях ЖК. При физической нагрузке освобождение НЭЖК из адипоцитов активно происходит и без участия симпатической нервной системы. Клинические наблюдения показывают, что гидродинамическое действие НУП, уменьшение перегрузки по объему двух кругов кровообращения у пациентов с сердечной недостаточностью, одновременно активирует липолиз в ИПА, вплоть до проявления клинических симптомов кахексии.

Полагают, что действие  $\beta$ -блокаторов может быть определено тем, что они активируют секрецию НУП. Внутривенное введение физиологической дозы предсердного НУП, активирует мобилизацию ЖК из ИПА в форме НЭЖК. У пациентов с ожирением имеется негативная зависимость между содержанием НУП в плазме крови и индексом массы тела. НУП активирует гидролиз ТГ в ИПА, но не в ВЖК. Нарушением, которое инициирует повышение АД у животных с ожирением, является: а) афизиологично большое число ИПА; б) увеличение параметров дистального отдела артериального русла и в) объема циркулирующей крови. В то же время, снижение числа ИПА, объема локального сосудистого русла и уменьшение локального объема циркулирующей крови не столь просто отметить у животных без ожирения. Подобное действие НУП при ожирении действительно достижимо.

Липолиз в поздних в филогенезе ИПА активирует также и гуморальный медиатор адипонектин [19]; такое же действие в ИПА проявляет и НУП. Поздний в филогенезе предсердный НУП не активирует липолиз в ВЖК; гормонзависимую липазу в ВЖК активируют ранние в филогенезе гуморальные медиаторы: адреналин, гормон роста, трийодтиронин и глюкостероиды. В склонных к пролиферации ИПА, действие адипонектина и НУП направлено на уменьшение числа адипоцитов. И первым шагом является разгрузка адипоцитов от избытка ТГ. Можно полагать, что активация при ожирении липолиза при действии НУП является первым шагом в нормализации кровообращения, уменьшении объема циркулирующей крови в дистальном отделе артериального русла.

Можно полагать, что активация липолиза при действии НУП уменьшает размеры и число ИПА, понижает параметры дистального отдела артериального русла и объем циркулирующей крови. Это можно оценивать как эндогенные биологические реакции, которые *in vivo* противостоят формированию ожирения. При этом в плазме крови повышается содержание НЭЖК, глицерина, формируется умеренная гипергликемия и синдром ИР. При действии НУП и активации гидролиза ТГ в ИПА, они освобождают НЭЖК в межклеточную среду; далее ЖК окисляют иные клетки. Возможна ли активация биологической реакции, при которой ИПА сами окисляли бы ЖК *in situ*. Действительно, такая биологическая реакция отработана на уровне ПС клеток, органов и в организме.

*Бежевые адипоциты, активация биологической реакции термогенеза и уменьшение депонированных в ИПА триглицеридов.* Если белые жировые клетки (ВЖК и ИПА) и БЖК — две линии клеток с разными предшественниками в форме бластов, то бежевые жировые клетки — это, главным образом, фенотипически измененные ИПА. В БЖК высокий уровень синтеза термогенина обусловлен генетически; в бежевых клетках синтез его возрастает при действии активаторов — агонистов  $\beta$ -адренергических рецепторов [20]. При

формировании в ИПА пула бежевых клеток происходит: а) экспрессия разобщающего протеина-1; белок препятствует формированию высокого градиента протонов по обе стороны внутренней мембраны митохондрий и разобщает физико-химические процессы окисления и окислительного фосфорилирования, понижая образование в дыхательной цепи АТФ. БЖК и бежевые ИПА содержат сходные концентрации термогенина и схожую активность продукции тепла; б) увеличение числа митохондрий, содержание в них цитохромов, которые накапливают ионы железа; наличие большого числа окрашенных митохондрий придает клеткам бежевый цвет; в) митохондрии продуцируют энергию преимущественно в форме тепла и образуют только четверть того количества АТФ, которое нарабатывают белые ИПА. Далее поток крови разносит тепло по всему телу, рассеивая его с кожных покровов. Так происходит метаболизм ЖК запасенных в ИПА в форме ТГ при активной биологической реакции термогенеза и выделении бежевыми клетками  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

При реализации биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации, образовании бежевых ИПА и усилении термогенеза происходит при: а) переохлаждении организма (после зимней спячки, периода гибернации), когда необходимо восстановить оптимальную температуру тела, согреться; б) при рождении ребенка, когда необходимо оптимально поддерживать температуру тела, не остыть и в) реализации биологических функций трофологии (питания) и функции гомеостаза при воздействии такого фактора внешней среды, как гипериндукция субстратом — хроническое перекармливание [21].

Интерес биологов и клинических биохимиков к БЖК и бежевым ИПА основан на способности клеток активировать *in vivo* адаптивные биологические реакции, которые эндогенно понижают размеры зрелых ИПА, их число и ожирение. В экспериментах на мышах, активация термогенеза в БЖК и бежевых ИПА достоверно коррелирует с устойчивостью мышей к ожирению [22]. Полагали, что *in vivo* у взрослых мало БЖК, чтобы они могли оказать влияние на число ИПА. В последнее время, при использовании позитронной эмиссионной томографии [23] одновременно с ядерной магнитной резонансной томографией, показаны фрагменты бурой жировой ткани, бежевых клеток ИПА, которые при стимуляции с  $\beta$ -адренорецепторами, экспрессируют термогенин. Активность термогенеза в бежевых клетках снижена у пожилых пациентов с ожирением, по сравнению с группой контроля [24].

Неоднозначным является и мнение, что снижение термогенеза в бежевых ИПА можно рассматривать как причину повышения индекса массы тела; возможно ли применить это при профилактике ожирения. Действие разобщающего протеина-1 [25], разобщение физико-химических реакций окисления и окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий опробовано в экспериментах по снижению массы тела. 2,4-динитрофенол (ДНФ) химически разобщает эти реакции, инициируя утечку протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, имитируя действие разобщающего протеина-1. Однако ДНФ обладает побочным действием.

Большинство бежевых клеток, полагают, формируются из зрелых ИПА: происходит это при охлаждении организма или активации  $\beta$ -адренергических рецепторов. В экспериментах при использовании нового метода картирования, авторы, вводя стабильную метку в зрелые ИПА, содержали мышей при пониженной температуре и действии агонистов  $\beta$ -рецепторов с целью образования бежевых ИПА. Большинство бежевых ИПА образовались из бластных предшественников, а не из зрелых, меченых ИПА. Термогенез бежевых ИПА обратим; он ослабевает при возвращении мышей в оптимальную по температуре среду и вновь усиливает образование тепла, если мышей вернуть в условия холода [26]. Бежевые ИПА уси-

ливают термогенез при действии агонистов РАПП- $\gamma$ . Далее выявлены две разновидности преадипоцитов в ИПА — белые и бежевые. И только бежевые преадипоциты реализуют генетическую программу термогенеза при действии агонистов  $\beta$ -адренорецепторов и РАПП- $\gamma$  [27].

*Бежевые клетки ИПА и регуляция метаболизма подкожной жировой ткани.* Активация БЖК и бежевых клеток ИПА происходит у грызунов, не только при адаптации к холоду, но и при перекармлении богатой углеводами пищи [28]. Это рассматривают как биологическую реакцию компенсации в ответ на усиление индукции субстратом с целью поддержания «баланса энергии»; в биологию введен термин диет-индуцированный термогенез [29]. Непонятным остается одно, почему мыши с выбитым геном разобщающего белка-1, которые не активируют холодовой термогенез, все-таки не повышают массу тела, не развивают ожирения при гипериндукции субстратом [30].

Мыши, с выбитым геном термогенина увеличивали массу тела при поедании большего количества пищи только, если их содержали в оптимальных по температуре условиях, при 28—30°C. При температуре (20—22°C) мышам холодно; они вынуждены тратить часть энергии на поддержание температуры тела. Вероятно, мыши с выбитым геном термогенина мобилизуют альтернативные механизмы для поддержания температуры тела [31]. Вклад БЖК в метаболизм ЖК при диет-индуцированном термогенезе четко пока не установлен. Формирование БЖК при дефиците разобщающего протеина-1 может влиять и на метаболизм ЖК в тканях, формирование бурой жировой ткани и участия в диет-индуцированном термогенезе [32]. Существуют ли компоненты пищи, которые в большей мере активируют диет-индуцированный термогенез? Какие генетические факторы могут этому способствовать?

*Патогенез ожирения; роль микробиоты кишечника.* Имеет ли значение в термогенезе и ожирении функция микробиоты — содружества микрофлоры преимущественно толстого кишечника? Микробиота — функциональный термогенератор; бактерии-пробиотики осуществляют переваривание компонентов пищи (пребиотиков), которые не усваивают ферментные системы тонкого кишечника, в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Пробиотики — субстраты ферментации микрофлоры; микробиота обеспечивает биологические потребности человека *in vivo*, синтез жизненно необходимых компонентов, реализуя одновременно наработку тепла. Пробиотики — биологически активные препараты, которые содержат живые микроорганизмы — физиологичную микрофлору толстого кишечника человека и способны восстановить нарушенный баланс микроорганизмов. Кроме того, микробиота нарабатывает большое количество тепла, реализуя физико-химические реакции. Субстратом для гидролиза микроорганизмами является, главным образом, клетчатка растительного происхождения [33].

Не выяснена и конкуренция микробиоты с пищеварительной системой тонкого кишечника; она с более высокими параметрами усваивает животную пищу. Бактерий в микробиоте  $\approx$  в 15 раз больше, чем всех соматических клеток *in vivo*. В экспериментах с генетически ожиревшими мышами показано, что состав микрофлоры кишечника, по сравнению с поджарыми мышами различается. Когда брали микрофлору от ожиревших мышей и пересаживали худым, мыши быстро увеличивали массу тела. И наоборот, полные мыши уменьшали массу тела, когда им «пересаживали» бактерии из кишечника худых животных.

Как показали эксперименты на мышах и на добровольцах, даже щадящие курсы антибиотиков уничтожают бактерии в кишечнике. Со временем количество бактерий восстанавливается, но не видовое их разнообразие; оно становится

на порядок меньше. С «бедным» набором штаммов бактерий лабораторные мыши гораздо более склонны к ожирению, синдрому ИР и МС. За последние годы показано, что микрофлора кишечника влияет на метаболизм: «плохая» микробиота способствует формированию болезни, «здоровая» — укрепляет здоровье [34].

Эксперименты на мышах показали, что при питании пищей с животными жирами микробиота мышей меняется. Отчасти, ситуацию можно поправить введением пробиотиков. В клиническом эксперименте, представители африканского племени в течение двух недель использовали только американскую пищу *fast food*, а группа афроамериканцев питалась бобовыми культурами и овощами из рациона индейцев. В результате, в первом случае развился синдром ИР, а у афроамериканцев, содержание ХС и ТГ в плазме крови достоверно снизилось. И у первых и у вторых изменилась микробиота кишечника. После 10 дней питания в «МакДональдсе», кишечная микрофлора выражено нарушается. Колония бифидобактерий, которая *in vivo* сдерживает биологическую реакцию воспаления, вымерла и разнообразие микроорганизмов уменьшилось на 40%. Через две недели после окончания питания *fast food*, микрофлора так и не восстановилась. Такие нарушения часто встречаются у людей с ожирением, синдромом ИР и метаболическим синдромом.

Разнообразие видов бактерий в кишечнике у городских жителей гораздо меньше, чем у жителей села. Состав микробиоты у горожан в России, Европе и Америке является сходным; у сельских жителей, даже в пределах РФ, выражено различается; в кишечнике человека также происходит процесс глобализации. Люди во всех странах едят гамбургеры с антибиотиками; микробиота становится скудной, понижается сопротивляемость микрофлоры заболеваниям. В последние годы выявлена взаимосвязь между составом микробиоты кишечника и склонностью к ожирению. Эту закономерность выявили у мышей: мыши, которые получали одинаковую (богатую полисахаридами) пищу, но имели различные гены предрасположенности к ожирению, имеют разный состав бактерий в кишечнике. У предрасположенных к ожирению мышей с увеличением массы тела, изменяется и соотношение бактерий-симбионтов в кишечнике. У мышей с ожирением, доля бактерий *Bacteroidetes* снижается ( $\approx 50\%$ ), а доля — *Firmicute* — пропорционально возрастает. Такая же взаимосвязь прослежена и у человека; в кишечнике человека также преобладают бактерии этих же типов. У пациентов с ожирением бактерий *Bacteroidetes* меньше, чем у худых. Это подтверждено и в США при участии моно- и dizиготных близнецов женского пола и их матерей (всего 154 человека), которые имели избыточную и физиологичную массу тела [35].

Используя современные методы, охарактеризованы не только истинные бактерии (эубактерии), но и древние археи. Отмечено, что у людей с ожирением повышается доля не только бактерий, которые продуцируют водород, но и метаногенных архей, которые потребляют  $H_2$ . Это характерно для людей с ожирением или тех пациентов, которые перенесли операцию шунтирования желудка. Авторы статьи предположили, что именно согласованное повышение количества бактерий, производящих водород, и архей, которые его потребляют, способствует повышенному извлечению из пищи всей энергии. Полагают, что влияние на состав микробиоты кишечника потенциально можно применить и для лечения пациентов с ожирением [36]. Можно контролировать состав микробиоты с помощью фармацевтических, биотехнологических или иных разрабатываемых подходов.

Эксперименты на мышах показали, что если провести колонизацию кишечника мышей микробиотой, которая характерна для животных с ожирением, мыши быстро набирают массу тела. Если же использовать для колонизации микробиоту, харак-

терную для худых мышей, развития ожирения не происходит. Микробиота может воздействовать на организм хозяина, повышая эффективность извлечения энергии из пищи, прежде всего, из полисахаридов. С другой стороны, и диета влияет на состав микробиоты: при использовании пищи с высоким содержанием животных жиров (сливочного жира) состав бактерий в кишечнике меняется за несколько дней. У мышей с низкой аффинностью Toll-подобного рецептора 5, развивается гиперфагия и синдром ИР, возрастает масса тела. Если после этого микробиоту от таких мышей перенести в кишечник здоровым животным, развивается МС и синдром ИР.

*Аэробная микробиота толстого кишечника и терморегуляция.* Термогенез у человека определяет, прежде всего, величина мышечной нагрузки, а теплоотдачу — температура окружающей среды и влажность воздуха. Параметры микроклимата в природной среде и в производственных условиях могут изменяться в широких пределах. Вместе с изменением микроклимата меняется и самочувствие человека. Нарушение теплового баланса активирует *in vivo* биологическую функцию адаптации, биологическую реакцию компенсации. Противостояние холоду, жаре происходит под контролем нервной системы; в ней задействованы органы, которые обеспечивают постоянную температуру тела эффективным и экономичным путем. Физиологичная система терморегуляции включает регуляцию биологических реакций теплообразования и теплоотдачи. Терморегуляция происходит: а) путем реализации биохимических реакций и б) путем изменения интенсивности кровообращения и потоотделения.

Терморегуляция биохимическим путем состоит в изменении интенсивности окислительных процессов *in vivo*. Терморегуляция путем изменения кровообращения заключается в регуляции объема протекающей крови; ее можно рассматривать как переносчик тепла от внутренних органов к поверхности тела человека при сужении, расширении сосудов. При температуре окружающей среды в  $36^\circ C$ , отвод тепла происходит только за счет испарения.

*Филогенетические, этиологические факторы ожирения.* Согласно филогенетической теории общей патологии, *Homo sapiens* потребляет пищу, какую он хочет и сколько хочет; но у него есть и биологическая обязанность — все съеденное истратить; не можешь истратить — не ешь. Важно понять на какие цели *in vivo* расходуются субстраты при наработке энергии, принимая во внимание и роль ядер гипоталамуса, нейроэндокринной системы [37]. Считают, что  $\approx 10\%$  субстратов *in vivo* расходуются на поддержание температуры тела. Легко одеваясь, обливаясь холодной водой, мы можем потерять не более 10% субстратов пищи. Около 20% энергии, в среднем, организм затрачивает на повседневную физическую активность. Посещая фитнес-клуб, мы сможем потратить более 20% энергии.

Остальные 70% энергии организм использует на реализацию жизнеобеспечения, на покрытие расходов в энергии при осуществлении реакций метаболизма. Энергоемкими являются: а) поддержание оптимального объема клеток, высокого градиента ионов  $K^+$  и  $Na^+$  по обе стороны клеточной мембраны, межклеточная среда: цитоплазма клеток; б) постоянные сокращения гладкомышечных клеток; в) функция дыхания; г) активность биологической реакции  $M \leftrightarrow M$ ; д) непрерывная функция эндозологии, биологические реакции эксскреции и реакция воспаления, энергетические затраты центральной нервной системы и центрального насоса сосудисто-сердечной системы — сердца.

На реализацию физико-химических и биохимических реакций метаболизма приходится трата большей части энергии, которую производит *in vivo* *Homo sapiens* в форме АТФ. Заранее запастись энергией *in vivo* в форме АТФ человек не может. В единицу времени при самой высокой потребности в энергии, *Homo sapiens* может истратить только то количество

энергии, которое за это же время нарабатывают митохондрии всех клеток *in vivo*. В динамике окислительного фосфорилирования ↔ дефосфорилирования, образования и гидролиза АТФ ↔ АДФ за сутки происходит образование десятков килограммов АТФ. Решающим в эволюционном, филогенетическом развитии, превосходстве видов животных являются кинетические параметры [38].

В чем же состоит основная проблема похудения [39]. Ответ на этот вопрос дает филогенетическая теория общей патологии. Мы полагаем, что основной этиологический фактор биологической реакции ожирение ↔ похудение сформировался на разных ступенях филогенеза, на уровне ПС клеток, органов, систем органов, в самих жировых клетках. Этиологический фактор ожирения в том, что все жировые клетки депонируют ЖК в форме неполярных ТГ, а освобождают в межклеточную среду только в форме полярных НЭЖК. Следовательно: а) депонировать ЖК в жировые клетки значительно проще, чем из жировых клеток ЖК извлечь и б) прежде чем ЖК извлечь, надо ТГ подвергнуть гидролизу (липолизу) и освободить ЖК в форме НЭЖК при действии гормонзависимой липазы жировых клеток.

Параметры освобождения ЖК из ВЖК и ИПА в форме НЭЖК, зависят от соотношения позиционных изомеров олеиновых, пальмитиновых ТГ, которые депонированы в жировых клетках. Их гормонзависимая липаза гидролизует, но с разной константой скорости реакции. Если мы посмотрим на последовательность пальмитиновых и олеиновых позиционных изоформ ТГ в плазме крови:

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

и сопоставим ее с температурой плавления ТГ, становится ясно, что первыми липаза будет гидролизовать позиционные изомеры олеиновых ТГ как олеил-олеил-олеат глицерол (ООО). И в последнюю очередь, липаза начнет гидролиз пальмитиновых позиционных изомеров ТГ как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат глицерол (ППП). Температура плавления пальмитиновой НЖК составляет 63°C, а олеиновой МЖК только 15°C.

Согласно скорости гидролиза позиционных изоформ ТГ, поедание животного, сливочного жира (пальмитиновых ТГ) является причиной сдвига позиционных изоформ ТГ влево, формирования *in vivo* пальмитинового, малоэффективного варианта метаболизма ЖК и низкой эффективности наработки митохондриями АТФ. Происходит это по причине низкой активности гидролиза ТГ в ИПА при реализации биологической функции трофологии (питания), биологической реакции эндотрофии. И чем большее количество пальмитиновых ТГ накапливается в ИПА, чем медленнее гидролизует их гормонзависимая липаза, тем более увеличивается число ИПА и масса подкожной жировой клетчатки с развитием такой метаболической пандемии, как ожирение.

Сопоставления, которые приведены выше, основаны на том, что точка плавления для каждого изомера ТГ, является физико-химической, функциональной константой. Экспериментально показана достоверная, негативная, коррелятивная зависимость между точкой плавления позиционных изомеров ТГ и скоростью их гидролиза в модельной системе при действии постгепариновой ЛПЛ. При скармливании крысам пищи с повышенным содержанием пальмитиновой НЖК, как и транс-форм МЖК, отмечено достоверное снижение скорости гидролиза ТГ в белой жировой ткани параллельно повышению температуры плавления позиционных изомеров ТГ.

Разобравшись в этиологии и патогенезе такой метаболической пандемии как ожирение, мы можем обоснованно говорить, что:

а) ожирение — патология белой жировой ткани, пула филогенетически поздних, инсулинзависимых подкожных адипоцитов;

б) этиологическим фактором ожирения является различие активного, рецепторного депонирования ЖК в адипоцитах в форме неполярных ТГ; освобождение же ЖК из адипоцитов в межклеточную среду происходит только пассивно в форме полярных НЭЖК; покидают они адипоциты только пассивно по градиенту концентрации цитоплазма ИПА → межклеточная среда;

в) основой патогенеза ожирения является избыточное количество в пище пальмитиновой НЖК и транс-форм МЖК, избыточное депонирование в ИПА пальмитиновых изоформ ТГ; гормонзависимая липаза гидролизует все пальмитиновые ТГ с низкой константой скорости реакции;

г) важным в патогенезе является формирование *in vivo* пальмитинового, малоэффективного варианта метаболизма ЖК, вплоть до функционального дефицита *in vivo* АТФ;

д) при дефиците АТФ в плане компенсации на уровне организма происходит усиление липолиза в ВЖК сальника на уровне организма, активация чувства голода, приема пищи и опять увеличение количества депонированных пальмитиновых ТГ при малом освобождении ЖК в форме НЭЖК. Компенсаторную активацию липолиза и освобождение НЭЖК в межклеточную среду при действии адреналина не может блокировать филогенетически поздний инсулин, поскольку более ранние в филогенезе ВЖК не имеют рецепторы только к инсулиноподобному фактору роста и не имеют рецепторов к инсулину.

Регуляция метаболизма ИПА сформировалась на поздних ступенях филогенеза, когда регуляция многих процессов метаболизма, в частности М ↔ М, была уже завершена. Поэтому, мы полагаем, физиологично увеличению размеров и числа ИПА противостоят, казалось бы, неспецифичные функциональные системы, как:

а) липолитическое действие НУП в подкожной жировой ткани; они уменьшают число адипоцитов, размеры дистального отдела артериального русла и объем циркулирующей крови;

б) активация термогенеза в бежевых адипоцитах; они формируются из предшественников в пуле белых ИПА и снижают содержание в них ТГ путем усиления образования и рассеивания тепла;

в) не совсем ясная функция микробиоты кишечника, которая функционально способна противостоять ожирению.

Действие адипонектина — гуморального медиатора механизма обратной связи ИПА → ядра гипоталамуса изложено нами ранее и эффективным регулятором противодействия ожирению не стала. В этой непростой ситуации с этиологией и патогенезом ожирения, единственно эффективным способом профилактики метаболической пандемии является активация когнитивной биологической функции, ограничение количества потребляемой пищи (индукции субстратом) при облигатном снижении животных жиров с высоким содержанием пальмитиновой НЖК.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4—6, 8—9, 12—37, 39 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. *Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014.
2. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А. *Жирные кислоты, триглицериды, гипертриглицеридемия, гипергликемия и инсулин*. М.: ИНФРА-М; 2016.
3. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Влияние гипергликемии на ангио-

- генные свойства эндотелиальных и прогениторных клеток сосудов. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(1): 38—44.
7. Титов В.Н. Становление в филогенезе биологической функции питания. Функциональное различие висцеральных жировых клеток и подкожных адипоцитов. *Вопросы питания*. 2015; 84(1): 15—24.
10. Титов В.Н. Различия в филогенезе этиологических факторов и единение патогенеза метаболических пандемий. Относительное биологическое «совершенство» и несогласованности регуляции метаболизма *in vivo*. *Кардиологический вестник*. 2015; X(4): 56—67.
11. Ксенева С.И., Бородулина Е.В., Трифонова О.Ю., Удут В.В. Вегетативное обеспечение функций при артериальной гипертензии и метаболических нарушениях. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(2): 197—200.
38. Шноль С.Э. *Физико-химические факторы биологической эволюции*. М.: Наука; 1979.
17. Del Pozo C.H., Calvo R.M., Vesperinas-García G., Gómez-Ambrosi J., Frühbeck G., Rubio M.A. et al. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes. Surg.* 2011; 21(5): 633—43.
18. Ray H., Pinteur C., Frering V., Beylot M., Large V. Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids Health Dis.* 2009; 8: 58—65.
19. Roh E., Song do K., Kim M.S. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp. Mol. Med.* 2016; 48: e216.
20. Shen Y., Liu X., Dong M., Lin J., Zhao Q., Lee H.J. et al. Recent advances in brown adipose tissue biology. *Chin. Sci. Bull.* 2014; 59: 4030—40.
21. Bai Z., Wuren T., Liu S., Han S., Chen L., McClain D. et al. Intermittent cold exposure results in visceral adipose tissue «browning» in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2015; 184: 171—8.
22. Yoneshiro T., Saito M. Transient receptor potential activated brown fat thermogenesis as a target of food ingredients for obesity management. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013; 16(6): 625—31.
23. Van Marken Lichtenbelt W.D., Vanhomerig J.W., Smulders N.M., Drossaerts J.M., Kemerink G.J., Bouvy N.D. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(15): 1500—8.
24. Lee P., Werner C.D., Kebebew E., Celi F.S. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2014; 38(2): 170—6.
25. Fromme T., Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011; 300: R1—8.
26. Okamatsu-Ogura Y., Fukano K., Tsubota A., Uozumi A., Terao A., Kimura K. et al. Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One*. 2013; 8(12): e84229.
27. Park A., Kim W.K., Bae K.H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World. J. Stem. Cells*. 2014; 6(1): 33—42.
28. Saito M. Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential. *Endocr. J.* 2014; 61(5): 409—16.
29. Kozak L.P., Koza R.A., Anunciado-Koza R. Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2010; 34(Suppl.1): S23—7.
30. Wang Q.A., Tao C., Gupta R.K., Scherer P.E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 2013; 19(10): 1338—44.
31. Asano H., Yamada T., Hashimoto O., Umamoto T., Sato R., Ohwatari S. et al. Diet-induced changes in Ucp1 expression in bovine adipose tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013; 184: 87—92.
32. Freire R.H., Fernandes L.R., Silva R.B., Coelho B.S., de Araújo L.P., Ribeiro L.S. et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2016; 40(3): 479—86.
33. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(5): 431—8.
34. Clarke S.F., Murphy E., Nilaweera K., Ross P.R., Shanahan F., O'Toole P.W. et al. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut. Microbes.* 2012; 3(3): 186—202.
35. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(44): 16452—63.
36. Harms M., Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 2013; 19(10): 1252—63.
37. Arruda A.P., Milanski M., Coope A., Torsoni A.S., Ropelle E., Carvalho D.P. et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology*. 2011; 152(4): 1314—26.
38. Шноль С.Э. *Physical and Chemical Factors of Biological Evolution [Физико-химические факторы биологической эволюции]*. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
39. Berness L.A., Opitz J.M., Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am. J. Med. Genet. A.* 2007; 143A(24): 3016—34.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.61-006.04-07:575.08

Береснева Е.В.<sup>1</sup>, Логинов В.И.<sup>2,3</sup>, Ходырев Д.С.<sup>4</sup>, Пронина И.В.<sup>2,3</sup>, Казубская Т.П.<sup>5</sup>, Карпухин А.В.<sup>3</sup>, Брага Э.А.<sup>2,3</sup>, Кушлинский Н.Е.<sup>5</sup>

## ГИПЕРМЕТИЛИРОВАННЫЕ ГЕНЫ МИКРОРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ

<sup>1</sup>Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП «Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов», 117545, Москва;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва;

<sup>4</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА, 115682, Москва;

<sup>5</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва

*Светлоклеточный рак почки (скПКР) характеризуется высокой частотой летальных исходов, и в первый год после постановки диагноза летальность составляет 16%. Отсутствие эффективной диагностики в ранних стадиях (30% случаев скПКР обнаруживается в поздних стадиях при наличии метастазирования) указывает на необходимость поиска новых биомаркеров скПКР. Нарушения в метилировании регуляторных генов микроРНК являются одной из причин развития опухоли. Цель данной работы — выявление гиперметилированных генов микроРНК при скПКР и оценка их диагностических и прогностических характеристик. Определение статуса метилирования генов микроРНК в образцах ДНК из опухоли и неизменной ткани 50 больных скПКР проводили с помощью бисульфитной конверсии ДНК и последующей метилспецифичной ПЦР. Показано частое гиперметилирование 7 генов микроРНК (miR-9-1/3, miR-124a-1/2/3, miR-34b/c, miR-129-2) в опухолях скПКР. Из 7 исследованных генов микроРНК составлены системы маркеров по 2–4 гена в каждой. Чувствительность систем из 4 маркеров по данным ROC-анализа достигает 88%, а специфичность — 94% (AUC 0,83–0,84). Кроме того, показано, что гиперметилирование 5 генов микроРНК (miR-9-1/3, miR-34b/c, miR-124a-3, miR-129-2) ассоциируется с параметрами прогрессии скПКР (стадия, размер опухоли, степень дифференцировки и метастазирование в лимфатические узлы или удаленные органы). Из генов, гиперметилирование которых связано с метастазированием (miR-129-2, miR-9-3, miR-124a-3), составлены и охарактеризованы 5 прогностических систем маркеров. Гиперметилирование гена miR-129-2 — новый эффективный маркер предсказания метастазирования (чувствительность 75% и специфичность 79%, AUC 0,77), который можно сочетать с маркерами, выявленными в других исследованиях.*

**Ключевые слова:** светлоклеточный рак почки; биомаркеры; ROC-анализ; микроРНК; метилирование ДНК.

**Для цитирования:** Береснева Е.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Карпухин А.В., Брага Э.А., Кушлинский Н.Е. Гиперметилированные гены микроРНК как потенциальные маркеры светлоклеточного рака почки. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 13-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-13-18>

*Beresneva E.V.<sup>1</sup>, Loginov V.I.<sup>2,3</sup>, Khodyrev D.S.<sup>4</sup>, Pronina I.V.<sup>2,3</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>5</sup>, Karpukhin A.V.<sup>3</sup>, Braga E.A.<sup>2,3</sup>, Kushlinskii N.E.<sup>5</sup>*

### THE HYPER-METHYLATED GENES MICRORNA AS POTENTIAL MARKERS OF CLEAR-CELL CARCINOMA OF KIDNEY

<sup>1</sup>The state research center of the Russian Federation "The state research institute of genetics and selection of industrial microorganisms", 117545 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The research institute of general pathology and pathophysiology, 125315 Moscow, Russia

<sup>3</sup>The medical genetic research center, 115478 Moscow, Russia

<sup>4</sup>The Federal research clinical center of specialized types of medical care and medical technologies of the Federal medical biological agency of Russia, 115682 Moscow, Russia

<sup>5</sup>The N.N. Blokhin Russian oncologic research center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

*The clear-cell carcinoma of kidney is characterized by high rate of lethal outcomes. The lethality makes up to 16% in the first year after disease was diagnosed. The absence of efficient diagnostic at early stages (30% of all cases of clear-cell carcinoma of kidney are found out at late stages if there is metastatic disease) indicates the necessity of searching new biomarkers of clear-cell carcinoma of kidney. The disorders in methylation of regulatory genes of micro-RNA are one the causes of development of tumor. The purpose of the present study is to discover hyper-methylated genes of micro-RNA under clear-cell carcinoma of kidney and to evaluate their diagnostic and prognostic characteristics. The establishment of status of methylation of genes of micro-RNA in samples of DNA from tumor and unaltered tissue of 50 patients with clear-cell carcinoma of kidney was implemented using bisulfite conversion of DNA and subsequent methyl-specific polymerase chain reaction. The frequent hyper-methylation of seven genes of micro-RNA (miR-9-1/3, miR-124a-1/2/3, miR-34b/c, miR-129-2) in tumors of clear-cell carcinoma of kidney. Out of 7 analyzed genes of micro-RNA the systems of markers on 2-4 genes in each one were compiled. According ROC-analysis, the sensitivity of 4 markers systems reaches 88%, specificity - 94% (AUC 0.83-0.84). Furthermore, it is demonstrated that hyper-methylation of 5 genes of micro-RNA (miR-9-1/3, miR-124a-1/2/3, miR-34b/c, miR-129-2) is associated with parameters of progression of clear-cell carcinoma of kidney (stage, size of tumor, degree of differentiation, metastasis in lymph nodes on remote organs). Out of genes which hyper-methylation is associated with metastasis disease (miR-9-1/3, miR-124a-1/2/3, miR-34b/c, miR-129-2) 5 prognostic systems of markers were compiled and characterized. The hyper-methylation of gene miR-129-2 is a new efficient marker of prognosis of metastasis disease (sensitivity 75% and specificity 79%, AUC 0.77) that can be combined with markers discovered in other studies.*

**Key words:** clear-cell carcinoma of kidney; biomarkers; ROC-analysis; micro-RNA; DNA methylation.

**Для корреспонденции:** Брага Элеонора Александровна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: [eleonora10\\_45@mail.ru](mailto:eleonora10_45@mail.ru)

**For citation:** Beresneva E.V., Loginov V.I., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Karpukhin A.V., Braga E.A., Kushlinskii N.E. The hyper-methylated genes microRNA as potential markers of clear-cell carcinoma of kidney. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 13-18. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-13-18>*

**For correspondence:** Braga E.A., doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory. e-mail: [eleonora10\\_45@mail.ru](mailto:eleonora10_45@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study was implemented within the framework of state research theme of the research institute of general pathology and pathophysiology (0520-2014-0030) and funded by the Federal Agency of Scientific Organizations

Received 18.07.2016  
Accepted 01.08.2016

**Введение.** Почечно-клеточный рак (ПКР) является третьим по распространенности урологическим заболеванием и составляет 2—3% всех некожных злокачественных новообразований у взрослых обоих полов [1]. ПКР включает группу гистологически различных видов рака, таких как светлоклеточный, папиллярный и хромофобный рак почки. При этом светлоклеточный рак почки (скПКР) является самым распространенным из всех видов ПКР [2]. СкПКР в ранних стадиях не имеет клинических проявлений, поэтому обнаружение этого заболевания происходит случайно визуальным методом, а на этапе диагностики 30% всех случаев скПКР уже имеют метастазирование [3]. В 2015 г. в России доля случаев скПКР с летальным исходом в течение года после постановки диагноза составила 16% [4]. При этом в качестве терапии локализованного заболевания скПКР в настоящее время остаются частичная или тотальная нефрэктомия [5]. Отсутствие эффективной диагностики в ранних стадиях заболевания и высокая частота летальных исходов указывают на необходимость поиска новых биомаркеров скПКР.

Нарушения в метилировании регуляторных генов являются одной из причин развития опухоли [6]. Так, при раке легкого наблюдали повышенное метилирование промоторов двух генов (Об-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы и белка-супрессора p16) за 3 года до постановки диагноза рака легкого [7]. Гены микроРНК подвержены метилированию в несколько раз чаще, чем кодирующие белок гены [8]. Из литературы известно о связи степени метилирования генов микроРНК с их экспрессией при различных видах рака. Например, гиперметилирование miR-34b/c вызывало подавление экспрессии этого гена при раке ротовой полости, кишечника, яичников и лейкозе [9], а гиперметилирование гена miR-9 снижало его экспрессию при скПКР [10].

Нами ранее выявлено гиперметилирование ряда генов микроРНК при раке легкого и почки [11, 12]. Цель настоящего исследования — оценка диагностических и прогностических характеристик гиперметилированных генов микроРНК при скПКР.

**Материал и методы.** Образцы опухолей скПКР собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Анализировали парные образцы опухоли и гистологически неизменной ткани почки, полученные от 50 больных скПКР. Отбор образцов проводили, как было описано ранее [12]. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан», получено разрешение этического комитета РОНЦ им. Н.Н. Блохина, а также информированное согласие больных.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) проводили, как описано ранее [12].

Статистический анализ выполняли с применением точного критерия Фишера в программе AtteStat. Изменения считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

Оптимальные системы маркеров выбирали на основании критерия Йодена по результатам ROC-анализа, проведенного с помощью ресурса <http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>, который позволил вычислить диагностические параметры: площадь под ROC-кривой (AUC), оптимальный критерий отсека, чувствительность, специфичность, положительное и отрицательное предсказательные значения. Для системы из одного гена-маркера чувствительность определяли как долю образцов из опухоли, в которых данный ген метилирован, а специфичность — как долю неметилированных образцов из нормальной ткани (табл. 1).

**Результаты.** Профиль гиперметилирования генов микроРНК при скПКР и системы маркеров для диагностики скПКР. В данном исследовании представлены результаты анализа метилирования генов 7 микроРНК miR-9-1, 9-3, 34b/c, 124a-1, 124a-2, 124a-3 и 129-2 при скПКР при помощи МС-ПЦР. В табл. 1 показан статус метилирования этих генов в образцах опухолевой и гистологически неизменной (условно-нормальной) ткани почки от 50 пациентов.

Частота гиперметилирования этих генов в образцах опухолей составила 40—60% (табл. 2). Отмечена высокая достоверность различий частот гиперметилирования в опухолевой и гистологически неизменной ткани пациентов ( $p$  составляло  $10^{-3}$ — $10^{-5}$ ). Как видно из табл. 2, все изученные нами гены имеют высокую частоту гиперметилирования в опухолевой ткани и полное отсутствие метилирования в ткани «доноров» (за исключением miR-124a-2 — 1 случай на 5 доноров).

На основании полученных результатов гиперметилирования 7 генов микроРНК при скПКР нами составлены потенциальные диагностические системы маркеров для выявления скПКР (табл. 3). Из всевозможных наборов генов самые высокие значения суммы чувствительности и специфичности соответствовали системам, в которые вошли гены miR 9-1, 124a-3 и 129-2 (см. табл. 3). Примечательно, что для первых двух генов наблюдали 7-кратное, а для miR 129-2 — 19-кратное увеличение частоты метилирования в опухоли по сравнению с условно-нормальной тканью; при этом полностью отсутствовало гиперметилирование этих генов в образцах ДНК «доноров» (см. табл. 2).

