

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

45 (2) • Март-апрель 2017

ISSN 2072-0505

Матриксные металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции

Антибиотикорезистентность культур *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в 2013–2016 гг. в хозяйствах Российской Федерации, и детекция у них генов резистентности к ванкомицину

Фенотипическая характеристика биологических свойств коагулазонегативных стафилококков, выделенных в кардиохирургическом стационаре

Оценка фенотипа интерфазных ядер лимфоцитов методом количественного фазового имиджинга (QPI) у пациенток с эндометриоидными кистами яичников

Себорейный кератоз: клинические особенности и ассоциация с вирусом папилломы человека рода β

Железозависимость биологических свойств *Candida albicans*

Методика расчета энергетической ценности питательных сред на основе стехиометрических закономерностей процесса биологического окисления

Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в диагностике и прогнозе множественной миеломы

ТЕМА НОМЕРА:

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

АЛЪМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Издается с 1998 г.
Периодичность – 8 выпусков в год
Учредитель – ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 45 • № 2 • Март-апрель 2017

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Палеев Филипп Николаевич, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.,
директор ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Заместитель главного редактора

Молочков Антон Владимирович, д-р мед. наук, проф.,
заместитель директора ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по науке
и международным связям (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Аляев Юрий Геннадьевич, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.,
зав. кафедрой урологии ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Москва, Россия)

Белоусова Елена Александровна, д-р мед. наук, проф., зав. отделением
гастроэнтерологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Васюк Юрий Александрович, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой
клинической функциональной диагностики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова
Минздрава России (Москва, Россия)

Ватазин Андрей Владимирович, д-р мед. наук, проф., зав. отделом
трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Герасименко Марина Юрьевна, д-р мед. наук, проф., директор ФГБУ «РНЦ
МРИК» Минздрава России (Москва, Россия)

Голухова Елена Зеликовна, академик РАН, д-р мед. наук, проф.,
руководитель отделения неинвазивной аритмологии ФГБУ «ННПССХ
им. А.Н. Бакулева» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Михайлович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук,
директор НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России (Москва, Россия)

Добрынина Лариса Анатольевна, д-р мед. наук, руководитель
3-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН (Москва, Россия)

Драпкина Оксана Михайловна, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.,
первый заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «ГНИЦПМ»
Минздрава России (Москва, Россия)

Егоров Виктор Иванович, д-р мед. наук, зав. оториноларингологическим
отделением ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Мельниченко Галина Афанасьевна, академик РАН, д-р мед. наук, проф.,
директор Института клинической эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный
центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Нероев Владимир Владимирович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.,
директор ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (Москва, Россия)

Овезов Алексей Мурадович, д-р мед. наук, зав. отделением анестезиологии
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Потапов Александр Сергеевич, д-р мед. наук, проф.,
зав. гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «ННПЦЗД»
Минздрава России (Москва, Россия)

Научный редактор выпуска

Русанова Елена Владимировна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр.
научно-исследовательской лаборатории лабораторного отдела ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Ответственный редактор

Парпара Олеся Анатольевна (Москва, Россия)

Рогаткин Дмитрий Алексеевич, д-р техн. наук, зав. лабораторией медико-
физических исследований ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Романко Юрий Сергеевич, д-р мед. наук, руководитель научно-
организационного отдела Медицинского радиологического научного центра
им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (Обнинск, Россия)

Сюч Наталия Иосифовна, д-р мед. наук, проф., зав. лабораторным
отделением ФКУ «ЦВКГ им. П.В. Мандрыка» (Москва, Россия)

Урсова Наталия Игоревна, д-р мед. наук, проф., зав. педиатрическим
отделением ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Председатель: **Палеев Николай Романович**, академик РАН, д-р мед.
наук, проф., зав. кафедрой терапии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Александрова Оксана Юрьевна, д-р мед. наук, проф., декан факультета
усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва,
Россия)

Де Херт Стефан, доктор медицины, председатель научного комитета
Европейского общества анестезиологии, проф. кафедры анестезиологии
и периперативной медицины Гентского университета (Гент, Бельгия)

Краснопольский Владислав Иванович, академик РАН, д-р мед. наук,
проф., директор ГБУЗ МО МОНИИАГ (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., зав.
лабораторией клинической биохимии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
(Москва, Россия)

Майр Йоханнес, доктор медицины, проф., консультант по детской хирургии
отделения детской хирургии Педиатрической клиники Университета Базеля (Базель,
Швейцария)

Райниш Уолтер, доктор медицины, проф. кафедры внутренних болезней
Университета МакМастер (Гамильтон, Канада)

Шабалин Владимир Николаевич, академик РАН, д-р мед. наук, проф.,
заместитель директора по научной работе ФГБНУ «НИИОПП» (Москва, Россия)

Шахова Наталия Михайловна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник
ИПФ РАН (Нижний Новгород, Россия)

Янг Чи, доктор медицины, проф., руководитель отделения челюстно-лицевой
хирургии Шанхайского 9-го народного госпиталя, Медицинская школа Шанхайского
университета Цзяотун (Шанхай, Китай)

Содержание

Юбилей

**К 80-летию со дня рождения
Геннадия Алексеевича Оноприенко** 78

Приглашенная статья

Оноприенко Г.А., Волошин В.П.
**Современные концепции процессов
физиологического и репаративного
остеогенеза** 79

Оригинальные статьи

*Герштейн Е.С., Муштенко В.В., Короткова Е.А.,
Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алферов А.А.,
Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е.*

**Матриксные металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их
тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке
крови больных раком почки: клинко-
морфологические корреляции** 94

*Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Вотякова О.М.,
Кушлинский Н.Е.*

**Свободные легкие цепи иммуноглобулинов
в диагностике и прогнозе множественной
миеломы** 102

*Гаспарян С.А., Попова О.С., Василенко И.А.,
Хрипунова А.А., Метелин В.Б.*

**Оценка фенотипа интерфазных ядер
лимфоцитов методом количественного
фазового имиджинга (QPI) у пациенток
с эндометриоидными кистами яичников** ... 109

Писклакова Т.П., Костенко Е.И., Телешева Л.Ф.

**Себорейный кератоз: клинические
особенности и ассоциация с вирусом
папилломы человека рода β** 118

Граничная Н.В., Зайцева Е.А., Бондарь В.Ю.
**Фенотипическая характеристика
биологических свойств коагулазонегативных
стафилококков, выделенных
в кардиохирургическом стационаре** 127

Леонов В.В., Миронов А.Ю.

**Железозависимость биологических
свойств *Candida albicans*** 133

*Светоч Э.А., Теймуразов М.Г., Тазина О.И.,
Абаимова А.А., Лев А.И., Асташкин Е.И.,
Леонова Е.С., Карцев Н.Н., Демушев К.В.,
Ерусланов Б.В., Дятлов И.А., Фурсова Н.К.*

**Антибиотикорезистентность культур
Enterococcus spp., выделенных от
промышленной птицы в 2013–2016 гг.
в хозяйствах Российской Федерации,
и детекция у них генов резистентности
к ванкомицину** 138

Зайцева Е.А.

**Особенности биологических свойств
бактерий вида *Listeria innocua*, выделенных
на территории Приморского края** 147

*Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Сылка О.И.,
Тюкавкина С.Ю., Алексеева Л.П.*

**Способность к адгезии типовых
и биопленочных культур токсигенных
штаммов *Corynebacterium diphtheriae*** 154

Хохлова О.Б., Кузнецова Е.Д., Сапожникова Н.Г.

**Методика расчета энергетической
ценности питательных сред на основе
стехиометрических закономерностей
процесса биологического окисления** 159

Гусева И.А., Рогаткин Д.А., Бувалая Е.С.

**Анализ люминесценции в мутных
биологических средах** 163

Подписной индекс 81988
Объединенный каталог «Пресса России»

Журнал индексируется в системе
Российского индекса научного цитирования
(РИНЦ): www.elibrary.ru

© 2017 ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе
по надзору в сфере связи, информационных тех-
нологий и массовых коммуникаций. Свидетель-
ство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» с 2001 г.
входит в перечень журналов Высшей аттеста-
ционной комиссии (Перечень ведущих российских
рецензируемых научных журналов, в которых
должны быть опубликованы основные научные
результаты диссертаций на соискание ученых
степеней доктора и кандидата наук)

Редакция не несет ответственности за содержа-
ние рекламных публикаций.

Полная или частичная перепечатка или размно-
жение каким-либо способом статей и иллюстра-
ций допускается только с письменного разреше-
ния редакции.

Адрес редакции:
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8
Тел.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_papara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru, www.monikiweb.ru/node/15

ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional
Research and Clinical Institute (MONIKI),
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 45 • Number 2 • March-April 2017

EDITOR-IN-CHIEF

Filipp N. Paleev, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof.,
Director of MONIKI (Moscow, Russia)

Deputy Chief Editor

Anton V. Molochkov, MD, PhD, Prof., Deputy Director on Science
and International Communications, MONIKI (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Yuri G. Alyaev, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof.,
Head of Chair of Urology, The First MSU (Moscow, Russia)

Elena A. Belousova, MD, PhD, Prof., Head of Department of Gastroenterology, MONIKI
(Moscow, Russia)

Iuri A. Vasiuk, MD, PhD, Prof., Head of Chair of Clinical Functional Diagnostics, MSUMD
(Moscow, Russia)

Andrey V. Vatazin, MD, PhD, Prof.,
Head of Department of Transplantology, Nephrology and Surgical Hemocorrection, MONIKI
(Moscow, Russia)

Marina Yu. Gerasimenko, MD, PhD, Prof., Director of Russian Scientist Center for
Medical Rehabilitation and Balneology (Moscow, Russia)

Elena Z. Golukhova, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Head of Department
of Non-invasive Arrhythmology, BSCCS (Moscow, Russia)

Mikhail M. Davydov, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Director of Research
Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Larisa A. Dobrynina, MD, PhD, Head of the 3rd Department of Neurology, Research
Center of Neurology (Moscow, Russia)