Наилучшей (по значению критерия Йодена) системой из 1 гена является система на основе гена miR 129-2: она характеризуется очень высоким значением специфичности — 98% (т. е. в 49 образцах условно-нормальной ткани этот ген не метилирован), однако ее чувствительность оказалась крайне низкой — 38% (т. е. в 19 образцах опухолевой ткани этот ген метилирован); значение AUC составило 0,68. Аналогично этому для наилучшей (по критерию Йодена) системы из 2 генов (miR 9-1 и 124a-3) специфичность составила 90%, чувствительность — 66% (см. табл. 3). При анализе систем из 3 генов мы выделили 2 системы, являющиеся наилучшими по критерию Йодена: систему № 2 (miR 9-1, 9-3, 124a-3) со значениями специфичности 80% и чувствительности 80%, а также систему № 3 (miR 9-1, 124a-3, 129-2), которая харак-

Таблица 1

Метилирование 7 генов микроРНК в образцах ДНК 50 больных скПКР

№	124a-1	124a-2	124a-3	9-1	9-3	34b/c	129-2	TNM	124a-1	124a-2	124a-3	9-1	9-3	34b/c	129-2
1	+	+	+	+	—	+	—	T1N0M0	+	—	—	—	—	+	—
2	—	+	—	—	—	+	—	T1N0M0	+	—	+	—	—	+	—
3	+	+	+	+	+	—	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	+	—
4	—	+	+	—	+	+	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	+	—
5	—	+	+	—	—	—	—	T1N0M0	+	—	—	+	—	+	—
6	+	—	—	+	—	—	—	T1N0M0	—	+	—	—	—	+	—
7	—	—	+	—	+	+	—	T1N0M0	—	+	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	+	+	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	—	—
9	+	—	—	—	+	+	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	+	—
10	—	—	—	—	—	+	—	T1N0M0	—	—	—	—	+	—	—
11	—	+	—	—	—	—	—	T1N0M0	—	—	—	—	+	—	—
12	—	+	—	—	—	—	—	T1N0M0	—	+	—	—	—	—	—
13	—	+	—	+	—	—	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	—	—
14	—	+	—	+	—	—	—	T1N0M0	—	—	—	—	—	—	—
15	+	+	—	—	+	—	+	T1N0M0	—	—	—	—	—	—	—
16	+	+	—	—	—	—	—	T2N0M0	+	—	—	—	—	+	—
17	+	—	—	—	—	—	—	T2N0M0	—	+	+	—	+	+	—
18	+	+	—	—	+	+	—	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
19	—	—	—	+	—	—	—	T2N0M0	+	—	—	—	+	—	—
20	+	—	+	—	—	+	—	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	+	—	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
22	—	—	—	—	—	—	—	T2N0M0	—	—	—	+	+	—	—
23	+	—	+	+	+	+	+	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—	—	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
25	—	+	+	—	—	—	+	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
26	—	+	—	+	—	—	+	T2N0M0	—	—	—	—	—	—	—
27	+	—	+	—	—	+	+	T1N1M0	+	+	—	—	—	—	—
28	+	—	+	+	+	+	+	T3N1M0	+	—	—	—	—	—	—
29	—	+	+	+	+	+	+	T3N1M0	+	—	—	—	—	—	+
30	+	—	—	—	+	+	+	T3N1M0	—	+	—	—	—	—	—
31	+	—	+	—	—	+	+	T1N1M0	—	+	—	—	+	+	—
32	+	+	—	—	+	+	—	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
33	+	+	—	+	—	—	—	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
34	—	+	—	—	—	—	—	T3N1M0	—	—	—	—	+	—	—
35	+	+	+	+	+	+	+	T3N1M0	—	—	—	—	—	—	—
36	+	+	+	—	—	+	+	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
37	—	+	+	—	—	+	+	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
38	+	+	—	+	—	+	+	T2N1M0	—	—	—	—	—	—	—
39	+	+	—	+	—	+	—	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
40	—	+	—	+	—	+	—	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
41	—	—	—	+	+	+	+	T3N0M0	—	+	—	—	—	—	—
42	—	+	+	—	+	—	—	T1N1M0	—	+	—	—	—	—	—
43	—	+	—	+	+	+	—	T3N1M0	—	—	—	—	—	—	—
44	+	—	+	+	—	—	—	T3N0M0	—	—	—	—	—	—	—
45	+	—	+	—	+	+	+	T3N0M1	—	—	—	—	—	—	—
46	+	—	—	+	+	+	+	T3N2M0	—	—	—	—	—	—	—
47	—	+	+	+	+	—	+	T4N2M1	+	—	—	—	—	+	—
48	—	+	—	—	+	+	—	T3N0M1	—	+	+	+	—	—	—
49	+	+	+	+	+	+	+	T2N1M1	—	—	—	—	—	—	—
50	—	+	+	—	—	—	—	T2N2M0	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Слева приведены номера пациентов и данные для образцов ДНК из опухолей, справа — для образцов условно-нормальной ткани; + соответствует наличию метилированного аллеля в образце ДНК ткани данного пациента, — соответствует отсутствию метилирования. По центру приведена TNM-классификация опухоли.

Таблица 2

Частота метилирования 7 генов микроРНК при скПКР

Ген микроРНК	<i>p</i> *	Опухолевая ткань, <i>n</i> (%)	Условно-нормальная ткань, <i>n</i> (%)	Ткань почки «доноров», <i>n</i> (%)
<i>miR-9-1</i>	<b>3,6•10<sup>-5</sup></b>	21/50 (42)	3/50 (6)	0/5 (0)
<i>miR-9-3</i>	<b>0,0033</b>	21/50 (42)	7/50 (14)	0/5 (0)
<i>miR-34b/c</i>	<b>0,00027</b>	29/50 (58)	11/50 (22)	0/5 (0)
<i>miR-124a-1</i>	<b>0,0026</b>	25/50 (50)	9/50 (18)	0/5 (0)
<i>miR-124a-2</i>	<b>8,3•10<sup>-5</sup></b>	30/50 (60)	10/50 (20)	1/5 (20)
<i>miR-124a-3</i>	<b>3,6•10<sup>-5</sup></b>	21/50 (42)	3/50 (6)	0/5 (0)
<i>miR-129-2</i>	<b>3•10<sup>-6</sup></b>	19/50 (38)	1/50 (2)	0/5 (0)

Примечание. Условно-нормальной ткани соответствует гистологически неизменная ткань пациентов. «Доноры» соответствуют постмортальным лицам без онкопатологии в анамнезе. Указаны процент и доля образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован от общего количества образцов (*n* = 50). Здесь и в табл. 4: статистически значимые величины *p* даны жирным шрифтом.

теризуется высоким значением специфичности — 88% (чувствительность 72%). Среди систем из 4 генов с наибольшей суммой чувствительности и специфичности выбрана система № 7 (*miR-9-1*, *34b/c*, *124a-3*, *129-2*), которая имеет наиболее высокие показатели AUC (0,84) и чувствительности (88%), а система № 5 (*miR-9-3*, *34b/c*, *124a-2*, *129-2*) — наиболее высокую специфичность (94%).

Ассоциация метилирования с прогрессией скПКР и прогностические системы маркеров метастазирования. Профиль гиперметилирования 5 исследованных нами генов ассоциируется с клинико-гистологическими характеристиками опухолей, которые связаны с прогрессией скПКР (табл. 4). Так, гиперметилирование генов *miR-129-2* и *-9-1* ассоциируется с увеличенным размером опухоли, *miR-34b/c* и *-129-2* — с более поздней стадией скПКР, *miR-129-2* — с пониженной степенью дифференцировки клеток опухоли. Гиперметилирование 3 генов, *miR-129-2*, *-9-3*, и *-124a-3*, ассоциируется с появлением метастаз в лимфатических узлах и удаленных органах (см. табл. 4).

Мы исследовали возможность использования систем маркеров, основанных на гиперметилировании генов микроРНК, для прогнозирования метастазирования. Рассмотрены 3 гена (*miR-9-3*, *-124a-3* и *-129-2*), частота гиперметилирования которых статистически значимо или маргинально значимо повышена при метастазировании (см. табл. 4). Оказалось, что среди систем из 1 гена наилучшими показателями обладает система на основе гена

Таблица 4

Ассоциация гиперметилирования генов микроРНК в образцах опухолевой ткани с клинико-гистологическими характеристиками

Показатель	Ген микроРНК	Клинико-гистологический показатель	<i>p</i>
Размер опухоли	<i>miR-9-1</i>	T1 vs T3/T4	0,0922
	<i>miR-129-2</i>	T1 vs T3/T4	<b>0,0354</b>
Стадия рака	<i>miR-34b/c</i>	I+II vs III + IV	<b>0,0475</b>
	<i>miR-129-2</i>	I+II vs III + IV	<b>0,0028</b>
Дифференцировка	<i>miR-129-2</i>	nd + md vs ld	<b>0,0045</b>
Метастазирование	<i>miR-124a-3</i>	N0/M0 vs N1-2/M1	0,0661
	<i>miR-9-3</i>	N0/M0 vs N1-2/M1	<b>0,0309</b>
	<i>miR-129-2</i>	N0/M0 vs N1-2/M1	<b>0,0016</b>

*miR-129-2*: значения чувствительности и специфичности составили 75 и 79% соответственно (табл. 5). Система из 2 генов, которая включает *miR-129-2* и дополнительно *miR-9-3*, характеризуется повышением чувствительности до 94% и понижением специфичности до 59% по сравнению с системой из 1 гена. Система из 3 генов, связанных с метастазированием, показала 100% чувствительность и низкую специфичность (47%).

Обсуждение. Результаты гиперметилирования 7 изученных генов микроРНК (*miR-9-1*, *9-3*, *34b/c*, *124a-1*, *124a-2*, *124a-3* и *129-2*), полученные в данной работе, указывают на онкосупрессорную функцию этих микроРНК при скПКР. Из 7 генов микроРНК, исследованных нами, ранее в литературе упоминалось гиперметилирование при скПКР только для четырех из них. Так, ранее при скПКР показано гиперметилирование гена *miR-124a-3* [13, 14]; для генов *miR-9-1* и *miR-9-3* также отмечено гиперметилирование, ассоциированное с уменьшением экспрессии этих генов [10]. В работе [15] указано, что частота метилирования гена *miR-34b/c* достигает 100% при скПКР. Полученные нами данные для этих 4 генов хорошо согласуются с указанными результатами.

Известно, что онкосупрессорные свойства *miR-9* проявляются подавлением ядерного фактора каппа-В и транскрипционных факторов FoxO, и подавление этой микроРНК связано с метастазированием [10], что согласуется с нашими результатами. МикроРНК *miR-34b/c* проявляет онкосупрессорные свойства путем подавления онкогенов с-MET и циклинзависимой киназы 4, как показано ранее при раке кишечника, а при эпителиальном

Таблица 3

Потенциально диагностические системы маркеров — генов микроРНК с наибольшей суммой чувствительности и специфичности

Система	Набор генов микроРНК	AUC (95% CI)	Критерий отсеечения	Sen	Sp	PV	NV
№ 1	<i>9-1</i> ; <i>124a-3</i>	0,78 (0,703—0,861)	1/2	0,660	0,900	0,868	0,726
№ 2	<i>9-1</i> ; <i>9-3</i> ; <i>124a-3</i>	0,81 (0,732—0,891)	1/3	0,800	0,800	0,800	0,800
№ 3	<i>9-1</i> ; <i>124a-3</i> ; <i>129-2</i>	0,81 (0,742—0,891)	1/3	0,720	0,880	0,857	0,759
№ 4	<i>9-1</i> ; <i>124a-1</i> ; <i>124a-3</i> ; <i>129-2</i>	0,83 (0,764—0,912)	1/4	0,840	0,760	0,778	0,826
№ 5	<i>9-3</i> ; <i>34b/c</i> ; <i>124a-2</i> ; <i>129-2</i>	0,83 (0,752—0,909)	2/4	0,660	0,940	0,917	0,734
№ 6	<i>9-1</i> ; <i>9-3</i> ; <i>124a-3</i> ; <i>129-2</i>	0,83 (0,762—0,910)	1/4	0,820	0,780	0,788	0,812
№ 7	<i>9-1</i> ; <i>34b/c</i> ; <i>124a-3</i> ; <i>129-2</i>	0,84 (0,778—0,920)	1/4	0,880	0,720	0,759	0,857

Примечание. Здесь и в табл. 5: показаны значения площади под кривой (AUC) в виде среднего и 95% доверительного интервала (95% CI), оптимальный критерий отсеечения, а также значения чувствительности (Sen) и специфичности (Sp), положительное (PV) и отрицательное (NV) предсказательные значения.

Таблица 5

**Характеристики прогностических систем маркеров метастазирования при скПКР**

Система генов	AUC (95% CI)	Критерий отсечения	Sen	Sp	PV	NV
129-2	0,772 (0,712—0,936)	1/1	0,750	0,794	0,632	0,871
9-3; 129-2	0,824 (0,712—0,936)	1/2	0,938	0,588	0,517	0,952
124a-3; 129-2	0,783 (0,653—0,913)	1/2	0,875	0,588	0,500	0,909
9-3; 124a-3	0,745 (0,608—0,882)	1/2	0,875	0,500	0,452	0,895
9-3; 124a-3; 129-2	0,824 (0,715—0,933)	1/3	1,000	0,471	0,471	1,000

раке яичников *miR-34b/c* подавляет с-MET и ингибирует пролиферацию, подвижность и инвазию клеток [9]. В литературе также упоминается ассоциация между статусом метилирования гена *miR-124a-3* и размером опухоли скПКР [13]; однако в указанной работе не обнаружено связи с метастазированием. В нашем исследовании обнаружено маргинально значимое ( $p = 0,0661$ ) различие в метилировании *miR-124a-3* между образцами от пациентов с наличием и отсутствием метастазирования. Таким образом, из полученных нами данных можно заключить, что связь с наибольшим количеством клинических параметров скПКР проявляет ген *miR-129-2*. Связь гиперметилирования этого гена с метастазированием при скПКР показана нами впервые, и этот ген можно выделить как новый маркер прогноза метастазирования при скПКР.

Основываясь на полученных результатах относительно профиля метилирования генов микроРНК, мы составили различные системы маркеров скПКР. Отобранные нами маркеры преимущественно гены *miR-9-1*, *124a-3* и *129-2* и системы маркеров (№ 1—3) позволяют выявлять скПКР с чувствительностью до 80% и специфичностью до 90%. Из генов, гиперметилирование которых связано с метастазированием (*miR-129-2*, *miR-9-3*, *miR-124a-3*), нами составлены и охарактеризованы 3 прогностические системы маркеров. Ранее в литературе не упоминались такие системы маркеров, основанные на гиперметилировании генов микроРНК. Описаны лишь системы, основанные на измерении уровня экспрессии микроРНК, которые позволяют выявлять опухолевые клетки, в том числе при анализе сыворотки крови пациентов. Так, в работе [16] показано, что система из *miR-378* и *miR-451*, исследованная на выборке из 90 образцов, позволяет выявлять рак почки с чувствительностью 81% и специфичностью 83% (AUC 0,860), а система из *miR-193a-3p*, *-362*, *-572*, *-28-5p* и *-378*, исследованная на выборке из 79 образцов, характеризуется значением AUC, равным 0,796 (95% CI: 0,724—0,867) [17]. В некоторых исследованиях приводятся системы, состоящие только из 1 микроРНК: *miR-210* позволяет выявлять скПКР с чувствительностью 81% и специфичностью 79,4% (AUC 0,874), что показано на выборке из 132 образцов [18], а *miR-451* — с чувствительностью 81% и специфичностью 77% (AUC 0,77; на выборке из 125 образцов) [16].

Из полученных нами результатов следует, что гиперметилирование генов микроРНК может быть основой для эффективной системы биомаркеров для диагностики рака почки. Гиперметилирование гена *miR-129-2* — новый эффективный маркер предсказания метастазирования (чувствительность 75% и специфичность 79%, AUC 0,77), ко-

торый можно сочетать с маркерами, выявленными в других исследованиях.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках плановой темы ФГБНУ «НИИОПП» (0520-2014-0030) и финансировано Федеральным агентством научных организаций (ФАНО).

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 5—10, 13—18 см.  
REFERENCES)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году*. М.: МНИОИ имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2016.
- Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика*. 2013; 49(7): 896—901.
- Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Ермилова В.Д., Казубская Т.П. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечноклеточном раке; связь с прогрессией рака. *Генетика*. 2013; 49(3): 366—75.

REFERENCES

- Randall J.M., Millard F., Kurzrock R. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art. *Cancer Metastasis Rev.* 2014; 33(4): 1109—24.
- Rini B.I., Campbell S.C., Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* (London, England). 2009; 373(9669): 1119—32.
- Gupta K., Miller J.D., Li J.Z., Russell M.W., Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat. Rev.* 2008; 34(3): 193—205.
- Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *State of the Oncological Care in Russia in 2015* [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2015 godu]. Moscow: MNIIOI imeni P.A. Gertsena — filial FGBU «NMIRTs» Minzdrava Rossii; 2016. (in Russian)
- Jonasch E., Gao J., Rathmell W.K. Renal cell carcinoma. *BMJ*. 2014; 349: g4797.
- Mack S.C., Hubert C.G., Miller T.E., Taylor M.D., Rich J.N. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nat. Neurosci.* 2016; 19(1): 10—9.
- Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G., Gilliland F.D., Baylin S.B., Herman J.G. et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000; 60(21): 5954—8.
- Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One*. 2013; 8(1): e54398.
- Wong K.Y., Yu L., Chim C.S. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family. *Epigenomics*. 2011; 3(1): 83—92.
- Hildebrandt M.A., Gu J., Lin J., Ye Y., Tan W., Tamboli P. et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010; 29(42): 5724—8.
- Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Braga E.A. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Генетика*. 2013; 49(7): 782—6. (in Russian)
- Beresneva E.V., Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Ermilova V.D., Kazubskaya T.P. et al. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma; involvement in cancer progression. *Генетика*. 2013; 49(3): 320—8. (in Russian)
- Gebauer K., Peters I., Dubrowskaja N., Hennenlotter J., Abbas M., Scherer R. et al. Hsa-mir-124-3 CpG island methylation is associated with advanced tumours and disease recurrence of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2013; 108(1): 131—8.
- Peters I., Dubrowskaja N., Abbas M., Seidel C., Kogosov M., Scherer R. et al. DNA methylation biomarkers predict progression-

- free and overall survival of metastatic renal cell cancer (mRCC) treated with antiangiogenic therapies. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91440.
15. Vogt M., Munding J., Grüner M., Liffers S.T., Verdoodt B., Hauk J. et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch*. 2011; 458(3): 313—22.
16. Redova M., Poprach A., Nekvindova J., Iliev R., Radova L., Lakomy R. et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J. Transl. Med*. 2012; 10: 55.
17. Wang C., Hu J., Lu M., Gu H., Zhou X., Chen X. et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci. Rep*. 2015; 5: 7610.
18. Zhao A., Li G., Péoc'h M., Genin C., Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol*. 2013; 94(1): 115—20.

Поступила 18.07.16  
Принята к печати 01.08.16

## ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.2-092:612.115]-074

Иванец Т.Ю., Кесслер Ю.В., Колодко В.Г.

### РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ДЛЯ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ В ДИНАМИКЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ ПОСЛЕ ЭКО И ПЭ

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации, 117997, Москва

*Представлены результаты обследования 1140 женщин со спонтанной одноплодной беременностью и 307 женщин с одноплодной беременностью, наступившей в результате проведения программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов в полость матки (ЭКО и ПЭ). Пациентки были распределены на 6 подгрупп в зависимости от гестационного срока (4—8, 9—13, 14—20, 21—27, 28—34 и 35—40 нед). Исследовано 16 основных гематологических показателей. Референсные интервалы (2,5 и 97,5 перцентили) для разных сроков физиологической беременности были вычислены согласно рекомендациям Международной Ассоциации клинической химии (IFSS) по статистической обработке референсных значений. Показано, что при оценке результатов клинического анализа крови у беременных женщин необходимо использовать специальные референсные интервалы. Сравнительный анализ гематологических показателей в динамике беременности у здоровых женщин и у пациенток программы ЭКО и ПЭ показал, что интерпретацию результатов обследования у обеих групп пациенток можно проводить с использованием референсных интервалов, полученных для спонтанной беременности. Исключение составили общее количество лейкоцитов и количество тромбоцитов в сроке 4—8 нед.*

**Ключевые слова:** гематологические показатели; референсные интервалы; беременность; ЭКО.

**Для цитирования:** Иванец Т.Ю., Кесслер Ю.В., Колодко В.Г. Референсные интервалы для основных параметров клинического анализа крови в динамике физиологической беременности. Сравнительный анализ с беременностью после ЭКО и ПЭ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (1):18-24

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-18-24>

Ivanetz T.Yu., Kessler Yu.V., Kolodko V.G.

THE REFERENCE RANGES FOR MAIN PARAMETERS OF CLINICAL BLOOD ANALYSIS IN DYNAMICS OF PHYSIOLOGICAL PREGNANCY. A COMPARATIVE ANALYSIS WITH PREGNANCY AFTER EXTRA CORPORAL FERTILIZATION AND EMBRYO TRANSFER INTO UTERINE CAVITY

The academician V.I. Kulakov research center of obstetrics, gynecology and perinatology of Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia

*The article presents the results of examination of 1140 women with spontaneous monochorionic pregnancy occurred and 307 women with monochorionic pregnancy occurred as a result of implementation of program of extra-corporal fertilization and transfer of embryos into uterus. The female patients were distributed to 6 subgroups depending on gestation period (4-8, 9-13, 14-20, 21-27, 28-34, 35-40 weeks). The 16 main hematologic indices were analyzed. The reference intervals (2.5 and 97.5 percentiles) for various periods of physiological pregnancy were calculated according IFSS guidelines concerning statistical processing of reference values. It is demonstrated that at evaluation of results of clinical analysis of blood in pregnant women it is necessary to apply special reference intervals. The comparative analysis of hematologic indices in dynamics of pregnancy of healthy women and in female patients of the program of extra-corporal fertilization and transfer of embryos into uterus demonstrated that interpretation of results of*

*examination in both groups of female patients can be implemented using reference intervals derived for spontaneous pregnancy. The exclusion of this rule included total number of leukocytes and number of thrombocytes in period of 4-8 weeks.*

**Key words:** *hematological indices; reference intervals; pregnancy; pregnancy; extra-corporeal fertilization.*

**For citation:** *Ivanetz T.Yu., Kessler Yu.V., Kolodko V.G. The reference ranges for min parameters of clinical blood analysis in dynamics of physiological pregnancy. A comparative analysis with pregnancy after extra corporal fertilization and embryo transfer into uterine cavity. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 18-24. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-18-24>*

**For correspondence:** *Ivanetz T.Yu., candidate of medical sciences, head of the laboratory. e-mail: [t\\_ivanets@oparina4.ru](mailto:t_ivanets@oparina4.ru)*

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

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

Received 20.06.2016  
Accepted 01.07.2016

Во время беременности в организме женщины происходят многочисленные гематологические изменения [1, 2]. Большинство из них начинается вскоре после зачатия и продолжается до конца беременности. Считают, что они направлены на физиологическую адаптацию и создание оптимальных условий жизнедеятельности матери и плода [1, 3].

Объем плазмы крови увеличивается, начиная с 6-й недели беременности, и к 28—30-й неделе его прирост составляет в среднем 1250 мл. Продукция эритроцитов возрастает с меньшей скоростью, в результате наблюдают относительное снижение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в крови [4]. При нормальной беременности объем плазмы возрастает на 25—50% по сравнению с исходным уровнем, а общий объем крови увеличивается к родам на 40%, что подготавливает материнский организм к потенциальной кровопотере, связанной с родами [5]. Отмечено, что осложнения беременности, приводящие к рождению маловесного к сроку гестации или нежизнеспособного плода, ассоциируются в том числе с недостаточным увеличением объема плазмы [1].

Во время беременности происходит увеличение количества лейкоцитов, в основном за счет фракции нейтрофилов [6, 7], умеренно увеличивается абсолютное и относительное количество моноцитов [8], при этом незначительно снижаются абсолютное и относительное количество лимфоцитов, а абсолютные и относительные значения эозинофилов и базофилов не меняются [6, 7]. Также в течение физиологической беременности можно наблюдать повышенное разрушение тромбоцитов из-за активации протромботических процессов. Это приводит к постепенному снижению общего количества тромбоцитов в периферической крови, росту количества более крупных молодых форм тромбоцитов и, как следствие, к увеличению среднего объема тромбоцитов [7, 9].

Таким образом, изменение значений гематологических параметров у беременных диктует потребность в определении референсных интервалов для данной группы пациенток. Как правило, референсные интервалы для многих лабораторных параметров приводят для здоровых мужчин и здоровых небеременных женщин. Однако во время беременности претерпевают изменения многие биологические маркеры, поэтому интерпретацию результатов лабораторного обследования, основанная на таких референсных значениях, нужно проводить с большой осторожностью [10]. Кроме того, внедрение новых лабораторных методов, разнообразие применяемых методик определения и производимая в последнее время переоценка «нормальных значений» требуют периодической коррекции референсных интервалов [11].

Согласно рекомендациям Международной Ассоциации клинической химии (IFSS) и Института клинических лабораторных стандартов (CLSI) каждая лаборатория должна определить собственные валидированные референсные интервалы исследуемых параметров, используя конкретные методы и лабораторное оборудование [11—14].

Другой аспект проблемы референсных значений для беременных — широкое развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и увеличение процента беременностей, полученных в результате проведения программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов в полость матки (ЭКО и ПЭ). Один из наиболее важных этапов реализации программы ЭКО — процедура стимуляции суперовуляции, при которой используют большие дозы активных гормональных препаратов. В ответ на действие этих препаратов в яичниках созревает большое число фолликулов, продуцирующих стероидные гормоны — эстрадиол и прогестерон. Концентрация стероидных гормонов в циклах стимуляции суперовуляции во много раз выше, чем в спонтанных циклах, что не может не оказывать влияния, как на процесс имплантации, так и на процесс раннего эмбриогенеза. Гормональная регуляция и течение беременности, наступившей в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий, имеют ряд особенностей по сравнению со спонтанной беременностью [15]. Кроме того, в современной литературе есть указания на то, что течение беременности, наступившей в результате программы ЭКО и ПЭ (далее ЭКО беременность), сопровождается повышенной частотой развития осложнений беременности и родов [16]. Возможно, сравнительный анализ лабораторных показателей при спонтанной и ЭКО беременности позволит вплотную подойти к проблемам повышения эффективности программы ЭКО, а также разработать адекватный алгоритм лабораторного мониторинга беременности, полученной в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий.

Цель данной работы — определение собственных референсных значений для гематологических показателей у здоровых беременных женщин, оценка влияния гестационного возраста на данные параметры и их сопоставление при физиологической и ЭКО беременности.

**Материал и методы.** В исследование были включены 1140 женщин в возрасте 21—39 лет со спонтанной неосложненной одноплодной беременностью и 307 пациенток с одноплодной беременностью, наступившей в результате проведения программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов в полость матки, в возрасте 21—41 года, наблюдавшихся в НЦАГиП им. В.И. Кулакова. Пациентки были распределены на 6 подгрупп в зависимости от гестационного срока (табл. 1 и 2). В контрольную группу вошли 174 здоровые небеременные женщины в возрасте 19—39 лет, в группу сравнения — 52 небеременные женщины с бесплодием в анамнезе.

Кровь брали утром натощак из периферической вены в закрытые вакуумные системы S-Monovette фирмы Sarstedt (Германия) с антикоагулянтом  $K_3$ ЭДТА. Во избежание возможного свертывания сразу после взятия кровь в пробирке тщательно перемешивали путем многократного покачивания.

Исследования проводили на гематологических автома-

Таблица 1

**Обследованные женщины с физиологической беременностью**

Группа	Количество
Небеременные женщины (контроль)	174
Беременные, группа (нед)	
1 (4—8)	168
2 (9—13)	123
3 (14—20)	179
4 (21—27)	205
5 (28—34)	288
6 (35—40)	177

Таблица 2

**Обследованные женщины с беременностью после ЭКО и ПЭ**

Группа	Количество
Небеременные женщины с бесплодием (группа сравнения)	52
Беременные, группа (нед)	
1 (4—8)	58
2 (9—13)	51
3 (14—20)	47
4 (21—27)	58
5 (28—34)	44
6 (35—40)	49

тических анализаторах фирмы Sysmex XT 2000i и 4000i (Sysmex, Япония) методом проточной цитофлуорометрии. Определяли следующие параметры: количество лейкоцитов (WBC), эритроцитов (RBC) и тромбоцитов (PLT), концентрация гемоглобина (HGB), гематокрит (HCT), а так же абсолютные и относительные значения нейтрофилов (NEU), лимфоцитов (LYM), моноцитов (MON), эозинофилов (EO) и базофилов (BASO). Определение СОЭ проводили на автоматическом анализаторе Roller R20PN (Alifax, Италия).

Для статистической обработки данных использовали пакет статистических программ MedCalc 14.8.1. Проверяли вариационные ряды на нормальность с помощью теста Шапиро—Уилка. Для каждого показателя рассчитывали среднее значение ( $X_{cp}$ ), медиану ( $P_{50}$ ) и референсные интервалы (2,5 и 97,5 перцентили) в соответствии с требованиями CLSI C23-A2 [10, 14]. Сравнивали ряды с использованием непараметрических методов (U-тест Манна—Уитни). Критерием статистической достоверности считали  $p < 0,05$ .

**Результаты. Гематологические показатели в динамике физиологической беременности.** Основные гематологические параметры, полученные при обследовании здоровых беременных женщин на сроках 4—8, 9—13, 14—20, 21—27, 28—34, 35—40 нед, представлены в табл. 3. Достоверность различий между группами показана в табл. 4.

Средние значения количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита в крови здоровых беременных женщин с неосложненным течением беременности снижались, начиная со второй половины I триместра, и достигали минимальных значений

к 21—27-й неделе гестации. К родам было отмечено незначительное повышение данных показателей, но при этом они оставались достоверно ниже средних значений контрольной группы (см. табл. 3).

При оценке количества тромбоцитов в динамике беременности отмечали постепенное снижение средних значений с  $258 \cdot 10^9/\text{л}$  в I триместре до  $212 \cdot 10^9/\text{л}$  к концу III триместра. Нижняя граница референсного интервала перед родами составила  $118 \cdot 10^9/\text{л}$ .

При оценке скорости оседания эритроцитов верхняя граница референсного интервала составила от 19 мм/ч в I триместре до 44 мм/ч в сроке 35—40 нед.

Общее количество лейкоцитов повышалось с 1-х недель беременности. С конца II триместра средние значения в группах составили от 9,78 до  $10,22 \cdot 10^9/\text{л}$  (см. табл. 3), а референсные интервалы — от 6,0 до  $15,9 \cdot 10^9/\text{л}$ . Увеличение количества лейкоцитов происходило в основном за счет нейтрофилов. Их абсолютное и относительное число возрастало одновременно с общим количеством лейкоцитов. Также в динамике беременности отмечали повышение абсолютного количества моноцитов и снижение абсолютного количества лимфоцитов. Максимальные абсолютные значения количества моноцитов выявляли в III триместре. Не было обнаружено достоверных различий при оценке абсолютного количества базофилов и эозинофилов в контрольной группе и у беременных женщин, однако относительное число моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов и базофилов оказалось достоверно ниже, чем в контрольной группе, за счет лейкоцитоза и нейтрофилеза.

Проведенный статистический анализ полученных данных позволил рассчитать референсные интервалы для основных гематологических показателей в зависимости от срока физиологической беременности (см. табл. 3).

Таблица 3

**Среднее, медиана и 95% референсный интервал для гематологических показателей в динамике физиологической неосложненной беременности**

Показатель	Контроль	Группы беременных					
		1	2	3	4	5	6
<b>RBC, <math>10^{12}/\text{л}</math></b>							
Хср	4,32	4,3	4,10*	3,84*	3,69*	3,79*	3,92*
$P_{50}$	4,3	4,27	4,11*	3,81*	3,69*	3,78*	3,91*
$P_{2,5}$	3,94	3,65	3,46	3,26	3,15	3,22	3,27
$P_{97,5}$	4,87	4,92	4,7	4,56	4,28	4,37	4,63
<b>HGB, г/л</b>							
Хср	129	128	126*	117*	114*	116*	118*
$P_{50}$	129	130	125*	118*	114*	116*	119*
$P_{2,5}$	117	106	103	95	96	96	97
$P_{97,5}$	141	145	145	138	132	136	139
<b>HCT, %</b>							
Хср	38,3	36,8	35,6*	33,5*	33,0*	33,6*	34,4*
$P_{50}$	38,2	36,8	35,5*	33,7*	33,1*	33,7*	34,5*
$P_{2,5}$	33,8	31,9	29,6	28,2	28,6	28,4	29,5
$P_{97,5}$	42,4	41,2	40,7	38,5	37,5	38,7	39,5
<b>PLT, <math>10^9/\text{л}</math></b>							
Хср	251	258	239*	232*	233*	225*	212*
$P_{50}$	244	256	241*	225*	229*	219*	206*
$P_{2,5}$	178	175	165	141	161	133	118
$P_{97,5}$	406	395	368	363	341	348	340
<b>СОЭ, мм/ч</b>							
Хср	2,93	4,65*	6,16*	9,87*	12,45*	16,79*	19,48*

P <sub>50</sub>	2,5	3,00*	5,00*	8,00*	10,50*	15,00*	18,00*
P <sub>2,5</sub>	2	2	2	2	2,1	3	3,43
P <sub>97,5</sub>	8	19	16,87	27,2	33,85	39	43,58
NEU,%							
Хср	55,11	66,28*	67,93*	69,59*	71,07*	70,85*	69,66*
P <sub>50</sub>	56,2	65,20*	68,60*	69,60*	72,00*	71,20*	70,10*
P <sub>2,5</sub>	40,6	50,16	51,47	57,1	57,02	59,8	55,48
P <sub>97,5</sub>	72,8	83,08	79,7	81,85	80,6	79,33	79,28
NEU, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	3,47	5,53*	5,88*	6,46*	7,04*	7,24*	6,81*
P <sub>50</sub>	3,5	5,23*	5,61*	6,26*	7,03*	7,08*	6,73*
P <sub>2,5</sub>	1,64	2,71	2,65	2,93	3,68	3,96	3,34
P <sub>97,5</sub>	6,53	12,25	10,63	11,05	12,09	12,61	11,58
LYM,%							
Хср	33,82	24,25*	22,84*	21,12*	19,47*	19,23*	20,41*
P <sub>50</sub>	33,85	25,00*	22,80*	20,80*	19,00*	18,80*	19,60*
P <sub>2,5</sub>	19,7	10,9	11,84	13	12,02	10,87	12,54
P <sub>97,5</sub>	48,4	36,82	35,13	31,6	29,05	28,11	30,21
LYM, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	2,13	2,02*	1,98*	1,96*	1,93*	1,97*	2,00*
P <sub>50</sub>	2,11	2,01*	1,87*	1,87*	1,86*	1,87*	1,88*
P <sub>2,5</sub>	0,8	0,59	0,61	0,67	0,78	0,72	0,75
P <sub>97,5</sub>	4,34	4,43	4,69	4,27	4,36	4,47	4,41
MONO,%							
Хср	8,44	7,9	7,42*	7,06*	7,34*	8,14	8,58
P <sub>50</sub>	7,95	7,6	7,10*	7,00*	7,20*	8	8,4
P <sub>2,5</sub>	4,8	5,02	4,82	4,3	4,62	5,12	5,34
P <sub>97,5</sub>	13,8	13,52	12,24	10,11	11,62	12,38	13,4
MONO, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	0,53	0,66*	0,64*	0,66*	0,73*	0,83*	0,84*
P <sub>50</sub>	0,49	0,61*	0,58*	0,63*	0,70*	0,80*	0,81*
P <sub>2,5</sub>	0,19	0,27	0,25	0,22	0,3	0,34	0,32
P <sub>97,5</sub>	1,24	1,99	1,63	1,36	1,74	1,97	1,96
BASO,%							
Хср	0,41	0,31*	0,24*	0,22*	0,21*	0,22*	0,20*
P <sub>50</sub>	0,4	0,30*	0,20*	0,20*	0,20*	0,20*	0,20*
P <sub>2,5</sub>	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
P <sub>97,5</sub>	1,1	0,86	0,54	0,6	0,5	0,5	0,41
BASO, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
P <sub>50</sub>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
P <sub>2,5</sub>	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
P <sub>97,5</sub>	0,1	0,13	0,07	0,08	0,08	0,08	0,06
EO,%							
Хср	2,2	1,24*	1,57*	2,11*	1,90*	1,55*	1,13*
P <sub>50</sub>	1,7	1,00*	1,10*	1,20*	1,30*	1,00*	0,90*
P <sub>2,5</sub>	0,3	0,1	0,11	0,2	0,32	0,22	0,25
P <sub>97,5</sub>	7,6	3,78	7,4	9,55	9,93	7,36	3,65
EO, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	0,14	0,1	0,14	0,20*	0,19*	0,16	0,11
P <sub>50</sub>	0,11	0,08	0,09	0,11	0,13	0,1	0,09
P <sub>2,5</sub>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02
P <sub>97,5</sub>	0,68	0,56	0,99	1,29	1,49	1,17	0,53

\* — различие достоверно при  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой; Хср — среднее; P<sub>50</sub> — медиана; P<sub>2,5</sub>—P<sub>97,5</sub> — референсный интервал.

**Сравнительный анализ показателей клинического анализа крови при физиологической и ЭКО беременности.**

Следующим этапом работы стал сравнительный анализ гематологических показателей в группах женщин со спонтанной беременностью и беременностью после ЭКО. Полученные результаты представлены в табл. 5.

При сравнении контрольной группы (небеременные здоровые женщины) и группы сравнения (женщины с бесплодием) не выявлено различий ни по одному исследуемому показателю (см. табл. 3, 5).

В группе ЭКО динамика изменения количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита и СОЭ совпадала с таковой при физиологической беременности. Однако, начиная с конца I триместра, средние значения количества эритроцитов были достоверно ниже, чем при физиологической беременности (рис. 1). Также отмечали пониженный уровень гемоглобина во II триместре (рис. 2). При этом все значения данных показателей в группах укладывались в соответствующие физиологические референсные интервалы.

Количество тромбоцитов на 1-х неделях беременности (4—8 нед) у женщин после ЭКО было достоверно выше, чем у женщин с бесплодием (группа сравнения) и чем у здоровых беременных в эти же сроки (см. табл. 5). Это, скорее всего, связано с повышенным уровнем половых гормонов, обусловленным проведением ЭКО, и с активацией свертывающей системы. Для данного показателя в сроке 4—8 нед необходима коррекция референсного интервала, поскольку часть значений в группе ЭКО не уложилась в полученный референсный интервал для спонтанной беременности (рис. 3). Минимальные значения количества тромбоцитов, как и при спонтанной беременности, наблюдали на последних неделях гестации.

При оценке общего количества лейкоцитов, нейтрофилов (как относительного, так и абсолютного) и моноцитов (абсолютного) в динамике ЭКО беременности было показано, что значимые различия со спонтанной беременностью отмечали только в I триместре. Так, на 4—8-й неделе беременности у пациенток ЭКО уровень лейкоцитов, абсолютное число нейтрофилов и моноцитов были выше, чем при спонтанной беременности в 1,3, в 1,4 и в 1,2 раза соответственно, что, по-видимому, связано с сохраняющимся влиянием стимуляции суперовуляции и повышенным уровнем половых гормонов. В дальнейшем отмечали одинаковую динамику данных показателей в обеих группах беременных. Не выявлено достоверных различий при оценке абсолютного количества базофилов и эозинофилов (рис. 4).

Абсолютное количество лимфоцитов (средние значения) было выше в группах ЭКО на всех сроках не только по сравнению со спонтанной беременностью, но и по сравнению с исходным состоянием (группа сравнения) в отличие от здоровых беременных. Несмотря на такое разнонаправленное изменение, все значения данного показателя укладывались в референсные интервалы для физиологической беременности.

**Обсуждение.** Лабораторное обследование, проводимое в течение беременности, направлено на исключение патологических процессов, способных повлиять на состояние матери и плода. Корректные референсные интервалы необходимы клиницистам для

**Достоверность различия значений гематологических показателей между группами пациенток с физиологической беременностью**

Группы	RBC	HGB	HCT	PLT	WBC	NEU абс	LYM абс	MONO абс	BASO абс	EO абс
Контроль/1	NS	NS	NS	NS	*	*	*	*	NS	NS
Контроль/2	*	*	*	NS	*	*	*	*	NS	NS
Контроль/3	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
Контроль/4	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
Контроль/5	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
Контроль/6	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
1/2	*	*	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
1/3	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS
1/4	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
1/5	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
1/6	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS
2/3	*	*	*	NS	*	*	NS	NS	NS	NS
2/4	*	*	*	NS	*	*	NS	*	NS	NS
2/5	*	*	*	*	*	*	NS	*	NS	NS
2/6	*	*	NS	*	*	*	NS	*	NS	NS
3/4	*	*	NS	NS	*	*	NS	*	NS	NS
3/5	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	*	NS	NS
3/6	NS	NS	NS	*	*	*	NS	*	NS	NS
4/6	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
4/6	*	*	*	*	NS	*	NS	*	NS	NS
5/6	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS

\*— различие достоверно при  $p < 0,05$ ; NS — различие недостоверно.

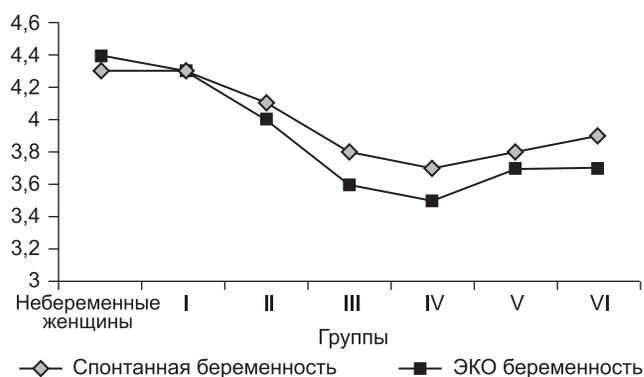


Рис. 1. Количество эритроцитов ( $10^{12}/л$ ) в динамике спонтанной и ЭКО беременности.