Oxana M. Drapkina, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., First Deputy
Director on Science and Clinical Work, FSI NRCPM Minzdrav of Russia (Moscow, Russia)

Viktor I. Egorov, MD, PhD, Head of Department of Otorhinolaryngology, MONIKI
(Moscow, Russia)

Galina A. Melnichenko, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Director
of Institut of Clinical Endocrinology, Endocrinology Research Center (Moscow, Russia)

Vladimir V. Neroev, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Director of
Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases (Moscow, Russia)

Aleksey M. Ovezov, MD, PhD, Head of Department of Anaesthesiology, MONIKI
(Moscow, Russia)

Alexandr S. Potapov, MD, PhD, Prof., Head of Gastroenterology Department with
Hepatology Group, FSAI "SCCH" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow,
Russia)

Science Editor

Elena V. Rusanova, MD, PhD, Leading Researcher, Research and Clinical Laboratory,
Laboratory Department

Managing Editor

Olesya A. Parpara (Moscow, Russia)

Dmitriy A. Rogatkin, PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics
Research, MONIKI (Moscow, Russia)

Yuri S. Romanko, MD, PhD, Head of Scientific and Organizational Department of A. Tsyb
Medical Radiological Research Centre (Obninsk, Russia)

Nataliya I. Siuch, MD, PhD, Prof., Head of Laboratory Department of P.V. Mandryka
Central Military Clinical Hospital (Moscow, Russia)

Nataliya I. Ursova, MD, PhD, Prof., Head of Department of Pediatrics, MONIKI (Moscow,
Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Chair: **Nikolay R. Paleev**, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof.,
Head of Chair of Therapy, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Oksana Yu. Aleksandrova, MD, PhD, Prof., Dean of Postgraduate Training Faculty,
MONIKI (Moscow, Russia)

Stefan De Hert, MD, PhD, Prof., Chair of ESA Scientific Committee, Department of
Anaesthesiology and Perioperative Medicine, University of Ghent (Ghent, Belgium)

Vladislav I. Krasnopol'skiy, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof.,
Director of MONIAG (Moscow, Russia)

Nikolay E. Kushlinskii, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof.,
Head of Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Johannes Mayr, MD, PhD, Prof., Consultant, Department of Pediatric Surgery, UKBB
(Basel, Switzerland)

Walter Reinish, MD, PhD, Prof., Department of Internal Medicine, McMaster University
(Hamilton, Canada)

Vladimir N. Shabalin, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Deputy Director on
Science, NIIOPP (Moscow, Russia)

Nataliya M. Shakhova, MD, PhD, Leading Research Fellow, IAP RAS (Nizhny
Novgorod, Russia)

Chi Yang, MD, PhD, Professor, Director of Department of Oral Surgery, Shanghai
9th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Shanghai, China)

Content

Anniversary

On the 80th anniversary of Gennadiy Alekseevich Onoprienko 78

Invited paper

Onoprienko G.A., Voloshin V.P.

Current concepts in physiological and reparative osteogenesis 79

Articles

Gershtein E.S., Mushtenko V.V., Korotkova E.A., Bezhanova S.D., Morozov A.A., Alferov A.A., Kazantseva I.A., Kushlinskii N.E.

Matrix metalloproteinases 2, 7, 8, 9 and their type 1 tissue inhibitor in serum of renal cancer patients: clinical and pathologic correlations ... 94

Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Votyakova O.M., Kushlinskii N.E.

Free light chains of immunoglobulins in the diagnosis and prognosis of multiple myeloma . 102

Gasparyan S.A., Popova O.S., Vasilenko I.A., Khripunova A.A., Metelin V.B.

Evaluation of the lymphocyte interphase nuclei phenotype by quantitative phase imaging (QPI) in patients with endometrial ovarian cysts 109

Pisklakova T.P., Kostenko E.I., Telesheva L.F.

Seborrheic keratosis: clinical characteristics and an association with the β -genus human papillomavirus 118

Granichnaya N.V., Zaitseva E.A., Bondar V.Yu.

Phenotypic characterization of the biological properties of coagulase-negative staphylococci isolated in a cardiac surgery department 127

Leonov V.V., Mironov A.Yu.

Iron-dependency of biological properties of *Candida albicans* 133

Svetoch E.A., Teymurazov M.G., Tazina O.I., Abaimova A.A., Lev A.I., Astashkin E.I., Leonova E.S., Kartsev N.N., Detushev K.V., Eruslanov B.V., Dyatlov I.A., Fursova N.K.

Antibacterial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry of the Russian Federation farms in 2013–2016, and identification of vancomycin resistance genes 138

Zaitseva E.A.

Specific biological properties of *Listeria innocua* spp. isolated in Primorye Territory 147

Kharseeva G.G., Alieva A.A., Sylka O.I., Tyukavkina S.Yu., Alekseeva L.P.

Adhesivity of standard and biofilm cultures of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains 154

Khokhlova O.B., Kuznetsova E.D., Sapozhnikova N.G.
The method for calculation of the energy density of culture media based on stoichiometrical patterns of the biological oxidative process 159

Guseva I.A., Rogatkin D.A., Buvalaya E.S.

Analysis of luminescence in turbid biological media 163

Subscription index 81988
in the united Pressa Rossii catalogue

The journal is indexed by Russian Index of Scientific
Citation (RISC): www.elibrary.ru

© 2017 MONIKI
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Registration certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is included in the List of leading referred journals, recommended by VAK (Higher Attestation Committee) for publication of scientific results of dissertations for the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible for claims made in the advertisements published in the journal.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data base, on video discs, etc., without first obtaining written permission from the publisher (respective of the copyright owner if other than MONIKI).

Editorial Office

Almanac of Clinical Medicine, MONIKI,
61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110,
Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_parpara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru, www.monikiweb.ru/node/15

Дорогие читатели!



Древнее изречение «кто хорошо диагностирует, тот хорошо лечит» продолжает оставаться актуальным и для современной медицины. Лабораторная диагностика играет ключевую роль в постановке диагноза, прогнозировании течения патологического процесса, контроле эффективности лечения при заболеваниях разного профиля. Повышение качества диагностических исследований, разработка и внедрение инновационных мультипараметрических аналитических систем и медико-биологических технологий – настоящее требование времени, главное условие научно-технического прогресса в медицине.

За последние десятилетия отмечается рост объемов исследований по всем направлениям лабораторной диагностики: изучению иммунологических, биохимических, гематологических, бактериологических аспектов патогенеза заболеваний; разработке критериев ранней и этиологической диагностики; обоснованию патогенетической терапии и профилактики.

В настоящем выпуске журнала «Альманах клинической медицины» предлагаем вашему вниманию оригинальные научные статьи, посвященные современным подходам к лабораторной диагностике, сочетающим применение новых и традиционных методов в клинической практике.

Внимание исследователей сосредоточено на поиске информативных биомаркеров целого ряда заболеваний. В одной из публикаций номера представлены данные по коррекции уровней белков группы металлопротеиназ-2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора I-го типа в сыворотке крови пациентов с раком почки. Актуальны также результаты работы по оценке диагностической значимости определения свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови больных множественной миеломой в зависимости от изотопа парапротеина, что позволяет дать ранний прогноз течения заболевания и оценить общую выживаемость больных.

Безусловный интерес представляет статья, посвященная применению нового перспективного метода клеточного имиджинга для прогнозирования и оценки эффективности терапии в гинекологической практике у пациенток с эндометриозными кистами яичников.

Учитывая внимание мировой научной общественности к проблеме взаимосвязи вируса папилломы человека с различными кожными заболеваниями, несомненно важное значение имеют результаты проведенного анализа вирусной нагрузки при себорейном кератозе в зависимости от клинической картины и распространенности процесса. Выявленные авторами ассоциативные взаимосвязи открывают перспективу разработки новых методов лечения данного заболевания.

Цельный ряд статей выпуска посвящен проблемам клинической микробиологии. В частности, убедительно показан новый путь (помимо влияния антибактериальных препаратов при лечении) распространения штаммов *Enterococcus* spp., обладающих множественной резистентностью; приведены доказательства роли коагулазонегативных стафилококков в развитии послеоперационных осложнений воспалительного характера в кардиохирургическом стационаре; представлены данные о распространении *Listeria innocua*, ранее считавшихся непатогенными для человека; изучены механизмы изменения биологических свойств грибов рода *Candida* при нарушениях обмена железа и т.д.

Экспериментальные статьи, посвященные разработке алгоритмов расчета концентраций люминофоров в условиях мутных сред и методике определения энергетической ценности питательных сред на основе стехиометрических закономерностей процесса биологического окисления, демонстрируют, что клинико-лабораторные исследования в научно-исследовательском учреждении не только востребованы как вспомогательный механизм для диагностики и мониторинга терапии, но имеют огромное значение при выполнении современных наукоемких разработок.

Главный редактор журнала
«Альманах клинической медицины»

Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Ф.Н. Палеев

К 80-летию со дня рождения Геннадия Алексеевича Оноприенко



Двадцать второго мая 2017 г. исполняется 80 лет заслуженному деятелю науки Российской Федерации, лауреату Государственной премии Российской Федерации, дважды лауреату премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, дважды лауреату именных премий РАМН, члену-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Геннадию Алексеевичу Оноприенко.

Г.А. Оноприенко родился в г. Сызрань Куйбышевской (ныне Самарской) области. В 1960 г. окончил Первый Московский медицинский институт и в течение трех лет работал хирургом, травматологом Мытищинской больницы Московской области. С 1963 г. работает в Московском областном научно-исследовательском клиническом институте им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). В 1982 г. назначен заместителем директора института по научной работе. В течение 26 лет (с 1987 по 2013 г.) был директором МОНИКИ. Под его руководством в институте произошли коренные перемены. Проведен капитальный ремонт всех 17 корпусов, осуществлено техническое переоснащение клиник и лабораторий. По инициативе Геннадия Алексеевича в 1990 г. открыт факультет усовершенствования врачей (впервые в стране на базе многопрофильного научно-исследовательского института). Сегодня факультет насчитывает 35 кафедр и курсов, а МОНИКИ по праву входит в число лидирующих лечебно-научно-учебных медицинских центров Российской Федерации.