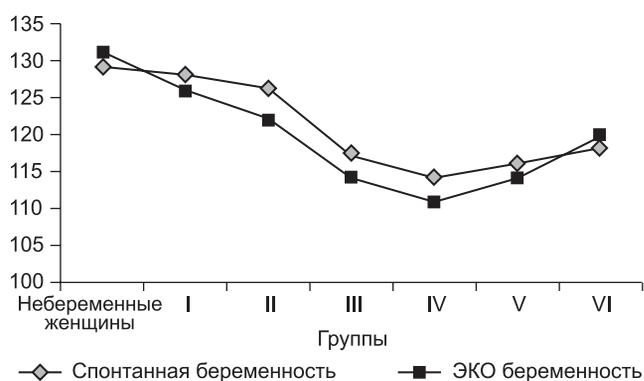


Рис. 2. Уровень гемоглобина (г/л) в динамике спонтанной и ЭКО беременности.

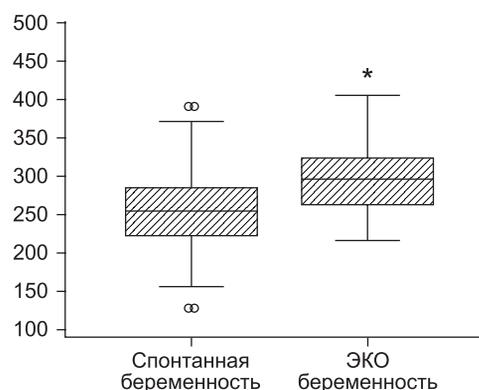


Рис. 3. Количество тромбоцитов ( $10^9/л$ ) в сроке 4—8 нед спонтанной и ЭКО беременности.

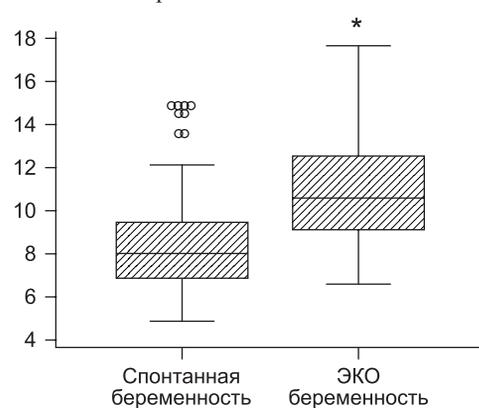


Рис. 4. Общее количество лейкоцитов ( $10^9/л$ ) в сроке 4—8 нед спонтанной и ЭКО беременности.

Таблица 5

**Показатели клинического анализа крови в динамике ЭКО беременности (среднее, медиана, стандартное отклонение, SD)**

Показатель	Группа сравнения	Группы беременных					
		1	2	3	4	5	6
<b>RBC, 10<sup>12</sup>/л</b>							
Хср	4,37	4,25	3,99*	3,64*	3,52*	3,67*	3,72*
P <sub>50</sub>	4,33	4,29	3,94	3,59	3,53	3,6	3,6
SD	0,4	0,26	0,28	0,34	0,27	0,28	0,32
<b>HGB, г/л</b>							
Хср	131,3	125,7	122,4*	113,9*	111,3*	113,9	120,4
P <sub>50</sub>	131,5	129	123	113	111	114,5	119
SD	7,9	11	7,6	9,7	9,1	12	8,1
<b>HCT, %</b>							
Хср	38,3	36,4	34,7	32,8	32	33,1	34,5
P <sub>50</sub>	38,2	36,6	35,1	32,7	32,4	33	33,9
SD	2,3	2,7	2,1	2,8	2,2	2,9	2,4
<b>PLT, 10<sup>9</sup>/л</b>							
Хср	250	296*	244	255*	255*	220	193*
P <sub>50</sub>	238	295	254	254	252	210	184
SD	49	45	57	46	62	56	48
<b>СОЭ, мм/ч</b>							
Хср	3,34	5,71	5,9	9,29	9,81	18,49	18,08
P <sub>50</sub>	2	3,5	3	9	8	16	16,5
SD	2,22	4,06	6,08	5,01	6,3	12,47	8,09
<b>WBC, 10<sup>9</sup>/л</b>							
Хср	6,31	10,96*	9,15*	9,49	10,33	10,22	9,58
P <sub>50</sub>	6,2	10,58	9,38	9,1	9,96	9,75	9,69
SD	1,5	2,63	1,48	1,72	2,11	2,81	1,6
<b>NEU, %</b>							
Хср	56,66	69,42*	64,78*	68,66	69,64	69,24	69,38
P <sub>50</sub>	56,8	70,2	65,2	69,7	69,85	70,3	68,2
SD	9,44	8,67	5,38	5,84	4,54	6,17	5,49
<b>NEU, 10<sup>9</sup>/л</b>							
Хср	3,58	7,61*	5,93*	6,52	7,19	7,08	6,65
P <sub>50</sub>	3,52	7,43	6,12	6,34	6,96	6,85	6,61
SD	0,14	0,23,	0,08	0,1	0,1	0,17	0,09
<b>LYM, %</b>							
Хср	33,26	22,15*	24,95	22,12	20,44	20,37	21,05
P <sub>50</sub>	33,75	21,8	24,6	21,3	19,7	20,1	21,2
SD	7,49	7	4,82	5,73	4,31	5,36	4,99
<b>LYM, 10<sup>9</sup>/л</b>							
Хср	2,1	2,43*	2,28*	2,10*	2,11*	2,08*	2,02*
P <sub>50</sub>	2,09	2,31	2,31	1,94	1,96	1,96	2,05
SD	0,11	0,18	0,07	0,1	0,09	0,15	0,08
<b>MONO, %</b>							
Хср	8,6	6,86*	7,48	7,2	7,51	8,13	8,68
P <sub>50</sub>	8,45	6,9	7,6	6,8	7,45	8,15	8,85
SD	2,34	1,21	1,46	1,41	1,55	2	1,64
<b>MONO, 10<sup>9</sup>/л</b>							
Хср	0,54	0,75*	0,68*	0,68	0,78	0,83	0,83
P <sub>50</sub>	0,52	0,73	0,71	0,62	0,74	0,79	0,86
SD	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03	0,06	0,03
<b>BASO, %</b>							
Хср	0,48	0,26*	0,28*	0,2	0,27	0,2	0,26
P <sub>50</sub>	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
SD	0,29	0,14	0,11	0,11	0,24	0,1	0,16

Продолжение табл. 5 см. на стр. 24

правильной интерпретации результатов клинического анализа и четкого разграничения физиологических изменений и патологических состояний в течение беременности.

Данные, полученные в ходе исследования, подтверждают ранее выявленную тенденцию к изменению основных гематологических показателей при неосложненной беременности [1, 2].

Снижение уровня гемоглобина и количества эритроцитов у беременных женщин требует осторожности при диагностировании анемий. Согласно рекомендациям ВОЗ (1989) диагноз анемии, требующей медикаментозной коррекции, ставится при уровне гемоглобина в I и III триместрах ниже 110 г/л (гематокрит ниже 33%), во II триместре ниже 105 г/л (гематокрит ниже 32%).

Физиологическая беременность сопровождается лейкоцитозом, при этом обычно отсутствуют клинические признаки инфекционно-воспалительных заболеваний [7]. Нейтрофилез объясняется повышением концентрации гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в течение беременности [17]. Слабый моноцитоз также характерен для нормальной беременности и ассоциируется с ростом уровня макрофагального стимулирующего фактора [8].

Гестационная тромбоцитопения (случайная тромбоцитопения беременных) составляет 75—80% всех тромбоцитопений во время беременности. В этой ситуации количество тромбоцитов редко опускается ниже 100•10<sup>9</sup>/л, но иногда отмечают падение значений до 70•10<sup>9</sup>/л [18]. Чаще всего (до 74% всех тромбоцитопений беременных) у беременных отмечают умеренную тромбоцитопению (случайную тромбоцитопению, количество тромбоцитов не менее 70•10<sup>9</sup>/л). Она не сопровождается выраженными клиническими симптомами и не связана с другими факторами риска. Хотя механизмы развития такой случайной тромбоцитопении беременных неизвестны, более высокого риска развития тромбоцитопении или кровотечения у детей, родившихся от этих матерей, не выявляют [19—21].

Значительное увеличение СОЭ во время беременности обусловлено в первую очередь повышением уровня плазменных глобулинов и фибриногена, и поэтому следует с осторожностью интерпретировать результаты определения СОЭ как маркера воспалительной реакции у беременных женщин. При оценке данного показателя необходимо учитывать гестационный возраст. Кроме того, была показана обратная зависимость СОЭ от концентрации гемоглобина [22].

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что референсные значения гематологических показателей, используемые в группе здоровых небеременных женщин, не подходят для интерпретации результатов клинического анализа крови у беременных. Кроме того, нужно учитывать, что референсные интервалы для большого количества лабораторных исследований оказываются метод-зависимыми. Так, в данной работе исследования проводили на гематологических анализаторах фирмы SYSMEX серии XT 2000i и 4000i (Япония) методом проточной цитофлуориметрии. В результате были сформированы референсные интервалы для 16 гематологических показателей в зависимости от срока физиологической беременности согласно правилам, регламентированным руководствами CLSI и IFCC. Полученные интервалы могут быть использованы в других клинико-диагностических лабораториях после соответствующей валидации согласно требованиям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI).

Продолжение табл. 5

BASO, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
P <sub>50</sub>	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
SD	0	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01
EO, %							
Хср	2	1,41	1,68	1,83	2,09	1,44	1,16
P <sub>50</sub>	1,66	0,8	1,5	1,3	1,4	1,15	1,1
SD	1,6	1,2	1,42	1,42	0,96	0,97	0,74
EO, 10 <sup>9</sup> /л							
Хср	0,13	0,15	0,15	0,17	0,22	0,15	0,11
P <sub>50</sub>	0,1	0,08	0,14	0,12	0,14	0,11	0,11
SD	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01

Примечание. \* — различия достоверны при  $p < 0,05$  при сравнении с физиологической беременностью в соответствующие сроки гестации.

Предполагается, что любая лаборатория может использовать референсные интервалы как свои собственные, если при тестировании 20 образцов крови пациентов со сходными клиническими характеристиками не более 2 результатов выходят за границы этих референсных интервалов [10, 13, 14].

Сравнительный анализ гематологических показателей в динамике беременности у здоровых женщин и у пациенток программы ЭКО и ПЭ показал, что интерпретацию результатов обследования у обеих групп пациенток можно проводить с использованием одинаковых референсных интервалов, полученных для неосложненной беременности. Исключение составили общее количество лейкоцитов и количество тромбоцитов в сроке 4—8 нед. Для этих показателей на данном сроке у пациенток программы ЭКО необходима коррекция референсных интервалов.

**Заключение.** Таким образом, для оценки гематологических показателей у беременных необходимо использовать референсные значения, рассчитанные для каждого гестационного возраста. Использование у беременных значений для небеременных женщин может привести к неправильной интерпретации клинического анализа крови. При лабораторном мониторинге беременности после ЭКО и ПЭ возможно использование референсных интервалов для физиологической беременности за исключением общего количества лейкоцитов и тромбоцитов на сроке 4—8 нед.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—14, 16—22  
см. REFERENCES)

15. Кулаков В.И., Леонов Б.В., ред. *Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические подходы)*. Руководство для врачей. М.: МИА; 2000.

REFERENCES

1. Gronowski A.M., ed. *Handbook of Clinical Laboratory Testing During Pregnancy*. New York: Humana Press; 2004.

2. Ramsay M. Normal values. In: James D.K., Steer P.J., eds. *High Risk Pregnancy: Management Options*. 4th ed. Saunders; 2011: 1385—6.

3. Maternal Physiological Changes During Pregnancy, Labor, and the Postpartum Period. In: Datta S., Kodali B.S., Segal S. *Obstetric Anesthesia Handbook*. 5th ed. Springer; 2010: 1—14.

4. Milman N., Byg K., Agger A. Hemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2000; 79: 89—98.

5. Hiss R.G. Evaluation of the anemic patient. In: Laros R.K., ed. *Blood Disorders in Pregnancy*. Philadelphia: Lea and Febiger; 1986: 1—18.

6. Kuhnert M., Strohmeier R., Stegmuller M., Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1998; 76: 147—51.

7. Pitkin R.M., Witte D.L. Platelet and leukocyte counts in pregnancy. *JAMA*. 1979; 242: 2696—8.

8. Tsakonas D.P., Nicolaides K.H., Tsakona C.P., Worman C.P. Changes in maternal plasma macrophage colony stimulating factor levels during normal pregnancy. *Clin. Lab. Haemat.* 1995; 17: 57—9.

9. Sill P.R., Lind T., Walker W. Platelet values during normal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1985; 92: 480—3.

10. Horowitz G.L., Altaie S., Boyd J.C., Ceriotti F., Gard U., Horn P. et al. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: C28-A3 Approved Guideline. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

11. Solberg H.E. Establishment and use of reference values. In: Burtis C.A., Aswood E.R., eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999.

12. Solberg H.E., Stamm D. IFCC recommendation: theory of reference values: Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Clin. Chim. Acta.* 1991; 202: 5—10.

13. Solberg H.E. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42: 710—4.

14. The National Committee for Clinical Laboratory standards. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Approved Guideline. 2nd ed. Pennsylvania: NCCLS; 2000.

15. Kulakov V.I., Leonov B.V., eds. *In Vitro Fertilization and its New Directions in the Treatment of Male and Female Infertility (theoretical approaches). Guidelines for Doctors [Ekstrakorporal'noe oplodotvorenie i ego novye napravleniya v lechenii zhenskogo i muzhskogo besplodiya (teoreticheskie podkhody)]*. Rukovodstvo dlya vrachej. Moscow: MIA; 2000. (in Russian)

16. Jauniaux E.R., Rizk B.R. *Pregnancy After Assisted Reproductive Technology*. Cambridge University Press; 2012.

17. Makinoda S., Mikuni M., Furuta I., Okuyama K. Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. *Eur. J. Clin. Invest.* 1995; 25: 877—9.

18. Rodger M., Sheppard D., Gandara E., Timmouth A. Haematological problems in obstetrics. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2015; 29(5): 671—84.

19. Boehlen F., Hohlfield P., Extermann P., Perneger T.V., de Moerloose P. Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. *Obstet. Gynecol.* 2000; 95: 29—33.

20. Burrows R.F., Kelton J.G. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 1463—6.

21. Saino S., Kekomaki R., Riikonen S., Teramo K. Maternal thrombocytopenia at term: a population-based study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2000; 79: 744—9.

22. Van den Broek N.R., Letsky E.A. Pregnancy and the erythrocyte sedimentation rate. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 2001; 108: 1164—7.

Поступила 20.06.16

Принята к печати 01.07.16

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.151.5-02:616.72-079.28]-085.273.53-074

Антропова И.П.<sup>1,2</sup>, Рейно Е.В.<sup>2</sup>, Юшков Б.Г.<sup>3,4</sup>

### КЛОТТИНГОВЫЕ ТЕСТЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ОЦЕНКЕ КОАГУЛЯЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НА ФОНЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ДАБИГАТРАНОМ ПОСЛЕ КРУПНЫХ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург;

<sup>2</sup>ГБУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи «Уральский институт травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина», 620014; г. Екатеринбург;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, 620049, г. Екатеринбург;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, г. Екатеринбург

*Крупные ортопедические операции сопряжены с высоким риском развития тромбоза глубоких вен нижних конечностей (ТГВ). Для антитромботической профилактики в настоящее время широко используются новые оральные антикоагулянты. Коагуляционные изменения на фоне действия прямого ингибитора тромбина дабигатрана исследовали у 30 пациентов, перенесших эндопротезирование коленного сустава (ЭКС). Определяли рутинные клоттинговые показатели, фибринопептид А (ФПА), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), Д-димер (Д-Д). Образцы крови отбирали до операции, через 30 мин, на 1, 3, 7 и 14-е сутки после ЭКС.*

*Показано, что рутинные клоттинговые тесты, а также определение Д-димера и РФМК не позволяют провести адекватную оценку коагуляционной активности у пациентов, перенесших крупную ортопедическую операцию. Концентрация специфического маркера фибринообразования ФПА остается повышенной не менее 2 нед после ЭКС, что свидетельствует о сохранении гиперкоагуляции и риска тромбоза. Прием дабигатрана этексилата в фиксированной дозе не исключает развития ТГВ, что подтверждает точку зрения о полезности индивидуализации антитромботической профилактики при использовании новых оральных антикоагулянтов.*

**Ключевые слова:** коагуляция; клоттинговые тесты, молекулярные маркеры, дабигатран; эндопротезирование коленного сустава.

**Для цитирования:** Антропова И.П., Рейно Е.В., Юшков Б.Г. Клоттинговые тесты и молекулярные маркеры в оценке коагуляционных изменений на фоне антитромботической профилактики дабигатраном после крупных ортопедических операций. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 25-30. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-25-30>

*Antropova I.P.<sup>1,2</sup>, Reino E.V.<sup>2</sup>, Yushkov B.G.<sup>3,4</sup>*

#### THE CLOTTING TESTS AND MOLECULAR MARKERS IN EVALUATING OF COAGULATION ALTERATIONS AGAINST THE BACKGROUND OF ANTI-THROMBOTIC PREVENTION BY DABIGATRAN AFTER LARGE ORTHOPEDIC OPERATIONS

<sup>1</sup>The Uralskii state medical university of Minzdrav of Russia, 620028 Yekaterinburg, Russia

<sup>2</sup>The center of specialized types of medical care "The V.D. Chaklin Uralskii institute of traumatology and orthopedics", 620014 Yekaterinburg, Russia

<sup>3</sup>The institute of immunology and physiology of the Uralskii branch of the Russian academy of sciences, 620049 Yekaterinburg, Russia

<sup>4</sup>The First President of Russia B.N. Yeltsin Uralskii federal university, 620002 Yekaterinburg, Russia

*The large orthopedic operations are associated with high risk of development of thrombosis of deep veins of lower extremities. Nowadays, new oral anticoagulants are widely applied for anti-thrombotic prevention. The coagulation alterations against the background of effect of Dabigatran, a direct inhibitor of thrombin were examined in 30 patients underwent endoprosthesis replacement of knee joint. The routine clotting indices, fibrinopeptid A, soluble fibrin-monomeric complexes, D-dimer. The samples of blood were selected before operation, after 30 minutes, and at 1st, 3d, 7th and 14th day after endoprosthesis replacement of knee joint. It is demonstrated that routine clotting tests and also detection of D-dimer and soluble fibrin-monomeric complexes provide no adequate evaluation of coagulation activity in patients underwent large orthopedic operation. The concentration of specific marker of fibrin formation of fibrinopeptid A continues to be increased no less than two weeks after endoprosthesis replacement of knee joint that testifies keeping hyper-coagulation and risk of thrombosis. The intake of Dabigatran etexilate in fixed dosage does not exclude development of thrombosis of deep veins of lower extremities that substantiates point of view concerning usefulness of individualization of anti-thrombotic prevention in case of application of new oral anti-coagulants.*

**Key words:** coagulation; clotting test; molecular marker; Dabigatran; endoprosthesis replacement of knee joint.

**Для корреспонденции:** Антропова Ирина Петровна, д-р биол. наук, ст. науч. сотр., ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет Минздрава России». ГБУЗ СО, «Центр специализированных видов медицинской помощи «Уральский институт травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина», e-mail: aip.hemolab@mail.ru

**For citation:** Antropova I.P., Reino E.V., Yushkov B.G. The clotting tests and molecular markers in evaluating of coagulation alterations against the background of anti-thrombotic prevention by Dabigatran after large orthopedic operations. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 25-30. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-25-30>

**For correspondence:** Antropova I.P., doctor of biological sciences, senior researcher. e-mail: [aip.hemolab@mail.ru](mailto:aip.hemolab@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to the orthopedic department №1 (the head - Piasatopulo K.I.) and the department of anesthesiology and intensive therapy (the head - Zhirova T.A.) of the V.D. Chaklin Uralskii institute of traumatology and orthopedics. The study was supported by the research program of the Russian Federation № 21506304014

Received 20.06.2016  
Accepted 01.07.2016

**Введение.** Обширные хирургические операции в ортопедии сопряжены с высоким риском развития тромбозомболических осложнений [1]. При эндопротезировании коленного сустава (ЭКС) в отсутствие антитромботической профилактики тромбоз глубоких вен (ТГВ) обнаруживается у 41—85% пациентов [2]. Существенное значение для развития патологических тромбов имеют индуцированные хирургическим вмешательством местные и общие реакции системы гемостаза, ключевая роль в которых принадлежит формированию тромбина [3, 4]. Поэтому приоритетным направлением в профилактике тромбозомболических осложнений у хирургических больных является использование фармакологических препаратов, снижающих уровень образования тромбина либо ингибирующих его активность [5, 6]. К последним относится новый оральный антикоагулянт дабигатран, который принимается в форме предшественника — дабигатрана этексилата и в организме преобразуется в активную форму [7]. Дабигатран специфически блокирует свободный и связанный с кровяным сгустком тромбин [8], при этом затормаживается превращение фибриногена (ФГ) в фибрин, а также активация тромбоцитов и факторов свертывания крови V, VIII и XI [9].

Рутинные коагуляционные тесты зависят от уровня тромбина и чувствительны к действию его ингибитора [10—12]. Однако эти тесты определяют только начальную скорость образования тромбина [13] и не дают представления о том, как развивается процесс свертывания на этапе распространения. Существенно дополнить оценку функционирования коагуляционной системы позволяет определение маркеров фибринообразования.

Формирование фибрина из ФГ можно разделить на 3 стадии: протеолитическое отщепление тромбином фибринопептидов А и В с образованием фибрин-мономеров, полимеризацию мономеров с образованием фибриновой сети, стабилизацию фибрина путем образования ковалентных связей под действием фактора XIIIa. Деградация фибрина происходит в процессе его лизиса плазмином, при этом образуются специфические продукты — Д-димеры (Д-Д) [14]. Таким образом, специфическим маркером фибринообразования является фибринопептид А (ФПА) [15], Д-димер отражает как конечную стадию формирования фибрина, так и активность его лизиса.

Цель работы — используя рутинные клоттинговые методы и молекулярные маркеры образования фибрина, изучить изменения в системе свертывания крови на фоне действия дабигатрана у пациентов, перенесших ЭКС.

**Материал и методы.** В исследование включено 30 пациентов (10 мужчин и 20 женщин) в возрасте  $61 \pm 8,5$  года. Критерий включения: поступление в ортопедическое отделение для проведения операции первичного тотального ЭКС. Критерии исключения: патология системы гемостаза, почечная, печеночная недостаточность, онкологические заболевания, антикоагулянтная или антиагрегантная терапия перед операцией. Получено одобрение локального этического комитета, а также информированное согласие всех обследованных.

С целью профилактики тромбозомболических осложнений все включенные в исследование пациенты принимали дабигатрана этексилат по стандартной схеме: первый прием 110 мг через 5 ч после операции, затем 1 раз в день 220 мг в течение 14 сут.

Всем пациентам до операции и через 2 нед после хирургического вмешательства проводилось ультразвуковое исследование вен нижних конечностей с целью выявления ТГВ. Наличие признаков геморрагических осложнений контролировалось в течение всего периода пребывания пациентов в стационаре.

Сбор крови пациентов выполняли за 1—2 сут до операции и на фоне профилактики дабигатраном в 1, 3, 7, 14-е сутки после ЭКС. Образцы венозной крови забирали утром натощак в специализированную пробирку с 3,2% (0,109 М) раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 с забираемой кровью и доставляли в лабораторию в течение 10—20 мин после венопункции.

Бедную тромбоцитами плазму получали при центрифугировании крови со скоростью 3000 об/мин (1200 г) в течение 15 мин на лабораторной центрифуге Sorwell («Thermo Electron LED GmbH», Германия). Рутинные клоттинговые исследования проводили непосредственно после получения бедной тромбоцитами плазмы. Для исследования молекулярных маркеров гемостаза, определяемых с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), образцы плазмы замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПТВ) и тромбиновое время (ТВ) определяли соответственно реактивами АРТТ-SP (liquid), PT-Fibrinogen HS PLUS, Thrombin Time (HemosIL, «Instrumentation Laboratory», США) на коагулометре ACL-200 («Instrumentation Laboratory», США). В качестве стандартной плазмы при определении ПТВ использовали Calibration plasma (HemosIL, «Instrumentation Laboratory», США), в качестве контроля — Normal Control и Low Abnormal Control (HemosIL, «Instrumentation Laboratory», США). Концентрацию ФГ определяли на коагулометре СА-50 («Sysmex», Япония) по Клаусу в модификации без разведения образца, использовали реактив Multifibren U («Siemens», Германия). Калибровку выполняли с помощью Fibrinogen Calibrators («Siemens», Германия) с диапазоном концентраций от 0,6 до 9,0 г/л.

Уровни ФПА определяли методом ИФА с наборами Imu-clone FPA ELISA («American Diagnostic Inc.», США). Для калибровки использовали стандартную коммерческую плазму (разведения 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Д-Д определяли методом ИФА с реактивами Technozym D-dimer ELISA («Technoclon», Австрия). Калибровочную кривую строили с использованием 5 стандартных растворов с концентрациями от 0 до 1500 нг/мл. Контроль осуществлялся на низком и высоком уровнях. Для ИФА использовали микропланшетный инкубатор/шейкер Stat Fax 2200, микропланшетный вошер Stat Fax 2600, фотометр Stat Fax 2100 («Awareness Technology

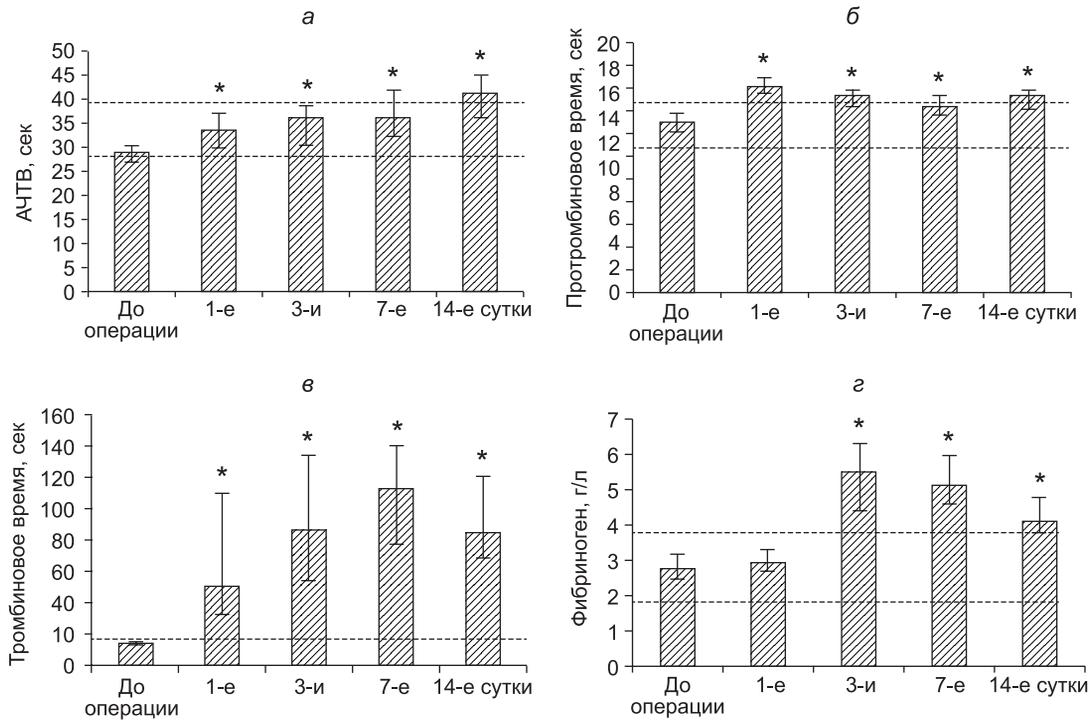


Рис. 1. Коагуляционные показатели до и после эндопротезирования коленного сустава на фоне антитромботической профилактики прямым ингибитором тромбина дабигатраном: АЧТВ (а), ПТВ (б), ТВ (в), концентрация ФГ (г).

Здесь и на рис. 2: \* — различия с исходным уровнем имеют статистическую значимость ( $p < 0,05$ ); пунктирными линиями обозначены границы референсной нормы.

Inc.), США). Уровень растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) оценивали с помощью фенантролинового теста («Технология-Стандарт», Россия).

Статистический анализ проводили в рамках правил ва-

риационной статистики. При сравнении послеоперационных показателей с исходными значениями использовали критерий Вилкоксона. Для оценки связи между показателями применялся корреляционный анализ с вычислением коэффициента

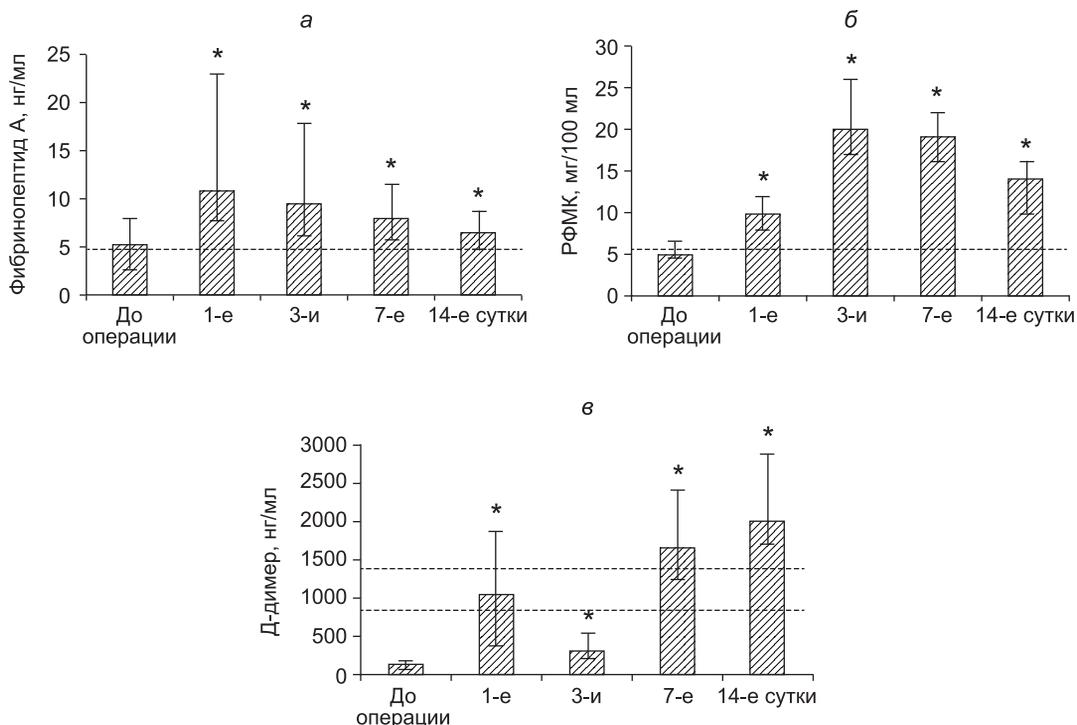


Рис. 2. Маркеры фибринообразования до и после эндопротезирования коленного сустава на фоне антитромботической профилактики прямым ингибитором тромбина дабигатраном: ФПА (а), РФМК (б), Д-димер (в).

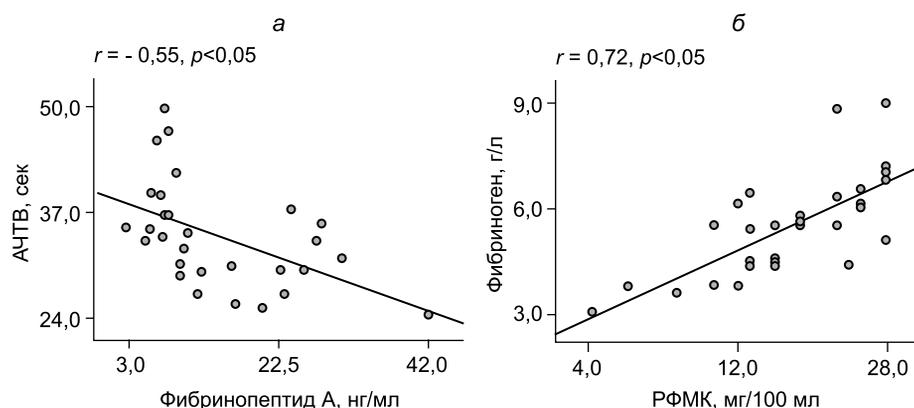


Рис. 3. Корреляция между показателями АЧТВ и ФПА в 1-е сутки после операции (а); между ФГ и РФМК в 3-и сутки после операции (б);  $r$  — коэффициент корреляции Спирмена.

корреляции Спирмена. Расчеты производили в программе Statistica version 6.0.

**Результаты.** До операции у всех обследованных пациентов значения рутинных коагуляционных тестов были в пределах референсной нормы. Спустя сутки после ЭКС наблюдалось значительное удлинение АЧТВ, ПТВ, ТВ, которое сохранялось до конца периода наблюдения (рис. 1, а–в). Наибольшие изменения показало ТВ, наименьшие — ПТВ.

Концентрация ФГ после операции существенно нарастала, достигала максимума к 3-м суткам и оставалась на повышенном уровне не менее 14 сут (рис. 1, з).

Концентрация ФПА в дооперационных пробах 19 (63,3%) пациентов, включенных в исследование, имела значения, превышающие референсную норму. Эти результаты согласуются с опубликованными ранее данными, которые показывают, что у пациентов, имеющих тяжелую патологию крупных суставов и нуждающихся в операции эндопротезирования, наблюдались значительные гиперкоагуляционные изменения в крови [16, 17]. Хирургическое вмешательство индуцировало значительное нарастание формирования ФПА, максимум которого приходился на ранний послеоперационный период (рис. 2, а). Спустя 2 нед после ЭКС концентрация ФПА возвращалась к исходному уровню, оставаясь тем не менее значительно выше референсной нормы

Послеоперационное повышение РФМК достигало максимума к 3-м суткам, тенденция к нормализации появлялась с 7-х суток, однако до конца периода наблюдения данный показатель был выше исходного уровня и референсной нормы (рис. 2, б).

Динамика концентрации Д-Д в послеоперационном периоде имела несколько фаз: значительное повышение в 1-е сутки, существенный сдвиг к нормализации к 3-м суткам, повторное повышение к 7-м суткам с сохранением высокого уровня не менее 2 нед после ЭКС (рис. 2, в).

Анализ связей между рутинными клоттинговыми тестами и маркерами фибринообразования показал значительную отрицательную корреляцию ФПА с АЧТВ в 1-е сутки после операции,  $r = -0,55, p < 0,05$  (рис. 3, а). С 3-х суток связь между данными показателями слабеет,  $r = 0,34, p = 0,07$ . Связь между ФПА и показателями ПТВ, ТВ и ФГ не выявлено.

Для РФМК значимой корреляции с АЧТВ, ПТВ, ТВ не обнаружено, однако выявлена сильная связь между РФМК и ФГ: на 3-и сутки  $r = 0,72, p < 0,05$  (рис. 3, б); на 7-е сутки  $r = 0,80, p < 0,05$ ; на 14-е сутки  $r = 0,69, p < 0,05$ .

Корреляция между концентрацией Д-Д и рутинными клоттинговыми тестами не обнаружено. Отсутствовали также существенные связи между ФПА, РФМК и Д-Д как до операции, ни после ЭКС.

Перед хирургическим вмешательством ни у одного из пациентов, включенных в исследование, не было выявлено тромбоза вен нижних конечностей. В послеоперационном периоде ТГВ развился у 2 (6,7%) больных. Признаков геморрагических осложнений не было выявлено ни у одного из обследованных лиц.

**Обсуждение.** Эндопротезирование крупных суставов сопряжено со значительной травматизацией костной, мышечной ткани, сосудов [18]. Экспозиция тканевого фактора поврежденными клетками эндотелия инициирует тромбообразование, активированные тромбоциты обеспечивают поверхность для усиления коагуляционного процесса, что приводит к массивной продукции тромбина и фибрина [19]. Высокая интенсивность коагуляции сопровождается активным потреблением факторов свертывания, вызывая существенное падение их уровня. Снижению компонентов системы гемостаза способствует также периоперационная дилуция инфузионными растворами. Исследование, проведенное N. Rosencher и соавт. [20], показало, что через 3 ч после ЭКС концентрация факторов II, V, VII, X падает на 30%, это приводит к удлинению тестов АЧТВ и ПТВ, которые возвращаются к норме между 1-ми и 3-ми сутками. В нашем исследовании также отмечено значительное удлинение рутинных клоттинговых показателей, но возвращения к исходному уровню не происходило, что связано с модулирующим действием дабигатрана.

Прямой ингибитор тромбина оказывает влияние на все лабораторные тесты, которые зависят от активности фактора Па (тромбина), включая ПТВ, АЧТВ, ТВ [10, 12]. В нашем исследовании ПТВ имело наименьшую чувствительность к ингибитору, ТВ было наиболее чувствительным к наличию препарата в плазме крови, но оба теста не имели связи с активностью образования фибрина. Ранее было показано, что АЧТВ зависит от концентрации дабигатрана в крови [21]. С этими данными согласуется обнаруженное нами наличие корреляционной связи между АЧТВ и ФПА на фоне действия препарата. Однако связь с активностью фибринообразования имела место только в раннем послеоперационном периоде, поэтому результаты нашего исследования подтверждают положение о том, что рутинные коагуляционные тесты не позволяют адекватно оценить эффект антикоагулянтного действия дабигатрана.

Крупная ортопедическая операция индуцирует коагуляционный процесс высокой интенсивности, при этом тромбин обнаруживается в циркуляции интраоперационно, а увеличение плазменного уровня маркеров фибринообразования наблюдается уже в ранней послеоперационной стадии [22]. В представленной работе спустя сутки после ЭКС наблюдалось значительное

повышение активности свертывания, о чем свидетельствовало двукратное увеличение концентрации маркера формирования фибрина — ФПА. Нормализация коагуляции после операций ЭКС, по данным разных авторов, может восстанавливаться в различные сроки: Y. López и соавт. [23] наблюдали повышенный уровень маркеров активации свертывания в течение недели после операции, A. Bunesco и соавт. [24] показали, что тромбинемия сохраняется до 10 сут после операции эндопротезирования. В нашей работе концентрация ФПА к 14-м послеоперационным суткам существенно не отличалась от исходного уровня, однако нужно учитывать, что пациенты, включенные в исследование, имели исходную гиперкоагуляцию. Таким образом, активность фибринообразования в конце периода исследования оставалась повышенной, что свидетельствует о длительном сохранении тромбинемии после ЭКС.

Наше исследование показало, что концентрации всех изучаемых маркеров фибринообразования резко повышаются при эндопротезировании. Однако если концентрация ФПА постепенно возвращается к исходному уровню, концентрация Д-димера вновь существенно увеличивается к 7-м суткам. В отличие от ФПА, образующегося в начальной стадии формирования фибрина и являющегося специфическим маркером фибринообразования [15], Д-димер — продукт плазминовой деградации нерастворимого фибрина, поэтому его уровень отражает активность не только формирования, но и лизиса фибрина. Повторное усиление литической активности обусловлено необходимостью освобождения от выполнившего свою функцию фибринового сгустка в процессе репарации поврежденной стенки сосуда.

Данные, полученные ранее с использованием высокоспецифичных иммуноферментных методов, показали, что концентрация фибрин-мономерных комплексов и растворимого фибрина быстро повышается при эндопротезировании, а затем постепенно возвращается к исходному уровню [25]. В нашем исследовании изменение параметров ортофантролинового теста имело максимум, совпадающий с максимумом острофазной гиперфибриногенемии. Корреляционный анализ обнаружил сильную связь между РФМК и ФГ с 3-х послеоперационных суток, однако связи с ФПА, специфичным маркером фибринообразования, выявлено не было. Очевидно, на фоне послеоперационной гиперфибриногенемии тест РФМК имеет сильную зависимость от уровня субстрата фибринообразования.

Послеоперационная воспалительная реакция индуцирует опосредованное цитокинами усиление продукции гепатоцитами ФГ как одного из острофазных белков [26]. Воспаление сопровождается также повышением прокоагулянтной активности эндотелия и стимулирует образование тромбина во всем внутрисосудистом пространстве [27]. Мы наблюдали сохранение гиперфибриногенемии и повышенного уровня фибринообразования спустя 2 нед после ЭКС, что может свидетельствовать о длительном взаимодействии между процессами коагуляции и воспаления после крупной ортопедической операции.

В нашем исследовании на фоне приема стандартной дозы дабигатрана этексилата после ЭКС не выявлено признаков повышенной кровопотери, однако у двух пациентов был обнаружен ТГВ. Новые оральные антикоагулянты, в число которых входит дабигатран, рекомендуется применять в фиксированной дозе без лабораторного мониторинга [7]. Теоретически при этом должен достигаться оптимальный баланс между антитромботической эффективностью и риском кровотечения. В то же время исследования показывают большую межиндивидуальную вариабельность концентрации дабигатрана в крови, что может приводить к избыточности либо недостаточности антикоагулянтного эффекта [21]. Мы обнаружили, что концентрация маркера фибринообразования (ФПА) сильно варьирует у пациентов, перенесших ЭКС. Это может свидетельствовать о значительных различиях в уровне

ингибирования тромбина при использовании фиксированной дозы антикоагулянта.

**Заключение.** На фоне действия прямого ингибитора тромбина дабигатрана рутинные клоттинговые тесты не позволяют провести адекватную оценку коагуляционной активности после крупной ортопедической операции.

Д-Д и РФМК не имеют связи со специфическим маркером фибринообразования ФПА и не могут адекватно отражать изменения коагуляции у пациентов, перенесших ЭКС, что объясняется зависимостью Д-Д от фибринолиза, а РФМК — от уровня острофазной гиперфибриногенемии.

Формирование ФПА, т. е. активность коагуляционного процесса, повышено у значительного числа лиц спустя 2 недели после ЭКС, что свидетельствует об обоснованности пролонгированной антитромботической профилактики.

Прием дабигатрана этексилата в фиксированной дозе не исключает развития ТГВ после крупной ортопедической операции, что подтверждает точку зрения относительно полезности индивидуализации антитромботической профилактики при использовании новых оральных антикоагулянтов.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам ортопедического отделения № 1 (зав. К.И. Пиастопуло) и отделения анестезиологии и реанимации (зав. Т.А. Жирова) ГБУЗ СО «ЦСВМП «УИТО им. В.Д. Чаклина».*

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

**Финансирование.** Исследование было поддержано научной программой РФ №215063040014

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—12, 15, 19—27 см. REFERENCES)

1. Добровольский А.Б., Титаева Е.В. Образование тромбина и его функции в системе гемостаза. *Атеротромбоз*. 2013; (1): 66—72.
2. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-издательство; 2010.
3. Бернакевич А.И., Васильев С.А., Еськин Н.А. Состояние системы гемостаза у пациентов, подвергающихся эндопротезированию тазобедренного сустава. *Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова*. 2009; (1): 37—42.
4. Антропова И.П., Юшков Б.Г. Изучение активности коагуляционного, фибринолитического и антикоагулянтного звеньев плазменного гемостаза у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями крупных суставов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153(4): 495—8.
5. Баешко А.А., Крючок А.Г., Юшкевич В.А., Корсак С.И. Послеоперационная тромбоземболия лёгочной артерии. *Хирургия*. 2000; (2): 45—9.

#### REFERENCES

1. Guyatt G.H., Eikelboom J.W., Gould M.K., Garcia D.A., Crowther M., Murad M.H. et al. *Approach to outcome measurement in the prevention of thrombosis in surgical and medical patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis*, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012; 141(2 Suppl.): e185S—94S.
2. Lowe G.D. Prediction of postoperative deep-vein thrombosis. *Thromb. Haemost.* 1997; 78(1): 47—52.
3. Cohen A.T. Applying risk assessment models in orthopaedic surgery: effective risk stratification. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1990; 10(Suppl. 2): 63—70.
4. Zaw H.M., Osborne I.C., Pettit P.N., Cohen A.T. Risk factors for venous thromboembolism in orthopedic surgery. *Isr. Med. Assoc. J.* 2002; 4(11): 1040—2.
5. Nicolaidis A.N., Fareed J., Kakkar A.K., Breddin H.K., Goldhaber S.Z., Hull R. et al. Prevention and treatment of venous thromboembolism. International Consensus Statement (guidelines according to scientific evidence). *Int. Angiol.* 2006; 25(2): 101—61.
6. Geerts W.H., Bergqvist D., Pineo G.F., Heit J.A., Samama C.M., Lassen M.R. et al. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008; (6 Suppl.): 381S—453S.

7. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin. Pharmacokinet.* 2008; 47(5): 285—95.
8. Huel N.H., Nar H., Priepke H., Ries U., Stassen J.M., Wiene W. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.* 2002; 45(9): 1757—66.
9. Lassen M.R. Recent developments in the use of oral anticoagulants. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009; 10(11): 1769—81.
10. Freyburger G., Macouillard G., Labrousse S., Sztrik F. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thromb. Res.* 2011; 127(5): 457—65.
11. Lindahl T.L., Baghaei F., Blixter I.F., Gustafsson K.M., Stigendal L., Sten-Linder M. et al. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb. Haemost.* 2011; 105(2): 371—8.
12. Falavero E.J., Lippi G. The new oral anticoagulants and the future of haemostasis laboratory testing. *Biochem. Med. (Zagreb).* 2012; 22(3): 329—41.
13. Dobrovolskiy A.B., Titaeva E.V. *Thrombin formation and function in haemostasis. Aterotromboz.* 2013; (1): 66—72. (in Russian)
14. Kuznik B.I. Cellular and Molecular Mechanisms for Regulation of the Hemostatic System in Health and Disease [Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii]. Chita: Express-izdatel'stvo; 2010. (in Russian)
15. Amiral J., Walenga J.M., Fareed J. Development and performance characteristics of a competitive enzyme immunoassay for fibrinopeptide A. *Semin. Thromb. Hemost.* 1984; 10(4): 228—42.
16. Bernakevich A.I., Vasil'ev S.A., Es'kin N.A. Hemostatic system in patients undergoing total hip arthroplasty. *Vestnik travmatologii i ortopedii imeni N.N. Priorova.* 2009; (1): 37—42. (in Russian)
17. Antropova I.P., Yushkov B.G. Activities of clotting, fibrinolytic, and anticoagulant components of plasma hemostasis in patients with degenerative diseases of large joints. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2012; 153(4): 495—8. (in Russian)
18. Baeshko A.A., Kryuchok A.G., Yushkevich V.A., Korsak S.I. Post-operative pulmonary embolism. *Khirurgiya.* 2000; (2): 45—9. (in Russian)
19. Perka C. Preoperative versus postoperative initiation of thromboprophylaxis following major orthopedic surgery: safety and efficacy of postoperative administration supported by recent trials of new oral anticoagulants. *Thromb. J.* 2011; 9: 17.
20. Rosencher N., Vassilief N., Guignon V., Toulon P., Conseiller C. Comparison of effects of Elohes and albumin on hemostasis in orthopedic surgery. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 1992; 11(5): 526—30.
21. Samama M.M., Guinet C., Le Flem L., Ninin E., Debue J.M. Measurement of dabigatran and rivaroxaban in primary prevention of venous thromboembolism in 106 patients, who have undergone major orthopedic surgery: an observational study. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2013; 35(2): 140—6.
22. Brueckner S., Reinke U., Roth-Isigkeit A., Eleftheriadis S., Schmucker P., Siemens H.J. Comparison of general and spinal anesthesia and their influence on hemostatic markers in patients undergoing total hip arthroplasty. *J. Clin. Anesth.* 2003; 15(6): 433—40.
23. López Y., Paloma M.J., Rifón J., Cuesta B., Páramo J.A. Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states. *Thromb. Res.* 1999; 93(2): 71—8.
24. Bunescu A., Widman J., Lenkei R., Menyes P., Levin K., Egberg N. Increases in circulating levels of monocyte-platelet and neutrophil-platelet complexes following hip arthroplasty. *Clin. Sci. (Lond).* 2002; 102(3): 279—86.
25. Misaki T., Kitajima I., Kabata T., Tani M., Kabata C., Tsubokawa T. et al. Changes of the soluble fibrin monomer complex level during the perioperative period of hip replacement surgery. *J. Orthop. Sci.* 2008; 13(5): 419—24.
26. Heinrich C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340(6): 448—54.
27. Mann K.G. *Thrombin formation.* *Chest.* 2003; 124 (3Suppl.): 4S—10S.

Поступила 20.06.16  
Принята к печати 01.07.16

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.078.33-074:543.544

Смирнова Д.Н., Крупина К.А., Богачева Н.В., Дармов И.В.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОМПОНЕНТОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИХ РАЗРАБОТКИ

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», 610000, Киров, Российская Федерация

В статье обобщены данные научных исследований, посвященных поиску оптимальных условий разработки высокоспецифичных и высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей инфекционных заболеваний. Проведен анализ выбора оптимального размера наночастиц коллоидного золота и концентрации антител для получения конъюгата. Представлены варианты наиболее часто используемых комбинаций буферных растворов, применяемых для разработки и анализа иммунохроматографических тест-систем. Выявлены предпочтения в области характеристик мембран, используемых в составе мультимембранного композита иммунохроматографических тест-систем.

Ключевые слова: иммунохроматографическая тест-система; наночастицы коллоидного золота; моноклональные антитела; конъюгат; буферные растворы; мультимембранный композит.

Для цитирования: Смирнова Д.Н., Крупина К.А., Богачева Н.В., Дармов И.В. Сравнительная оценка компонентов иммунохроматографических тест-систем, используемых для их разработки. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (1):30-34

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-30-34>

Smirnova D.N., Krupina K.A., Bogacheva N.V., Darmov I.V.

THE COMPARATIVE EVALUATION OF COMPONENTS USED IN DEVELOPMENT OF IMMUNE CHROMATOGRAPHY TEST-SYSTEMS

The Viatskii state university, 610000 Kirov, Russia

*The article summarizes data of research studies concerning searching optimal conditions of development of highly specific and highly sensitive immune chromatography test-systems designed for detection of agents of infectious diseases. The analysis was implemented concerning choosing of optimal size of nano-particles of colloid gold and concentration of antibodies for production of conjugate. The alternatives are presented concerning the most frequently used combinations of buffer solutions applied for development and analysis of immune chromatography test-systems. The preferences are established in the field of characteristics of membranes used in composition of multi-membrane composite of immune chromatographic test-systems.*

**Key words:** *immune chromatography test-systems; nano-particles of colloid gold; monoclonal antibodies; conjugate; buffer solution; multi-membrane composite*

**For citation:** *Smirnova D.N., Krupina K.A., Bogacheva N.V., Darmov I.V. The comparative evaluation of components used in development of immune chromatography test-systems. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 30-34. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-30-34*

**For correspondence:** *Bogacheva N.V., doctor of medical sciences, associate professor, professor of the chair of microbiology. e-mail: bogacheva70@mail.ru*

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

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

Received 20.04.2016  
Accepted 15.05.2016

Одним из перспективных иммунологических методов, используемых в настоящее время для диагностики инфекционных заболеваний, является иммунохроматография. Принцип данного метода основан на тонкослойной хроматографии и создании комплекса «антиген—антитело» [1], визуализация которого возможна благодаря меченым соединениям, в качестве которых при разработке иммунохроматографических тест-систем чаще всего используют наночастицы коллоидного золота [2].

В настоящее время создано большое количество иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей инфекционных заболеваний [3—10]. Однако проблемы выбора оптимального размера наночастиц коллоидного золота, концентрации антител, состава буферных растворов, используемых для разведения и отмывки антител, а также тестирования иммунохроматографических тест-систем, становятся актуальными каждый раз, когда встает вопрос о разработке новой иммунохроматографической тест-системы. Вышеизложенное обуславливает необходимость обобщения результатов исследований, посвященных поиску оптимальных условий разработки высокоспецифичных и высокочувствительных диагностических тест-систем, основанных на методе иммунохроматографии.

Этапы процесса создания иммунохроматографической тест-системы можно представить следующим образом: получение конъюгата антител с коллоидным маркером; отмывка конъюгата от несвязавшихся антител; нанесение конъюгата на стекловолоконную мембрану; нанесение специфических и антивидовых антител, соответственно, на аналитическую и контрольную зоны нитроцеллюлозной мембраны; сушка и сборка мультимембранного композита [11].

В качестве коллоидного маркера используют углерод, квантовые точки, парамагнитные частицы, липосомы, латексные частицы, но чаще всего — наночастицы коллоидного золота (НчКЗ) [2]. В иммунохроматографии применяют препараты КЗ как малого — 3—5 нм, так и большого — до 50 нм — диаметра, но чаще всего для получения конъюгата НчКЗ с антителами используют наночастицы размером 20—35 нм [3—10]. Применение наночастиц более крупного размера требует специальных решений по обеспечению их стабильности в растворе и предотвращению агрегации [12].

Несмотря на опыт многолетних исследований, вопрос об оптимальной концентрации биомолекул в составе конъюгата с

НчКЗ остается открытым. Обычно в ИХА используют конъюгаты с содержанием антител, на 10—20% превышающим минимальную концентрацию, достаточную для предотвращения агрегации НчКЗ в растворах, содержащих 10% раствор хлорида натрия [13]. Превышение данных значений может привести к снижению чувствительности иммунохроматографической тест-системы. Так, А.А. Титов и соавт. в ходе оптимизации иммунохроматографических тестов для детекции ботулинических токсинов выявили, что предел обнаружения токсинов уменьшался при увеличении нагрузки конъюгата по белку в 2 раза относительно минимальной стабилизирующей концентрации [14].

Оптимальная концентрация антител в конъюгате зависит от индивидуальных особенностей белкового препарата. Например, при разработке иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов *H. pylori* значение данного параметра составило 19 мкг/мл [3], для обнаружения Т-2 токсина — 30 мкг/мл [7], а в ходе получения конъюгата с НчКЗ при создании тест-системы для диагностики возбудителей сапа и мелиоидоза была использована минимальная концентрация антител (5,5 мкг/мл) [6].

Неоднозначно мнение авторов и по поводу буферных растворов, используемых для получения конъюгата НчКЗ с антителами. Наночастицы коллоидного золота в растворах электролитов характеризуются нестабильностью, которая связана с нарушениями их энергетического барьера, приводящими к агрегации частиц. Поэтому для получения конъюгатов НчКЗ с антителами применяют буферные растворы с ионной силой не ниже 0,01 М [15]. Наиболее распространенными буферными растворами для получения конъюгатов (рабочими буферными растворами) являются сукцинатно-боратный, фосфатно-солевой, ацетатный, карбонатный растворы, а также трис-буфер. Например, авторы трис-буфер использовали в качестве рабочего буфера при создании тест-систем для детекции микотоксина [4], возбудителя бруцеллеза [8] и вируса табачной мозаики [10], фосфатно-солевой буфер — для детекции дифтерийного [5] и ботулинического токсина [14], карбонатный — для детекции возбудителей сапа и мелиоидоза [6].

Одним из способов повышения чувствительности создаваемых тест-систем является перевод антител, используемых для получения конъюгата (если они исходно находились, например, в фосфатно-солевом буферном растворе), в соответствующий рабочий буфер посредством диализа.

Иммунохроматографическая тест-система, предназначенная для детекции:	Характеристика БР, используемого:			
	для диализа АТ	в качестве рабочего буфера	для отмывки конъюгата от несвязавшихся АТ и доведения его концентрации до необходимой оптической плотности	для анализа тест-систем
<i>H. pylori</i> [3]	0,01 М трис-НСI буфер, рН 9,0	0,01 М трис-НСI буфер, рН 9,0	0,02 М трис-НСI, рН 7,6 + 1,0 % БСА + 1,0 % сахараза + 0,1 % Tween-20 + 0,1 % NaN <sub>3</sub>	0,2 М карбонатный буфер, рН 9,5 + 4 мМ ЭДТА + 1,0 % БСА + 0,1 % NaN <sub>3</sub>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> [5]	0,01 М карбонатный буфер, рН 9,0	0,01 М карбонатный буфер, рН 9,0	0,05 М ФБС, рН 7,4 + 0,1 М NaCl + 0,25 % БСА + 0,05 % NaN <sub>3</sub>	Нет информации
<i>Burkholderia mallei</i> [6]	0,005 М карбонатный буфер, рН 8,2	0,005 М карбонатный буфер, рН 8,2	0,02 М трис-буфер, рН 8,2 1 % сахараза, 1 % БСА, 0,02 % Tween20, 0,01 % NaN <sub>3</sub>	0,02М ФСБ + 0,05 % Tween 20
T2-токсина [4]	0,01 М трис-буфер, рН 9,0	0,01 М трис-буфер, рН 9,0	0,05 М трис-буфер рН 7,5 + 1,0 % БСА + 1,0 % сахараза + 0,05 % NaN <sub>3</sub>	0,02 М ФСБ + 0,1 % Тритон-Х-100
<i>Plasmodium falciparum</i> [9]	0,05 М боратный буфер, рН 7,4	0,05 М боратный буфер, рН 7,4 10 % БСА, 0,5 % Tween 20, 0,05 % NaN <sub>3</sub>	0,05 М боратный буфер, рН 7,4 0,1 % БСА, 0,5 % Tween 20, 0,05 % NaN <sub>3</sub>	0,05 М боратный буфер, рН 7,4 + 1 % БСА + 0,5 % Tween 20 + 0,05 % NaN <sub>3</sub>

Эффективность адсорбции иммуноглобулинов на НчКЗ зависит от рН буферного раствора, в котором находятся антигена: оптимальный диапазон его значений, согласно данным литературы, составляет 8—9 ед. [3—5].

В качестве стабилизаторов в состав рабочего буфера чаще всего добавляют бычий сывороточный альбумин в концентрации от 0,25% [3] до 10% [7] и 1% сахаразу [3, 6, 7].

Имеются некоторые закономерности в использовании комбинаций буферных растворов для получения конъюгата антител с НчКЗ; для отмывки конъюгата от несвязавшихся антител и последующего разведения конъюгата до необходимой оптической плотности (в соответствии с данными спектрофотометрии); в качестве буфера разгона при анализе тест-систем (см. таблицу).

Наиболее часто используемые комбинации буферных растворов, применяемые при разработке и анализе иммунохроматографических тест-систем [3—6, 9]

Для отмывки полученного конъюгата от антител, не связанных с частицами золота, используют метод центрифугирования. По данным литературы, чаще всего с этой целью используют следующие режимы центрифугирования: температура — +4°C, время центрифугирования — 15 [7, 16] — 45 [17] мин, значение центробежной силы — от 6000 g [18] до 25 000 g [15].

После центрифугирования супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в стабилизирующем буферном растворе, в качестве консерванта добавляют 0,1% раствор азида натрия [3, 4, 6, 7].

Иммунохроматографическая тест-система представляет

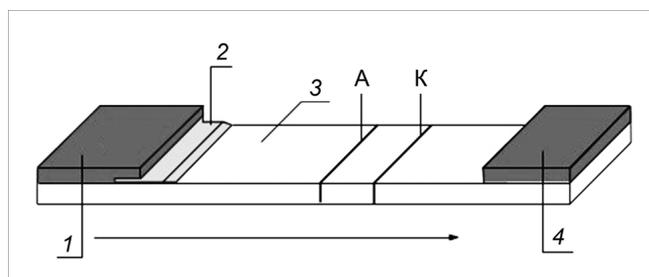


Рис. 1. Состав мультимембранного композита.

1 — мембрана для нанесения образца; 2 — мембрана для конъюгата; 3 — рабочая мембрана; 4 — адсорбирующая мембрана; А — аналитическая зона; К — контрольная зона [19].

собой мультимембранный композит, состоящий из мембраны для образца, мембраны для конъюгата, аналитической и адсорбирующей мембран. Состав мультимембранного композита иммунохроматографической тест-системы представлен на рис. 1.

Чувствительность и специфичность разрабатываемой тест-системы во многом зависят от выбора рабочей мембраны, на которой в ходе анализа формируются иммунные комплексы.

В работе А.Е. Урусова [4] был проведен анализ 12 видов рабочих мембран двух самых популярных фирм-производителей мембран для ИХА — MDI («Advanced Microdevices», Индия) и «Millipore» (США), различающихся скоростью латерального потока. Результаты исследования показали, что с повышением скорости потока коллоидного маркера с иммобилизованными антителами по рабочей мембране увеличивается специфичность, уменьшается время анализа, но в разы снижается чувствительность (предел обнаружения возбудителя) [4].

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что для определения афлатоксина АФБ1 оптимальной оказалась мембрана MDI CNPC 15, поскольку при ее использовании обеспечивались максимальная интенсивность окрашивания образующихся полос и высокая чувствительность (предел обнаружения при визуальной детекции составил 1 нг афлатоксина на 1 мл пробы). Аналогичные исследования были проведены и в отношении охратоксина А, при этом лучшие результаты по интенсивности окраски и пределу обнаружения были получены при использовании мембраны Millipore HF 240 [4].

Чаще всего при разработке иммунохроматографических тест-систем используют мембраны фирмы MDI (данную фирму предпочли авторы 11 из 17 проанализированных статей) [3—11, 18, 20]. Процентное соотношение в пользу выбора рабочей мембраны фирмы-производителя MDI и Millipore составляет, соответственно, 35,3 и 65,7%.

Однако и при использовании мембран одной из выше-названных фирм нет единого мнения по поводу их преимуществ, связанных с размером пор в мембране и скоростью латерального потока жидкости. Из продуктов фирмы MDI для конструирования тест-систем выбирают обычно мембраны CNPF10 (CNPC10) с размером пор 10 мкм и скоростью латерального потока 4 см за 125 с [3] (120 с [4]) или CNPC15 с размером пор 15 мкм и скоростью латерального потока 4 см за 100 с. Из мембран фирмы Millipore — HF240 (скорость латерального течения — 240 с/4 см) [4, 7, 15] или HF120 (скорость латерального течения — 120 с/4см).

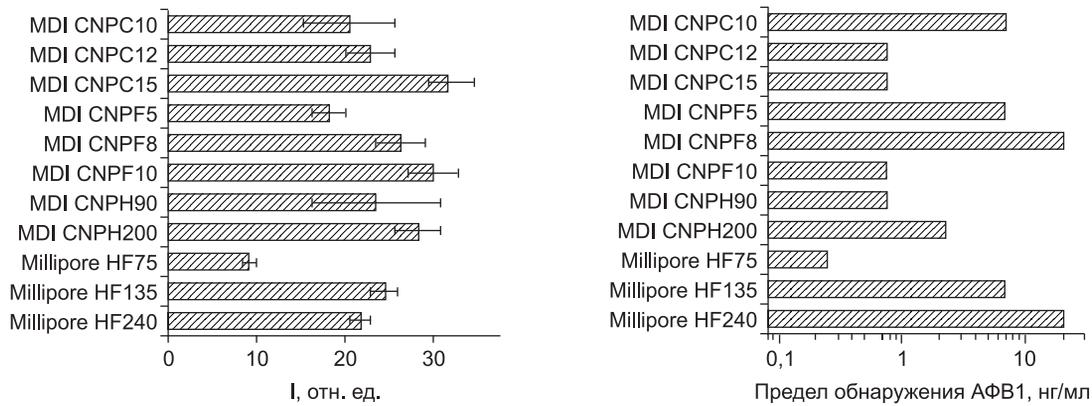


Рис. 2. Влияние рабочей мембраны на характеристики иммунохроматографического определения афлатоксина АФВ1 [14].

При нанесении конъюгата НчКЗ с антителами оптимальным выбором являются мембраны фирмы MDI (PT-R-5 [6, 10, 19], PT-R-7 [3, 7]).

Эффективным способом повышения чувствительности иммунохроматографического анализа является усиление окраски аналитической зоны после добавления солей серебра [3]. Для этого после проведения иммунохроматографии на рабочую мембрану тест-полоски с окрашенными зонами накладывают мембрану с лактатом серебра и гидрохиноном и наносят 100 мкл дистиллированной воды. Через 10 мин мембрану снимают и регистрируют цифровое изображение зон связывания иммунореагентов с помощью сканера CanoScan LiDE 90. Усиление окраски зон обусловлено восстановлением катиона и образованием оболочки металлического серебра вокруг НчКЗ.

Оптический сигнал, генерируемый НчКЗ, может быть усилен с помощью ферментов. В работе С. Pаgolo и соавт. [20] предложена иммунохроматографическая тест-система, в которой НчКЗ конъюгированы с антителами и пероксидазой. После проведения анализа тест-полоску отмывают от несвязавшихся реагентов и погружают в раствор субстрата пероксидазы (тетраметилбензидина, дающего ярко-синий нерастворимый продукт окисления) [12].

Успех создания высокочувствительной иммунохроматографической тест-системы во многом зависит от условий нанесения реагентов на мембраны тест-полоски. Так, А.Е. Урусовым и А.В. Жердевым на примере тест-системы для выявления липополисахарида *Vrucella abortus* определены оптимальные условия иммобилизации реагентов на иммунохроматографические мембраны [20]: скорость нанесения антител на аналитическую и контрольную зоны — 5—20 мм/с; концентрация наносимых реагентов — 1—3 мкл/мм (рис. 3); оптимальное значение скорости нанесения реагентов на стекловолоконистую мембрану для конъюгата — 8 мкл/мм (обеспечивает равномерную пропитку мембраны и отсутствие избытка реагента); оптимальные значения pH буфера разгона

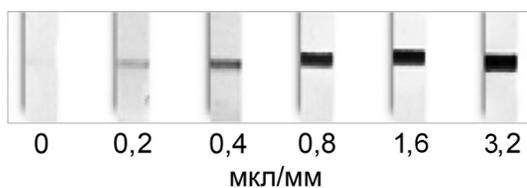


Рис. 3. Зависимость интенсивности сигнала от концентрации антител, наносимых на аналитическую зону [20].

— 8—9 ед. Кроме того, с целью обеспечения равномерности потока иммунохимических компонентов по мембране во время тестирования и для повышения специфичности иммунохроматографического анализа авторы рекомендуют добавлять в состав буфера разгона небольшие количества детергентов — 0,05% SDS или 0,005% Тритон X-100 [20].

После нанесения иммунореагентов готовые мембраны хранят при комнатной температуре в течение как минимум 7—8 ч до полного высыхания и сборки мультикомпозиата [20]. Упаковывать изготовленные тест-системы следует в пакеты из комбинированного материала на основе алюминиевой фольги вместе с расфасованным по 0,6 г силикагелем, хранить — при комнатной температуре [3].

Таким образом, в данной статье обобщены данные по выбору оптимальных условий разработки высокоспецифичных и высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний [3—11, 14, 18]. Следует учесть, что значения таких параметров, как концентрация антител в конъюгате с НчКЗ, молярность и pH буферных растворов, не являются универсальными для всех тест-систем. Выше представлены лишь наиболее распространенные варианты, упоминаемые в проанализированных работах. Условия постановки реакции, номенклатуру и концентрации используемых иммунохимических реагентов в каждом конкретном случае уточнять следует экспериментально.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 9, 16—17 см. REFERENCES)

- Будчанов Ю.И. Реакции, основанные на взаимодействии антигена с антителом. Тверь; 2012.
- Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Часть I. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом. Available at: <http://www.vniims.ru/inst/publication/public-metrol-1-10-2012.html>.
- Бызова Н.А., Жердев А.В., Свешников П.Г., Садыхов Э.Г., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов *H. pylori*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015; 51(5): 520—30.
- Урусов А.Е. Разработка и сравнительная характеристика систем экспрессного иммунохимического определения микотоксинов: Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. М.; 2012.
- Бызова Н.А., Свиридов В.В., Гаврилов Н.Ф., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., Генералова А.Н. и др. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная система детекции дифтерийного токсина. *Биоорганическая химия*. 2009; 35(4): 533—41.
- Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Колосова Н.В. и др. Получение ком-

- понтентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза. *Биотехнология*. 2015; (1): 85—92.
- Петракова А.В., Урусов А.Е., Возняк М.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая тест-система для детекции T-2 токсина. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015; 51(6): 616—23.
  - Бызова Н.А., Жердев А.В., Ескендинова С.З., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Муканов К.К. и др. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции липолисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012; 48(6): 653—61.
  - Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И. и др. Высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-метод определения зараженности растений вирусом табачной мозаики. *Биохимия*. 2009; 74(9): 1212—20.
  - Пивень Н.В., Бураковский А.И. Современные модификации иммунохимических диагностикумов: экспресс-методы. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2012; (3): 6—12.
  - Таранова Н.А. Комплекс антител с нанодисперсными носителями: синтез, свойства и применение в иммунохроматографии: Дисс. ... канд. хим. наук. М.; 2014.
  - Бызова Н.А., Сотников Д.В. Влияние состава конъюгатов коллоидного золота с белками на эффективность их использования с иммунохроматографическом анализе. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (3): 1—8.
  - Титов А.А., Шиленко И.В., Морозов А.А., Ярков С.П., Здобин В.Н. Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012; 48(2): 249—56.
  - Мокрецова И.М., Богачева Н.В. Обоснование способов получения основных компонентов иммунохроматографических тест-систем. *Аргіті. Серія: Естественные и технические науки*. 2014; (5): 4.
  - Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото—антиген. *Биотехнология*. 2015; (2): 76—81.
  - Скопинская С.Н., Ярков С.П., Здобин В.Н., Валиев Х.Х. Использование гидрозоль гексацианоферрата железа для создания диагностических иммунохроматографических тест-систем. *Вестник РАМН*. 2012; (3): 80—6.
  - Урусов А.Е., Жердев А.В. Изучение зависимости аналитических параметров иммунохроматографических тест-систем от режима иммобилизации иммунореагентов на мембраны. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (3): 25—31.
  - tems Express Immunochemical Determination of Mycotoxins: Diss. Moscow; 2012. (in Russian)
  - Byzova N.A., Sviridov V.V., Gavrilo N.F., Raspopova E.N., Yakovleva I.V., Generalova A.N. et al. Immunoassay and latex agglutination-detection system of diphtheria toxin. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2009; 35(4): 533—41. (in Russian)
  - Fedyukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitskiy S.Yu., Solov'ev P.V., Kolosova N.V. et al. Getting components immunoassay for the detection of pathogens glanders and melioidosis. *Biotechnologiya*. 2015; (1): 85—92. (in Russian)
  - Petrakova A.V., Urusov A.E., Voznyak M.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunoassay test system for the detection of T-2 toxin. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2015; 51(6): 616—23. (in Russian)
  - Byzova N.A., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Unysheva G.B., Mukanov K.K. et al. Development of immunochromatographic test-systems for express detection of polysaccharide antigen of the pathogen and the cells of the brucellosis in cattle. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2012; 48(6): 653—61. (in Russian)
  - Peng Y., Wu J., Wang J., Li W., Yu S. Wang. Study and evaluation of Wondfo rapid diagnostic kit based on nano-gold immunochromatography assay for diagnosis of Plasmodium falciparum. *Parasitol. Res.* 2012; 110(4): 1421—5.
  - Drygin Yu.F., Blintsov A.N., Osipov A.P., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Uskov A.I. et al. Highly sensitive immunoassay rapid method for the determination of plant infection by tobacco mosaic virus. *Biokhimiya*. 2009; 74(9): 1212—20. (in Russian)
  - Piven' N.V., Burakovskiy A.I. Modern versions immunochemistry diagnostics: rapid methods. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2012; (3): 6—12. (in Russian)
  - Taranova N.A. The Complex Antibody Nanodispersnyimi Carriers: Synthesis, Properties and Applications in Immunoassay: Diss. Moscow: 2014. (in Russian)
  - Byzova N.A., Sotnikov D.V. Influence of the composition of colloidal gold conjugates with proteins on the efficiency of their use with the immunoassay analysis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (3): 1—8. (in Russian)
  - Titov A.A., Shilenko I.V., Morozov A.A., Yarkov S.P., Zdobin V.N. Development and optimization of immunoassay for the detection of botulinum toxins. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2012; 48(2): 249—56. (in Russian)
  - Mokretsova I.M., Bogacheva N.V. Substantiation of ways for producing of immunochromatographic test-system's major components. *Apriori. Ceriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2014; (5): 4. (in Russian)
  - Parolo C., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosens. Bioelectron.* 2013; 40(1): 412—6.
  - Omidfar K., Kia S., Kashanian S., Paknejad M., Besharatie A., Kashanian S. et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010; 160(3): 843—55.
  - Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Avdienko V.G., Dzantiev B.B. Immuno-chromatographic assay for serodiagnosis of tuberculosis using an antigen-colloidal gold conjugate. *Biotechnologiya*. 2015; (2): 76—81. (in Russian)
  - Skopinskaya S.N., Yarkov S.P., Zlobin V.N., Valiev Kh.Kh. Using hydrosols hexacyanoferrate iron to create immunochromatographic diagnostic test systems. *Vestnik RAMN*. 2012; (3): 80—6. (in Russian)
  - Urusov A.E., Zherdev A.V. Study of the dependence of analytical parameters immunochromatographic test systems on the mode of immobilization immunoreagents membranes. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (3): 25—31. (in Russian)

## REFERENCES

- Budchanov Yu.I. *The Reactions are Based on the Interaction of the Antigen with the Antibody* [Reaktsii, osnovannye na vzaimodeystvii antigena s antitelom]. Tver'; 2012. (in Russian)
- The method of calibration curves for immunochromatographic rapid tests. Part I Immunochromatographic rapid tests with colloidal gold. Available at: <http://www.vniims.ru/inst/publication/public-metrol-1-10-2012.html>. (in Russian)
- Byzova N.A., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Development of immunoassay systems to detect antigen H. pylori. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2015; 51(5): 520—30. (in Russian)
- Urusov A.E. Development and Comparative Characteristics of Sys-

Поступила 20.04.16  
Принята к печати 15.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.19-006.04-078.33

Новиков Д.В.<sup>1</sup>, Фомина С.Г.<sup>1</sup>, Гурина Н.Н.<sup>1</sup>, Перенков А.Д.<sup>1</sup>, Красногорова Н.В.<sup>1</sup>, Шумилова С.В.<sup>1</sup>,  
Луковникова Л.Б.<sup>1</sup>, Новиков В.В.<sup>1</sup>, Караулов А.В.<sup>1,2</sup>

## КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ MUC1, ICAM1, IL32, FCGR3A И FOXP3 В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва

*Гипогликозилированный муцин 1 (MUC1) часто избыточно экспрессируется в клетках карциномы молочной железы, что является неблагоприятным прогностическим маркером для больных раком молочной железы (РМЖ). Целью данного исследования явилась оценка в опухолевых очагах больных РМЖ взаимосвязи между экспрессией MUC1 и генов, принимающих участие в реализации иммунологических реакций. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени исследовали экспрессию генов MUC1, Fas, ICAM1, FcγR3A, FcγR3B, FoxP3, IL2Ra, IL32 и TNF в опухолевых очагах 40 больных раком молочной железы. Уровень мРНК каждого из исследуемых генов оценивали относительно трех генов домашнего хозяйства. Частота обнаружения мРНК MUC1 составила 80%, мРНК Fas — 95%, мРНК ICAM1 — 97,5%, мРНК IL2Ra — 87,5%, мРНК FoxP3 — 85%, мРНК TNF — 95%, мРНК FcγR3A — 95%, мРНК FcγR3B — 32,5% и мРНК IL32 — 75%. Обнаружена прямая корреляция между уровнями мРНК MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3. Наиболее тесная связь регистрировалась между уровнями экспрессии генов MUC1 и IL32 ( $r = 0,72$ ;  $p = 0,0001$ ). По сравнению с MUC1-негативными, MUC1-позитивные карциномы молочной железы характеризовались более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов IL32 и TNF, молекулы адгезии ICAM1 и молекулярного маркера T-регуляторных клеток FoxP3. Данный профиль экспрессии генов в опухолях больных РМЖ показывает связь экспрессии MUC1 с воспалением и его модуляцией T-регуляторными клетками. Обсуждается влияние экспрессии исследуемых генов на фенотип раковых клеток и течение заболевания.*

**Ключевые слова:** рак молочной железы; воспаление; MUC1; ICAM1; IL32; FcγR3A; FoxP3.

**Для цитирования:** Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д., Красногорова Н.В., Шумилова С.В., Луковникова Л.Б., Новиков В.В., Караулов А.В. Корреляция экспрессии MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3 в опухолевых очагах больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (1): 35-39. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-35-39>

Novikov D.V.<sup>1</sup>, Fomina S.G.<sup>1</sup>, Gurina N.N.<sup>1</sup>, Perenkov A.D.<sup>1</sup>, Krasnogorova N.V.<sup>1</sup>, Shumilova S.V.<sup>1</sup>, Lukovnikova L.B.<sup>1</sup>,  
Novikov V.V.<sup>1</sup>, Karaulov A.V.<sup>1,2</sup>

THE CORRELATION OF EXPRESSION OF MUC1, ICAM1, IL32, FCGR3A AND FOXP3 IN TUMOR NIDUS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

<sup>1</sup>The N.I. Lobachevskii National research Nizhegorodskii state university, 603950 Nizhniy Novgorod, Russia

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

*The hypo-glycosylated mucin 1 (MUC1) frequently is redundantly expressed in cells of breast carcinoma that is considered as an unfavorable prognostic marker for patients with breast cancer. The purpose of study is to evaluate in tumor areas of patients with breast cancer the interrelationships between expression of MUC1 and genes participating in implementation of immune reactions. The technique of polymerase chain reaction with reverse transcription in real-time was applied to investigate expression of genes of MUC1, Fas, ICAM1, FcγR3A, FcγR3B, FoxP3, IL2Ra, IL32 and TNF in tumor areas of 40 patients with breast cancer. The level of mRNA of each of analyzed genes was evaluated relatively to three genes of household. The rate of detection of mRNA MUC1 amounted to 80%, mRNA Fas - 95%, mRNA ICAM1 - 97.5%, mRNA FcγR3A - 95%, mRNA FcγR3B - 32.5%, mRNA FoxP3 - 85%, mRNA IL2Ra - 87.5%, mRNA IL32 - 75%, mRNA TNF - 95%. The direct correlation was established between levels of mRNA MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3. The most strong relationship was registered between levels of expression of genes MUC1 and IL32 ( $r=0.72$ ;  $p=0.0001$ ). In comparison with MUC1 negative breast carcinoma, MUC1 positive breast carcinoma characterized by higher level of mRNA of pro-inflammatory cytokines IL32 and TNF, molecules of adhesion ICAM1 and molecular marker of T-regulative cells FoxP3. The given profile of expression of genes in tumors of patients with breast cancer demonstrates relationship of expression of MUC1 with inflammation and its modulation by T-regulative cells. The effect of expression of analyzed genes on phenotype of cancer cells and course of disease are discussed.*

**Key words:** breast cancer; inflammation; MUC1; ICAM1; IL32; FcγR3A; FoxP3

**For citation:** Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., Krasnogorova N.V., Shumilova S.V., Lukovnikova L.B., Novikov V.V., Karaulov A.V. The correlation of expression of MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3 in tumor nidus of patients with breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 35-39. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-35-39>

**For correspondence:** Karaulov A.V., corresponding member of the Russian academy of sciences, doctor of medical sciences, professor, head of the chair of clinical immunology and allergology of the I.M. Sechenov first Moscow state medical university. e-mail: [drkaraulov@mail.ru](mailto:drkaraulov@mail.ru)

**Для корреспонденции:** Караулов Александр Викторович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. клин. иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, e-mail: [drkaraulov@mail.ru](mailto:drkaraulov@mail.ru)

**Information about authors:**

Novikov D.V., <http://orcid.org/0000-0001-7049-6935>  
Fomina S.G., <http://orcid.org/0000-0002-6610-1774>  
Gurina N.N., <http://orcid.org/0000-0001-8025-7292>  
Perenkov A.D., <http://orcid.org/0000-0002-0710-6882>  
Krasnogorova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-8800-4553>  
Shumilova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-2727-2888>  
Lukovnikova L.B., <http://orcid.org/0000-0002-5489-4623>  
Novikov V.V. <http://orcid.org/0000-0002-2449-7213>  
Karaulov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

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

**Acknowledgment.** *The study was supported by the Minobrnauki of Russia within the framework of the state research task (project № 20.223.2014/K)*

Received 22.06.2016  
Accepted 01.07.2016

**Введение.** Микроокружение опухоли играет ключевую роль в прогрессии рака молочной железы (РМЖ). В опухолевых очагах кроме раковых клеток присутствуют эндотелиальные и периваскулярные клетки, адипоциты, фибробласты и активированные клетки иммунной системы. Наиболее представленными являются макрофаги, которые во многом определяют взаимодействие иммунной системы и опухолевых клеток. Присутствие в опухолевом очаге повышенного количества инфильтрирующих лимфоцитов и цитотоксических Т-клеток ассоциировано с успешным ответом на химиотерапию [1] и снижением риска смерти от болезни у пациентов с HER<sub>2</sub>-положительными опухолями [2]. Вместе с тем иммунная система может способствовать как росту опухоли, так и метастазированию. Воспалительные процессы, которые сопутствуют развитию опухолевой ткани, приводят к состоянию, сходному с таковым при заживлении ран. Продукция клетками микроокружения опухоли и самими клетками опухоли биологически активных молекул опосредует сигналы к перестройке метаболизма раковых клеток, пролиферации, ангиогенезу и миграции, что в итоге влияет на выживаемость пациентов и ответ на терапию [3].