Геннадий Алексеевич Оноприенко – один из ведущих травматологов-ортопедов страны. Он автор 590 научных работ. Основные направления его научных исследований – экспериментальное обоснование оптимальных условий репаративной регенерации костной, хрящевой, сухожильной тканей, в клинике – разработка новых способов хирургического лечения больных с неблагоприятными последствиями травм и ортопедических заболеваний конечностей. Г.А. Оноприенко предложил комплекс уникальных методов

визуализации микроваскулярной сети опорных органов и тканей, получил новые данные о системе микроциркуляции, физиологической и репаративной регенерации тканей опорного аппарата при экспериментальном моделировании на животных различных видов функциональных нарушений, повреждений и оперативных вмешательств, наиболее распространенных в клинической практике. Данный цикл научных работ отмечен Государственной премией Российской Федерации в области науки и техники (1999), премией РАМН им. В.В. Парина (1995), а также им. А.А. Богомольца (2000).

Итоги многолетних уникальных исследований подведены в монографии «Микроциркуляция и регенерация костной ткани: теоретические и клинические аспекты» (2017), написанной в соавторстве с профессором В.П. Волошиным. Работа содержит значительный объем новых экспериментальных данных и представляет собой крупный вклад в медицинскую науку.

Г.А. Оноприенко известен также как крупный организатор здравоохранения и медицинской науки. На протяжении 10–15 лет был членом бюро ученого совета Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Межведомственного координационного совета по новой медицинской технике, председателем комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по новой технике в области травматологии и ортопедии, возглавлял Проблемно-научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации по хирургии.

В настоящее время Г.А. Оноприенко работает в должности профессора кафедры травматологии и ортопедии факультета усовершенствования врачей МОНИКИ. Он – Почетный председатель ученого совета института, Почетный гражданин Московской области (2007), Почетный член Всероссийского общества хирургов (2007), Почетный академик Сербской академии наук и искусств (2012). Награжден орденом «За заслуги перед Отечеством» IV степени (2003), орденом Ивана Калиты Московской области (2010). ©



Современные концепции процессов физиологического и репаративного остеогенеза

Оноприенко Г.А.¹ • Волошин В.П.¹

Оноприенко Геннадий Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры травматологии и ортопедии факультета усовершенствования врачей¹
 ✉ 123242, г. Москва, ул. Б. Грузинская, 22–118, Российская Федерация.
 Тел.: +7 (495) 923 12 46.
 E-mail: gao-1537@mail.ru

Волошин Виктор Парфентьевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделением травматологии и ортопедии, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии факультета усовершенствования врачей¹

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Исследования последних лет, выполненные биологами, убедительно свидетельствуют, что в основе физиологического и репаративного остеогенеза, а также функционально-адаптивной и посттравматической перестройки костной ткани лежат единые и стереотипные молекулярно-клеточные механизмы. Собственные экспериментальные исследования авторов показали: все этапы морфогенеза костных микроструктур синхронно обеспечиваются и непрерывно сопровождаются очаговым и стереотипным ангиогенезом (капиллярогенезом). Мощным фактором реализации репаративного остеогенеза выступает остеоиндуцирующее взаимодействие концов поврежденного костного сегмента, которое положительно проявляется даже в случаях значительных диастазов между отломками (но стабильно фиксированных). При обеспечении стабильности зоны костного повреждения на весь период

консолидации после любого вида стабильного остеосинтеза формируется эндостально-кортикальный костный регенерат за счет прямого остеогенеза (то есть без фиброзно-хрящевой ткани) минимального объема и в кратчайшие сроки. Periosteal osteogenesis при этом фактически становится резервным источником костеобразования, который проявляется в недостаточно стабильных условиях. Нестабильность зоны костного повреждения и особенно металлического имплантата черева та самыми тяжелыми деструктивными последствиями.

Ключевые слова: регенерация и микроциркуляция костной ткани, остеогенез физиологический и посттравматический, прямой остеогенез, стабильный остеосинтез

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-79-93

Фундаментальные исследования последних лет, выполненные биологами на молекулярно-клеточном уровне, позволяют по-новому представить процессы физиологического и репаративного остеогенеза. Обращается внимание на многофункциональность остеоцитов, образующих в костном органе целостную информационно-трофическую систему – остеоцитарную сеть. Помимо трофической ей свойственна еще и сенсорная функция – реагирование на механические импульсы [1–3]. С.Н. Turner и соавт. [4]

сравнивают остеоцитарную сеть компактного вещества костной ткани по эффекту своей деятельности с сетью нейронов. Н.П. Омеляненко и соавт. [5] отмечают, что она хорошо интегрирована в лакуно-канальцевую систему интерстициального пространства костного матрикса.

Механические воздействия на костную ткань вызывают деформацию клеточной мембраны остеоцитов и изменение трансмембранных рецепторов. Изменяется активность трансмембранных канальцев, увеличивается поступление в клетки ионов калия и кальция. Именно здесь,

у цитоплазматической мембраны остеоцита, происходит трансформация механической энергии в биохимическую с распространением сигналов по остеоцитарной сети, называемая некоторыми авторами механической трансдукцией, или механотрансдукцией [6, 7]. В этот процесс включается ряд внутриклеточных ферментов. Сигнальные белки активируют множество механосенсорных генов, ростовых факторов, которые стимулируют экспрессию сигнальных молекул, регулирующих пролиферацию, дифференцировку и функцию как остеокластов, осуществляющих резорбцию костной ткани, так и остеобластов, ее продуцирующих [8, 9].

Дополнительный фактор механотрансдукции – увеличение периosteоцитарной жидкости интерстициального пространства костного матрикса в ответ на механические воздействия [10, 11]. Очаги ремоделирования костной ткани возникают и активизируются также при генетически запрограммированном апоптозе остеоцитов [12].

Таким образом, в современном понимании, остеоциты регулируют физиологический остеогенез и адаптацию микроархитектоники костной ткани в ответ на механические воздействия, являясь своеобразным «механостатом» [13, 14]. Кроме того, остеоциты, располагая рецепторами практически всех гормонов, служат проводниками системной (эндокринной) регуляции морфофункционального состояния костной ткани [15–18].

В качестве «организаторов архитектуры новой костной ткани» Е. J. Mackie [19] называет остеобласты, учитывая их важную роль в синтезе и секреции компонентов костного матрикса, в активной экспрессии большого числа сигнальных молекул локального (короткодистантного) межклеточного взаимодействия. Часть из них регулируют и остеокластическую резорбцию костного матрикса [20], а также остеонеров [21]. В свою очередь, остеокласты на определенном этапе активируют остеобласты. Дифференцировка остеобластов проходит 5 стадий и занимает около 60 часов [22], а срок их активной жизни составляет 10–20 суток [23, 24].

В конечном итоге дифференцировка остеобластов завершается трансформацией их в остеоциты, имеющие фенотип «управляющей клетки», или апоптозом – генетически запрограммированной смертью. Часть незрелых остеобластов (преosteобластов), выстилающих гаверсовы и фолькмановские каналы, сохраняет длительно выраженную экспрессию генов, обеспечивающих остеогенез и ремоделирование костной ткани [25].

По мнению ряда авторов, при физиологическом остеогенезе (на фоне обычной жизнедеятельности) очаги резорбции и генерации костной ткани не распространяются на весь костный орган, а локализуются мозаично на микроучастках (рис. 1). Н. М. Frost [26] предложил термин “basis multicellular unit, BMU” (базисная многоклеточная единица), которым обозначил взаимосвязь остеобластов, остеокластов и их клеток-предшественников, формирующих на костной поверхности локусы перестройки. Позже появились другие названия этого процесса: “bone structural unit” (костная структурная единица), “bone remodeling unit” (костная ремоделирующая единица). Продолжительность подобного локального процесса в норме составляет 3–4 месяца, а их общее число в скелете достигает 3 млн в год [27]. Процесс одновременного ремоделирования у взрослого человека занимает 10% костной поверхности скелета, а у детей – 60% [28]. В отличие от костной поверхности в толще компактного вещества кортикальной пластинки формируется «режущий конус», где остеокласты запускают каскад распада минерала до размера наночастиц, последующее растворение их до молекул, дезинтеграцию коллагеновых фибрилл до макромолекул, полипептидов и их фрагментов с выделением продуктов распада в межклеточную среду [29–31]. Сопряженность взаимодействия остеокластов и остеобластов обеспечивается множеством

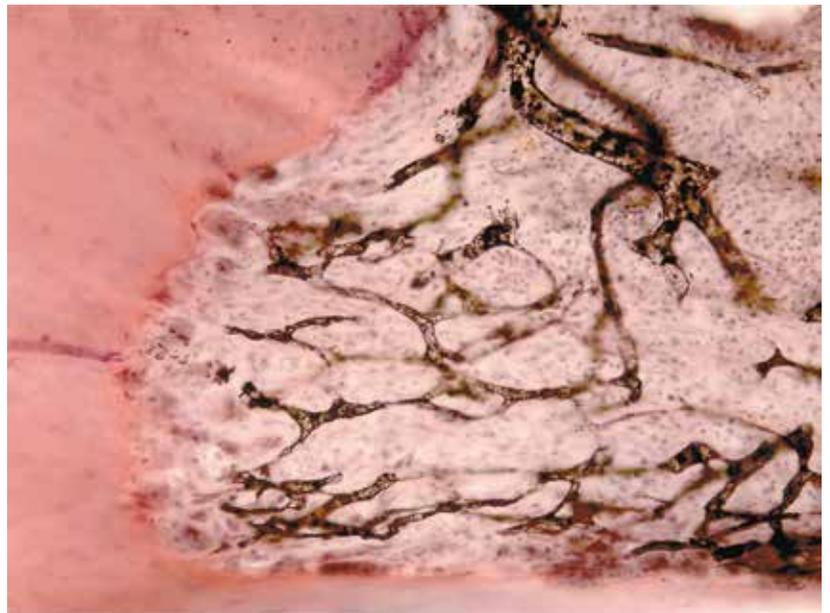


Рис. 1. Локальный участок (локус) капиллярогенеза, остеокластической резорбции костной ткани, формирования остеобластической ткани. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 90$ (Источник [39])



сигнальных молекул – факторов ферментативного аутолиза клеток [32–34]. В конечном итоге адаптационное ремоделирование приводит новую микроструктуру костной ткани в соответствие с изменившимися функциональными потребностями. Подсчитано, что при обычной жизнедеятельности организма полная замена костной ткани происходит каждые 10 лет [35].

При масштабной репаративной перестройке костной структуры, особенно после травмы, быстродействующая резорбция костной ткани осуществляется без участия остеокластов – за счет остеоцитарного остеолита [36, 37]. Этот процесс А.С. Аврунин [38] называет «остеоцитарным ремоделированием». То же самое мы наблюдали при экспериментальном моделировании остеопороза [39].

По данным А.Н. Simpson и соавт. [40], Н.П. Омеляненко и соавт. [5], физиологический остеогенез обеспечивается преимущественно за счет местного пластического материала – коммитированных остеогенных клеток-предшественников (преостеобластов, незрелых остеобластов), которые находятся в стенках сосудистых каналов (то есть гаверсовых и фолькмановских), на эндостальной и периостальной поверхностях кортикальной пластинки, а также за счет детерминированных остеогенных клеток-предшественников стромы костного мозга. При необходимости привлекаются индуцибельные остеогенные клетки-предшественники за счет мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, которые локализуются в различных участках соединительной ткани организма. При наличии соответствующих сигналов они дают начало «мобильным клеткам», циркулирующим в кровеносном русле. Пусковым моментом физиологического остеогенеза служит гибель остеоцитов в результате генетического апоптоза, механического разрушения или гипоксической дегенерации [29–31, 40–42].

Все этапы структурных преобразований и функционирования костной ткани сопровождаются соответствующими изменениями ее микроциркуляторного русла, непрерывным образованием новых микрососудов – ангиогенезом (точнее – капиллярогенезом). В этом процессе особое значение имеют сосудистые эндотелиальные клетки (эндотелиоциты), обнаруженные впервые в кровеносном русле Т. Asahara и соавт. [43]. При физической нагрузке и травме уровень циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников значительно повышается [44].

Эндотелий – метаболически активный эндокринный орган, служащий источником большого

количества ангиогенных факторов и медиаторов, играющих чрезвычайно важную роль в поддержании гомеостаза организма [18]. Кроме того, эндотелиоциты обладают способностью к рецепции парциального напряжения кислорода [45–47]. Тканевая ишемия (гипоксия) служит индуктором проангиогенных факторов, под действием которых из кровеносного русла эндотелиальные клетки-предшественники направляются к месту деструкции, где пролиферируют и дифференцируются в эндотелиоциты [48–51].

Фундаментальным медиатором ангиогенеза признан сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF). Его также называют фактором проницаемости сосудов (vascular permeability factor, VPF). Обнаружены ингибирующие варианты VEGF [52]. Наряду с этим VEGF осуществляет ингибирование апоптоза эндотелиальных клеток посредством индукции экспрессии антиапоптозных генов, обеспечивая стабилизацию сосудистой сети [53].

Сегодня VEGF рассматривается как мультифокальный цитокин, представляющий собой гомодимерный гликопротеин, содержащий 26 аминокислот. Он обнаруживается в сыворотке крови, паренхиматозных органах, продуцируется различными типами клеток – макрофагами, лимфоцитами, остеобластами, эндотелиоцитами [54–56].

Эндотелиальные клетки капилляров, активированные VEGF, секретируют ферменты, расщепляющие матрикс стенки своего сосуда. Эндотелиоциты получают возможность деления и миграции, формирования клеточных тяжей и трубчатых структур новых капилляров. Скорость удвоения их популяции возрастает почти в 100 раз. В свою очередь, экспрессия VEGF стимулируется множеством проангиогенных сигналов, а также такими факторами окружающей среды, как градиенты давления и концентрации кислорода [48, 49, 55]. В итоге VEGF индуцирует активацию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов и их предшественников, повышает сосудистую проницаемость при формировании новых капиллярноподобных структур с последующим ремоделированием их в «зрелые» сосуды [57, 58].

VEGF осуществляет стимуляцию непосредственно остеогенеза за счет пролиферации и дифференцировки перицитов стенок сосудов в остеобластические клетки [59–62], а также за счет выраженного влияния на клетки остеобластического дифферона в закреплении ими «osteoblastic фенотипа». Под воздействием VEGF



значительно увеличивается (на 70%) и активируется миграция остеогенных клеток-предшественников [63]. Со своей стороны, прогениторные клетки, коммитированные в остеобластическом направлении, сами синтезируют VEGF не только в общее кровеносное русло, но и окружающую микросреду для собственной дифференцировки в остеобластическом направлении [64–66].

Таким образом, VEGF характеризуется широким спектром действия на клетки эндотелиального и мезенхимального клеточных дифференциров, вовлеченных в репаративный остеогенез, оказывая как опосредованное через ангиогенез стимулирующее влияние, так и индуцирующее воздействие непосредственно на клетки остеобластической линии через рецепторные и интракринные механизмы.

При изучении механизмов остеогенеза в работах последних лет значительное внимание уделяется так называемым костным морфогенетическим белкам (bone morphogenetic protein, BMP). Они относятся к суперсемейству В-трансформирующего фактора роста и представляют собой низкомолекулярные трансмембранные гликопротеины, состоящие из сотен аминокислотных остатков. К настоящему времени идентифицированы около 30 видов BMP. Они являются молекулярными регуляторами остеогенеза, обладают высокой способностью инициировать костеобразование за счет экспрессии генов, отвечающих за формирование остеобластического фенотипа со стороны мультипотентных мезенхимальных клеток [65, 67–69]. В экстрацеллюлярном костном матриксе концентрация различных факторов роста в десятки раз превышает таковую в других тканях организма [5], следовательно, костная ткань в определенной степени является их депо. Высокая степень остеоиндуктивной активности костных морфогенетических белков послужила основанием для разработки с помощью генной инженерии рекомбинантных форм BMP и успешного использования их в клинической практике [70–72].

В случаях травматических переломов костей в ответ на массивное поступление в кровеносное русло продуктов клеточного распада, местные и генерализованные расстройства гомеостаза и микроциркуляции возникает целостная неспецифическая защитная реакция организма. Запускается каскад сложных взаимосвязанных действий, направленных на ликвидацию повреждений, восстановление нарушенного гомеостаза, реализацию репаративных процессов тканей [73, 74]. Механизм передачи сигналов к остеогенезу многообразен [75].

К. Ozaki и W.J. Leonard [76] показали, что системообразующая роль в целостном ответе на травму, любое повреждение, изменение гомеостаза принадлежит цитокинам – специфическим регуляторным пептидам, продуцируемыми клетками организма. Обнаружено около 200 видов цитокинов, которые могут оказывать индуцирующее и ингибирующее воздействие на клеточные структуры, их пролиферацию и дифференцировку. В ответ на активирующие сигналы происходит быстрый синтез различных видов цитокинов, имеющих плейотропный характер воздействия (одновременно в нескольких направлениях). Формируется своеобразная «цитокиновая среда» – матрица взаимодействующих и часто меняющихся сигналов. Рецепторы цитокинов могут иметь растворимую форму. Они выступают посредниками системных (нейроэндокринных) регуляторов и местных (короткодистантных) факторов воздействия [16]. Стволовые полипотентные клетки мезенхимального резерва, сохраняющиеся практически во всех органах и тканях, мобилизуются в зону репарации тканей, где формируют пролиферирующий клеточный пул новообразующихся тканевых структур [60, 61].

По мнению большинства исследователей, репаративный остеогенез после травмы костей по механизмам своей реализации соответствует уже названным проявлениям физиологического остеогенеза, отличаясь лишь масштабом и интенсивностью процессов.

При диафизарном переломе с обеспечением плотного контакта костных фрагментов на 7-й день после малотравматичного стабильного остеосинтеза электронно-микроскопически в фиброретикулярной ткани, заполняющей межотломковую щель и медулярную полость, констатируются фибробластические клетки различной степени дифференцировки [77]. Кроме фибробластов встречаются и клетки макрофагального типа. В участках минерализующегося остеоида формируются остеобласты, а также менее дифференцированные клетки типа преостеобластов. Через 2 недели между образующимися костными балками регенерата видна остеобластическая ткань, клеточный состав которой представлен остеобластами. Коллагеновые фибриллы формирующегося матрикса выглядят более зрелыми, они ориентированы поперечно оси кости. Вокруг вновь образованных костных балок располагаются остеобласты. Через 3 недели костные структуры регенерата выглядят достаточно зрелыми. В них прослеживаются остеоциты, отростки которых видны в глубине костных



балок. Ультраструктура некоторых остеоцитов напоминает структуру остеобластов – это так называемые остеидные остеоциты. В медуллярной полости аналогичным образом формируются эндостальные регенераты спонгиозной структуры, также соединяющие между собой концы костных фрагментов.

На просветленных препаратах (рис. 2), где микроваскулярная сеть визуализирована путем предварительного заполнения кровеносной системы конечности экспериментального животного (собаки) тушь-желатиновой смесью, через 1–2 недели после операции в щели перелома обнаруживаются новообразованные капилляры синусоидного типа, идущие как со стороны медуллярной полости, так и гаверсовых каналов кортикальных пластинок противоположных концов отломков. Большинство функционирующих гаверсовых и фолькмановских каналов кортикальной пластинки диафиза расширено, в части из них содержится густая сеть новообразованных капилляров и остеогенные клеточные элементы. По эндостальной поверхности концов отломков – сеть синусоидных капилляров, расположенных в зоне эндостального костеобразования. Через 3 недели после операции (рис. 3) щелевидное пространство между кортикальными пластинками обоих отломков заполнено пролиферирующей сетью синусоидных капилляров, балочными структурами новообразованной костной ткани и остеогенными клеточно-волоконистыми элементами. Через 6 недель в зоне сращения кортикальных пластинок наблюдаются активные процессы перестройки костных и микроваскулярных структур. Через 8 недель (рис. 4) кортикальный интермедиарный регенерат представлен пластинчатой костной тканью, микроструктура и микроциркуляторное русло которой находятся в стадии функционально-адаптивной перестройки. В последующие сроки в зоне бывшего перелома сохраняются явления дальнейшей перестройки. Через 3 месяца редуцируются спонгиозные структуры эндостального регенерата. Завершенность процесса восстановления дефинитивных структур констатируется через 5 месяцев после операции.