Муцин 1 (*MUC1*, *CD227*) является опухолеассоциированным антигеном, который избыточно экспрессируется в карциномах молочной железы. В эпителиальных клетках *MUC1* сильно гликозилирован и экспрессируется исключительно на апикальной поверхности. В раковых клетках *MUC1* гипогликозилирован и распределен по всей поверхности клетки. Кроме того, значительное количество *MUC1* обнаруживается в ядре и митохондриях [4]. На мембране раковой клетки *MUC1* участвует в сигнальных взаимодействиях и контактах между клетками и матриксом. В ядре *MUC1* взаимодействует с различными факторами транскрипции и элементами промоторных регионов [5]. Экспрессия *MUC1* в раковых клетках вызывает транскрипционные изменения, опосредующие общую выживаемость в ответ на гипоксию, недостаток питательных веществ и воздействие иммунной системы [6]. Экспрессия *MUC1* опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим маркером при РМЖ [7]. В настоящее время *MUC1* рассматривается как мишень для направленной иммунотерапии карцином различных локализаций, включая РМЖ [8]. Ранее S. Cascio и соавт. показали, что *MUC1* регулирует транскрипцию провоспалительных цитокинов в культурах раковых клеток путем связывания с промоторами генов в комплексе с ядерным фактором κB p65 [9].

В настоящей работе показано, что в сравнении с *MUC1*-негативными (*MUC1*<sup>-</sup>), *MUC1*-позитивные (*MUC1*<sup>+</sup>) карциномы у больных РМЖ характеризуются более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов IL32 и TNF, а также более высоким уровнем мРНК маркера Т-регуляторных клеток FoxP3 и мРНК молекулы адгезии ICAM1.

**Материал и методы.** В исследование включены 40 больных РМЖ, проходивших хирургическое лечение в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все больные дали согласие на участие в исследовании. После хирургического удаления тканей фрагмент опухолевого очага размером 0,5 см<sup>3</sup> помещали в 0,5 мл лизирующего буфера (4М гуанидин тиоцианат, 100 мМ ацетат натрия, 1% Тритон X-100) и замораживали при –20°C. Суммарную нуклеиновую кислоту выделяли из 200 мкл лизата методом фенол-хлороформной экстракции. Полученный препарат нуклеиновой кислоты обрабатывали ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и синтезировали кДНК с использованием M-MLV ревертазы (ЗАО «Силекс», Россия). Полученную кДНК амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

В каждом образце оценивали уровень мРНК *MUC1*, Fas (CD95), ICAM1 (CD54), FcγR3A (CD16A), FcγR3B (CD16B), FoxP3, IL2Rα (CD25), IL32 и TNF. Для нормировки использовали мРНК генов домашнего хозяйства: убиквитина С (UBC), бета-2-микроглобулина (β2M), гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT1), бета-актина (βA), тирозин 3-монооксигеназы/триптофан 5-монооксигеназы, активационного протеина зета (YWHAZ). Определение уровня мРНК исследуемого гена и гена домашнего хозяйства проводили в одной пробирке с использованием зондов TaqMan. Смесь ПЦР объемом 25 мкл содержала 2 мкл кДНК, по 0,4 пМ праймеров и зондов TaqMan, 0,8 мМ дНТФ, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 единицы активности Taq-полимеразы (ЗАО «Силекс», Россия). Реакцию проводили в амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США). Первичная структура используемых праймеров и зондов представлена в табл. 1.

В каждом образце проводили нормировку уровней исследуемых мРНК по трем генам домашнего хозяйства. В расчетах учитывали эффективность реакции, которую вычисляли по стандартной прямой, построенной по результатам последовательных разбавлений. Относительные уровни мРНК оценивали методом сравнения пороговых циклов (ΔΔCt). Для поиска взаимосвязей между экспрессией генов внутри одного образца использовали уровни мРНК, нормированные относительно одного гена домашнего хозяйства. При сравнении уровней мРНК между образцами нормировочный коэффициент рассчитывали как среднее геометрическое значение уровней мРНК, полученных относительно нескольких генов домашнего хозяйства.

Статистические вычисления проводили с использованием компьютерной программы GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software Inc.», США). Соответствие распределения количественных признаков нормальному закону оценивали критерием Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Оценку взаимосвязей между уровнями мРНК проводили по

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени

мРНК		Олигонуклеотид (5' → 3')
UBC	F	GCACAGCTAGTTCGTCGCA
	R	TGCATTGTCAAGTGACGAT
	Z	CY5-ATTTGGGTGCGAGTTCTTGTGGAT-BHQ-2
HPRT1	F	CTGAAGAGCTATTGTAATGA
	R	TTATATCCAACACTTCGTGG
	Z	CY5-AGATATAATTGACACTGGCAAAACAATGCA-BHQ-2
B2M	F	CTGGAGGCTATCCAGCGTAC
	R	GCTTACATGTCTCGATCCCA
	Z	CY5-TTCAGTTTACTCACGTCATCCAGCA-BHQ-2
BA	F	AGCCTTCCTCCTGGGCATG
	R	AGGAGGAGCAATGATCTTGA
	Z	CY5-CTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGCGG-BHQ-2
YWHAZ	F	TGCAATGATGACTGTCTCT
	R	ACTGATCGACAATCCSTTTC
	Z	CY5-ATTACTACCGTTACTTGGCTGAGGTTGCC-BHQ-2
MUC1	F	CGCTGGCCATTGTCTATCTCA
	R	AGAGGCTGCTGCCACCATTA
	Z	ROX-CTTGGCTGTCTGTCAAGTCCGCGAAAG-BHQ-2
Fas	F	ACCAAATGTGAACATGGAAT
	R	CTTTCTGTGCTTTCTGCAT
	Z	ROX-TCAAGGAATGCACACTCACCAGCAACACCA-BHQ-2
IL32	F	CTGAAGGCCCGAATGCACCA
	R	TAGAGGAGTGAGCTCTGGGT
	Z	FAM-AGGGTACTCTGGAGACAGTGGCGGCTTA-BHQ-1
FcγR3A/B	FA/B	GCTCTGCTACTTCTAGTTTCA
	RA	CACTGTCCTTCTCGAGCACC
	RB	CACTGTCCTTCTCAAGCACC
	ZA/B	ROX-CTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTA-BHQ-2
ICAM-1	F	GAGCTTCGTGCTCTGTATGG
	R	CTCATACCGGGGGAGAGCA
	Z	ROX-CCCATTGCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGA-BHQ-2
FoxP3	F	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	R	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
	Z	FAM-TGCCATTTCCAGCCAGGTGG-BHQ-1
IL2Rα	F	CTGCTCACGTTTCATCATGGT
	R	AGTTCAACATGGTTCTTCC
	Z	ROX-TGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGC-BHQ-2
TNF	F	CTCTTCTCCTTCTGATCGTG
	R	TTGAGGGTTTGTACAACATGG
	Z	ROX-AGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTAATC-BHQ-2

Спирмену. Для сравнения уровней между группами применяли U-критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически достоверными при значениях  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В образцах опухолевых очагов частота обнаружения мРНК *MUC1* составила 80%, *Fas* (CD95) — 95%, *ICAM1* (CD54) — 97,5%, *IL2Rα* (CD25) — 87,5%, *FoxP3* — 85%, *TNF* — 95%, *FcγR3A* — 95%, *FcγR3B* — 32,5% и *IL32* — 75%.

Для оценки путем совместной амплификации относительных уровней мРНК подбирали пары, включающие ген домашнего хозяйства и ген интереса. Выбор гена домашнего хозяйства проводили на основе эффективности реакции при совместной амплификации с кДНК исследуемого гена в одной пробирке. Использовали пары генов, в которых значение эффективности реакции для обеих мРНК было не ниже 0,7. Для нормировки уровня мРНК *MUC1* заданным условиям соответствовали мРНК *BA*, *B2M* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *ICAM1*, *FcγR3A*, *FcγR3B* и *TNF* — мРНК *BA*, *UBC* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *Fas*, *FoxP3* и *IL2Rα* — мРНК *B2M*, *HPRT1* и *YWHAZ*; для нормировки уровня мРНК *IL32* — мРНК *B2M*, *UBC* и *YWHAZ*.

В большинстве исследуемых образцов числовые значения относительных уровней мРНК *MUC1*, *ICAM1*, *Fas*, *TNF*, *IL32*, *FcγR3A* и *IL2Rα* варьировали в пределах 0,1—3 единицы. Для мРНК *FoxP3* и *FcγR3B* регистрировались более низкие числовые значения уровней мРНК, составляющие сотые и тысячные доли от уровней экспрессии референтных генов. Низкие значения свидетельствуют о том, что наблюдаемый уровень мРНК является характеристикой небольшого числа клеток опухолевого очага больных РМЖ, вероятно, относящихся к лимфоцитам, инфильтрованным в опухоль.

Прямая корреляционная связь обнаружена одновременно между уровнями мРНК *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcγR3A* и *FoxP3*, причем связь между уровнями мРНК *MUC1* и *IL32* была наиболее тесной (табл. 2). Следует отметить, что мРНК *IL32* была обнаружена только в двух *MUC1*-образцах опухолевого очага больных РМЖ. Оценка тесноты связи экспрессии *FcγR3B* с уровнями мРНК других генов не проводилась, поскольку мРНК *FcγR3B* была выявлена лишь в трети (13 из 40) исследуемых образцов.

Сравнение относительных уровней мРНК в *MUC1*-позитивных (*MUC1*<sup>+</sup>) и негативных (*MUC1*<sup>-</sup>) опухолевых очагах показало, что уровни мРНК *ICAM1*, *TNFα*, *IL32* и *FoxP3* статистически значимо выше в *MUC1*<sup>+</sup> карциномах (см. рисунок). Наиболее яркие различия регистрировались между уровнями мРНК *IL32* в *MUC1*<sup>+</sup> и *MUC1*<sup>-</sup> опухолевых очагах. В *MUC1*-негативных опухолях регистрировался высокий уровень мРНК *Fas*, однако различия не имели статистической значимости. В *MUC1*<sup>+</sup> карциномах дополнительно к мРНК *ICAM1*, *IL32* и *FoxP3* регистрировали более высокий уровень мРНК *TNF*, который, однако, не коррелировал с уровнями мРНК других генов.

**Обсуждение.** На основе экспрессии генов РМЖ принято разделять на молекулярные подтипы, которые тесно связаны с клиническими проявлениями заболевания и чувствительностью к лекарственным средствам. В то же время в ряде исследований показано, что молекулярный подтип и характер воспалительного процесса в месте локализации опухоли являются двумя независимыми особенностями РМЖ [10—12]. В настоящей работе выявлена значимая прямая корреляция между экспрессией генов *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcγR3A* и *FoxP3* в опухолевых очагах РМЖ. Наибольшей теснотой свя-

Таблица 2

**Коэффициенты парных корреляций между уровнями исследуемых мРНК, рассчитанные относительно мРНК *YWHAZ***

	Коэффициент корреляции Спирмена							
	<i>MUC1</i>	<i>ICAM1</i>	<i>Fas</i>	<i>TNF</i>	<i>IL32</i>	<i>FcyR3A</i>	<i>IL2Ra</i>	<i>FoxP3</i>
<i>MUC1</i>		0,46	-0,2	0,08	0,72	0,45	0,15	0,47
<i>ICAM1</i>	0,003		0,08	0,24	0,41	0,49	0,12	0,64
<i>Fas</i>	0,06	0,17		0,08	-0,28	0,09	0,12	-0,04
<i>TNF</i>	0,61	0,15	0,63		0,16	-0,05	-0,25	-0,07
<i>IL32</i>	0,0001	0,008	0,07	0,32		0,49	0,13	0,43
<i>FcyR3A</i>	0,004	0,0001	0,19	0,75	0,001		-0,04	0,24
<i>IL2Ra</i>	0,36	0,48	0,45	0,13	0,43	0,8		0,29
<i>FoxP3</i>	0,003	0,67	0,80	0,68	0,006	0,14	0,29	

зи обладали *MUC1* и *IL32*. При сравнении уровней экспрессии исследуемых генов было показано, что в *MUC1*<sup>+</sup> карциномах дополнительно к *ICAM1*, *IL32* и *FoxP3* регистрировался более высокий уровень экспрессии *TNF*, который, однако, не коррелировал с уровнями мРНК других генов. Полученные данные свидетельствуют, что *MUC1*-позитивные карциномы молочной железы характеризуются высоким уровнем медиаторов воспаления. Ранее было показано, что экзогенные провоспалительные цитокины, такие как *TNF* и интерферон-гамма, приводят к повышению экспрессии *MUC1* в карциномах молочной железы [13]. Внутриклеточная локализация *MUC1* сопровождается повышением экспрессии *TNF* в модельных линиях клеток РМЖ [9]. *TNF* является мощным индуктором экспрессии эндогенного *IL-32*, а *IL-32* сам по себе способствует длительной продукции *TNF* [14]. Таким образом, совместная экспрессия *MUC1*, *IL32* и *TNF* способствует автостимуляции провоспалительного каскада. Ранее показано, что *MUC1* и *IL32* способствуют пролиферации и снижают апоптоз линий клеток РМЖ [15]. Обнаруженный нами низкий уровень мРНК *Fas* в *MUC1*<sup>+</sup> опухолях РМЖ косвенно подтверждает эти данные (см. рисунок).

Высокий уровень экспрессии мРНК *FoxP3* в *MUC1*<sup>+</sup> опухолевых очагах РМЖ отражает присутствие большого числа регуляторных Т-клеток (Трег) по сравнению с *MUC1*<sup>-</sup> карциномами РМЖ. По литературным данным известно, что привлечение Трег в опухолевое микроокружение является одной из основных стратегий, используемых раковыми клетками для подавления иммунитета и уклонения от иммунного над-

зора [16]. Показано также, что присутствие *FoxP3*<sup>+</sup> Трег клеток в опухолевых очагах больных РМЖ приводит к повышенному метастатическому потенциалу клеток опухоли [17]. Отсутствие связи между уровнями мРНК *FoxP3* и мРНК другого маркера Трег клеток — *IL2Ra*, по-видимому, объясняется экспрессией *IL2Ra* клетками самой опухоли.

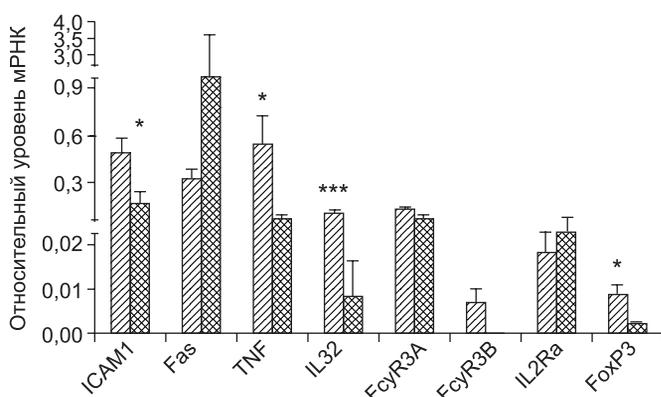
Экспрессия *ICAM1* не регистрируется в нормальном эпителии молочной железы [18]. В нашем исследовании мРНК *ICAM1* детектировалась в большинстве исследуемых образцов опухолевых очагов, а в *MUC1*-позитивных опухолях регистрировался более высокий уровень экспрессии мРНК *ICAM1*. Ранее показано, что *MUC1*<sup>+</sup> клетки РМЖ способны мигрировать по поверхности или через слой *ICAM1*-экспрессирующих клеток с помощью прямых взаимодействий между *MUC1* и *ICAM1* [19]. В гене *ICAM1* описаны генетические перестройки [20] и его экспрессия клетками РМЖ тесно связана со способностью к метастазированию [21]. Корреляция между уровнями мРНК *ICAM1* и *FoxP3* свидетельствует, что изменение уровня экспрессии *ICAM1* опосредует инфильтрацию Трег в опухолевый очаг.

Интересным является обнаружение высокого уровня экспрессии гена *FcyR3A* клетками РМЖ и ее корреляция с экспрессией генов провоспалительных цитокинов. Высокий уровень мРНК *FcyR3A* в опухолевых очагах свидетельствует в пользу его экспрессии раковыми клетками. Ранее было показано, что при прогрессии РМЖ повышение уровня мРНК *FcyR3A* происходит перед морфологическими изменениями опухолевых клеток [22]. Какие функции выполняет *FcyR3A* в раковой клетке, остается неизвестным. Экспрессия молекулярного маркера нейтрофилов *FcyR3B* выявлена только в трети исследуемых образцов, причем все опухоли были *MUC1*<sup>+</sup>.

Таким образом, показана связь экспрессии генов *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcyR3A* и *FoxP3* в опухолевых очагах больных РМЖ. По сравнению с *MUC1*-негативными, *MUC1*-позитивные карциномы характеризуются более высоким уровнем мРНК провоспалительных цитокинов *IL32* и *TNF*, молекулы адгезии *ICAM1* и маркера Трег-клеток *FoxP3*. Данный профиль экспрессии генов в опухолях больных РМЖ показывает связь экспрессии *MUC1* с воспалением и его регуляцией с помощью *FoxP3*<sup>+</sup> Трег.

**Финансирование.** Исследование было поддержано Министерством образования и науки РФ в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (№ 20.223.2014/К).

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



Сравнение относительных уровней мРНК исследуемых генов в *MUC1*<sup>+</sup> ( $n = 32$ ) и *MUC1*<sup>-</sup> ( $n = 8$ ) опухолевых очагах больных РМЖ (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—11, 13—15, 17—19, 21—22 см. REFERENCES)**

12. Скотаренко Л.В., Воротников И.К., Кадагидзе З.Г., Шамилов Ф.А. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2011; (4): 24—7.

16. Колядина И.В., Поддубная И.В., van de Velde с. J.H., Kuppen P., Франк Г.А., Комов Д.В. и др. Иммунная гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое, популяционное и прогностическое значение (опыт международного сотрудничества). *Современная онкология*. 2015; 17(1): 30—8.

20. Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В., Калугин А.В., Фомина С.Г., Караулов А.В. Генетическая нестабильность в локусе rs5498 E469K (A/G) гена *ICAM-1* у больных раком толстой кишки и молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160(12): 783—6.

## REFERENCES

1. Kroemer G., Senovilla L., Galluzzi L., André F., Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat. Med.* 2015; 21: 1128—38.
2. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.J., Blows F.M., Liu B., Shah M. et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1536—43.
3. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883—99.
4. Raina D., Ahmad R., Rajabi H., Panchamoorthy G., Kharbanda S., Kufe D. Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2012; 40: 1643—9.
5. Behrens M.E., Grandgenett P.M., Bailey J.M., Singh P.K., Yi C.H., Yu F. et al. The reactive tumor microenvironment: MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF. *Oncogene.* 2010; 29: 5667—77.
6. Nath S., Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014; 20(6): 332—42.
7. Khodarev N.N., Pitroda S.P., Beckett M.A., MacDermed D.M., Huang L., Kufe D.W. et al. MUC1-induced transcriptional programs associated with tumorigenesis predict outcome in breast and lung cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 2833—7.
8. Mohit E., Hashemi A., Allahyari M. Breast cancer immunotherapy: monoclonal antibodies and peptide-based vaccines. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014; 10(7): 927—61.
9. Cascio S., Zhang L., Finn O.J. MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- $\kappa$ B p65 and binding to cytokine promoters. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(49): 42248—56.
10. Bertucci F., Finetti P., Rougemont J., Charafe-Jauffret E., Cervera N., Tarpin C. et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 2170—8.
11. Masuda H., Baggerly K.A., Wang Y., Iwamoto T., Brewer T., Pusztai L. et al. Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(6): R112. Available at: <http://breast-cancer-research.com/content/15/6/R112> (accessed 17 June 2016).
12. Skotarenko L.V., Vorotnikov I.K., Kadagidze Z.G., Shamilov F.A. The specific features of T cell immunity in breast cancer. *Opukholy zhenskoy reproduktivnoy sistemy.* 2011; (4): 24—7. (in Russian)
13. Lagow E.L., Carson D.D. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 2002; 86: 759—72.
14. Heinhuis B., Koenders M.I., van Riel P.L., van de Loo F.A., Dinarello C.A., Netea M.G. et al. Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(4): 660—7.
15. Wang S., Chen F., Tang L. IL-32 promotes breast cancer cell growth and invasiveness. *Oncol. Lett.* 2015; 9(1): 305—7.
16. Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., van de Velde s. J.H., Kuppen P., Frank G.A., Komov D.V. et al. Immunological heterogeneity of stage and breast cancer: biological, population-based and prognostic value (international cooperation experience). *Sovremennaya onkologiya.* 2015; 17(1): 30—8. (in Russian)
17. Tan W., Zhang W., Strasner A., Grivennikov S., Cheng J.Q., Hoffman R.M. et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature.* 2011; 470(7335): 548—53.
18. Guo P., Huang J., Wang L., Jia D., Yang J., Dillon D.A. et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2014; 111(41): 14710—5.
19. Geng Y., Yeh K., Takatani T., King M.R. Three to tango: MUC1 as a ligand for both E-selectin and ICAM-1 in the breast cancer metastatic cascade. *Front. Oncol.* 2012; 2: 76. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00076/full> (accessed 17 June 2016).
20. Novikov V.V., Shumilova S.V., Novikov D.V., Kalugin A.V., Fomina S.G., Karaulov A.V. Genetic Instability in Locus rs5498 E469K (A/G) of ICAM-1 Gene in Patients with Colorectal Cancer and Breast Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160(6): 811—3.
21. Di D., Chen L., Wang L., Sun P., Liu Y., Xu Z. et al. Downregulation of human intercellular adhesion molecule-1 attenuates the metastatic ability in human breast cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 2016; 35(3): 1541—8.
22. Castro N.P., Osorio C.A., Torres C., Bastos E.P., Mourão-Neto M., Soares F.A. et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(5): R87. Available at: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2157> (accessed 17 June 2016).

Поступила 22.06.16  
Принята к печати 01.07.16

Ткаченко О.Ю.<sup>1</sup>, Лапин С.В.<sup>1</sup>, Мазинг А.В.<sup>1</sup>, Лазарева Н.М.<sup>1</sup>, Шмонин А.А.<sup>1</sup>, Соловьева Л.Н.<sup>1</sup>, Бондарева Е.А.<sup>1</sup>, Сельков С.А.<sup>2</sup>, Чепанов С.В.<sup>2</sup>, Тотолян А.А.<sup>3</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», 199033, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург

*Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипидных (аКл) антител и антител к  $\beta_2$ -гликопротеину ( $\beta_2$ Гп). Несмотря на то, что серологическая диагностика играет решающую роль в постановке диагноза АФС, использование лабораторных тестов затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител стало использование иммуноблоттинга на основе поливинилиденфторидной (ПВДФ) мембраны. Преимущество этого метода по сравнению с методом ИФА — использование для сорбции антигенов гидрофобной твердой фазы. Пористая структура ПВДФ мембраны ориентирует гидрофильные участки фосфолипидов и обеспечивает тем самым более плотное их распределение, имитируя билипидный слой мембран живого организма. Для уточнения и сравнения ценности разных методов мы сопоставили результаты измерения АФА на ИФА тест-системах разных производителей и наборах реактивов для иммуноблоттинга. Нами собрана коллекция биоматериала 47 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 20 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 50 пациентов с акушерской патологией, а также 30 здоровых доноров. В данных сыворотках измерены аКлIgG, аКлIgM,  $\beta_2$ ГП методом ИФА с помощью немецких тест-систем фирм Euroimmun и Orgentec Diagnostica, образцы с наиболее высоким титром — методом иммуноблоттинга на реактивах фирмы Medipan. На основании измерений АФА различными ИФА тест-системами частота  $\beta_2$ ГП составила 31% для Euroimmun ИФА наборов реактивов, 78% — для Orgentec Diagnostica ИФА тест-систем, аКлIgG — 2 и 30%, аКлIgM — 31 и 54% соответственно. Измерив АФА методом иммуноблоттинга на тест-системах фирмы Medipan в биообразцах с наиболее высокими титрами, мы обнаружили  $\beta_2$ ГП у всех пациентов, аКлIgG — у 70%, аКлIgM — у 30% пациентов. Сходимость между тремя коммерческими наборами реактивов варьирует от 20 до 88%. Стандартизация коммерческих тест-систем все еще не достигнута. Новый метод иммуноблоттинга может быть использован в сочетании с классическими методами серологической диагностики АФС. Отсутствие алгоритмов диагностики и стандартизации различных тест-систем для детекции АФА ставит под сомнение достоверность серологического диагноза АФС, а следовательно и существование АФС как нозологической единицы.*

**Ключевые слова:** антифосфолипидный синдром; антифосфолипидные антитела; иммуноферментный анализ; иммуноблоттинг; стандартизация.

**Для цитирования:** Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 40-44

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-40-44>

Tkachenko O.Yu.<sup>1</sup>, Lapin S.V.<sup>1</sup>, Mazing A.V.<sup>1</sup>, Lazareva N.M.<sup>1</sup>, Shmonin A.A.<sup>1</sup>, Solovieva L.N.<sup>1</sup>, Bondareva E.A.<sup>1</sup>, Selkov S.A.<sup>2</sup>, Chepanov S.V.<sup>2</sup>, Totolian A.A.<sup>3</sup>

### THE COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGIC TECHNIQUES OF DETECTION OF ANTI-PHOSPHOLIPID ANTIBODIES

<sup>1</sup>The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university, 197022 St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>The D.O. Ott research institute of obstetrics, gynecology and reproductology, 199033 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>The Pasteur Sankt-Peterburgskii` research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

*The laboratory diagnostic of anti-phospholipid syndrome consists in detection of anti-phospholipid antibodies using technique of enzyme-linked immunosorbent assay namely in detection of anti-cardiolipin antibodies and antibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein. In spite of the fact that serological diagnostic plays a key role in diagnosing anti-phospholipid syndrome application of laboratory tests is complicated by their insufficient standardization. The new approach to detection of anti-phospholipid antibodies became application of immune blotting on the basis of polyvinylidene fluoride membrane. As compared with enzyme-linked immunosorbent assay, the advantage of the mentioned technique is in using hydrophobic solid phase for sorption of antigens. The porous structure of polyvinylidene fluoride membrane orientates hydrophilic areas of phospholipids and by that ensures their more dense distribution imitating bi-lipid layer of membranes of living organism. To specify and compare value of different techniques the comparison was implemented concerning the results of measurement of anti-phospholipid antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay test-systems of various manufacturers and reagents kits for immune blotting. The collection was assembled including bio-materials from 47 patients with non-cardioembolic ischemic strokes, 20 patients with recurrent thrombosis of deep veins of lower extremities and 50 patients with obstetrics pathology and also 30 healthy donors. In the given serums aKlaIgG, aKlaIgM,  $\beta_2$ glycoprotein I were measured using enzyme-linked immunosorbent assay technique assisted by test-systems of Euroimmun and Orgentec*

*Diagnostica and the samples with the highest titre using immune blotting technique with reagents manufactured by Medipan. On the basis of measurement of anti-phospholipid antibodies by various enzyme-linked immunosorbent assay test-systems the rate of  $\alpha\beta$ 2glycoprotein I amounted to 31% in case of Euroimmun reagents kits for enzyme-linked immunosorbent assay, 78% in case of Orgentec Diagnostica test-systems for enzyme-linked immunosorbent assay, aKlIgG - 2% and 30%, aKlIgM - 31% and 54% correspondingly. The measurement of anti-phospholipid antibodies using immune blotting technique on Medipan test-systems in bio-samples with the highest titres detected  $\alpha\beta$ 2glycoprotein I in all patients, aKlIgG in 70% and aKlIgM in 30% of patients. The convergence between three commercial reagents kits varies from 20% to 88%. The standardization of commercial test-systems still to be achieved. The new technique of immune blotting can be applied jointly with classic techniques of serological diagnostic of anti-phospholipid syndrome. The absence of algorithms of diagnostic and standardization of different test-systems for detection of anti-phospholipid antibodies prejudices reliability of serological diagnosis of anti-phospholipid syndrome and therefore existence of anti-phospholipid syndrome as a nosologic unit.*

**Key words:** anti-phospholipid syndrome; anti-phospholipid antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; immune blotting; standardization

**For citation:** Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovieva L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian A.A. The comparative analysis of immunologic techniques of detection of anti-phospholipid antibodies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 40-44. (in Russ.)*. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-40-44>

**For correspondence:** Tkachenko O.Yu., researcher of research center of molecular medicine of the I.P. Pavlov first St.Petersburg state medical university e-mail: tkachenie@mail.ru

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

**Acknowledgment.** The study was supported by the Russian scientific foundation, agreement № 16-15-00118

Received 27.06.2016  
Accepted 01.08.2016

**Введение.** Антифосфолипидные антитела (АФА) — серологический маркер антифосфолипидного синдрома (АФС), который характеризуется венозными и/или артериальными тромбозами, акушерской патологией, тромбоцитопенией, а также разнообразными неврологическими, кожными, сердечно-сосудистыми нарушениями, характер и выраженность которых зависят от локализации тромботической окклюзии в том или ином сосудистом бассейне [1]. Основными лабораторными показателями АФС служат волчаночный антикоагулянт (ВАК), антикардиолипиновые антитела (аКЛ) и антитела к  $\beta_2$ -гликопротеину 1 ( $\alpha\beta_2$ ГП1) [2].  $\beta_2$ -гликопротеин 1 ( $\beta_2$ ГП1) — фосфолипид-связывающий белок и кофактор, необходимый для взаимодействия АФА с фосфолипидами [1]. Оценка титра АФА и количество положительных тестов позволяет разделить пациентов по группам риска. Пациенты, положительные по всем трем тестам, а также и пациенты с высоким титром антикардиолипиновых антител (аКл) ( $> 40$  GPL или MPL) состоят в группе наиболее высокого риска развития клинических проявлений [2]. В структуре других этиологических причин АФС — вероятная причина 14% инсультов, 11% инфарктов миокарда, 10% тромбозов глубоких вен, 6% патологии беременности, 9% выкидышей. У 30—40% пациентов с системной красной волчанкой присутствуют антифосфолипидные антитела, но только у 10% есть проявления антифосфолипидного синдрома [3].

Несмотря на то что серологическая диагностика играет решающую роль в постановке диагноза АФС, использование лабораторных тестов затруднено их недостаточной стандартизацией. Классический метод детекции аКЛ и  $\alpha\beta_2$ ГП1 — иммуноферментный анализ (ИФА). Оригинальные стандарты сыворотки, содержащей АФА, (стандарты Харриса) были первой попыткой глобальной стандартизации тест-систем для диагностики АФС на основе первых радиоиммунных методов [2, 4, 5]. Доступность этих стандартов ограничена. В качестве альтернативных могут использоваться референсные материалы на основе моноклональных человеческих антител, так называемые стандарты АФА Саппоро, но на данный момент они не получили широкого распространения [2, 8, 9].

Новый подход к детекции антифосфолипидных антител — использование иммуноблоттинга. Преимущество этого метода — сорбция антигенов на PVDF-мембране на основе

гидрофобного поливинилиденфторида. Его пористая структура ориентирует гидрофильные участки фосфолипидов и обеспечивает тем самым их плотное распределение. Данный метод более полно отражает связь антител с антигеном в организме пациентов с АФС [10].

Цель нашего исследования — сопоставление классических и новых методов детекции АФА и оценка их диагностической ценности в постановке серологического диагноза АФС.

**Материал и методы.** Для оценки встречаемости АФА и сопоставимости тестов для их выявления проведен анализ информационной базы данных специализированной лаборатории за 2013—2014 гг. Комплексный тест, включающий определение аКлIgG, аКлIgM,  $\alpha\beta_2$ ГП1, выполнен 885 пациентам.

Нами собраны клинические данные и биологические образцы: 47 образцов пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 20 — пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, 51 — пациентов с акушерской патологией, 70 — здоровых доноров, а также 34 биологических образца с высоким титром АФА из серологической коллекции лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний.

Для исследования сопоставимости результатов тестов оценены тест-системы различных производителей. Мы использовали ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), в дальнейшем именуемой Производитель 1 (ПР1); фирмы Orgentec Diagnostica (Германия), Производитель 2 (ПР2), и тест-системы фирмы Medipan, основанные на методе иммуноблоттинга, Производитель 3 (ПР3), в соответствии с инструкцией. В собранных биообразцах измерены аКлIgG, аКлIgM,  $\alpha\beta_2$ ГП1 антитела. Проведен сравнительный анализ и оценка сходимости результатов.

Определение активности волчаночного антикоагулянта проведено нами в оригинальной модификации: вместо плазмы мы использовали контрольную плазму, смешанную с сывороткой пациентов в соотношении 1:4. Образцы инкубировали при  $t = 0^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, после чего измеряли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на полуавтоматическом коагулометре (Helena Biosciences Europe). Использовали чувствительные к ВАК реактивы APPTSiLPlus (Helena Biosciences Europe). Соотношение сыворотки и плазмы, время и температура инкубации опре-

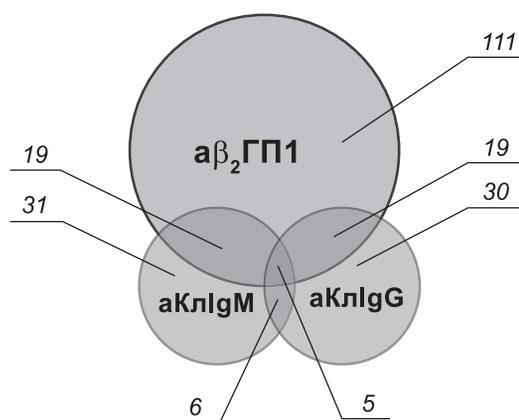


Рис. 1. Сходимость сероположительных результатов тестов для выявления АФА на основе анализа лабораторной базы данных.

Преобладают а-β<sub>2</sub>ГП1, при этом три положительных маркера АФС обнаружены только в 5 образцах. Цифрами обозначено количество серопозитивных образцов при сопоставлении сочетанного выявления АФА.

деляли экспериментальным путем. Мы рассчитали границы нормы в биообразцах 70 здоровых доноров методом 95 перцентиль и оценили воспроизводимость данной методики. В качестве референтного значения был принят временной интервал от 24 с до 50 с. Мы измерили ВАК в оригинальной модификации в 34 биообразцах с высоким титром АФА из серологической коллекции специализированной лаборатории.

Для определения роли минорных антител в диагностике АФС в ВАК-положительных образцах измерены антитела к аннексину V IgM, IgG и антитела к протромбину методом ИФА на тест-системах фирмы Orgentec Diagnostica (Германия).

**Результаты.** Для сопоставления результатов тестов для выявления АФА между собой мы провели анализ базы лабораторных исследований специализированной лаборатории. Комплексный тест, включающий определение аКлIgG, аКлIgM, аβ<sub>2</sub>ГП1 на тест-системах ПР1, выполнен 885 пациентам. Лабораторный диагноз антифосфолипидного синдрома выставлен 122 пациентам (рис. 1) Из них аβ<sub>2</sub>ГП1 определяли у 90%, аКлIgG — у 27, аКлIgM — у 27% пациентов. Ведущим маркером стал аβ<sub>2</sub>ГП1, определяющийся в 55% изоли-

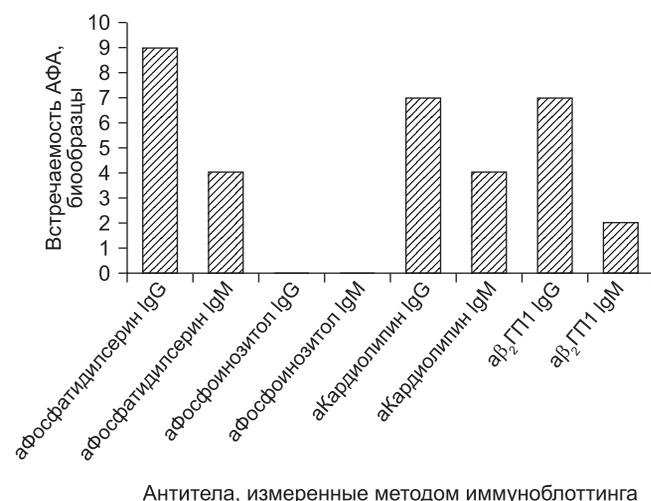


Рис. 2. Встречаемость АФА в ВАК-положительных образцах, измеренных методом иммуноблоттинга, по данным исследования 11 пациентов.

рованно, в 20% — в комплексе с аКлIgG или аКлIgM и только в 0,8% случаев — с аКлIgG и аКлIgM.

Чтобы оценить корреляцию между АФА и ВАК, мы измерили активность ВАК в 34 биологических образцах с наиболее высоким титром антител. Активность ВАК была обнаружена только у 11. Из 11 пациентов 100% положительны по аβ<sub>2</sub>ГП1 (ПР1), 63 — по аКлIgG (ПР2), 73 — по аКлIgG (ПР2), 55 — по аКлIgM (ПР1), 73 — по аКлIgM (ПР2), 73 — по аPs-PT (ПР2), 0,09 — по aAnnexinIgG, 18% — по aAnnexinIgM (ПР2).

Также в ВАК-положительных образцах мы измерили АФА методом иммуноблоттинга (ПР3): антитела к фосфатидилсерину IgG обнаружили в 82% образцов, к фосфатидилсерину IgM — в 36, фосфоинозитолу IgG — в 36, фосфоинозитолу IgM — в 9, аКлIgG — в 64, аКлIgM — в 36, аβ<sub>2</sub>ГП1 IgG — 64, аβ<sub>2</sub>ГП1 IgM — в 18% (рис. 2).

Для определения встречаемости АФА в группах пациентов с разными клиническими проявлениями, а также для оценки сходимости ИФА тест-систем аКлIgM, аβ<sub>2</sub>ГП1 измерены в биообразцах пациентов с некардиоэмболическими инсультами, тромбозами глубоких вен, патологией беременности на ИФА тест-системах ПР1 и ПР2 (см. таблицу, рис. 3). У пациенток с патологией беременности АФА выявляла чаще, чем у других групп пациентов.

Чтобы уточнить лабораторный диагноз АФС и сравнить классический и новый методы детекции АФА в сомнительных биообразцах, мы измерили АФА методом иммуноблоттинга (ПР3) (рис. 4). Согласно полученным данным наиболее частым маркером АФС оказался β<sub>2</sub>ГП1.

Среди больных с подтвержденным методом иммуноблоттинга (ПР3) лабораторным диагнозом АФС превалирует группа пациентов, положительных по одному маркеру (ПР1) и по двум маркерам (ПР2).

**Обсуждение.** В зависимости от локализации тромбоза, АФС может поражать несколько систем и органов, а также служить причиной выкидышей и преждевременных родов, что делает проблему АФС актуальной во врачебной практике различных узких специалистов. Клинические проявления АФС неспецифичны, поэтому диагноз может быть верифицирован только посредством измерения АФА. Измерение аКЛ, аβ<sub>2</sub>ГП1, ВАК, являющихся основными лабораторными критериями АФС, затруднено в связи с методологическими сложностями, а также недостаточной стандартизацией тестов. Выбор источника антигена, типа сорбционной поверхности, состава дилуирующих, моющих, блокирующих буферных растворов, использования сыворотки или плазмы в качестве биоматериала, а также температуры и времени инкубации тест-систем представляют собой сложную задачу и отличаются у разных производителей. Эти методологические

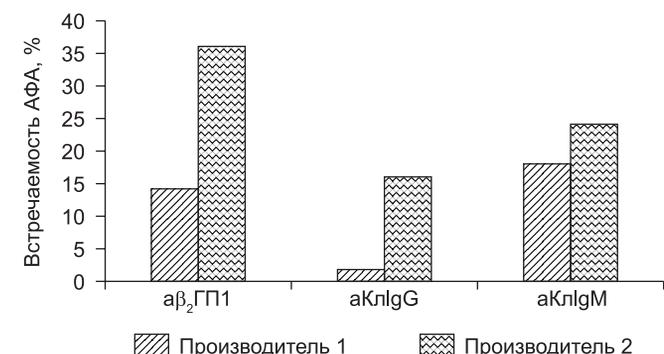


Рис. 3. Сравнение встречаемости АФА, измеренных ИФА тест-системами ПР1 и ПР2 в 128 биообразцах пациентов с предполагаемым АФС.

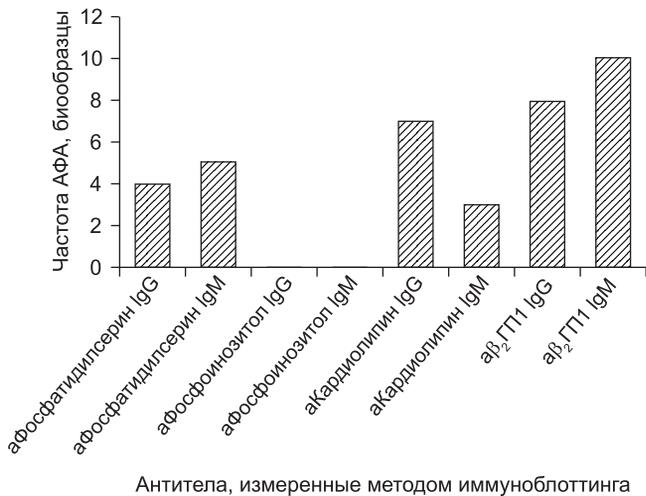


Рис. 4. Частота АФА в сомнительных биообразцах, измеренных методом иммуноблоттинга.

особенности, а также отсутствие международных стандартов ведут к значительным вариациям результатов [2, 4, 5]. Для преодоления этих проблем научным и стандартизационным комитетом Международного общества по изучению тромбоза и гемостаза разработаны рекомендации по детекции антифосфолипидных антител для твердофазных тест-систем [11—15]. Авторы предлагают алгоритмы для улучшения преаналитического этапа, проведение исследования на АФА в течение 2—3 дней после забора крови, постановки проб в дублях, расчет внутрилабораторного пограничного значения и референтного интервала, но не упоминают о недостаточной стандартизации тест-систем. Несмотря на рекомендации для лабораторной диагностики АФС методом ИФА, результаты тестов, выполненных на различных коммерческих тест-системах, плохо сопоставимы между собой [2, 17].

В нашей работе мы проанализировали базу лабораторных исследований специализированной лаборатории, сравнили ИФА тест-системы разных производителей между собой, а также оценили новый метод иммуноблоттинга для детекции антифосфолипидных антител, использовали его в качестве подтверждающего метода в ВАК-положительных и сомнительных биологических образцах.

Анализ базы лабораторных серологических исследований за 2013—2014 гг. показал, что преобладающим маркером АФС оказались антитела к β<sub>2</sub>ГТТ1, в то время как аКЛ, IgM, так и IgG встречаются крайне редко и практически никогда — изолированно. Изолированная положительность как по аКЛ, так и по аβ<sub>2</sub>ГТТ1 не ассоциирована с тромбозами. Наиболее вероятно, что лишь аβ<sub>2</sub>ГТТ1 с ВАК-активностью патогенетически связаны с клиническими проявлениями.

**Заключение.** Из проведенного нами сравнительного анализа и оценки сходимости ИФА тест-систем ПР1 и ПР2 можно сделать вывод, что сходимость тест-систем разных производителей вариабельна, в некоторых тестах — крайне низка (от 20 до 88%).

Один из первых сравнительных анализов тест-систем ИФА проведен в 1987 г. Авторы сравнивали чувствительность первых коммерческих и внутрилабораторных тест-систем и пришли к выводу, что чувствительность внутрилабораторных тест-систем выше чувствительности коммерческих тестов и что ИФА-методика для детекции АФА нуждается в стандартизации [5]. В 2009 г. вышла обзорная статья, название которой очень хорошо характеризует возникшую 20 лет назад проблему, до сих пор не имеющую решения [17]. Редкие статьи о сравнении коммерческих тест-систем между собой говорят о том, что анализ воспроизводимости показывает небольшие различия между ИФА тест-систем от разных производителей [16, 18].

Частота положительных результатов при использовании реактивов разных производителей в исследованных нами группах пациентов крайне вариабельна. По результатам тестов наибольшее значение приобретает аКЛ IgM и аβ<sub>2</sub>ГТТ1. Тест-системы ПР1 чаще выявляют аβ<sub>2</sub>ГТТ1, наборы реактивов ПР2 — КЛ IgM. Из некритериальных маркеров (Ps-Pt и An-pexin) а-PS-PT тест обладает чувствительностью, сравнимой с чувствительностью аКЛ IgM и аКЛ IgG [19—21].

В качестве подтверждающего теста мы использовали метод иммуноблоттинга (ПР3) в сомнительных биологических образцах, которые были положительными при использовании ИФА тест-систем хотя бы одного из производителей. Помимо использования PVDF — мембраны в качестве твердой фазы, преимуществом данной методики стало еще и определение минорных классов АФА, а именно антител к фосфатидилсерину и фосфатидилинозитолу. Антитела к фосфатидилсерину определялись в 32—80% биологических образцов, а антитела к фосфатидилинозитолу практически не идентифицировались. В отличие от ИФА тест-систем, при использовании методики иммуноблоттинга преобладающим маркером после аβ<sub>2</sub>ГТТ1 оказывается аКЛ IgG.

В целом полученные нами данные о детекции антикардиолипиновых антител и антител к β<sub>2</sub>-гликопротеину и сравнение их с ИФА тест-системами свидетельствуют о том, что сходимость детекции антифосфолипидных антител методом иммуноблоттинга с тестами ИФА ПР2 значимо превышает сходимость с тестами ИФА фирмы ПР1. Метод иммуноблоттинга представляется нам довольно перспективным для использования в качестве подтверждающего теста в диагностике АФС, но вопрос об отсутствии стандартизации тест-систем ИФА различных производителей остается открытым.

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

#### Встречаемость АФА в группах пациентов с разными клиническими проявлениями

Группы пациентов	Антитела к β <sub>2</sub> гликопротеину1 (ПР1)	Антитела к β <sub>2</sub> гликопротеину1 (ПР2)	Антитела к кардиолипину IgG (ПР1)	Антитела к кардиолипину IgG (ПР2)	Антитела к кардиолипину IgM (ПР1)	Антитела к кардиолипину IgM (ПР2)
Пациенты с некардиоэмболическим острым инсультом (n = 47)	4 (8%)	11 (25%)	—	2 (6%)	—	15 (34%)
Пациентки с патологией беременности (n = 51)	9 (18%)	19 (39%)	1 (2%)	12 (24%)	12 (24%)	5 (11%)
Пациенты с тромбозом глубоких вен (n = 20)	1 (5%)	5 (10%)	—	—	13 (26%)	5 (10%)
Здоровые доноры (n = 10)	2 (20%)	—	—	1 (10%)	—	—

Примечание. ПР1 — Euroimmun; ПР2 — Orgentec Diagnostica.

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—20 см. REFERENCES)

1. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтерра; 2004.
21. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани. Медицинская иммунология. 2007; 9(1): 69—76.

REFERENCES

1. Nasonov E.L. Antiphospholipid Syndrome [Antifosfolipidnyy sindrom]. Moscow: Litterra; 2004. (in Russian)
2. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Cervera R. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 2006; 4(2): 295—488.
3. Barbhuiya M., Erkan D. Top 10 clinical research developments in antiphospholipid syndrome. Curr. Rheumatol. Rep. 2013; 15(10): 367.
4. Devreese K.M. Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? Lupus. 2012; 21(7): 718—2.
5. Urbanus R.T., de Groot P.G. Antiphospholipid antibodies—we are not quite there yet. Blood Rev. 2011; 25(2): 97—106.
6. De Groot P.G., Derksen R.H., de Laat B. Twenty-two years of failure to set up undisputed assays to detect patients with the antiphospholipid syndrome. Semin. Thromb. Hemost. 2008; 34(4): 347—55.
7. Pierangeli S.S., Favaloro E.J., Lakos G., Meroni P.L., Tincani A., Wong R.C. et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Clin. Chim. Acta. 2012; 413(1-2): 358—60.
8. Ichikawa K., Khamashta M.A., Koike T., Matsuura E., Hughes G.R. Beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum. 1994; 37(10): 1453—61.
9. Ichikawa K., Tsutsumi A., Atsumi T., Matsuura E., Kobayashi S., Hughes G.R. et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Arthritis Rheum. 1999; 42(11): 2461—70.
10. Egerer K., Roggenbuck D., Buttner T., Lehmann B., Kohn A., Von L.P. et al. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome

- using a multi-line dot assay. Arthritis Res. Ther. 2011; 13(4): R118.
11. Tincani A., Filippini M., Scarsi M., Galli M., Meroni P.L. European attempts for the standardisation of the antiphospholipid antibodies. Lupus. 2009; 18(10): 913—9.
  12. Tincani A., Allegrì F., Balestrieri G., Reber G., Sanmarco M., Meroni P. et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. Thromb. Res. 2004; 114(5-6): 553—8.
  13. Reber G., Tincani A., Sanmarco M., de Moerloose P., Boffa M.C. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. J. Thromb. Haemost. 2004; 2(10): 1860—2.
  14. Wong R.C., Australasian aCL Working Party. Consensus guidelines for anticardiolipin antibody testing. Thromb. Res. 2004; 114(5-6): 559—71.
  15. Devreese K.M., Pierangeli S.S., de Laat B., Tripodi A., Atsumi T., Ortel T.L. et al. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. J. Thromb. Haemost. 2014; 12(5): 792—5.
  16. Covelli M., Lapadula G., Numo R. Immunoenzymatic test for the study of anti-cardiolipin antibodies. Evaluation of a commercial kit. Quad. Sclavo. Diagn. 1987; 23(4): 447—53.
  17. Reber G., Boehlen F., de Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? Semin. Thromb. Hemost. 2008; 34(4): 340—6.
  18. Decavele A.S., Schouwers S., Devreese K.M. Evaluation of three commercial ELISA kits for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. Int. J. Lab. Hematol. 2011; 33(1): 97—108.
  19. Ieko M., Nakabayashi T., Tarumi T., Yoshida M., Naito S., Atsumi T. et al. Phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody as a new marker for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. Rinsho Byori. 2006; 54(3): 256—62.
  20. Atsumi T., Ieko M., Bertolaccini M.L., Ichikawa K., Tsutsumi A., Matsuura E. et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. Arthritis Rheum. 2000; 43(9): 1982—93.
  21. Sozina A.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Lapin S.V. Coincidence of autoantibodies among patients with diffuse connective tissue disorders. Meditsinskaya immunologiya. 2007; 9(1): 69—76. (in Russian)

Поступила 27.06.16

Принята к печати 01.08.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.24-007.272-092:612.6.02.017.1].613.6

Карзакова Л.М.<sup>1</sup>, Мучукова О.М.<sup>1</sup>, Борисова Л.В.<sup>2</sup>, Кудряшов С.И.<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ HLA-АССОЦИАЦИЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, 428015, г. Чебоксары;

<sup>2</sup>БУ «Республиканский эндокринологический диспансер» Минздрава Чувашии, 428009, г. Чебоксары

*Цель работы* — изучить ассоциации полиморфных аллельных генов HLA класса II — DRB1, DQA1 и DQB1 и их гаплотипических сочетаний с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) у работников кремнийорганического производства в чувашской популяции. Проведено HLA-генотипирование 50 больных ХОБЛ и 38 здоровых работников кремнийорганического производства, принадлежащих к чувашской этнической популяции. Генотипирование проводили по трем генам HLA: DRB1 (14 аллелей), DQA1 (8 аллелей) и DQB1 (11 аллелей) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Для типирования использовали наборы фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Степень ассоциации HLA-аллелей и гаплотипов с развитием ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства определяли по значению относительного риска (ОР). Обнаружены отрицательные ассоциации ХОБЛ с аллелями HLA-DRB1\*01 (ОР = 0,021;  $p < 0,001$ ); DQA1\*0101 (ОР = 0,013;  $p < 0,001$ ); DQB1\*0501 (ОР = 0,021;  $p < 0,001$ ) и гаплотипами DRB1\*01-DQA1\*0101 (ОР = 0,031;  $p < 0,01$ ); DRB1\*07-DQA1\*0201 (ОР = 0,076;  $p < 0,01$ ); DRB1\*13-DQA1\*0102 (ОР = 0,11;  $p < 0,05$ ). Установлены HLA-маркеры устойчивости к развитию ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства в чувашской популяции.

Для корреспонденции: Карзакова Луиза Михайловна, д-р мед.наук, зав.каф. госпитальной терапии с курсом клин. иммунологии, e-mail: [luizak58@mail.ru](mailto:luizak58@mail.ru)

**Ключевые слова:** HLA-ассоциация заболеваний; хроническая обструктивная болезнь легких; чувашская популяция; кремнийорганическое производство.

**Для цитирования:** Карзакова Л.М., Мучукова О.М., Борисова Л.В., Кудряшов С.И. Исследование HLA-ассоциаций хронической обструктивной болезни легких в условиях кремнийорганического производства. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (1): 44-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-44-49>

Карзакова Л.М.<sup>1</sup>, Мучукова О.М.<sup>1</sup>, Борисова Л.В.<sup>2</sup>, Кудряшов С.И.<sup>1</sup>

#### THE STUDY OF HLA-ASSOCIATIONS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE DISEASE OF LUNGS IN CONDITIONS OF ORGANIC-SILICON MANUFACTURE

<sup>1</sup>The I.N. Ulianov Chuvashskii` state university of the Minobrnauka of Russia, 428015 Cheboksary, Russia

<sup>2</sup>The Respublikanskii` endocrinology dispensary of the Minzdrav of Chuvashiia, 428009 Cheboksary, Russia

*The purpose of study is to examine associations of polymorphic allele genes HLA class II - DRB1, DQA1 and DQB1 and their haplotypic combinations with chronic obstructive disease of lungs in workers of organocilic manufacture in Chuvash population. The HLA-genotyping was implemented to 50 patients with chronic obstructive disease of lungs and 38 healthy workers of organocilic manufacture, belonging to Chuvash ethnic population. The genotyping was implemented on three genes HLA: DRB1 (14 alleles), DQA1 (8 alleles) and DQB1 (11 alleles) using multi-primary polymerase chain reaction technique. The typing was implemented using kits manufactured by "DNA-Technology" (Russia). The degree of association of HLA-alleles and gaplotypes with development of chronic obstructive disease of lungs in conditions of organocilic manufacture was determined by value of relative risk (rr). The study established negative associations of chronic obstructive disease of lungs with alleles HLA-DRB1\*01 (rr=0.021; p<0.001); DQA1\*0101 (rr=0.013; p<0.001); DQB1\*0501 (rr=0.021; p<0.001) and gaplotypes DRB1\*01-DQA1\*0101 (rr=0.031; p<0.01); DRB1\*07-DQA1\*0201 (rr=0.076; p<0.01); BKII1\*13-DQA1\*0102 (rr=0.11; p<0.05).*

*The HLA-markers of resistance to development of chronic obstructive disease of lungs in conditions of organocilic manufacture in Chuvash population.*

**Key words:** HLA-association of diseases; chronic obstructive disease of lungs; Chuvash population; organocilic manufacture

**For citation:** Karzakova L.M., Muchukova O.M., Borisova L.V., Kudriashov S.I. The study of HLA-associations of chronic obstructive disease of lungs in conditions of organo-silicon manufacture. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 44-49. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-44-49>

**For correspondence:** Karzakova L.M., doctor of medical sciences, head of the chair of hospital therapy with course of clinical immunology. e-mail: [luizak58@mail.ru](mailto:luizak58@mail.ru)

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

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

Received 15.06.2016

Accepted 28.06.2016

**Введение.** О возможности развития патологии бронхиального дерева, связанной с воздействием вредных производственных факторов, известно на протяжении нескольких столетий [3]. В настоящее время известны две нозологические формы профессионального поражения воздухоносных путей легких — профессиональный бронхит и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) профессиональной этиологии [13]. В соответствии с программным документом экспертов глобальной инициативы по борьбе с ХОБЛ — Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), «ХОБЛ — болезненное состояние, характеризующееся не полностью обратимой бронхиальной обструкцией» [16]. Обструкция прогрессирует и является следствием атипичной воспалительной реакции легких на раздражающие частицы и газы. Главным фактором риска в 80—90% случаев ХОБЛ выступает курение. Существенная часть (4,5—24,6%) случаев ХОБЛ может быть связана с производственной деятельностью человека [7, 14]. Среди основных факторов риска профессиональной природы наиболее агрессивными считаются кадмий и кремний [1]. Кремнийорганические соединения вызывали в эксперименте повреждение слизистой оболочки бронхиального дерева, эмфизематозное расширение просветов альвеол с истончением межальвеолярных перегородок [4]. В связи с этим наше внимание привлекли высокие показатели заболеваемости ХОБЛ, рост заболеваемости с временной утратой трудоспособности по болезням органов дыхания у работников цеха по производству кремнийорганических соединений ПАО «Химпром», г. Новочебоксарск Чувашской Республики [11].

Вместе с тем не у всех курящих и не у всех работников, подвергающихся вредному воздействию промышленных аэрозолей, развивается бронхиальная обструкция [16]. Сле-

довательно, в формировании ХОБЛ участвуют внутренние индивидуальные факторы. Предполагается наличие группы генов восприимчивости к ХОБЛ, включающей гены фактора некроза опухоли альфа, трансформирующего фактора роста бета1 [12]. На роль генов, определяющих предрасположенность индивида к развитию ХОБЛ, могут претендовать и аллели генов системы гистосовместимости человека — HLA (human leukocyte antigens) [21]. HLA-гены класса II, чрезвычайно важные для развития иммунного ответа, рассматриваются в качестве маркеров целого ряда заболеваний, в патогенезе которых участвуют иммунологические механизмы [17, 18, 20]. Известны единичные работы, посвященные изучению ассоциации генов HLA с ХОБЛ [2, 6]. В чувашской популяции выявлена связь ХОБЛ с HLA-аллелями DRB1\*11, DQB1\*0301 [6]. В русской популяции населения Ульяновской области России данное заболевание было ассоциировано с аллелями DQB1\*0201, DQA1\*0101 [2]. Противоречивость приведенных данных может быть связана с этническими особенностями HLA-профиля обследуемых и разнородностью состава обследованных групп, обусловленных различиями в этиопатогенетических механизмах развития ХОБЛ.

Целью настоящего исследования явилось определение роли генов HLA (класс II) в развитии ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства в чувашской популяции.

**Материал и методы.** Обследованы 88 работников цеха кремнийорганического производства (ПАО «Химпром», г. Новочебоксарск, Россия). Обследуемую когорту разделили на две группы. Первую группу составили больные ХОБЛ в стадии ремиссии — 50 человек (в том числе 20 мужчин и 30 женщин в возрасте 28—66 лет), у которых симптомы заболевания в виде кашля и одышки развились в течение 3—5 лет после начала работы на химкомбинате. ХОБЛ диагностировали в

соответствии с диагностическими критериями GOLD [16]. Длительность заболевания —  $12,3 \pm 2,4$  года. Вторую группу составили 38 человек (22 мужчины и 16 женщин в возрасте 32—64 лет), работающих и живущих в тех же условиях на протяжении 15—30 лет и не имеющих заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью. Эта группа работников, устойчивых к развитию ХОБЛ, условно названа группой «резистентных» к заболеванию. Сформированные группы были однородны по половому, возрастному составу, продолжительности работы на химическом производстве, стажу курения. Средний возраст группы больных ХОБЛ составил  $45,4 \pm 2,3$  года, лиц группы «резистентных» —  $43,5 \pm 2,1$  года. В обеих группах преобладали лица мужского пола, составляющие  $66,0 \pm 6,7\%$  в первой группе и  $68,4 \pm 7,5\%$  — во второй. В первой группе доля курящих равнялась  $22,0 \pm 5,8\%$ , во второй —  $21,0 \pm 6,6\%$ . С целью исключения этнических различий в обследуемые группы отбирались лишь коренные жители Чувашии, предки которых как минимум в трех последних поколениях принадлежали к чувашской этнической популяции.

HLA-генотипирование аллелей II класса проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно методике производителя в ДНК, полученной из ядерных клеток периферической крови (ПК), с использованием наборов реагентов НПФ «ДНК-Технология» (Москва). Типировали по 14 аллелям DRB1, 8 аллелям DQA1 и 11 аллелям DQB1-локусов. Параллельно с иммуногенетическими исследованиями проводили иммунофенотипирование мононуклеарных клеток ПК обследуемых методом непрямого иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD71, CD95 («Сорбент», Москва), определение концентрации сывороточных IgM, IgG, IgA по Манчини, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000), изучение фагоцитарной активности нейтрофилов в латекс-тесте согласно стандартным методикам [10]. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0. Частоту аллелей и гаплотипов (H) вычисляли по формулам, предложенным Р. Маттиуз и соавт. [19]. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины относительного риска (ОР), которую высчитывали по модифицированной формуле J. Haldane для малых выборок [8]. Достоверность ассоциации, а также разницы в частоте распространения аллелей в группах обследованных оценивали с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации ( $\chi^2$ ) и точному двухстороннему тесту Фишера (модуль Nonparametrics/Distrib.). Коррекцию  $p$  ( $p_c$ ) проводили путем умножения величины  $p$  на число исследованных HLA-аллелей [8]. При изучении количественных показателей CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD71, CD95-лимфоцитов, IgM, IgG, IgA, ЦИК учитывалось их распределение. Если оно приближалось к нормальному, то данные представляли в виде  $M \pm SD$  (где  $M$  — среднее арифметическое,  $SD$  — среднее квадратичное отклонение), при этом достоверность различия количественных показателей определяли с помощью  $t$ -параметрического критерия Стьюдента ( $p$ ). Если распределение отличалось от нормального, то данные представляли в виде  $Me \{P_{10}; P_{90}\}$ , где  $Me$  — медиана,  $P_{10}$  — нижний и  $P_{90}$  — верхний перцентили, и при сравнении двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна—Уитни [9].

**Результаты и обсуждение.** Анализ частот обнаруженных аллелей HLA класса II в обследованных группах выявил отсутствие у больных ХОБЛ аллелей DRB1\*01, DQA1\*0101 и DQB1\*0501. При этом все три данных аллеля являлись наиболее часто встречающимися HLA-специфичностями у представителей группы «резистентных» работников кремнийорганического производства (табл. 1).

Выраженность ассоциации аллелей HLA с развитием ХОБЛ определялась по значению ОР. Значения ОР, превышающие 1, свидетельствуют о положительной ассоциации аллеля с развитием рассматриваемого заболевания; значения ОР меньше 1 указывают на ассоциацию вариантов HLA-генов с устойчивостью к развитию заболевания. У больных ХОБЛ установлены отрицательные ( $OP < 1$ ) связи HLA-генов DRB1\*01, DQA1\*0101 и DQB1\*0501 с развитием заболевания. Более наглядными являются реципрокные значения, представляющие собой величины, обратные ОР ( $1/OP$ ), которые показывают, во сколько раз меньше риск развития заболевания у лиц, имеющих в своем генотипе конкретный аллель, чем у лиц

Таблица 1

**Частоты распределения аллелей HLA класса II среди больных ХОБЛ и устойчивых к развитию ХОБЛ работников кремнийорганического производства, %**

HLA-аллель	Больные ХОБЛ (n = 50)	Устойчивые к ХОБЛ (n = 38)	p
DRB1*01	0	15,8	< 0,001
*15(02)	14,0	5,3	NS
*16(02)	6,0	10,5	NS
*17(03)	6,0	13,2	NS
*18(03)	0	0	NS
*04	12,0	7,9	NS
*11(05)	26,0	7,9	NS
*12(05)	6,0	2,6	NS
*13(06)	10,0	6,6	NS
*14(06)	0	5,3	NS
*07	2,0	13,1	NS
*08	2,0	5,3	NS
*09	16,0	6,1	NS
*10	0	0	NS
DQA1*0101	0	21,0	< 0,001
*0102	18,0	18,4	NS
*0103	12,0	5,3	NS
*0201	2,0	13,1	NS
*0301	28,0	13,1	NS
*0401	2,0	5,3	NS
*0501	38,0	23,7	NS
*0601	0	0	NS
DQB1*0201	6,0	23,7	NS
*0301	34,0	15,8	NS
*0302	4,0	0	NS
*0303	22,0	7,9	NS
*0305	2,0	2,6	NS
*0401/0402	2,0	5,3	NS
*0501	0	15,8	< 0,01
*0502/0504	6,0	15,8	NS
*0503	0	0	NS
*0601	6,0	2,6	NS
*0602-8	18,0	10,5	NS

Примечание. NS — различие статистически недостоверно ( $p > 0,05$ ).

Таблица 2

Таблица 3

**Частота HLA-ассоциаций у больных ХОБЛ и у устойчивых к ХОБЛ работников кремнийорганического производства**

HLA-аллель	Частота HLA-аллеля, %		ОР	I/ОР	p <sub>c</sub>
	Больные ХОБЛ	Устойчивые к ХОБЛ			
DRB1*01	0	15,8	0,021	47,6	0,0001
DQA1*0101	0	21,0	0,013	76,9	0,0001
DQB1*0501	0	15,8	0,021	47,6	0,0001

без этого аллеля. Наличие у работников кремнийорганического производства в генотипе аллелей DRB1\*01, DQA1\*0101 и DQB1\*0501 снижает риск возникновения ХОБЛ в 47,6; 76,9 и 47,6 раза соответственно (табл. 2).

Для анализа генетической структуры популяции большее значение, по сравнению с отдельными аллелями, имеют устойчивые гаплотипические сочетания, которым свойственно достоверное положительное неравновесное сцепление [5]. Из парных сочетаний аллелей локусов HLA-DRB1 и HLA-DQA1, имеющих статистически значимое положительное сцепление, гаплотипы HLA-DRB1\*01-DQA1\*0101, HLA-DRB1\*07-DQA1\*0201, HLA-DRB1\*13-QA1\*0102, HLA-DRB1\*14-DQA1\*0101, HLA-DRB1\*15-QA1\*0103 и DRB1\*17-DQA1\*0501 определялись лишь в группе резистентных лиц и не обнаружены у больных ХОБЛ (табл. 3). Два гаплотипических сочетания: HLA-DRB1\*11-DQA1\*0501 и HLA-DRB1\*15-DQA1\*0102 не выявлялись у устойчивых к развитию ХОБЛ работников, но встречались у больных ХОБЛ.

Анализ аллельных сочетаний локусов DRB1 и DQB1 показал, что для больных ХОБЛ характерно присутствие гаплотипа DRB1\*15-DQB1\*0601, в то время как у резистентных к заболеванию лиц специфичным был гаплотип DRB1\*14-DQB1\*0502-04. Среди аллелей локусов DQA1 и DQB1 не было выявлено ни одного статистически достоверного гаплотипического сочетания ни в группе больных, ни в группе устойчивых к развитию заболевания лиц.

В результате изучения степени ассоциации HLA-гаплотипов с развитием ХОБЛ с использованием показателя ОР установлено, что из перечисленного выше ряда гаплотипических сочетаний лишь три гаплотипа — DRB1\*01-DQA1\*0101, DRB1\*07-DQA1\*0201 и DRB1\*13-DQA1\*0102 — имели статистически значимую ассоциацию с ХОБЛ (табл. 4), причем все связи имели обратный характер. Следовательно, наличие данных гаплотипов в генотипе работников кремнийорганического производства обеспечивает устойчивость к развитию ХОБЛ.

По мнению W. Vodmer и J. Vodmer [15], проявление неравновесного сцепления в популяции обусловлено действием естественного отбора. Неравновесное сцепление обеспечивает наиболее благоприятное взаимоотношение с окружающей средой. Видимо, присутствие в геноме у представителей чувашской популяции гаплотипов DRB1\*01-DQA1\*0101, DRB1\*07-DQA1\*0201 и DRB1\*13-DQA1\*0102 обеспечивает резистентность к отрицательным факторам внешней среды и обуславливает устойчивость к развитию ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства, а также, возможно, в условиях воздействия и других факторов, способных вызывать развитие данного заболевания (курение, выхлопные газы автотранспорта, химические поллютанты и др.). Данные гаплотипы можно рассматривать как протективные маркеры заболевания.

Вероятно, гаплотипы устойчивости к ХОБЛ обеспечивают оптимальное функционирование иммунной системы, выполняя регулирующую функцию в отношении иммунного ответа.

**Частота HLA-гаплотипов со статистически значимой и положительной величиной неравновесного сцепления у работников кремнийорганического производства**

HLA-гаплотип	Больные ХОБЛ	Устойчивые к ХОБЛ
DRB1*01-DQA1*0101	—	1315
		1728***
DRB1*04-DQA1*0301	1185	957
	1835**	1115**
DRB1*07-DQA1*0201	—	1216
		1416***
DRB1*08-DQA1*0401	206	512
	211*	541**
DRB1*09-DQA1*0301	1891	707
	2929***	823*
DRB1*11-DQA1*0501	1769	—
	3876**	
DRB1*12-DQA1*0501	—	—
DRB1*13-DQA1*0102	—	654
		823*
DRB1*13-DQA1*0103	775	496
	871***	541*
DRB1*14-DQA1*0101	—	848
		1115*
DRB1*15-DQA1*0102	984	—
	1316**	
DRB1*15-DQA1*0103	—	512
		541**
DRB1*16-DQA1*0102	511	1125
	646*	1416**
DRB1*17-DQA1*0501	—	1254
		1728**
DRB1*08-DQB1*0401-02	206	512
	211*	541**
DRB1*09-DQB1*0303	1804	496
	2362***	541*
DRB1*11-DQB1*0301	1744	681
	3230***	823*
DRB1*13-DQB1*0602-08	711	732
	871**	823**
DRB1*14-DQB1*0502-04	—	922
		1115**
DRB1*15-DQB1*0601	544	—
	646*	
DRB1*15-DQB1*0602-08	1034	481
	1324**	541*
DRB1*16-DQB1*0502-04	604	922
	646***	1115**

Примечание. Верхняя строка в каждой ячейке таблицы — частота гаплотипа (Н × 10 000), нижняя строка — величина неравновесного сцепления (D × 10 000).

\* — p < 0,05; \*\* — p < 0,01; \*\*\* — p < 0,001 — достоверность по двухстороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц.

Таблица 4

Статистически значимые ассоциации гаплотипических сочетаний с ХОБЛ у работников кремнийорганического производства

HLA-гаплотип	ОР	1/ОР	p
DRB1*01-DQA1*0101	0,031	32,2	0,0018
DRB1*07-DQA1*0201	0,076	13,1	0,0035
DRB1*13-DQA1*0102	0,11	9,09	0,039

Поиск механизмов иммунорегуляторной роли HLA-молекул поставил задачу изучения ассоциаций HLA-гаплотипов с иммунологическими параметрами, отражающими функционирование различных звеньев иммунной системы у здоровых людей. Для решения этой задачи исследуемая когорта здоровых работников была разделена на подгруппы в зависимости от наличия и отсутствия в генотипе обследуемого рассматриваемого гаплотипа, и для каждой подгруппы были определены медиана и перцентильные значения иммунологического показателя в пределах  $P_{10}$ — $P_{90}$  (табл. 5).

Маркер устойчивости к ХОБЛ-гаплотип DRB1\*01-DQA1\*0101 имел наибольшее влияние на иммунологические параметры: его наличие в генотипе здоровых лиц определяло более высокие уровни содержания клеток с хелперным фенотипом (CD4), преобладание экспрессии на мононуклеарных клетках активационных маркеров позитивной активации CD25 (рецепторов цитокина с регулирующей Т-клеточной функцией — интерлейкина-2) над маркером негативной активации — CD95 (Fas-рецептором апоптоза). Другой гаплотип — DRB1\*13-DQA1\*0102 определял низкий уровень экспрессии рецептора активационного апоптоза. Гаплотипическое сочетание аллелей DRB1\*07 и DQB1\*0201 отрицательно влияло на число эозинофильных клеток в ПК. Таким образом, влияние гаплотипических маркеров устойчивости к развитию ХОБЛ на функционирование иммунной системы сводится к их стимулирующему влиянию на количественные и активационные показатели клеточного звена адаптивного иммунитета. В связи с полученными данными значительный интерес представляет сравнение показателей функционирования различных звеньев иммунной системы больных ХОБЛ и устойчивых к развитию заболевания работников кремнийорганического производства (табл. 6).

Иммунный статус у больных ХОБЛ отличался низкими уровнями содержания в ПК лимфоцитов, связанных с клеточным механизмом адаптивного иммунитета — CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-клеток. Наблюдался дисбаланс экспрессии

Таблица 6

Статистически значимые различия иммунологических показателей у больных ХОБЛ и здоровых работников кремнийорганического производства ( $M \pm SD$ )

Иммунологический показатель	Больные ХОБЛ (n = 50)	Устойчивые к ХОБЛ (n = 38)
CD3 <sup>+</sup> -клетки, %	42,3 ± 9,3***	52,6 ± 6,2
CD3 <sup>+</sup> -клетки, абс.	830,6 ± 217,6***	1016,3 ± 266,5
CD4 <sup>+</sup> -клетки, %	22,6 ± 4,9***	32,2 ± 4,8
CD4 <sup>+</sup> -клетки, абс.	438,1 ± 199,2***	610,1 ± 222,3
CD8 <sup>+</sup> -клетки, %	21,3 ± 6,1*	23,6 ± 5,0
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,2 ± 0,4***	1,4 ± 0,4
CD25 <sup>+</sup> -клетки, %	4,1 ± 0,9*	4,5 ± 0,6
CD71 <sup>+</sup> -клетки, %	3,8 ± 0,8***	4,4 ± 0,7
CD95 <sup>+</sup> -клетки, %	19,8 ± 5,9***	11,2 ± 3,8
ЦИК, усл. ед.	17,9 ± 10,7**	13,0 ± 5,8
IgA, г/л	3,4 ± 1,6***	2,6 ± 1,1

активационных маркеров на клетках: число мононуклеаров, несущих маркеры положительной активации CD25 и CD71, оказалось меньше, чем в группе резистентных лиц, а число клеток, имеющих маркер негативной активации — Fas-рецептор апоптоза, напротив, увеличено. У больных уровни ЦИК и IgA в сыворотке крови были выше, чем у здоровых, что может являться свидетельством активации на системном уровне гуморального звена адаптивного иммунного ответа. Характер изменений в функционировании иммунной системы у больных ХОБЛ в целом противоположен сдвигам в иммунологических параметрах, обусловленных регулирующим влиянием на них гаплотипических маркеров устойчивости к ХОБЛ. Следовательно, обнаруженные в настоящем исследовании HLA-сцепленные генетические факторы устойчивости к развитию ХОБЛ опосредованы, возможно, HLA-ассоциированной устойчивостью факторов иммунной защиты организма человека к отрицательному влиянию на них химических факторов.

**Заключение.** В генотипе работников кремнийорганического производства выявлены маркеры устойчивости к развитию ХОБЛ — HLA-аллели DRB1\*01, DQA1\*0101 и DQB1\*0501 и гаплотипические сочетания HLA — DRB1\*01-DQA1\*0101, DRB1\*07-DQA1\*0201 и DRB1\*13-DQA1\*0102. Протективные HLA-маркеры ХОБЛ ассоциированы с более высокими показателями клеточного механизма адаптивного иммунитета, находящимися под HLA-сцепленным генетическим контролем.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 13—21 см. REFERENCES)

1. Айсанов З.Р., Кокосов А.Н., Овчаренко С.И., Хмелькова Н.Г., Цой А.Н., Чучалин А.Г. и др. Хронические обструктивные болезни легких. Федеральная программа. *Русский медицинский журнал*. 2001; 9(1): 9—33.  
2. Брыляева Е.В., Крюков Н.Н., Жестков А.В. Иммуногенетические исследования хронической обструктивной болезни легких. *Практическая медицина*. 2011; 51(3): 55—7.

Таблица 5

Связь показателей иммунного статуса с HLA-гаплотипами устойчивости к ХОБЛ в чувашской популяции

HLA-гаплотип	Показатель иммунного статуса	Значение показателя Me {P <sub>10</sub> ; P <sub>90</sub> }		p
		в присутствии гаплотипа	в отсутствие гаплотипа	
DRB1*01-DQA1*0101	CD4 <sup>+</sup> -клетки, %	34,5 {33; 42}	31 {24; 35}	0,002
	CD25 <sup>+</sup> -клетки, %	6 {4; 8}	4 {3; 5}	0,045
	CD95 <sup>+</sup> -клетки, %	8,5 {4; 14}	11 {8; 19}	0,013
	CD95 <sup>+</sup> -клетки, абс.	140 {80; 280}	200 {130; 350}	0,011
DRB1*13-DQA1*0102	CD95 <sup>+</sup> -клетки, %	8 {7; 9}	11 {8; 19}	0,035
DRB1*07-DQA1*0201	Эозинофилы, %	2 {1; 2}	3 {1; 4}	0,006

Примечание. Здесь и в табл. 6: абс. — абсолютное значение содержания клеток (·10<sup>9</sup>/л).

3. Деметьев Е.М. *Фабрика, что она дает населению и что она у него берет*. 2-е изд. М.: Издательство Товарищества И.Д. Сытина; 1897.
4. Диденко М.Н., Стежка В.А. Влияние наночастиц аморфного высокодисперсного кремнезема на морфологическую структуру внутренних органов крыс. *Биотехнология*. 2009; 2(1): 80—6.
5. Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю. Новые антигены тканевой совместимости человека. М.: Медицина; 1986.
6. Карзакова Л.М., Ухтерова Н.Д., Борисова Л.В., Сунгоркина Е.П., Мучукова О.М., Сунгоркина Т.М. Роль иммунологических и иммуногенетических факторов в развитии хронической обструктивной болезни легких. *Здравоохранение Чувашии*. 2008; (2): 45—51.
7. Мазитова Н.Н. Профессиональные факторы риска хронической обструктивной болезни легких: результаты когортного исследования. *Казанский медицинский журнал*. 2011; 92(4): 537—41.
8. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями. *Вестник Академии медицинских наук СССР*. 1988; (7): 48—51.
9. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М.: Медицина; 2000.
10. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. *Экологическая иммунология*. М.: Издательство ВНИРО; 1995.
11. Шевничина О.Ю. Иммуно-физиологическая реакция организма человека в условиях кремнийорганического производства: Дисс. ... канд. мед. наук. Чебоксары; 2004.
12. Янбаева Д.Г., Байнак О.Ф., Корыгина Г.Ф., Зигидуллин Ш.З., Викторова Т.В. Полиморфные варианты генов провоспалительных цитокинов как маркеры предрасположенности к хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2004; (5): 17—22.
7. Mazitova N.N. Occupational risk factors of chronic obstructive pulmonary disease: results of cohort study. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 92(4): 537—41. (in Russian)
8. Pevnitskiy L.A. Statistical evaluation of HLA antigens associations with diseases. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR*. 1988; (7): 48—51. (in Russian)
9. Platonov A.E. *Statistical Analysis in Biology and Medicine: Challenges, Terminology, Logic, Computer Methods [Statisticheskiy analiz v meditsine i biologii: zadachi, terminologiya, logika, komp'yuternye metody]*. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
10. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov Kh.I. *Ecological Immunology [Ekologicheskaya immunologiya]*. Moscow: Izdatel'stvo VNIRO; 1995. (in Russian)
11. Shevnitsina O.Yu. *Immune and Physiological Reaction of a Human Body in the Conditions of Silicon-organic Production: Diss.* Cheboksary; 2004. (in Russian)
12. Yanbaeva D.G., Baynak O.F., Korytina G.F., Zigidullin Sh.Z., Viktorova T.V. Polymorphic variants of genes of proinflammatory cytokines as markers of susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2004; (5): 17—22. (in Russian)
13. Ameille J., Dalphin J.C., Descatha A., Pairen J.C. Occupational chronic obstructive pulmonary disease: a poorly understood disease. *Rev. Mal. Respir.* 2006; 23(4 Suppl.): 119—30.
14. Bergdahl I.A., Torén K., Eriksson K., Hedlund U., Nilsson T., Flodin R. et al. Increased mortality in COPD among construction workers exposed to inorganic dust. *Eur. Respir. J.* 2004; 23(3): 402—6.
15. Bodmer W.F., Bodmer J.G. Evolution and function of the HLA system. *Brit. Med. Bull.* 1978; 34(3): 309—16.
16. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*. Available at: [http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD\\_Report\\_2015\\_Apr2.pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Apr2.pdf). (accessed 2 April 2015)
17. Kuranov A.B., Kozhamkulov U.A., Vavilov M.N., Belova E.S., Bismilda V.L., Alenova A.H. et al. HLA-class II alleles in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis in Kazakhstan. *Tissue Antigens*. 2014; 83(2): 106—12.
18. Lenz T.L., Deutsch A.J., Han B., Hu X., Okada Y., Eyre S. et al. Widespread non-additive and interaction effects within HLA loci modulate the risk of autoimmune diseases. *Nat. Genet.* 2015; 47(9): 1085—90.
19. Mattiuz P.L., Ihde D., Piazza A., Ceppellini R., Bodmer W.F. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system. In: Terasaky P.I., ed. *Histocompatibility Testing*. Munksgaard Copenhagen; 1970: 193—205.
20. Okada Y., Han B., Tsoi L.C., Stuart P.E., Ellinghaus E., Tejasvi T. et al. Fine mapping major histocompatibility complex associations in psoriasis and its clinical subtypes. *Am. J. Hum. Genet.* 2014; 95(2): 162—72.
21. Wain L.V., Shrine N., Miller S., Jackson V.E., Ntalla I., Soler Artigas M. et al. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *Lancet Respir. Med.* 2015; 3(10): 769—81.