В условиях стабильного остеосинтеза и сохранения неподвижности металлического фиксатора выявлен факт остеоиндуцирующего воздействия имплантата. Например, в эксперименте через 8–10 недель после операции в просвете медуллярной полости диафиза пролиферирующий пул стромальных клеток-предшественников на поверхностях металлического винта или штифта



Рис. 2. Сосудистая пролиферация вдоль щели перелома со стороны расширенных гаверсовых каналов кортикальных пластинок концов отломков. Обильная сеть синусоидов в зоне эндостального костеобразования через 2 недели после стабильного накостного остеосинтеза. Просветленный срез. $\times 12$

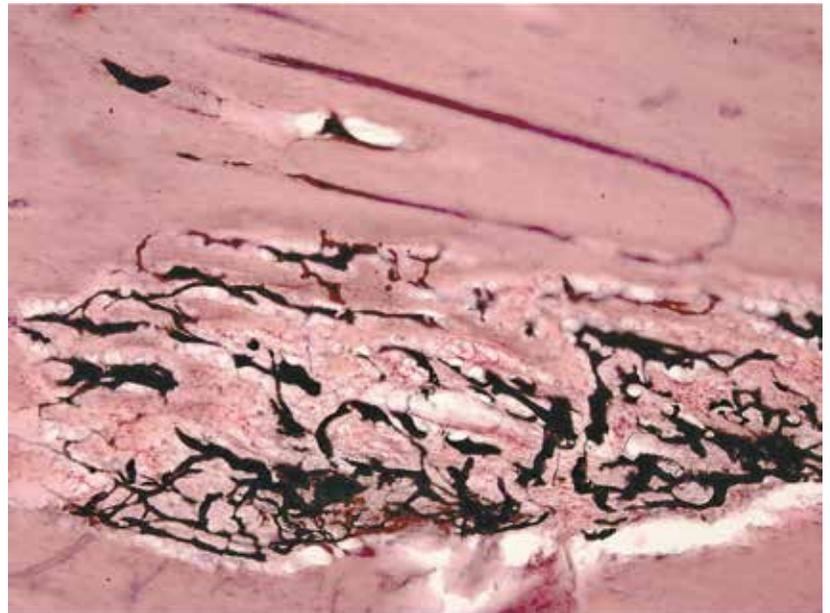


Рис. 3. Формирование остеидных балочных структур в щели перелома через 3 недели после стабильного накостного остеосинтеза. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 90$ (Источник [39])

завершается остеобластогенезом и формированием костной ткани капсулы имплантата с сетью собственных капилляров. В результате степень стабильности поврежденного костного сегмента лишь повышается.

Указанная динамика репаративных процессов в условиях обеспечения и сохранения плотного

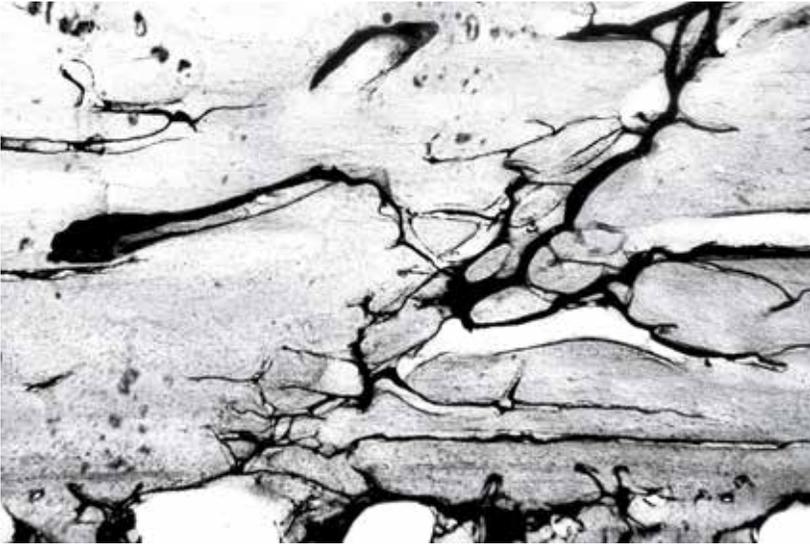


Рис. 4. Перестройка микрососудов в зоне костного интермедулярного регенерата кортикальной пластинки на месте сросшегося перелома через 8 недель после накостного стабильного остеосинтеза. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 90$ (Источник [39])

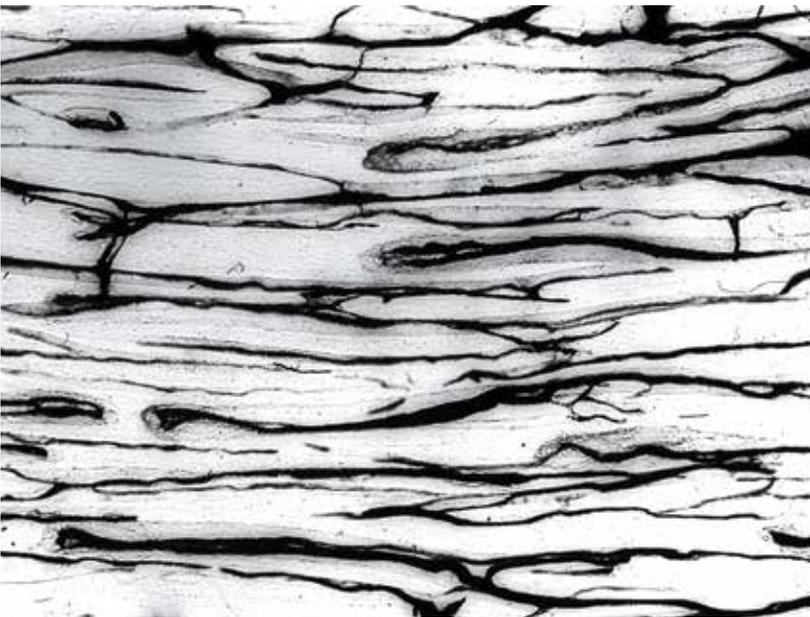


Рис. 5. Формирование новой остеонной системы кортикальной пластинки диафиза через 1 год после интрамедулярного стабильного остеосинтеза. Просветленный срез. $\times 20$

контакта костных фрагментов на весь период консолидации стереотипна и наблюдается практически после всех видов стабильного остеосинтеза, включая внутрикостный массивным штифтом с рассверливанием медулярной полости. При этом констатируется прямой остеогенез, где остеогенная клеточно-волокнистая ткань, исходящая из медулярной полости и гаверсовой

системы кортикальных пластинок концов отломков, формирует зрелый костный интермедулярный регенерат небольшого объема без соединительнотканых и хрящевых элементов, а также без заметного периостального костеобразования [78]. Различия – лишь в сроках и масштабах репаративных процессов, которые полностью обусловлены «первичными» циркуляторными расстройствами, то есть наступающими однократно в результате травмы и в ходе хирургического вмешательства.

Наибольшие циркуляторные расстройства кортикальной пластинки диафиза отмечаются, в частности, после перелома и открытого интрамедулярного стабильного остеосинтеза большеберцовой кости массивным металлическим штифтом с рассверливанием костномозговой полости. В подобной ситуации на завершение ревазуляризации диафиза и формирование зрелой костной мозоли требуется время в 2–3 раза большее, чем при минимальных циркуляторных расстройствах, которые наблюдаются, например, при косо-спиральном переломе большеберцовой кости после малотравматичного чрескостного остеосинтеза (рис. 5).

Реализация процессов посттравматического репаративного остеогенеза осуществляется на фоне стереотипного адаптационно-компенсаторного комплекса васкулярных реакций – региональной гиперваскуляризации поврежденной конечности и костного сегмента, увеличения емкости и повышения сосудистой проницаемости микроциркуляторного русла костной ткани, синусоидной трансформации капилляров в зоне формирования новых тканевых структур, образования тканевых микрокист, связанных с микроваскулярной сетью, активизации внесосудистых путей микроциркуляции. Синусоидный характер трансформации капиллярного звена терминального сосудистого русла костей, который в норме у взрослых отсутствует и появляется в зоне остеогенеза, а также образование множества тканевых микрокист, окруженных микроваскулярной сетью, можно считать частью функционально-структурных проявлений общей адаптационно-компенсаторной реакции организма в ответ на травму [78, 79]. Этому способствует высокая устойчивость компактной костной ткани к посттравматической ишемии, обусловленная возможностью интерстициального пространства костного матрикса обеспечивать адекватный объем внесосудистой микроциркуляции [5], а также свойством длительного сохранения (до восстановления коллатерального

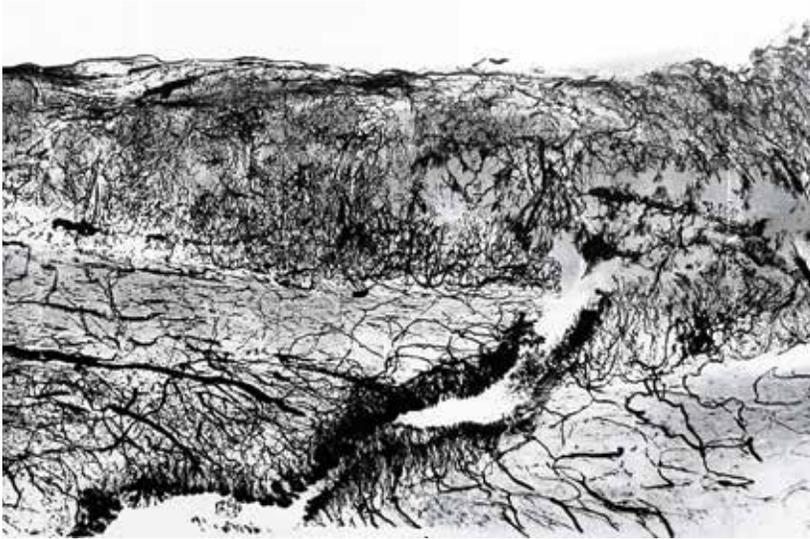


Рис. 6. Общий вид микроваскулярной сети в зоне несращения перелома через 6 недель после нестабильного накостного остеосинтеза. Микроангиограмма костного среза. $\times 8$

кровоснабжения) функции микроциркуляторного русла кортикальной пластинки диафиза в отсутствие естественной перфузии крови [79].

При нарушении стабильности костных отломков динамика репаративных процессов самая разнообразная – от формирования обширной периостальной мозоли, содержащей аваскулярные поля хрящевой ткани, с сомнительным прогнозом относительно наступления консолидации до активной и распространенной резорбции костной ткани с исходом в ложный сустав. В условиях тканевой гипоксии и отсутствия оксидиотической среды остеобластогенез становится невозможным, и пролиферирующий пул стволовых стромальных клеток на периостальной поверхности костных фрагментов дифференцируется в направлении фибро- и хондрогенеза. В результате формируется обширная фиброзно-хрящевая периостальная мозоль. Торцевая поверхность нестабильных костных отломков покрывается густой сетью постоянно травмирующихся синусоидных капилляров (рис. 6).

Как показали С.Н. Kasperk и соавт. [80], J. Dai и А.В. Rabie [52], после вторичной стабилизации зоны перелома обширной периостальной мозолью наступает гипертрофия и апоптоз хрящевых клеток, деградация хрящевого матрикса. Происходит эрозия провизорного хрящевого регенерата. При этом секретируются эндотелиальные факторы роста, которые оказывают прямое воздействие не только на ангиогенез, но и на дифференцировку остеобластов и остеокластов из стволовых клеток-предшественников,

осуществляющих оссификацию участков хрящевой ткани [81, 82]. На фоне энхондральной оссификации процессу остеогенеза содействует экспрессия сигнальных молекул остеобластов и остеокластов [29, 83], а также остеогенная индукция со стороны морфогенетических белков костной ткани [67]. В конечном итоге интермедиарное пространство поврежденного костного органа заполняется эндостально-кортикальным костным регенератом с последующими этапами его перестройки, а периостальная мозоль постепенно резорбируется.

При значительной степени нестабильности зоны костного повреждения (рис. 7) отмечается избыточная региональная гиперваскуляризация, которая индуцируется непрерывным и мощным потоком продуктов тканевого распада. На фоне глубоких циркуляторных расстройств и постоянных микрокровоизлияний

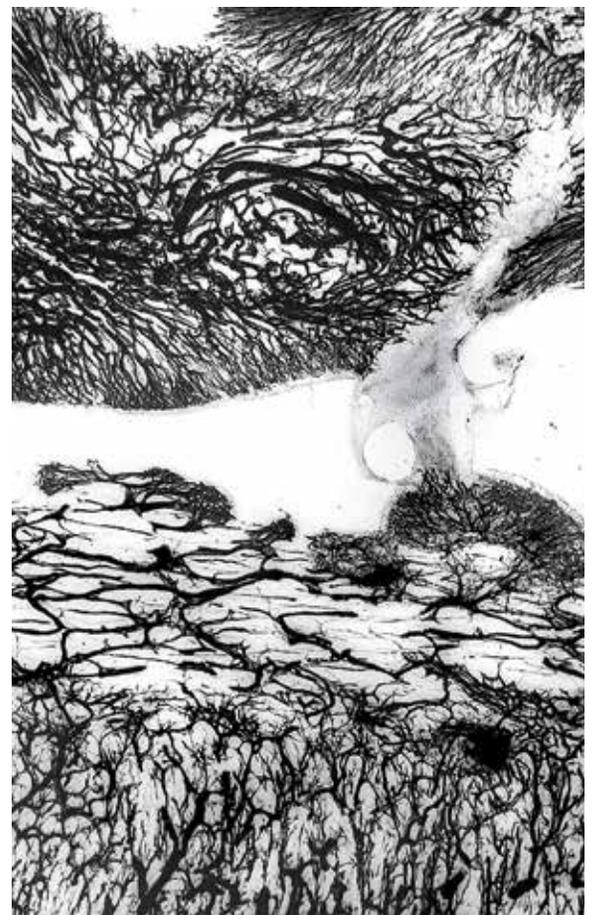


Рис. 7. Активная («агрессивная») резорбция костной ткани кортикальных пластинок в зоне их нестабильного контакта на фоне избыточной микроваскулярной сети через 2 месяца после накостного остеосинтеза. Просветленный срез. $\times 20$

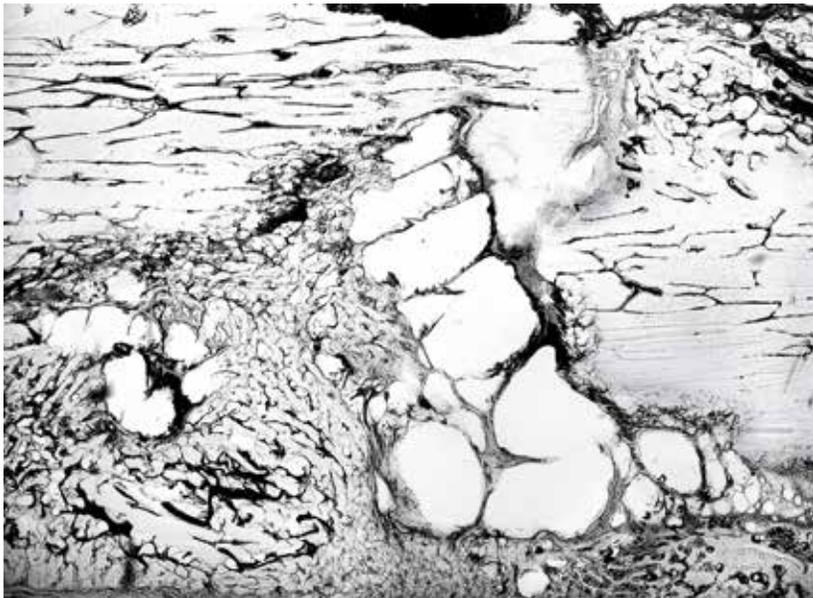


Рис. 8. Обширные кистозные полости, сформированные на месте резорбированных концов отломков, через 6 недель после нестабильного остеосинтеза. Просветленный срез. $\times 20$

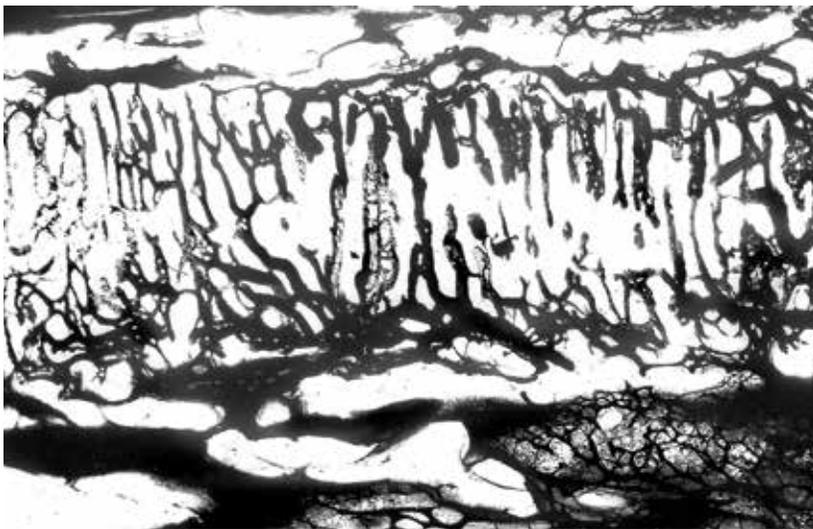


Рис. 9. Сеть варикозно измененных синусоидных капилляров медуллярной полости, окружающих нестабильный штифт, с резко выраженными явлениями сосудистой проницаемости через 2 месяца после остеосинтеза. Просветленный срез. $\times 25$

в области контакта костных фрагментов наступает краевая резорбция кортикальных пластинок. Межфрагментарное пространство расширяется и заполняется обширными кистами с плазмоподобной жидкостью (рис. 8). Кортикальный остеогенез отсутствует. Деструктивные процессы завершаются формированием атрофичного ложного сустава.

Наиболее разрушительные последствия отмечаются после остеосинтеза с нестабильностью металлического имплантата. Например, в случаях микроподвижности металлического штифта интенсивные деструктивные процессы распространяются практически на всем протяжении диафиза. В медуллярной полости, особенно вокруг штифта, формируется густая сеть резко расширенных микрососудов высокой степени сосудистой проницаемости (рис. 9). Микроваскулярная сеть очагов эндостального костеобразования приобретает варикозный характер (рис. 10). Обширные расстройства кровоснабжения костной ткани в некоторой степени компенсируются за счет максимального включения резервных внесосудистых путей микроциркуляции, то есть лакуно-канальцевой системы интерстициального пространства костного матрикса. Однако персистирующая травматизация тканей металлическим штифтом сопровождается непрерывным образованием продуктов клеточного некроза и индукцией избыточной сосудистой пролиферации на фоне сохранения тканевой гипоксии, обширных полей остеолита и отсутствия каких-либо репаративных процессов, которые теряют свой защитно-приспособительный характер. Наступает срыв адаптивной реакции с дисрегенерацией на неопределенный срок. В результате интенсивной резорбции костной ткани «широким фронтом» кортикальная пластинка теряет остеонное строение, на отдельных участках диафиза она отсутствует или имеет спонгиозную структуру (рис. 11). Естественно, что механическая прочность подобного костного сегмента крайне низкая и подвержена патологическому перелому.