## REFERENCES

Поступила 15.06.16

Принята к печати 28.06.16

Исмаилова А.А., Уралова Ш.А., Нигматова Л.М., Адылов Д.Г., Петрова Т.А., Набиева У.П., Авазова Т.А.

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРИОГЛОБУЛИНОВ В УСЛОВИЯХ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Институт иммунологии Академии Наук Республики Узбекистан, 100060, Ташкент, Узбекистан

*Предложен метод оценки криоглобулинов, связанных с IgM и с IgG, на основе выявления циркулирующих иммунных комплексов у практически здоровых лиц и больных циррозом печени. Показано, что у больных циррозом печени содержание криоглобулинов, связанных с IgM, возрастает почти в 2 раза, а связанных с IgG, более чем в 2,5 раза по сравнению со здоровыми лицами. Установлено, что у практически здоровых лиц криоглобулины также присутствуют в крови в незначительном количестве. Предложенный подход к определению криоглобулинов позволяет до минимума сократить время проведения исследования, а также расход реактивов.*

**Ключевые слова:** криоглобулины; иммунологическая диагностика; циркулирующие иммунные комплексы.

**Для цитирования:** Исмаилова А.А., Уралова Ш.А., Нигматова Л.М., Адылов Д.Г., Петрова Т.А., Набиева У.П., Авазова Т.А. Оптимизация метода определения криоглобулинов в условиях клинико-диагностической лаборатории. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (1):50-52

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2017-62-1-50-52>.

Ismailova A.A., Uralova Sh.A., Nigmatova L.M., Adylov D.G. Petrova T.A., Nabieva U.P., Avazova T.A.

### THE OPTIMIZATION OF TECHNIQUE OF DETECTION OF CRYO-GLOBULINS IN CONDITIONS OF CLINICAL DIAGNOSTIC LABORATORY

The institute of immunology of the Academy of sciences of the Republic of Uzbekistan, 100060 Tashkent, Uzbekistan

*The technique is proposed to evaluate cryoglobulins associated with IgM and IgG on the basis of detection of immune complexes circulating in healthy individuals and patients with liver cirrhosis. It is demonstrated that in patients with liver cirrhosis content of cryoglobulins associated with IgM increases almost twice and those associated with IgG more than two and a half times as compared with healthy individuals. It is established that in healthy individuals cryoglobulins are also present in blood in small amount. The proposed approach to detection of cryoglobulins permits to minimize time of implementation of study and also discharge of reagents.*

**Key words:** cryoglobulin; immune diagnostics; circulating immune complexes

**For citation:** Ismailova A.A., Uralova Sh.A., Nigmatova L.M., Adylov D.G. Petrova T.A., Nabieva U.P., Avazova T.A. The optimization of technique of detection of cryo-globulins in conditions of clinical diagnostic laboratory. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2017; 62 (1): 50-52. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-50-52

**For correspondence:** Ismailova A.A., doctor of medical sciences, deputy director on research activities. e-mail: immunocitokin@rambler.ru

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

**Acknowledgment.** The study was supported by grant of the Republic of Uzbekistan (FA-F6-T054-The state committee for science and technology of the Republic of Uzbekistan)

Received 14.07.2016  
Accepted 01.08.2016

Первое упоминание о криоглобулинах (КГ) принадлежит Wintrobe (1933), затем началось бурное изучение и разработка разных методов и подходов к определению КГ. Криоглобулины — показатель нарушения иммунных свойств организма, они обнаружены при многих заболеваниях: СКВ, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, васкулиты, вирусные гепатиты В и С, цирроз печени и др. [1, 2].

Известно, что перечисленные заболевания связаны с нарушениями в гуморальном звене иммунной системы и сопровождаются увеличением крупных (связанных с IgM) и мелких (связанных с IgG) циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). ЦИК — наиболее универсальные факторы воспалительного процесса, а также тканевого повреждения. Они играют существенную роль в развитии ряда тяжелых

хронических системных заболеваний человека [3]. Известно также, что к одному из типов ЦИК принадлежат белки, которые преципитируют на холоде, — криоглобулины. КГ при температурах ниже +37°C проявляют аномальную растворимость и способны образовывать криопреципитаты, один из компонентов которых может проявлять антительную активность, тогда как КГ формируют иммунные комплексы, играющие существенную роль в хронизации иммунокомплексных заболеваний [2].

Существует множество методов и подходов к определению КГ [4—7]. Однако методы, применяемые в исследовательских целях, не позволяют использовать их в условиях клинико-диагностических лабораторий ввиду отсутствия единого стандарта исследования. Так, существуют разные модификации метода: количественное и полуколичественное определение КГ, их визуальная оценка, в предлагаемых методах используются разные объемы сыворотки, предусматривается длительная инкубация сыворотки при +4°C (от 2 до 7 сут).

**Для корреспонденции:** Исмаилова Адолат Абдурахимовна, д-р мед. наук, зам. дир. по научной работе, e-mail: immunocitokin@rambler.ru

Таблица 1

**Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови здоровых лиц и больных циррозом печени**

Показатель, у.е.	Контрольная группа (n = 69)	Больные ЦП (n = 55)
3% ЦИК, связанные с IgG	24,3 ± 2,3	60,9 ± 6,9*
4% ЦИК, связанные с IgM	41,4 ± 3,8	99,7 ± 10,2*

\* — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) относительно контрольной группы.

Таблица 2

**Содержание криоглобулинов в сыворотке крови здоровых и больных циррозом печени**

Показатели, у.е.	Контрольная группа (n = 69)	Больные ЦП (n = 55)
Криоглобулины, связанные с IgM	11,2 ± 1,7	20,4 ± 4,5*
Криоглобулины, связанные с IgG	12,2 ± 1,5	32,1 ± 5,6**

\* — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) относительно контрольной группы; \*\* — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) относительно контрольной группы.

В связи с этим мы разработали новый подход к определению КГ, в основу которого положено определение крупных (связанных с IgM) и мелких (связанных с IgG) ЦИК, способных преципитировать при +4°C и полностью растворяться при +37°C.

Цель работы — оценить содержание криоглобулинов, связанных с IgM и IgG, с учетом циркулирующих крупных и мелких иммунных комплексов.

**Материал и методы.** Обследовано 57 практически здоровых и 55 больных с диагнозом «цирроз печени» в возрасте от 18 до 60 лет. Среди практически здоровых оказалось 6 (10,5%) мужчин и 51 (89,4%) женщины, средний возраст которых составил  $36 \pm 1,77$ . Среди больных с диагнозом «цирроз печени» — 24 (43,6%) мужчин и 32 (58,1%) женщины, средний возраст  $44 \pm 1,89$  лет. Здоровый контингент отобран по следующим критериям: к этой группе относили практически здоровых людей, которые при медицинском осмотре не имели каких-либо отклонений в состоянии организма, не страдающих острыми и хроническими заболеваниями. Больных циррозом печени отбирали согласно классификации по Чайлд—Пью [8].

Взятие крови у пациентов проводили, используя стандартную процедуру забора крови в количестве не менее 2 мл. Стерильные пробирки и шприцы для взятия крови содержали в термостате при температуре +37°C. Сыворотку крови отделяли общепринятым методом. Кровь инкубировали в термостате при +37°C в течение одного часа, что позволило свести к минимуму потери КГ при ретракции сгустка и предотвратить связывание с компонентами комплемента.

В собранной сыворотке определяли крупные и мелкие ЦИК, используя при этом 3 и 4% раствор полиэтиленгликоля. Оптическую плотность (ОП) определяли при длине волны 450 на иммуноферментном анализаторе, что позволило использовать минимальное количество реактивов.

Основываясь на том, что КГ преципитируют при +4°C, оставшуюся сыворотку оставляли в холодильнике при +4°C на сутки, а затем определяли спектр ЦИК. Поскольку известно, что КГ полностью растворяются при +37°C, сыворотка (после холодильника) была проинкубирована в термостате при +37°C в течение часа, после чего определены крупные и мелкие ЦИК. О количестве КГ судили по разнице оптической плотности проб, инкубированных при +4°C и +37°C.

**Результаты и обсуждение.** Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ

Microsoft Excel. Достоверность различий между группами оценивали по критерию t Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Поскольку разработанный нами подход выявления КГ основан на определении ЦИК, на начальном этапе исследований мы выявили содержание ЦИК у практически здоровых и больных ЦП. Данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что в группе больных с ЦП количество ЦИК более чем в 2 раза превышает нормативные значения, причем это касается как крупных, так и мелких ЦИК ( $p < 0,001$  в обоих случаях).

Используя предложенный подход и проведение статистической обработки, мы определили крупные (связанные с IgM) и мелкие (связанные с IgG) криоглобулины в группе практически здоровых лиц и больных ЦП. Полученные результаты исследований представлены в табл. 2.

Как видно из представленных в таблице данных, после суточного выдерживания сыворотки при +4°C, а затем часовой инкубации в термостате при +37°C и проведения математического анализа получены значения, которые и определяли содержание КГ в сыворотке экспериментальных групп. Обнаружено, что в сыворотке крови здоровых лиц присутствуют криоглобулины, связанные с IgM, и криоглобулины, связанные с IgG, что соответствует и данным литературы, где авторы обнаружили содержание криоглобулинов в сыворотке крови здоровых лиц [9].

У больных с ЦП отмечали достоверное увеличение КГ в сыворотке крови. Так, содержание КГ, связанных с IgM, у пациентов с ЦП было почти 2 раза выше, чем у практически здоровых ( $p < 0,05$ ), а связанные с IgG — почти в 3 раза превышали нормативные значения ( $p < 0,001$ ).

У 16 больных ЦП (29% всех случаев) отмечали высокий уровень (выше среднего показателя по группе) криоглобулинов, связанных с IgM, у 20 больных (36,7% всех случаев) — высокий уровень криоглобулинов, связанных с IgG. У 14 пациентов этой группы (25,5% всех случаев) отмечали сочетанные высокие показатели обоих криоглобулинов.

**Заключение.** Разработанный нами подход к определению криоглобулинов в сыворотке крови объективен, не требует большой затраты времени и реактивов. Использование предлагаемого метода позволит определять содержание криоглобулинов в сыворотке крови больных в любой клинико-диагностической лаборатории, а также при проведении скрининговых исследований и в научных целях.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом Республики Узбекистан (ФА-Ф6-Т054 — Государственным комитетом науки и технологии РУз).

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—7 см. REFERENCES)

1. Дунаева Н.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Сысоев К.А., Алексеева Н.П., Лапин С.В. и др. Распространенность и факторы риска развития криоглобулинемии, ассоциированной с хроническим гепатитом С. *Медицинская иммунология*. 2007; 9(6): 575—80.
2. Константинова Н.А. *Криоглобулины и патология*. М.: Медицина; 1999.
3. Константинова Н.А., Кирсанов А.Ю. Оценка криоглобулинов в сыворотке крови с учетом циркулирующих иммунных комплексов. *Лабораторное дело*. 1989; (11): 62—5.
4. Неустроева Ю.А. Оптимизация полуколичественного метода выявления криоглобулинов в условиях клинико-диагностической лаборатории. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; (1): 37—41.
5. Тихомиров А.А. Криоглобулины и их клиническое значение. *Терапевтический архив*. 1977; 49: 144—7.

8. Классификация цирроза печени. Симптомы и лечение декомпенсированного цирроза печени. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>.
9. Диагностика и лечение системных васкулитов. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>.

## REFERENCES

1. Dunaeva N.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Sysoev K.A., Alekseeva N.P., Lapin S.V. et al. Prevalence and risk factors for cryoglobulinemia associated with chronic hepatitis C. *Meditinskaya immunologiya*. 2007; 9(6): 575—80. (in Russian)
2. Konstantinova N.A. *Cryoglobulins and Pathology* [Krioglobuliny i patologiya]. Moscow: Meditsina; 1999. (in Russian)
3. Konstantinova N.A., Kirsanov A.Yu. Evaluation of serum cryoglobulins subject circulating immune complexes. *Laboratornoe delo*. 1989; (11): 62—5. (in Russian)
4. Neustroeva Yu.A. Optimization of semi-quantitative method of detection of cryoglobulins in a clinical diagnostic laboratory. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; (1): 37—41. (in Russian)
5. Tikhomirov A.A. Cryoglobulins and their clinical significance. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1977; 49: 144—7. (in Russian)
6. Hilgard P., Treichel U., Dries V., Dienes H.P., Gerken G. Cryoglobulin-associated uptake of hepatitis C virus into human hepatocytes. *Hepato-gastroenterology*. 2005; 52(65): 1534—40.
7. Hwang S.J., Chu C.W., Huang D.F., Lan K.H., Chang F.Y., Lee S.D. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens*. 2002; 59(1): 31—7.
8. The classification of cirrhosis. The symptoms and treatment of decompensated cirrhosis. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>. (in Russian)
9. Diagnosis and treatment of systemic vasculitis. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>. (in Russian)

Поступила 14.07.16

Принята к печати 01.08.16

## ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-078.33

Дон Е.С.<sup>1</sup>, Тарасов А.В.<sup>2</sup>, Эпштейн О.И.<sup>1</sup>, Тарасов С.А.<sup>2</sup>

## БИОМАРКЕРЫ В МЕДИЦИНЕ: ПОИСК, ВЫБОР, ИЗУЧЕНИЕ И ВАЛИДАЦИЯ

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва;

<sup>2</sup>ООО «НПФ Материа Медика Холдинг», 129272, Москва

*Поскольку сфера применения биомаркеров с каждым годом расширяется и уже включает в себя использование их в качестве индикатора наличия или отсутствия заболевания, ответа на терапию, эффективности лекарственного средства или доклинической модели диагностического параметра и даже участника процесса поиска механизма действия лекарственных препаратов, значимость изучения биомаркеров нельзя переоценить. Данная работа посвящена систематизации и структурированию существующей информации о биомаркерах, начиная с первичного скрининга и заканчивая валидацией выбранной молекулы или характеристики.*

**Ключевые слова:** биомаркер; диагностика.

**Для цитирования:** Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 52-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

Don E.S.<sup>1</sup>, Tarasov A.V.<sup>2</sup>, Epshtein O.I.<sup>1</sup>, Tarasov S.A.<sup>2</sup>

THE BIOMARKERS IN MEDICINE: SEARCH, CHOICE, STUDY AND VALIDATION

<sup>1</sup>The research institute of general pathology and pathophysiology, 125315 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The "NPF Materia Medica Holding", 129272 Moscow, Russia

*The sphere of application of biomarkers is expanding every year and already comprises their using as indicator of presence or absence of disease, response to therapy, efficiency of medications or pre-clinical model of diagnostic parameter and even participant of process of search of mechanism of effect of medications. Hence, it is impossible to overestimate significance of studying of biomarkers. The article is dedicated to systematization and structuring of present information concerning biomarkers, starting from primary screening and completing with validation of chosen molecule or characteristic.*

**Key words:** biomarker; diagnostics.

**For citation:** Don E.S., Tarasov A.V., Epshtein O.I., Tarasov S.A. The biomarkers in medicine: search, choice, study and validation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 52-59. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

**For correspondence:** Don E.S., senior researcher of the laboratory of physiologically active substances. e-mail: don\_es@mail.ru

**Для корреспонденции:** Дон Елена Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: don\_es@mail.ru

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

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

Received 27.06.2016  
Accepted 06.07.2016

Возможность безошибочно предсказывать развитие рака и вовремя начать лечение, возможность выбирать терапию в зависимости от индивидуальных особенностей пациента, возможность ранней диагностики заболевания и определения стадии заболевания за секунды *in vitro* — ключом к решению этих и многих других задач современной медицины могут стать биомаркеры. Биомаркер определяют как количественно и объективно измеряемый индикатор биологического, патогенного процесса или фармакологического ответа на терапию [1] и используют [2—4]:

- как индикатор наличия (или отсутствия) заболевания, его степени тяжести;
- на разных этапах разработки лекарственного средства;
- в оценке пригодности доклинических моделей на животных;
- в клинических исследованиях для разделения пациентов по группам;
- как диагностический или сопутствующий диагностике параметр;
- индикатор ответа на терапию;
- характеристику эффективности и безопасности/токсичности лекарственного средства;
- при поиске механизмов действия лекарственных препаратов;
- анализе и регистрации биоаналоговых лекарственных средств.

**Классификации биомаркеров.** При введении биомаркеров в медицинскую практику они были в основном физиологическими (температура тела, кровяное давление и сердечный ритм) и служили сигналом наличия нарушений в работе внутренних органов [2]. В настоящее время, исходя из широкого спектра их применения, стало ясно, что биомаркерами могут быть различные, как правило, измеряемые количественно параметры, как то: молекулы, изображения, свойства клеток, тканей, органов и организма в целом, а также их комбинации. Все чаще биомаркерами становятся белки, особенно перспективным выглядит использование белков сыворотки крови ввиду их доступности, наличия разработанных методов анализа и диагностического потенциала [5]. За последние годы сотни потенциальных биомаркеров — белков сыворотки крови были оценены на предмет возможного использования в диагностике болезней; к сожалению, только единицы нашли применение в клинической практике. К примеру, для диагностики рака яичников в качестве потенциальных биомаркеров рассматривали цитокины, факторы роста, коагуляции и апоптоза, гормоны, адгезионные молекулы; зарегистрированным биомаркером стал только СА 125 [6]. Также в последнее время большую популярность приобрели биомаркеры на основе ДНК и РНК, которые включают в себя саму ДНК (циркулирующая ДНК для диагностики рака легкого [7]), вариации числа копий гена, длинные некодирующие РНК [8], паттерны метилирования ДНК (фекальные ДНК-тесты для выявления колоректального рака [9]), микроРНК (биомаркер при диагностике и прогнозировании рака яичников [10]) или модифицированные гистоны. Более традиционные биомаркеры представляют собой простые характеристики состояния здоровья человека, такие как величина артериального давления, объем легких, концентрация глюкозы в сыворотке/плазме крови, объем мочи, клеточные метаболиты, липиды и другие физические и биохимические измеряемые величины. Параметры, оцениваемые при проведении компьютерной

или магнитно-резонансной томографии [11], могут также выступать в качестве биомаркеров.

Рабочая группа по биомаркерам и суррогатным конечным точкам Национального института здравоохранения США [1] классифицировала биомаркеры на три типа:

- тип 0 отражает естественный ход заболевания и коррелирует с известными клиническими показателями в течение всей длительности заболевания (например, концентрация глюкозы в крови натощак);
- тип I отражает влияние терапии с учетом механизма действия лекарственного средства (как маркеры противовоспалительной активации);
- тип II — суррогатные конечные точки, которые предсказывают клиническую эффективность или вред при использовании лекарственного средства.

Также биомаркеры можно разделить по их применению (табл. 1).

Клинические биомаркеры — это определенные валидированные характеристики или переменные, отражающие самочувствие и качество жизни пациента в результате лечения. Они являются объективным отражением уровня здоровья человека и характеризуют протекание и исход его патологического и естественного биологического процессов и связанных с ними функциональных и физиологических реакций, а также ответа на фармакологическое вмешательство [16]. Суррогатные биомаркеры — это мера замещения клинической конечной точки, которая используется для оценки эффективности фармакологического вмешательства на основании изменения биологических маркеров. Такие маркеры, в отличие от клинических точек, могут быть не очевидны с первого взгляда, поскольку не характеризуют здоровье пациента в полной мере. Примерами суррогатных биомаркеров могут быть изменение кровяного давления и/или степени снижения концентрации липопротеинов высокой плотности в плазме крови при использовании соответствующих лекарств [17] (тогда как клиническим биомаркером будет, например, головная боль), а также использование уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови в качестве суррогатной конечной точки при диабете [18]. Проверка суррогатных конечных точек требует обширных данных, в том числе полученных в ходе крупных рандомизированных клинических испытаний, которые должны продемонстрировать, что суррогат является достаточно прогностическим для истинного клинического параметра, и эффект терапии на суррогат прогнозирует его влияние на истинную конечную точку. Как следствие, при всей обширности изучения таких маркеров, количество зарегистрированных и используемых в реальной клинической практике биомаркеров крайне мало.

Диагностические маркеры — это биомаркеры наличия заболевания у индивидуума; такие маркеры в некоторых случаях могут быть использованы для определения этапа болезни, и при этом они также будут прогностическими биомаркерами. Наличие таких маркеров особенно важно для ранней диагностики заболеваний, для которых в настоящее время не существует эффективной терапии на поздних стадиях, как, например, некоторые формы рака.

Тем не менее при отсутствии эффективной терапии на первый план выходит другая роль диагностических биомаркеров — помощь в фундаментальных исследованиях процесса течения болезни или оценка новых лекарственных веществ в качестве потенциальных терапевтических средств. Прогно-

**Основные типы биомаркеров, используемых на разных стадиях жизнедеятельности**

Биологические процессы	Патогенные процессы	Ответ на терапию
Конечная точка клинической эффективности — характеристика, отражающая самочувствие, функционирование и выживаемость пациента [1]	Конечная точка клинической эффективности	Конечная точка клинической эффективности
Суррогатный биомаркер — биомаркер, используемый взамен какой-либо конечной точки и предсказывающий либо клиническую эффективность, либо вред, либо отсутствие какой-либо реакции [12]	Суррогатный биомаркер	Суррогатный биомаркер
Прогностический биомаркер — биомаркер, который используют при прогнозах развития болезни или исхода заболевания у пациента вне зависимости от используемой/неиспользуемой терапии [13, 14]. Иногда выделяют биомаркеры состояния, которые применяются для определения тяжести заболевания, или верификационные биомаркеры, подтверждающие заболевание на субклинической стадии (до появления первых клинических признаков)	Прогностический биомаркер	Фармакодинамический биомаркер — биомаркер, показывающий прямой фармакологический эффект лекарственного препарата [15]
	Диагностический биомаркер — биомаркер для идентификации заболевания у пациента	Предиктивный биомаркер — это такой, который предсказывает пользу или вред медикаментозной или иной терапии [13], в том числе:

стические биомаркеры также могут быть использованы для прогнозирования развития заболевания или возможности его вылечить у пациентов вне зависимости от принимаемой терапии [3], как, например, при применении коммерческих диагностических тест-систем для изучения материала, полученного при биопсии опухоли.

Предиктивные биомаркеры полезны при анализе пользы или вреда конкретного лекарственного средства для пациента [3]. Яркий пример — оценка эффективности лечения рака молочной железы трастузумабом (рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела к рецептору эпидермального фактора роста человека 2 типа — HER<sub>2</sub>) путем амплификации онкогена HER<sub>2</sub>/neu на ранних стадиях рака груди [19]. Биомаркеры также полезны при изучении эффектов новых лекарственных веществ и их фармакодинамики.

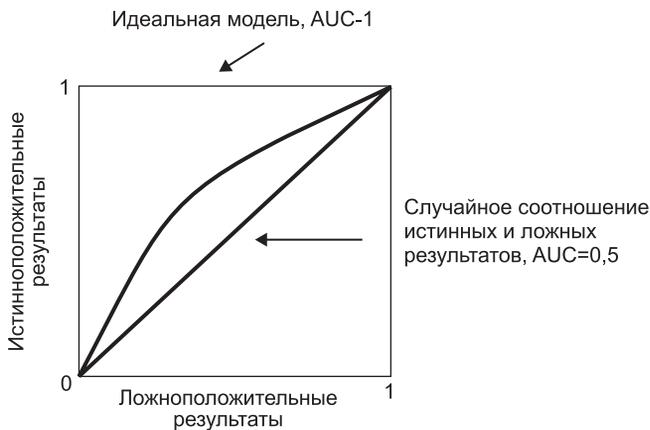
Биомаркеры могут быть классифицированы по их отношению к мишеням лекарственных препаратов. Такие мишени в основном представляют белками. Если биомаркер совпадает с предполагаемой терапевтической мишенью, как, например, для большинства противоопухолевых препаратов, концентрация биомаркера может говорить о влиянии или отсутствии влияния препарата на мишень и соответственно свидетельствовать о его эффективности/неэффективности [19]. В этом случае совместное изучение биомаркера и препарата в клинических испытаниях может ускорить процесс разработки лекарственного средства. Тем не менее, хотя первичные мишени лекарства могут быть наиболее подходящими биомаркерами, во многих случаях различные клеточные белки, которые связываются с препаратом, также оказывают непосредственное влияние на взаимодействие лекарственно-го препарата и его первичной мишени. В таких случаях для представления правильной клинической картины необходимо учитывать все возможные взаимодействия.

*Поиск биомаркеров.* Для успешного применения биомаркер необходимо выбрать, изучить и валидировать. Для поиска биомаркеров существуют две основные стратегии: стратегия, основанная на гипотезе или основанная на открытии [20]. Идентификация биомаркеров на основе гипотезы осуществляется в результате анализа механизмов развития

болезни. Например, данные о том, что при сахарном диабете наблюдается стабильно повышенный уровень глюкозы в крови, привели к идентификации гликированного гемоглобина в качестве биомаркера для диагностики сахарного диабета [21]. Выбор, основанный на открытии, чаще является результатом скрининга множества молекул, потенциально связанных с изучаемой болезнью. В таком случае на начальной стадии определяют только категорию потенциального биомаркера. Тем не менее такой скрининг часто приводит к появлению новых гипотез. Так, при изучении генов в опухолевых клетках яичников и молочной железы было обнаружено повреждение гена BRCA1 при данных видах злокачественных новообразований, после чего последующее его изучение привело к пониманию его роли в репарации ДНК, т. е. к гипотезе [22]. При поиске биомаркеров особенно следует отметить инновационные подходы, объединенные суффиксом «-омика» (от англ. -omics), которые относятся к таким перспективным технологическим платформам, как транскриптомика, геномика, протеомика и метаболомика. Эти подходы, хотя и недавно разработанные, позволяют исследователям обнаружить и идентифицировать различные присутствующие в организме молекулы или их части (ДНК, РНК, белки, пептиды, липиды, метаболиты) для количественной оценки их уровня в крови, плазме и моче [23]. Все чаще омика-стратегии становятся первым этапом поиска биомаркеров, за которым следует огромная аналитическая работа по квалификации выбранных молекул для использования в разработке лекарств и последующей постановке диагноза [2].

Вне зависимости от стратегии, которой придерживается исследователь, при поиске биомаркера необходимо ответить на следующие вопросы:

- Каким будет предполагаемое использование биомаркера(ов)? Например, для выявления заболевания на начальных этапах, для оценки влияния лекарственных средств на течение заболевания, для идентификации мишеней лекарственных средств и т. д.
- Какой источник материала будет использован (ткань, биологическая жидкость)? Так, использование образцов, собранных не специально для изучения биомаркера, часто



### ROC-анализ.

приводит к ошибкам измерения и трудностям при валидации биомаркера. Моча, сыворотка, плазма, слюна или мокрота, как правило, доступнее, чем ткани, требующие биопсии.

- Какой способ измерения будет использован (микрочип для изучения экспрессии генов, иммунологический метод анализа, масс-спектрометрия и т. п.)?
- Как будут выбраны пациенты и контрольные группы?
- Какова специфика клинического исследования, какие конечные клинические точки представляют интерес?
- Как будут интерпретированы результаты измерения уровня биомаркера?
- Можно ли использовать экспериментальные модели заболевания на животных вместо клинических испытаний на людях?

Так как кровеносные сосуды пронизывают все ткани организма, логично предположить, что кровь является источником биомаркеров по умолчанию, однако связь между тестируемыми образцами и заболеванием может оказаться важнее. Так, при болезнях ЦНС можно использовать спинномозговую жидкость [24], кровь идеально подходит при сердечно-сосудистых заболеваниях, моча — при метаболических болезнях, болезнях печени или почек. При заболеваниях желудочно-кишечного тракта в качестве источника биомаркеров могут быть использованы желудочный сок или слюна [25], при болезнях легких — слюна, мокрота или даже пары выдыхаемого воздуха. При заболеваниях, локализованных в конкретном месте, могут быть использованы ткань или тканевая жидкость. Вместе с тем иногда образцы, полученные из очагов, удаленных от источников заболевания, тоже могут содержать подходящие биомаркеры. Например, анализ РНК, выделенной из образцов крови, позволяет диагностировать болезнь Альцгеймера или ее отсутствие со 100% чувствительностью и 96% специфичностью [26].

N. Rifai и соавт. [27] отмечают важность наличия «золотого стандарта» образцов для белковых биомаркеров, которые не только были бы отобраны близко к пораженной ткани/органу (чтобы измеренные показатели превосходили таковые для остальных белков сыворотки/плазмы на достаточное число порядков), но и обеспечивали бы максимальный контраст между здоровыми добровольцами и больными пациентами. Отдельные пациенты могут выступать в качестве собственного контроля (например, при изучении каких-либо характеристик до и после терапии).

Однако в случае если заболевание является системным, а не локализованным в каком-либо участке тела, при таком подходе потенциальные биомаркеры могут быть потеряны. Поскольку каждый из пациентов-доноров биомаркеров в

данном случае является больным, можно говорить о некоторой предвзятости данного подхода при отборе пациентов. Если исследования для обнаружения биомаркеров проводят на ограниченном числе пациентов, в дальнейшем обязательно должны быть проведены дополнительные исследования на большем числе пациентов с адекватной статистической моделью и с включением в исследуемые группы здоровых индивидуумов и/или лиц с сопутствующими заболеваниями.

Если есть возможность, следует использовать положительный контроль (например, «золотой стандарт» терапии данного заболевания при изучении лекарства-кандидата) для возможности сравнения с существующими биомаркерами. Кроме того, для ряда гетерогенных заболеваний, как например рак молочной железы, одного биомаркера или даже панели биомаркеров недостаточно для использования у всей популяции больных. В таком случае исследования для выявления биомаркеров могут потребовать гораздо большего объема образцов и групп, чем для однородных заболеваний, а также использования различных методов статистического анализа.

*Подходы к выбору биомаркеров.* Универсального подхода к выбору биомаркеров не существует, и выбор его зависит от задачи исследования [28]. Два основных подхода к оценке биомаркеров — это логистическая регрессия и ROC-анализ.

Логистическую регрессию широко используют для оценки связи биомаркеров с бинарными событиями в рамках клинических исследований. Исследователи должны решить, рассматривают ли они биомаркер как непрерывную или категориальную переменную. Измеряемые параметры, которые распределены асимметрично, должны быть нормализованы, прежде чем они могут быть оценены как непрерывные; для этого и используют логарифмическое преобразование. Если биомаркеры включены в расчет как переменные с непрерывным значением в логистической регрессии, модель предполагает, что данные по биомаркеру подчинены нормальному распределению среди испытуемых, испытывающих «событие», а также среди тех, кто его не испытывает (контрольная группа) [29]. Несмотря на то что распределение измеряемых параметров биомаркеров часто отличается от нормального, применение трансформации по логарифмической шкале или лямбда-преобразование позволяют приблизить их к нормальному распределению. Коэффициенты соотношения, полученные из логистической регрессии, описывают взаимосвязь между наличием биомаркера и клиническим событием, однако неточное математическое преобразование может привести к ошибочным оценкам [28].

На практике несколько чаще используют определение рабочей характеристики приемника (ROC) и измерение площади под кривой (AUROC, или просто AUC) (т. н. ROC-анализ) [30]. Этот подход предложен в качестве наиболее оптимального способа выбора биомаркеров на Консорциуме по экспериментально-прогностической оценке безопасности [31] и служит частью процесса проверки каждого индивидуального биомаркера-кандидата, а затем и для панели различных комбинаций биомаркеров в исследовательской организации ранней диагностики (EDRN) Национальных институтов онкологии США, вплотную занимающейся изучением биомаркеров [13]. Кривая рабочей характеристики приемника отражает способность маркера указывать на различие между двумя группами субъектов. Для этого варьируют какой-либо из параметров и строят график «специфичность против чувствительности». Так, например, при использовании в качестве примера двухкомпонентной диагностики рака на ось ординат наносят процент истинно-положительных измерений (количество субъектов с достоверно определенным раком — характеристика чувствительности), а на ось абсцисс — процент ложноположительных результатов (пациенты без рака,

которым ошибочно поставлен диагноз «рак», — характеристика специфичности). AUC 0,5 свидетельствует о том, что эффективность биомаркера не выше случайной (50%), в то время как AUC 1,0 означает, что найден идеальный классификатор, который верно диагностирует как наличие рака, так и его отсутствие (см. рисунок). Такая обработка учитывает ошибки как первого, так и второго рода, то есть прогнозирует как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. AUC позволяет сравнивать эффективность (если анализ проводят на том же наборе проб) различных биомаркеров или панели биомаркеров, но предполагает наличие другого признанного метода, позволяющего определить истинно-положительные срабатывания (т. н. «золотого стандарта»), как например гистопатология органов).

Другим важным моментом, на который стоит обратить внимание, является количество субъектов, проанализированных при оценке эффекта биомаркера. Это принципиальный момент для дизайна клинических исследований при изучении биомаркеров. Многие биомаркеры исследовали менее чем на ста пациентах, однако в таком случае связь биомаркеров с определенным состоянием не имеет достаточной статистической мощности. Количество и объем получаемых образцов также важно заранее предусмотреть. Для идеальной оценки биомаркеров желательно иметь как наборы данных для определения параметров метода, так и независимые наборы данных для оценки стабильности результатов [20]. Во многих случаях из-за ограниченности средств и времени для оценки данных используют «бутстрэп» подходы, основанные на перекрестной валидации или многократном делении одного набора данных на разные выборки, которые могут быть использованы для оценки общей эффективности метода (англ. bootstrapping) [32]. Такая парадигма позволяет оценить производительность на «независимых» данных, но не всегда учитывает влияние неизвестных или неучтенных отношений в рамках этих данных [32]. Однако таким образом можно довольно эффективно провести понижающую селекцию биомаркеров, что может значительно упростить установление потенциальных биомаркеров-кандидатов, когда данные независимых тестов недоступны.

*Методы оценки биомаркеров.* Критическим моментом при количественном определении биомаркеров является использование стандартных операционных процедур для сбора и хранения проб для экспериментов, ведь даже небольшие различия в обработке и подготовке проб могут сыграть важную роль в надежности результатов и воспроизводимости анализов. Поэтому разработка биомаркеров должна быть завершена валидацией анализа для определения биомаркеров, особенно такого его параметра, как устойчивость, характеризующего способность анализа давать правильные воспроизводимые результаты при незначительных колебаниях условий проведения эксперимента [33], а также проверкой анализа при значительных изменениях этих условий.

Для обнаружения биомаркеров могут быть использованы различные методы. Если метод основан на известной ранее информации (т. е. на гипотезе), его чаще всего используют для наблюдения за изменениями содержания аналита (потенциального биомаркера), исходя из общих знаний. Сильной стороной такого подхода будет применение общеизвестного метода анализа, например, использование мультиплексных анализов при оценке уровня цитокинов в ходе стимуляции иммунного ответа. Методы, основанные на открытиях, когда биомаркеры ищут «вслепую», путем скрининга, более распространены. Часто в этом случае можно заранее определить только категорию потенциального биомаркера (белковый биомаркер, генетический биомаркер, продукт метаболизма и т. д.), но не идентифицировать его. Для определения биомаркеров в случае, когда известно об их белковой природе,

часто используют различные варианты масс-спектрометрии, позволяющие фракционировать несколько сотен пептидов и даже выявлять посттрансляционные модификации [13]. Для детекции метаболитических биомаркеров применяют в комбинации с масс-спектрометрией такие методы, как газожидкостная (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез, а также ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [34]. Подходы для анализа генома (ДНК-секвенирование и т. д.) также довольно перспективны, а поскольку в качестве биомаркеров могут применяться различные изображения, методы их получения также можно добавить к этому списку [35]. Бывают и случаи, когда в обнаружении искомого биомаркера может помочь только комбинация нескольких методов.

*Валидация биомаркеров.* После того как биомаркеры выбраны, необходимо их тщательно квалифицировать и валидировать в клинических исследованиях. Под валидацией понимают процесс документированного подтверждения достижения разумной степени уверенности в том, что выбранный биомаркер выполняет свое функциональное назначение, а его использование приводит к ожидаемым результатам. Такая работа является многопрофильной и требует привлечения множества лабораторий и организаций различного профиля.

Валидацию любого биомаркера следует начинать с валидации анализа для его определения, а иногда и с предварительной его разработки. В связи с особенностями изучения биомаркеров (динамические или слишком низкие/высокие концентрации в образцах, чувствительность к условиям забора и хранения образцов, влияние компонентов раствора и отсутствие хорошо охарактеризованного стандарта [36]), валидация метода их оценки сложнее валидации обычного метода определения биомолекул. Поэтому единой стратегии валидации методов для оценки биомаркеров не существует. Разные исследователи классифицируют их на несколько категорий, самой распространенной из которых является подход «пригодности для конкретных целей» (англ. «fit-for-purpose»), когда методику валидируют под определенные задачи, допуская ее непригодность для альтернативных целей [37]. При таком подходе анализы для принятия решения о дальнейшем изучении биомаркера, о выборе биомаркеров-кандидатов и концепции доклинических исследований, анализы для тестирования образцов из клинических исследований валидируют в различном объеме (табл. 2).

При валидации биомаркера для клинического применения задачи анализов также можно разделить на первичную оценку пригодности (показывают прямой биологический или фармакологический эффект), на анализ для оценки вторичных эффектов (корреляция прямого биологического или фармакологического эффекта с известным терапевтическим действием: фармакодинамика, анализ ответа, выбор дозы и режима дозирования), и анализы для оценки безопасности или подтверждения/постановки диагноза. В зависимости от цели строгость требований также различна, например, валидация биомаркера для установления диагноза должна быть проведена в сертифицированных лабораториях, действующих согласно Резолюции по улучшению работы клинических лабораторий (CLIA), а образцы могут быть только из клинического исследования, тогда как в остальных случаях это не принципиально [3].

Кроме валидации метода, сам биомаркер должен пройти квалификацию, то есть должен быть оценен на предмет корреляции с клиническими эффектами. Признанный валидный биомаркер — это маркер, который можно определить аналитическим методом с установленными воспроизводимыми характеристиками и о котором существует общепризнанное мнение в научном и медицинском сообществе касательно физиологической, токсической и клинической значимости

**Объем валидации анализа для определения биомаркеров в зависимости от задачи**

Параметры, которые необходимо учесть	Принятие решения о дальнейшем использовании биомаркера (1)	Выбор дозы и режима дозирования, выбор/подтверждение концепции (2)	Безопасность биомаркера/подтверждение диагноза (3)
Выбор раствора с учетом влияния его компонентов	Выбирают теоретически наиболее вероятно подходящий	Выбирают наилучший (минимальное влияние на результат и стабильность анализа)	(2) + максимальное приближение к аналиту
Забор образцов	Выбирают теоретический способ как наиболее вероятно подходящий	При выборе метода забора образцов руководствуются их стабильностью при краткосрочном хранении, хранении при комнатной температуре и при замораживании—оттаивании	(2) + изучают стабильность при долгосрочном хранении
Документация	План валидации не нужен, описание анализа или использование документов из коммерческих наборов для описания результатов	Нужны и план и отчет по валидации	Нужны и план и отчет по валидации
Референсный стандарт и реагенты	Ограниченно охарактеризованы, исследования стабильности начаты	Хорошо охарактеризованы, установлен контроль изменений от партии к партии	Соблюдены требования GMP для референсного стандарта, реагенты охарактеризованы и стабильны
Калибраторы	Стандарты из набора или 6 ненулевых стандартов	6 ненулевых стандартов	(2)
Диапазон	Используют 3 валидационных прогона для нахождения нижнего и верхнего предела количественного определения на стандартных образцах	Используют 6 валидационных прогонов, нижний и верхний предел количественного определения рассчитывают на основании точности и прецизионности на независимых образцах	(2) + чувствительность как принципиальный параметр
Точность	На валидированных образцах или контролях из коммерческого набора, минимум 3 независимых прогона	4—6 валидированных образцов, минимум 6 независимых прогонов	(2)
Прецизионность			
Чувствительность	По схеме из набора или как стандарт с минимальной концентрацией для анализа в лаборатории	Основана на независимых валидированных образцах, измеренных минимум в 6 независимых прогонах	Чувствительность, адекватная для обнаружения разницы между большими и здоровыми пациентами
Селективность и специфичность	В соответствии с инструкцией набора или по разработанному в лаборатории методу анализа — специфичность к тестируемому препарату	От других изоформ, ко-медиаторов и эндогенных лигандов	(2)
Стабильность	На валидационных или актуальных образцах: замораживание-оттаивание — 1 цикл Стабильность при комнатной температуре — до 4 ч Стабильность при +4°C — до 4 ч Влияние разведения Краткосрочное хранение	На валидационных или актуальных образцах замораживание-оттаивание — 3 цикла Стабильность при комнатной температуре — до 24 ч Стабильность при +4°C — до 24 ч Стабильность при экстракции Стабильность при -20°C и при -80°C Стабильность 1 год	На актуальных образцах (2) + 2-летняя стабильность

результатов. Некоторые биомаркеры можно классифицировать как потенциально валидные, они отличаются от признанных валидных тем, что их значимость не установлена, а основана на научных гипотезах или предположениях. Все остальные биомаркеры относятся к категории исследуемых, и именно они составляют большую часть всех изучаемых на стадии разработки биомаркеров [38].

Кроме того, в клинических исследованиях биомаркеры также делят по функциям, которые они выполняют. Биомаркеры, играющие интегральную роль, используют в тестированиях в рамках текущих клинических исследований. Такие биомаркеры либо характеризуют пригодность исследования в принципе, либо помогают подразделить одно клиническое исследование на разные направления по мере необходимости.

Если интегральные маркеры служат для принятия индивидуального решения по пациенту, то их анализы должны быть проведены в соответствии с правилами CLIA. Так, в ходе I фазы клинического исследования интегральный биомаркер может быть использован для подтверждения правильности подобранной дозы лекарственного средства и оценки необходимости ее увеличения, а в ходе II фазы такой биомаркер помогает определить, следует ли продолжать или прекратить набор пациентов из-за отсутствия эффективности изучаемого лекарственного средства у дефицитных по биомаркеру участников исследования.

В тестах, предназначенных для идентификации или валидации методик анализа или маркеров, которые будут только изучены в планируемом клиническом исследовании для про-

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

верки гипотезы (с подробными планами по забору образцов, лабораторным измерениям и анализам), биомаркеры играют интеграционную роль. Так, в ходе I фазы клинического исследования такой биомаркер планируют к изучению при использовании минимальной токсической или выбранной дозы лекарственного средства для подтверждения влияния на мишень. В рамках II фазы предиктивный маркер измеряют во всех случаях, но не для использования в оценке пригодности метода, назначения лечения или контроля над ходом лечения в текущем клиническом исследовании, а для понимания общей картины происходящего. Статистический дизайн и объем пробы заданы заранее.

При вспомогательной или исследовательской роли биомаркеров клинические исследования используются для разработки биомаркеров и/или их методов анализа или для лучшего понимания терапевтического потенциала агента. Эти данные по биомаркерам сами по себе не могут служить основанием для завершения I или II фазы клинического исследования. Примерами могут служить ретроспективные анализы биомаркеров, пилотные или пробные биопсии или исследования, генерирующие гипотезу.

**Панели биомаркеров.** Ключевой вопрос при валидации биомаркеров — это потенциальная необходимость использования панели биомаркеров и достаточность использования одного биомаркера. В ряде случаев панель превосходит один маркер, но иногда один или два маркера могут прекрасно работать для решения конкретных задач. Факт наличия в трансформированных клетках нескольких сигнальных путей, а также широкое распространение гетерогенности опухолей при большинстве онкологических заболеваний с участием эпителия предполагают, что множественные биомаркеры более адекватно отражают биологию гетерогенных опухолей и превосходят по эффективности анализы по одному биомаркеру [39]. Наличие различных сопутствующих заболеваний у пациентов также может затруднить точный диагноз, что приводит к необходимости сбора дополнительной информации, которую зачастую можно получить только анализируя панель биомаркеров. Вместе с тем добавление дополнительных маркеров может повысить чувствительность за счет снижения специфичности. Например, по протоколу, разработанному для анализа биомаркеров в EDRN, после результатов слепого анализа биомаркеров по результатам установленного референсного набора данных на предмет специфичности и чувствительности, были протестированы отдельные биомаркеры, после чего сформированы панели биомаркеров для сравнения эффективности панели с эффективностью какого-либо одного биомаркера. Показано, например, что для идентификации рака простаты и рака яичников достаточно пары маркеров.

**Заключение.** К сожалению, огромное количество потенциальных биомаркеров остаются только на страницах научных журналов. Из 150 тыс. известных опубликованных данных биомаркеров-кандидатов меньше ста находят реальное применение в клинической практике [40]. Главной проблемой, конечно, остается финансирование, так как для того чтобы превратить пилотные исследования в комплект документов, необходимых для регистрации биомаркера, необходим большой объем ресурсов, межлабораторных взаимодействий и дополнительных экспериментов. Также проблемой может стать отсутствие воспроизводимости из-за неправильно спланированного исследования, неверной обработки данных или персонализированного характера действия биомаркера. Парадоксально, но даже при масштабных и дорогостоящих исследованиях причиной их провала могут быть обычные нарушения правил работ в лаборатории: нарушение сроков и условий хранения образцов, пулирование образцов и т. п. Помешать исследованию может и динамический характер

поведения белков в плазме, и их низкие концентрации по сравнению с основными белками. Тем не менее биомаркеры используются на всех фазах изучения лекарственного препарата — от этапа разработки до последней фазы клинических исследований. Остается надеяться, что в ближайшем будущем все больше биомаркеров будут стоять на страже здоровья пациентов и помогать работе врачей.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 6—13, 17—29, 31—35, 37—40 см. REFERENCES)

1. Павлушкина Л.В., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б., Белобородова Н.В. Биомаркеры в клинической практике. *Поликлиника*. 2013; (4-1): 10—4.
14. Садвакас А.С. *Современные концепции идеальных биомаркеров в медицине*. В кн.: Материалы XXXI международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы». Новосибирск: СибАК; 2014: 99—104.
15. Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта. *Практическая онкология*. 2012; 13(4): 219—28.
16. Ягудина Р.И., Чибилев В.А. Использование конечных и суррогатных точек в фармакоэкономических исследованиях. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2010; 3(2): 12—8.
30. Никольский Ю.Е., Захарова Н.Б., Чехонацкая М.Л., Понукалин А.Н., Дурнов Д.А. Значение мочевых молекулярных маркеров в диагностике рака почки. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2015; 5(6): 915—7.
36. Беневоленский Д.С. *Биомаркеры в диагностике неотложных состояний*. В кн.: Научно-образовательный форум «Актуальные проблемы современной лабораторной диагностики». Казань; 2011: 18—20.

REFERENCES

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69(3): 89—95.
2. Hess S., Ozoux M.L., Gerl M. *Biomarker Definition and Validation During Drug Development*. Berlin: Springer; 2011: 223—44.
3. Dancy J.E., Dobbin K.K., Groshen S., Jessup J.M., Hruszkewycz A.H., Koehler M. et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(6): 1745—55.
4. Mayeux R. *Biomarkers: potential uses and limitations*. *NeuroRx*. 2004; 1(2): 182—8.
5. Pavlushkina L.V., Chernevskaia E.A., Dmitrieva I.B., Beloborodova N.V. Biomarkers in clinical practice. *Poliklinika*. 2013; (4-1): 10—4. (in Russian)
6. Nowak M., Janas Ł., Stachowiak G., Stetkiewicz T., Wilczyński J.R. Current clinical application of serum biomarkers to detect ovarian cancer. *Prz. Menopauzalny*. 2015; 14(4): 254—9.
7. Jiang T., Ren S., Zhou C. Role of circulating-tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015; 90(2): 128—34.
8. Riedmaier I., Pfaffl M.W. Transcriptional biomarkers — high throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods*. 2013; 59(1): 3—9.
9. Ahlquist D.A., Zou H., Domanico M., Mahoney D.W., Yab T.C., Taylor W.R. et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology*. 2012; 142(2): 248—56.
10. Pal M.K., Jaiswar S.P., Dwivedi V.N., Tripathi A.K., Dwivedi A., Sankhwar P. MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol. Med.* 2015; 12(4): 328—41.
11. Klassen B.T., Hentz J.G., Shill H.A., Driver-Dunckley E., Evidente

- V.G., Sabbagh M.N. et al. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. *Neurology*. 2011; 77(2): 118—24.
12. Aronson J.K. Biomarkers and surrogate endpoints. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 59(5): 491—4.
  13. Anderson D.C., Kodukula K. Biomarkers in pharmacology and drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 87(1): 172—88.
  14. Sadvakas A.S. Modern concepts of ideal biomarkers in medicine. In: Materials XXXI International Scientific-Practical Conference «Modern Medicine: Current Issues» [Materialy XXXI mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy»]. Novosibirsk: SibAK; 2014: 99—104. (in Russian)
  15. Imyanitov E.N. Standard and potential predictive markers for gastrointestinal cancer. *Prakticheskaya onkologiya*. 2012;13(4): 219—28. (in Russian)
  16. Yagudina R.I., Chibilyaev V.A. *Clinical and surrogate endpoints application in pharmaco-economic researches. Farmakoekonomika. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya*. 2010; 3(2): 12—8. (in Russian)
  17. Heinonen T.M., Aamer M., Marshall C., Black D.M., Tardif J.C. Cardiovascular biomarkers and surrogate end points: key initiatives and clinical trial challenges. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2012; 10(8): 989—94.
  18. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(7): 1327—34.
  19. Singer C.F., Kostler W.J., Hudelist G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1786(2): 105—13.
  20. McDermott J.E., Wang J., Mitchell H., Webb-Robertson B.J., Hafen R., Ramey J. et al. Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2013; 7(1): 37—51.
  21. Executive summary: Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care*. 2010; 33(Suppl.1): S4—10.
  22. Welch P.L., King M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(7): 705—13.
  23. Ma N., Rahmat Z., Lam S. A Review of the «Omics» approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(4): 7515—41.
  24. Lleo A., Cavedo E., Parnetti L., Vanderstichele H., Herukka S.K., Andreasen N. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 2015; 11(1): 41—55.
  25. Wong D. Clinical Utility of Salivary ExRNA Biomarkers for Gastric Cancer Detection. 2016. Available at: <http://grantome.com/grant/NIH/UH2-TR000923-02>. (accessed 27 April 2016).
  26. Fehlbaum-Beurdeley P., Jarrige-Le Prado A.C., Pallares D., Carriere J., Guihal C., Soucaille C. et al. Toward an Alzheimer's disease diagnosis via high-resolution blood gene expression. *Alzheimers Dement.* 2010; 6(1): 25—38.
  27. Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24(8): 971—83.
  28. Grund B., Sabin C. Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010; 5(6): 473—9.
  29. Cook R.D., Weisberg S. *Applied Regression Including Computing and Graphics*. Minnesota: John Wiley and Sons; 1999.
  30. Nikol'skiy Yu.E., Zakharova N.B., Chekhonatskaya M.L., Ponukalin A.N., Durnov D.A. The value of urinary molecular markers in the diagnosis of renal cancer. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2015; 5(6): 915—7. (in Russian)
  31. Dieterle F., Sistare F., Goodsaid F., Papaluca M., Ozer J.S., Webb C.P. et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28(5): 455—62.
  32. Jiang W., Simon R. A comparison of bootstrap methods and an adjusted bootstrap approach for estimating the prediction error in microarray classification. *Stat. Med.* 2007; 26(29): 5320—34.
  33. GMP Guideline ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 30 rue de St-Jean, P.O. Box 758, 1211 Geneva 13, Switzerland; ICH Secretariat, c/o IFPMA; 1995. Available at: [http://www.gmp-compliance.org/eca\\_guideline\\_879.html](http://www.gmp-compliance.org/eca_guideline_879.html). (accessed 27 April 2016).
  34. Wu Q., Zou M., Yang M., Zhou S., Yan X., Sun B. et al. Revealing Potential Biomarkers of Functional Dyspepsia by Combining 1H NMR Metabonomics Techniques and an Integrative Multi-objective Optimization Method. *Sci. Rep.* 2016; 6: 18852.
  35. Atluri G., Padmanabhan K., Fang G., Steinbach M., Petrella J.R., Lim K. et al. Complex biomarker discovery in neuroimaging data: Finding a needle in a haystack. *Neuroimage Clin.* 2013; 3: 123—31.
  36. Benevolenskiy D.S. Biomarkers in the diagnosis of emergency conditions. In: Actual Problems of Modern Laboratory Diagnostic [Nauchno-obrazovatel'nyy forum «Aktual'nye problemy sovremennoy laboratornoy diagnostiki»]. Kazan'; 2011: 18—20. (in Russian)
  37. Cummings J., Raynaud F., Jones L., Sugar R., Dive C. Fit-for-purpose biomarker method validation for application in clinical trials of anticancer drugs. *Br. J. Cancer*. 2010; 103: 1313—7.
  38. Guidance for industry. Pharmacogenomic data submissions. 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm126957.pdf>. (accessed 27 April 2016).
  39. Morgan T.M., Seeley E.H., Fadare O., Caprioli R.M., Clark P.E. Imaging the clear cell renal cell carcinoma proteome. *J. Urol.* 2013; 189(3): 1097—103.
  40. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011; 469(7329): 156—7.

Поступила: 27.06.16  
Принята: 06.07.16

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.887.11.083.1

Гизингер О.А.<sup>1</sup>, Заручейнова О.В.<sup>2</sup>, Зима М.А.<sup>3</sup>, Шеметова М.А.<sup>3</sup>, Закревская А.В.<sup>2</sup>, Вербов В.Н.<sup>2</sup>, Куляшова Л.Б.<sup>2</sup>, Зиганшин О.Р.<sup>1</sup>, Францева О.В.<sup>1</sup>

### ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA HOMINIS* И *UREAPLASMA SPP.* КУЛЬТУРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИЕЙ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 454092, г. Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ООО «Экология здоровья» МЦ «Ситимед», 454004, г. Челябинск, Российская Федерация

Проведена оценка частоты выявления *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) и *Ureaplasma spp.* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и культуральным методом (КМ) при использовании наборов реагентов для выявления и определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм «Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12» с определением характера чувствительности клинических изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* в материале отделяемого уретры, цервикального канала в клинико-диагностических лабораториях Челябинска и Санкт-Петербурга. В исследовании принимали участие женщины и мужчины репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Результаты исследования показали, что частота обнаружения *Ureaplasma spp.* оказалась значительно выше, чем *M. hominis*. Общее совпадение результатов в Санкт-Петербурге между двумя методами (ПЦР и КМ) при обнаружении *Ureaplasma spp.* составило 97,5%, при исследованиях на *M. hominis* — 93,5%. Общее совпадение результатов в Челябинске между двумя методами (ПЦР и КМ) при обнаружении *Ureaplasma spp.* составило 79,9%, при исследованиях на *M. hominis* — 96,1%.

Ключевые слова: *M. hominis*; *Ureaplasma spp.*; антибиотикочувствительность урогенитальных микоплазм.

Для цитирования: Гизингер О.А., Заручейнова О.В., Зима М.А., Шеметова М.А., Закревская А.В., Вербов В.Н., Куляшова Л.Б., Зиганшин О.Р., Францева О.В. Оценка частоты выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* культуральным методом и полимеразной цепной реакцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 60-64

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-60-64>

Gizinger O.A.<sup>1</sup>, Zarucheynova O.V.<sup>2</sup>, Zima M.A.<sup>3</sup>, Shemetova M.A.<sup>3</sup>, Zakrevskaya A.V.<sup>2</sup>, Verbov V.N.<sup>2</sup>, Kuliashova L.B.<sup>3</sup>, Ziganshin O.R.<sup>1</sup>, Frantseva O.V.<sup>1</sup>

THE EVALUATION OF DETECTION RATE OF *MYCOPLASMA HOMINIS* AND *UREAPLASMA SPP.* USING CULTURAL TECHNIQUE AND POLYMERASE CHAIN REACTION

<sup>1</sup>The Iuzhno-Ural'skii state medical university of Minzdrav of Russia, 454092 Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup>The Pasteur research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>"Ecology of Health" the medical center "Citymed", 454004 Chelyabinsk, Russia

In the clinical diagnostic laboratories of Chelyabinsk and St. Petersburg evaluation of detection rate of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp.* was implemented using technique of polymerase chain reaction and cultural method. The reagents kits "Mycoplasma ACH-12" and "Ureaplasma ACH-12" were used to detect and determine antibiotics sensitivity of urogenital mycoplasma with determination of character of sensitivity of clinical isolates *M. hominis* and *Ureaplasma spp.* in sample of secretion of urethra and cervical channel. The results of study demonstrated that rate of detection of *Ureaplasma spp.* turned out significantly higher than *M. hominis*. The common coincidence of results in St. Petersburg between two techniques (polymerase chain reaction and cultural method) in case of detection of *Ureaplasma spp.* amounted to 97.5% and in case of detection of *M. hominis* - 93.5%. The common coincidence of the results in Chelyabinsk between two techniques (polymerase chain reaction and cultural method) in case of detection of *Ureaplasma spp.* amounted to 79.9% and in case of detection of *M. hominis* - 96.1%.

Key words: *M. hominis*; *Ureaplasma spp.*; antibiotics sensitivity; urogenital mycoplasma

For citation: Gizinger O.A., Zarucheynova O.V., Zima M.A., Shemetova M.A., Zakrevskaya A.V., Verbov V.N., Kuliashova L.B., Ziganshin O.R., Frantseva O.V. The evaluation of detection rate of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp.* using cultural technique and polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 60-64. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-60-64>

For correspondence: Gizinger O.A., doctor of biological sciences, associate professor, professor of the chair of microbiology, virology and clinical laboratory diagnostic, senior researcher of the research institute of immunology of the Iuzhno-Ural'skii state medical university. e-mail: [franceva.olga@rambler.ru](mailto:franceva.olga@rambler.ru)

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

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

Received 18.05.2016  
Accepted 15.06.2016

Среди воспалительных заболеваний урогенитального тракта одно из ведущих мест занимают уреа- и микоплазменные инфекции, возбудителями которых являются условно-патогенные микроорганизмы *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) и *Ureaplasma spp.* Урогенитальные микоплазмы *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* являются этиологическими агентами таких заболеваний, как негонеоккокковые уретриты, эндометриты и бактериальные вагинозы [9—12]. Поражение верхних отделов урогенитального тракта *M. hominis*, *Ureaplasma spp.* может приводить к нарушению репродуктивной функции — невынашиванию беременности, бесплодию. Урогенитальные микоплазмы также могут быть причиной преждевременных родов, рождения детей с малым весом [1, 3, 5]. При обнаружении *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* микробиологические лабораторные методы играют решающую роль в связи с отсутствием четких клинических проявлений, широким распространением бессимптомного носительства и частым сочетанием *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* с другими инфекционными агентами. Несмотря на широкое использование в настоящее время полимеразной цепной реакции (ПЦР) культуральный метод (КМ) диагностики продолжает оставаться «золотым стандартом» при выявлении *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* Микробиологическое исследование на наличие микоплазм в исследуемом материале позволяет не только с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять возбудитель, но и оценивать его количественное содержание в исследуемом материале, определять чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам [6, 14]. При назначении лечения предварительное определение антибиотикочувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* позволяет снизить удельный вес положительных результатов при повторном обследовании после курса антибиотикотерапии с 37,3 до 7,7% [13]. Клинически значимый титр для *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* составляет  $10^4$  КОЕ/мл, поскольку микоплазмы в количестве  $10^3$  КОЕ/мл и менее могут обнаруживаться у здоровых людей [6].

Отделом новых технологий ФБУН НИИЭМ им. Пастера были разработаны наборы реагентов для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их антибиотикочувствительности («Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12»). Наборы разрабатывались с 2009 по 2011 г., регистрационные удостоверения получены в 2009 г., в 2011 г. — бессрочно. В основе наборов реагентов «Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12» лежит использование селективных питательных сред для выявления либо *M. hominis*, либо *Ureaplasma spp.* Выбор селективных питательных сред обусловлен созданием оптимальных условий для роста *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* при подавлении роста других микоплазм, грибов и большинства представителей бактериальной флоры, потенциально содержащихся в исследуемых образцах. Идентификация микоплазм основывается на характерном для *M. hominis* гидролизе аргинина, а для *Ureaplasma spp.* гидролизе мочевины с выделением аммиака и защелачиванием среды, при этом визуализация реакции фиксируется при смене цвета среды с зеленого на фиолетовый для *M. hominis* и с желтого на красный или красно-малиновый для *Ureaplasma spp.* Наборы «Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12» разработаны в виде микротест-систем, куда входят лиофильно высушенные питательные среды и готовые стерильные полистироловые 12-луночные

стрипы, в лунки которых сорбированы растворы различных антибактериальных препаратов. После вскрытия стрипов стандартизованную суспензию в жидкой питательной среде в одинаковой дозе асептически вносят в соответствующие ряды лунок, закрывают крышкой и инкубируют при оптимальной температуре 37°C. После инкубирования при наличии роста *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* (изменение цвета) в контроле культуры и опытных лунках определяют величину концентрации возбудителя и чувствительность к антибиотикам. В тех лунках, где антибиотик не действует, отмечают рост возбудителей (изменение цвета). В лунках стрипов, входящих в состав наборов «Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12», сорбированы антибактериальные препараты различных групп, которые зарегистрированы на территории РФ и используются в лечении микоплазменных инфекций практикующими врачами. Каждый антибактериальный препарат сорбирован в лунки стрипов в одной концентрации, позволяющей оценивать чувствительность урогенитальных микоплазм в двух категориях: чувствительные или резистентные.

Цель — провести сравнительный анализ частоты выявляемости *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* между двумя методами (ПЦР и КМ) при использовании наборов реагентов «Микоплазма-АЧ-12», «Уреаплазма-АЧ-12» с определением характера чувствительности клинических изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* в двух клинико-диагностических лабораториях Санкт-Петербурга и Челябинска.

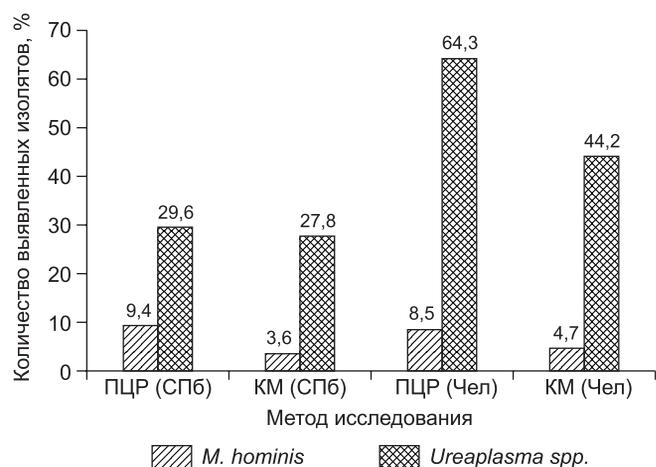
**Материал и методы.** Исследование проводилось на клиническом материале (отделяемое уретры, цервикального канала) с 2011 по 2015 г., полученном от 406 пациентов, из которых 277 обратились для амбулаторного обследования в медицинский центр при ФБУН НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург), а 129 пациентов обратились для амбулаторного обследования в медицинский центр «Ситимед» ООО «Экология здоровья» (Челябинск). Материал для исследования забирали до начала антибиотикотерапии при помощи одноразовых стерильных зондов и цитощеток в специализированную транспортную среду.

Обследование клинического материала (отделяемое уретры, цервикального канала) на наличие ДНК *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* проводилось методом ПЦР с использованием наборов реагентов «АмплиСенс» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). В Санкт-Петербурге реакцию амплификации и учет результатов проводили на устройстве «АНК-32» (Россия). В Челябинске реакцию амплификации и учет результатов проводили на аппарате BioRad CFX 96 (США).

Исследование клинического материала КМ проводилось с использованием наборов реагентов «Микоплазма-АЧ-12» и «Уреаплазма-АЧ-12» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). В Челябинске также определяли характер чувствительности выявленных клинических изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к 12 антибактериальным препаратам.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 8 (StatSoft, Inc., США). Для описания полученных результатов по оценке выявления использовались стандартные методы непараметрической статистики. (ХИ-квадрат и критерия Фишера). Оценка 95% доверительных интервалов (ДИ) произведена по Клопперу—Пирсону.

**Результаты и обсуждение.** В результате исследования клинического материала 277 человек, обратившихся для ам-



Сравнение частоты выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* культуральным методом и методом ПЦР в Санкт-Петербурге и Челябинске.

булаторного обследования в медицинский центр при ФБУН НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург), методом ПЦР *Ureaplasma spp.* была обнаружена у 59 (21,3%) человек, *M. hominis* — у 3 (1,1%) человек, а оба возбудителя: *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* — у 23 (8,3%) человек. При исследовании клинического материала КМ только *Ureaplasma spp.* выявлялась в 68 (24,6%) случаях, рост *M. hominis* был обнаружен в 1 (0,4%) случае, а оба возбудителя (*M. hominis* и *Ureaplasma spp.*) обнаружены у 9 (3,3%) человек.

При использовании метода ПЦР общее выявление *Ureaplasma spp.* в клиническом материале составило 82 (59 + 23 = 82) (29,6%) случая (95% доверительный интервал по методу Клоппера—Пирсона 24,3% — 35,4%), а при исследовании КМ — 77 (68 + 9 = 77) (27,8%) случаев (95% доверительный интервал 22,6% — 33,5%). Достоверно значимых различий по частоте выявления *Ureaplasma spp.* не выявлено [ $\chi^2 = 0,22$ ;  $p > 0,05$ ]. При использовании метода ПЦР общее выявление *M. hominis* составило 26 (23 + 3 = 26) (9,4%) случаев (95% доверительный интервал 6,2% — 13,4%), а КМ — 10 (9 + 1 = 10) (3,6%) случаев (95% доверительный интервал 1,7% — 6,5%). Значимость различий составила [ $\chi^2 = 7,61$ ;  $p < 0,05$ ].

Общее совпадение результатов между двумя методами (ПЦР и КМ) в проведенных исследованиях по частоте выявления *Ureaplasma spp.* из клинического материала, полученного от пациентов, составило 97,5%, в исследованиях по частоте выявления *M. hominis* общее совпадение результатов составило 93,5%.

Результаты сравнительного исследования клинического материала по частоте выявления урогенитальных микоплазм *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* методом ПЦР и КМ представлены в таблице и на рисунке.

В результате исследования клинического материала от 129 человек, обратившихся в медицинский центр «Ситимед» (Челябинск), методом ПЦР общее выявление *Ureaplasma spp.* составило 83 (64,3%) случая (95% доверительный интервал 55,4 — 72,6%), а при исследовании КМ — 57 (44,2%) случаев (95% доверительный интервал 35,4 — 53,2%). Значимость различий по частоте выявления *Ureaplasma spp.* составила [ $\chi^2 = 10,56$ ;  $p < 0,05$ ]. Общее выявление *M. hominis* при использовании метода ПЦР наблюдалось у 11 (8,5%) человек (95% доверительный интервал 4,3 — 14,7%), а КМ — у 6 (4,7%) человек (95% доверительный интервал 1,7 - 9,8%). Достоверно значимых различий не выявлено [ $\chi^2 = 1,57$ ;  $p > 0,05$ ].

Общее совпадение результатов между двумя методами (ПЦР и КМ) в проведенных исследованиях по частоте выявления *Ureaplasma spp.* составило 79,9%. При исследованиях по частоте выявления *M. hominis* общее совпадение результатов составило 96,1%.

В медицинском центре «Ситимед» (Челябинск) при исследовании клинического материала 129 человек с помощью наборов «Микоплазма-АЧ-12» и «Уреаплазма-АЧ-12» также определяли характер чувствительности выявленных изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к 12 антибактериальным препаратам. Культуральное исследование показало, что частота выявления *M. hominis* составила 6 (4,7%) случаев, из которых 3 (50%) изолята оказались резистентны к джозамицину, а 2 (33,3%) изолята — к мидекамицину и линкомицину. К остальным антибиотикам (доксидоцилину, тетрациклину, офлоксацину, ципрофлоксацину, пефлоксацину, спарфлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину и клиндамицину) клинические изоляты *M. hominis* оказались чувствительны. Частота выявления *Ureaplasma spp.* КМ составила 57 (44,2%) случаев, из которых 31 (54,4%) изолят был резистентным к азитромицину, к эритромицину — 30 (52,6%), к рокситромицину — 15 (26,3%), к мидекамицину — 14 (24,6%), к кла-

Сравнение результатов по частоте выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* культуральным методом и методом ПЦР

Результаты	Исследование в Санкт-Петербурге				Исследование в Челябинске			
	<i>Ureaplasma spp.</i>		<i>M. hominis</i>		<i>Ureaplasma spp.</i>		<i>M. hominis</i>	
	количество	%	количество	%	количество	%	количество	%
КМ «+»	76	27,4	9	3,25	57	44,2	6	4,6
ПЦР «+»								
КМ «-»	194	70	250	90,25	46	35,7	118	91,5
ПЦР «-»								
Совпадение	270	97,5	259	93,5	103	79,9	124	96,1
КМ «+»	1	0,4	1	0,4	0	0	0	0
ПЦР «-»								
КМ «-»	6	2,2	17	6,1	26	20,1	5	3,9
ПЦР «+»								
Несовпадение	7	2,5	18	6,5	26	20,1	5	3,9
Всего	277	100	277	100	129	100	129	100

ритромицину — 7 (12,3%), к левофлоксацину — 13 (22,8%), к спарфлоксацину — 8 (14,0%), к офлоксацину — 5 (8,8%), к моксифлоксацину — 4 (7,0%), к джозамицину — 4 (7%), к доксициклину — 2 (3,5%), а к тетрациклину — 2 (3,5%). Следует отметить, что 8 (14,04%) изолятов *Ureaplasma spp.* оказались мультирезистентны, т. е. проявили устойчивость ко всем двенадцати антибиотикам.

**Выводы.** В проведенных сравнительных исследованиях по оценке частоты выявления урогенитальных микоплазм *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* отмечается высокий процент совпадения результатов между двумя методами (ПЦР и КМ). Так, в Санкт-Петербурге при обнаружении *Ureaplasma spp.* общее совпадение результатов составило 97,5%, а при выявлении *M. hominis* — 93,5%. В Челябинске общее совпадение результатов несколько отличалось от полученных результатов в Санкт-Петербурге: при обнаружении *Ureaplasma spp.* было ниже (79,9%), а при выявлении *M. hominis* наоборот немного выше (96,1%).

Согласно полученным данным было установлено, что частота обнаружения *Ureaplasma spp.* оказалась значительно выше, чем *M. hominis*. Так, в Санкт-Петербурге для *Ureaplasma spp.* частота выявления составила 29,6% (ПЦР) и 27,8% (КМ), когда для *M. hominis* она была 9,4% (ПЦР) и 3,6% (КМ). В Челябинске частота выявления *Ureaplasma spp.* была приблизительно в 2 раза выше, чем в Санкт-Петербурге, и составила 64,3% (ПЦР) и 44,2% (КМ), частота выявления *M. hominis* находилась примерно на том же уровне — 8,5% (ПЦР) и 4,7% (КМ).

В ходе исследования в Челябинске также был определен характер чувствительности обнаруженных клинических изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* с помощью наборов «Микоплазма-АЧ-12» и «Уреаплазма-АЧ-12». Оценивая результаты, обращает внимание высокий процент антибиотикорезистентности выявленных изолятов *Ureaplasma spp.*, устойчивость наблюдалась по отношению ко всем 12-ти антибактериальным препаратам. Наименее активными антибиотиками оказались макролиды, особенно азитромицин и эритромицин, к которым были резистентны около 50% исследованных изолятов *Ureaplasma spp.* Из фторхинолонов наименее активным антибиотиком оказался левофлоксацин. Проведенное исследование выявило мультирезистентность у 8 (14,04%) изолятов *Ureaplasma spp.*, что может являться следствием бесконтрольного лечения или неправильного назначения антибактериальных препаратов без предварительного определения антибиотикочувствительности.

Таким образом, согласно проведенным исследованиям по частоте выявления урогенитальных микоплазм методом ПЦР и КМ можно сделать вывод, что оба метода сравнимы по своей диагностической эффективности и могут быть использованы в практическом здравоохранении. Расхождение результатов, т.е. отсутствие роста урогенитальных микоплазм на питательных средах при положительном результате исследования методом ПЦР, может быть объяснено несколькими причинами: низкой обсемененностью биопробов возбудителем, а также более высокой чувствительностью метода ПЦР, наличием нежизнеспособных форм микоплазм в клиническом материале или отсутствием четкой стандартизации количества исходного материала.

На наш взгляд, полученные результаты по определению характера чувствительности клинических изолятов урогенитальных микоплазм к антибактериальным препаратам и выявлению множественной устойчивости *Ureaplasma spp.*, показывают необходимость до назначения лечения проводить анализ на сравнительную чувствительность антибиотиков различных видов.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гизингер О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета: Дисс. ... докт. биол. наук. Челябинск; 2010.
2. Долгушин И.И., Гизингер О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2008; (4): 29—31.
3. Немченко О.И., Уварова Е.В. Урогенитальный микоплазмоз. *Дерматология*. Приложение к журналу *Consilium Medicum*. 2007; (1): 45—50.
4. Лятева О.И., Гизингер О.А., Зиганшина Т.А., Зиганшин О.Р., Семенова И.В. Возможность иммунокоррекции воспалительных заболеваний урогенитального тракта, ассоциированных с микоплазмами у женщин репродуктивного возраста. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2011; (2): 86—91.
5. Мальцева Л.И., Андрушко И.А. Патогенетическая роль нарушений системы гемостаза при урогенитальной микоплазменной инфекции у женщин. *Архив патологии*. 1995; (5): 118—22.
6. Шипулина О.Ю., Гушин А.Е., Рыжих П.Г. Разработка и апробация тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации видов уреаплазм и определения их концентрации в образцах из урогенитального тракта. В кн.: Сборник трудов 6-ой Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика-2007». Том 2. М.; 2007: 239—44.
7. Кубанова А.А., Лесная И.Н., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Капирович М.А. Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010; (5): 4—21.
8. Раковская И.В. Микоплазмы человека и микоплазменные инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; (3): 25—32.
9. Прилепская В.Н., Кисина В.И., Соколовский Е.В., Савичева А.М., Гомберг М.А., Гушин А.Е. К вопросу о роли микоплазм в урогенитальной патологии. *Гинекология*. 2007; 9(1): 31—8.
10. Martin D.H. Nongonococcal urethritis: new views through the prism of modern molecular microbiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2008; 10(2): 128—32.
11. Baka S., Kouskouni E., Antonopoulou S., Sioutis D., Papakonstantinou M., Hassiakos D. et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms. *Urology*. 2009; 74(1): 62—6.
12. Elias M., Grzeško J., Siejkowski R., Nowicka J., Maczyńska B., Goluda M. et al. The presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the cervical canal of uterus. *Ginek. Pol.* 2005; 76(1): 28—32.
13. Колупаев В.Е., Гиммельфарб Е.И., Липова Е.В. Взаимосвязь концентрации уреа- и микоплазм и распространения инфекционно-воспалительного процесса урогенитального тракта у женщин. *Вестник последипломного медицинского образования*. 2009; (1): 34—7.
14. Заручейнова О.В. Методы лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, ассоциированных с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(4): 331—8.

## REFERENCES

1. Gizinger O.A. *Effect of Low-Intensity Laser Radiation on Neutrophils and Mucosal Immunity Factors*: Diss. Chelyabinsk; 2010. (in Russian)
2. Dolgushin I.I., Gizinger O.A. Effect of low-intensity laser radiation on neutrophils cervical secretion in women with mycoplasma infection. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury*. 2008; (4): 29—31. (in Russian)
3. Nemchenko O.I., Uvarova E.V. Urogenital mycoplasmosis. *Dermatologiya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum*. 2007; (1): 45—50. (in Russian)

4. Letyaeva O.I., Gizinger O.A., Ziganshina T.A., Ziganshin O.R., Semenova I.V. The ability of immune inflammatory diseases of the urogenital tract, associated with mycoplasma in women of reproductive age. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2011; (2): 86—91. (in Russian)
5. Mal'tseva L.I., Andrushko I.A. The pathogenetic role of hemostatic system in urogenital mycoplasma infection in women. *Arkhiv patologii*. 1995; (5): 118—22. (in Russian)
6. Shipulina O.Yu., Gushchin A.E., Ryzhikh P.G. *Development and testing of a test system based on real-time PCR to differentiate ureaplasma species and determine their concentrations in samples of urogenital tract*. In: Proceedings of the 6th All-Russian Scientific-Practical Conference «Molecular Diagnostics 2007». Volume 2 [Sbornik trudov 6-oy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika-2007». Tom 2]. Moscow; 2007: 239—44. (in Russian)
7. Kubanova A.A., Lesnaya I.N., Kubanov A.A., Melekhina L.E., Kaspirovich M.A. The analysis of the epidemiological situation and the dynamics of infection diseases, sexually transmitted infections, dermatoses and in the Russian Federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2010; (5): 4—21. (in Russian)
8. Rakovskaya I.V. Mycoplasma human and mycoplasma infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; (3): 25—32. (in Russian)
9. Prilepskaya V.N., Kisina V.I., Sokolovskiy E.V., Savicheva A.M., Gomberg M.A., Gushchin A.E. The role of mycoplasmas in urogenital pathology. *Ginekologiya*. 2007; 9(1): 31—8. (in Russian)
10. Martin D.H. Nongonococcal urethritis: new views through the prism of modern molecular microbiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2008; 10(2): 128—32.
11. Baka S., Kouskouni E., Antonopoulou S., Sioutis D., Papakonstantinou M., Hassiakos D. et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms. *Urology*. 2009; 74(1): 62—6.
12. Elias M., Grzeško J., Siejkowski R., Nowicka J., Maczyńska B., Goluda M. et al. The presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the cervical canal of uterus. *Ginekol. Pol.* 2005; 76(1): 28—32.
13. Kolupaev V.E., Gimmel'farb E.I., Lipova E.V. The relationship of concentration urea- and mycoplasmas and spread infectious inflammation of the urogenital tract in women. *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya*. 2009; (1): 34—7. (in Russian)
14. Zarucheynova O.V. Methods of laboratory diagnosis of urogenital infections associated with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp.* *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(4): 331—8. (in Russian)

Поступила 18.05.16

Принята к печати 15.06.16

## Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки

**[www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)** можно подписаться на электронную версию

нашего журнала и других журналов издательства «Медицина» на 2017 год.

Архив журналов Издательства «Медицина»

находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах

Научной электронной библиотеки **[www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

и Киберленинки **[www.cyberleninka.ru](http://www.cyberleninka.ru)**