Вместе с тем экспериментальные исследования [79, 84] позволили выявить высокие регенераторные возможности костной ткани – при сегментарном дефекте большой берцовой кости, равном поперечнику диафиза, – но в условиях внеочаговой стабильной фиксации аппаратом Илизарова. Без каких-либо костно-пластических вмешательств эндостально-кортикальные регенераты, исходящие из концов костных фрагментов навстречу друг другу, через 6–9 месяцев заполняли дефект и через 1 год формировали новый участок диафиза (рис. 12). Аналогичный результат был получен нами и при диафизарном дефекте лучевой кости, стабильно фиксируемом методом синостоза с парной локтевой костью предплечья. L.S. Poplich и соавт. [85] сообщили о заживлении в эксперименте дефекта локтевой кости после введения в него BMP, а X. Chen и соавт. [86] – при



Рис. 10. Варикозный характер сети капилляров эндостального регенерата через 4 недели после операции в условиях нестабильного остеосинтеза. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 90$

инфицированном сегментарном дефекте бедренной кости.

Все эти факты свидетельствуют о наличии мощного остеоиндуцирующего взаимодействия костных фрагментов, которое проявляется даже при их значительном диастазе, но в условиях стабильной фиксации поврежденного костного органа. Наиболее наглядно это проявляется при постепенном разведении отломков, то есть при дистракционном остеосинтезе. Через 2 недели после поперечной остеотомии диафиза большеберцовой кости (перед началом дистракции) отмечается формирование эндостально-кортикального регенерата, соединяющего концы остеотомированных фрагментов, а также восстановление их единой микроваскулярной сети. В процессе последующего постепенного увеличения диастаза отломков (дистракции) остеоиндуцирующее взаимодействие поддерживается также эндостально-кортикальными регенератами, сохраняющими васкулярную взаимосвязь за счет формирования общей микроваскулярной сети, часть которой в середине диастаза представлена продольно идущими плазматическими капиллярами (рис. 13). Периостальное костеобразование при этом отсутствует. В подобных условиях период окончательного формирования нового участка большеберцовой кости, равного поперечнику диафиза, в 2–3 раза меньше по сравнению с предыдущим примером (в условиях

одномоментно созданного и стабильно фиксированного костного дефекта).

В клинике подобным образом происходит формирование нового костного участка, например, у больного даже в условиях гипертрофического псевдоартроза диафиза и грубой фиксированной деформации голени многолетней давности после внеочагового дистракционного остеосинтеза аппаратом Илизарова (рис. 14).

Заключение

Анализ данных литературы и материалов собственных экспериментальных исследований [39] позволяет констатировать следующее. В основе физиологического и репаративного остеосинтеза, а также адаптивной функциональной и посттравматической перестройки костной ткани лежат единые и стереотипные клеточно-молекулярные процессы:

- очаговая гибель остеоцитов в результате генетического апоптоза, механического разрушения или гипоксической деградации;
- экспрессия сигнальных молекул остеоцитами и эндотелиоцитами капилляров микроциркуляторного русла костной ткани, адресованных в общую (нейроэндокринную) сигнальную систему и местную (короткодистантную) сеть тканевого микроокружения;
- остеоцитарный остеолиз стенок сосудистых каналов с их расширением (декомпактизации-



Рис. 11. Разрозненные балочные структуры на месте резорбируемого участка кортикальной пластинки диафиза после нестабильного остеосинтеза массивным штифтом. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 60$

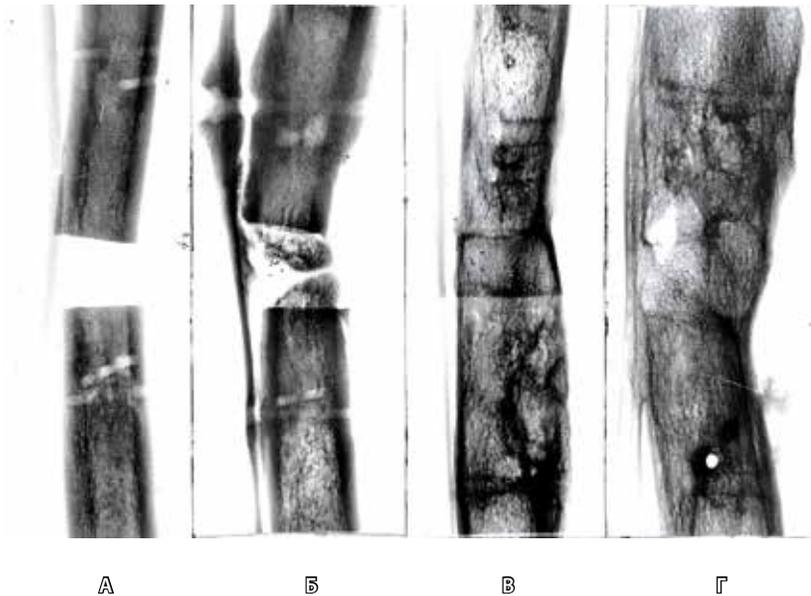


Рис. 12. Рентгенологическая динамика формирования регенерата в зоне диафизарного дефекта большой берцовой кости, стабильно фиксированного аппаратом Илизарова: **А** – через 2 недели; **Б** – через 2 месяца; **В** – через 6 месяцев; **Г** – через 1 год после операции

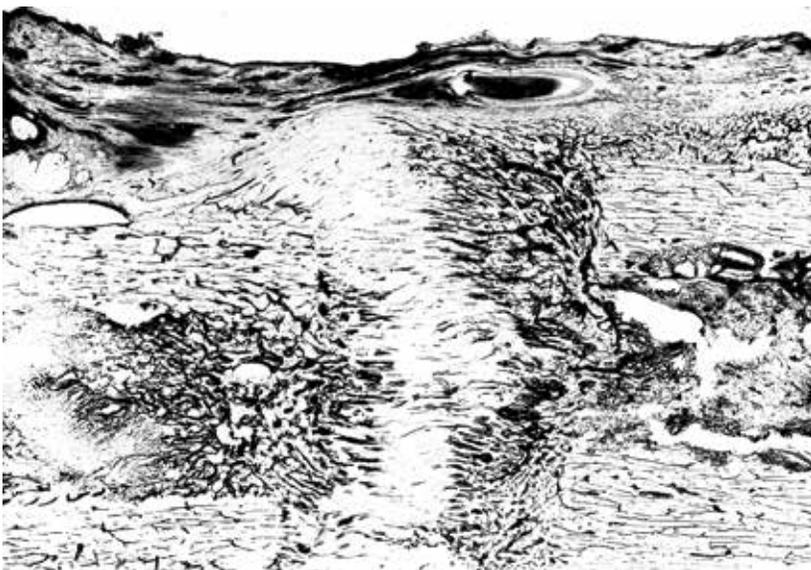


Рис. 13. Сохранение сосудистых связей васкулярных систем эндостально-кортикальных регенератов концов отломков в процессе их distraction (6 недель после операции)

ей) плотной костной ткани, увеличением емкости ее микроциркуляторного русла, очаговым ангиогенезом (капиллярогенезом);

- мобилизация прекурсоров остеокластов, местных коммитированных остеогенных клеток-предшественников (преостеобластов,

незрелых остеобластов), которые находятся в стенках сосудистых каналов (гаверсовых, фолькмановских), на эндостальной и периостальной поверхностях костного вещества, а также детерминированных остеогенных клеток-предшественников стромы костного мозга;

- привлечение из кровеносного русла мобильных индуцибельных остеогенных клеток-предшественников за счет стволовых мезенхимальных полипотентных клеток, локализующихся в различных участках соединительной ткани организма.

Все этапы морфогенеза костных микроструктур синхронно обеспечиваются и непрерывно сопровождаются очаговым и стереотипным ангиогенезом (капиллярогенезом).

Мощным фактором реализации репаративного остеогенеза является остеоиндуцирующее взаимодействие концов поврежденного костного сегмента, которое положительно проявляется даже в случаях значительных диастазов между отломками (но стабильно фиксированных).

При обеспечении стабильности зоны костного повреждения на весь период консолидации формируется эндостально-кортикальный костный регенерат за счет прямого остеогенеза (то есть без фиброзно-хрящевой ткани) минимального объема и в кратчайшие сроки. Периостальный остеогенез при этом – фактически резервный источник костеобразования, который проявляется в недостаточно стабильных условиях. Нестабильность зоны костного повреждения и особенно металлического имплантата чревата самыми тяжелыми деструктивными последствиями.



Рис. 14. Формирование клиновидного костного регенерата на месте гипертрофического псевдоартроза у больного с многолетней фиксированной деформацией голени (distractionный остеосинтез аппаратом Илизарова)



Здесь следует подчеркнуть, что стабильный остеосинтез, обеспечивающий оптимальные условия для репаративного остеогенеза, стал доминирующим в современной системе лечения костных повреждений. В связи с этим общепринятые трактовки консолидации костей

как многоэтапного формирования обширной костно-фиброзно-хрящевой мозоли являются отражением характера репаративных процессов в явно неблагоприятных (осложненных) условиях, что для клиницистов, конечно, не может служить нормой. ☺

Литература

- Bonewald LF. Osteocytes: a proposed multi-functional bone cell. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):239–41.
- Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 2006;3(10):7–15. doi: 10.1138/20060233.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229–38. doi: 10.1002/jbmr.320.
- Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3(6): 346–55.
- Омельяненко НП, Слущкий ЛИ. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). В 2 т. Т. 1. М.: Известия; 2009. 380 с. Т. 2. М.: Известия; 2010. 599 с.
- Silver FH, Siperko LM. Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix? *Crit Rev Biomed Eng.* 2003;31(4):255–331.
- Yang W, Kalajzic I, Lu Y, Guo D, Harris MA, Gluhak-Heinrich J, Bonewald LF, Feng JQ, Rowe DW, Harris SE. In vitro and in vivo study on osteocyte-specific mechanical signaling pathways. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(4):386–7.
- Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(1):1–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.214.
- Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006;367:1–16. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.028.
- Cowin SC. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):256–60.
- Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40): 15941–6. doi: 10.1073/pnas.0707246104.
- Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res.* 2009;24(4):597–605. doi: 10.1359/jbmr.081210.
- Huiskes R. If bone is the answer, then what is the question? *J Anat.* 2000;197(Pt 2):145–56. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19720145.x.
- Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C545–52. doi: 10.1152/ajpcell.00611.2005.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002;23(3):279–302. doi: 10.1210/edrv.23.3.0465.
- Spencer GJ, Hitchcock IS, Genever PG. Emerging neuroskeletal signalling pathways: a review. *FEBS Lett.* 2004;559(1–3):6–12. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00053-5.
- Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(4):1095–101. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.211.
- Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(5): 230–6. doi: 10.1016/j.tem.2009.02.001.
- Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(9):1301–5. doi: http://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00107-9.
- Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Sorocéanu MA, Zhao J, Su H, Tong X, Amizuka N, Gupta A, Genant HK, Kronenberg HM, Goltzman D, Karaplis AC. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest.* 2005;115(9): 2402–11. doi: 10.1172/JCI24918.
- Prêle CM, Horton MA, Caterina P, Stenbeck G. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2003;282(1):24–34. doi: https://doi.org/10.1006/excr.2002.5668.
- Roberts WE, Morey ER. Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat.* 1985;174(2): 105–18. doi: 10.1002/aja.1001740202.
- Malluche HH, Faugere MC, Rush M, Friedler R. Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs. *Endocrinology.* 1986;119(6):2649–54. doi: 10.1210/endo-119-6-2649.
- McCulloch CA, Heersche JN. Lifetime of the osteoblast in mouse periodontium. *Anat Rec.* 1988;222(2):128–35. doi: 10.1002/ar.1092220204.
- Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6): 975–84. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.6.975.
- Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(248):283–93.
- Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone.* 1997;20(5): 385–91. doi: https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00019-7.
- Григорьев АИ, Воложин АИ, Ступаков ГП. Минеральный обмен у человека в условиях измененной гравитации. М.: Наука; 1994. 214 с.
- Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med.* 2005;11(2):76–81. doi: 10.1016/j.molmed.2004.12.004.
- Case N, Ma M, Sen B, Xie Z, Gross TS, Rubin J. Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29196–205. doi: 10.1074/jbc.M801907200.
- Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2009;458(7237):524–8. doi: 10.1038/nature07713.
- Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(2):460–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.193.



33. Edwards CM, Mundy GR. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci.* 2008;5(5):263–72. doi: 10.7150/ijms.5.263.
34. Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, Iwakura Y, Suda T, Matsuo K. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem.* 2009;284(21):14637–44. doi: 10.1074/jbc.M807598200.
35. Rosen CJ. Restoring aging bones. *Sci Am.* 2003;288(3):70–7.
36. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;159(1–2):7–13. doi: [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00174-4](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00174-4).
37. Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone.* 2009;44(1):11–6. doi: 10.1016/j.bone.2008.09.017.
38. Аврунин АС. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки. *Травматология и ортопедия России.* 2012;(1):128–34. doi: <http://dx.doi.org/10.21823/2311-2905-2012--1-128-134>.
39. Оноприенко ГА, Волошин ВП. Микроциркуляция и регенерация костной ткани: теоретические и клинические аспекты. М.: Бино; 2017. 184 с.
40. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88(6):701–5. doi: 10.1302/0301-620X.88B6.17524.
41. Kaunitz JD, Yamaguchi DT. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):655–62. doi: 10.1002/jcb.21885.
42. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):444–51. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.016.
43. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964–7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
44. Koutroumpi M, Dimopoulos S, Psarra K, Kyrianiou T, Nanas S. Circulating endothelial and progenitor cells: Evidence from acute and long-term exercise effects. *World J Cardiol.* 2012;4(12):312–26. doi: 10.4330/wjcv.4.i12.312.
45. Kiefer F, Siekmann AF. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(17):2811–30. doi: 10.1007/s00018-011-0677-7.
46. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
47. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47–71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
48. Tsutsumi Y, Losordo DW. Double face of VEGF. *Circulation.* 2005;112(9):1248–50. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.566166.
49. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9(4):225–30. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8.
50. Fong GH. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(6):549–60. doi: 10.1007/s00109-009-0458-z.
51. Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guilamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res.* 2010;80(3):317–23. doi: 10.1016/j.mvr.2010.05.008.
52. Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res.* 2007;86(10):937–50. doi: 10.1177/154405910708601006.
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669–76. doi: 10.1038/nm0603-669.
54. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(7):527–43.
55. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation.* 2004;109(21):2487–91. doi: 10.1161/01.CIR.0000128595.79378.FA.
56. Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation.* 2008;15(8):715–38. doi: 10.1080/10739680802095964.
57. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 2005;438(7070):937–45. doi: 10.1038/nature04479.
58. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359–71. doi: 10.1038/nrm1911.
59. Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;953:75–84. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02075.x.
60. Caplan AL, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076–84. doi: 10.1002/jcb.20886.
61. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204–13. doi: 10.1242/jcs.02932.
62. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:239356. doi: 10.1155/2014/239356.
63. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012;4(2):64–8. doi: 10.1038/ijos.2012.33.
64. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272–88. doi: 10.7150/ijbs.2929.
65. McMahon MS. Bone morphogenetic protein 3 signaling in the regulation of osteogenesis. *Orthopedics.* 2012;35(11):920. doi: 10.3928/01477447-20121023-02.
66. Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(2):103–8. doi: 10.1369/0022155413516347.
67. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Gene.* 2006;366(1):51–7. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.011.
68. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem.* 2006;98(3):538–54. doi: 10.1002/jcb.20719.
69. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)- α expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reprod Sci.* 2014;21(4):477–82. doi: 10.1177/1933719113503411.
70. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(395):110–20.
71. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:82–8.
72. Булатов АА, Савельев ВИ, Калинин АВ. Применение костных морфогенетических белков в эксперименте и клинике. *Травматология и ортопедия России.* 2005;(1):46–54.
73. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511. doi: 10.1038/nri1391.



74. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40(12):845–59. doi: <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>.
75. Zhu AJ, Scott MP. Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes Dev.* 2004;18(24):2985–97. doi: [10.1101/gad.1233104](http://doi.org/10.1101/gad.1233104).
76. Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29355–8. doi: [10.1074/jbc.R200003200](http://doi.org/10.1074/jbc.R200003200).
77. Лаврищева ГИ, Оноприенко ГА. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М.: Медицина; 1996. 208 с.
78. Оноприенко ГА. Микроциркуляция и регенерация костной ткани. В: Сборник тезисов IX съезда травматологов-ортопедов России. Саратов, 15–17 сентября 2010 г. Саратов; 2010. Т. 3. с. 1128–9.
79. Оноприенко ГА. Васкуляризация костей при переломах и дефектах. М.: Медицина; 1995. 222 с.
80. Kasperk CH, Börcsök I, Schairer HU, Schneider U, Nawroth PP, Niethard FU, Ziegler R. Endothelin-1 is a potent regulator of human bone cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1997;60(4):368–74.
81. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett.* 2000;473(2):161–4. doi: [10.1016/S0014-5793\(00\)01520-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01520-9).
82. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(15):9656–61. doi: [10.1073/pnas.152324099](http://doi.org/10.1073/pnas.152324099).
83. Gori F, Schipani E, Demay MB. Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. *J Cell Biochem.* 2001;82(1):46–57.
84. Шевцов ВИ, Дьячков АН, Мигалкин НС, Ручкина ИВ, Осипова ЕВ. Изучение процесса остеогенеза в циркулярных дефектах длинных костей (экспериментальное исследование). Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2007;(6):163–8.
85. Poplich LS, Salkeld SL, Rueger DC. Critical and noncritical size defect healing with osteogenic protein. *Trans Orthop Res Soc.* 1997;22:600.
86. Chen X, Kidder LS, Lew WD. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res.* 2002;20(1):142–50. doi: [10.1016/S0736-0266\(01\)00060-2](http://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00060-2).
18. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(5):230–6. doi: [10.1016/j.tem.2009.02.001](http://doi.org/10.1016/j.tem.2009.02.001).
19. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(9):1301–5. doi: [http://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00107-9](http://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00107-9).
20. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Sorocéanu MA, Zhao J, Su H, Tong X, Amizuka N, Gupta A, Genant HK, Kronenberg HM, Goltzman D, Karaplis AC. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2402–11. doi: [10.1172/JCI24918](http://doi.org/10.1172/JCI24918).
21. Prêle CM, Horton MA, Caterina P, Stenbeck G. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2003;282(1):24–34. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5668>.
22. Roberts WE, Morey ER. Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat.* 1985;174(2):105–18. doi: [10.1002/aja.1001740202](http://doi.org/10.1002/aja.1001740202).
23. Malluche HH, Faugere MC, Rush M, Friedler R. Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs. *Endocrinology.* 1986;119(6):2649–54. doi: [10.1210/endo-119-6-2649](http://doi.org/10.1210/endo-119-6-2649).
24. McCulloch CA, Heersche JN. Lifetime of the osteoblast in mouse periodontium. *Anat Rec.* 1988;222(2):128–35. doi: [10.1002/ar.1092220204](http://doi.org/10.1002/ar.1092220204).
25. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and
1. Bonewald LF. Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):239–41.
2. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 2006;3(10):7–15. doi: [10.1138/20060233](http://doi.org/10.1138/20060233).
3. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229–38. doi: [10.1002/jbmr.320](http://doi.org/10.1002/jbmr.320).
4. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3(6):346–55.
5. Omel'yanenko NP, Slutskiy LI. The fibrous tissue (histophysiology and biochemistry). In 2 vol. Vol. 1. Moscow: Izvestiya; 2009. 380 p. Vol. 2. Moscow: Izvestiya; 2010. 599 p. Russian.
6. Silver FH, Siperko LM. Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix? *Crit Rev Biomed Eng.* 2003;31(4):255–331.
7. Yang W, Kalajzic I, Lu Y, Guo D, Harris MA, Gluhak-Heinrich J, Bonewald LF, Feng JQ, Rowe DW, Harris SE. In vitro and in vivo study on osteocyte-specific mechanical signaling pathways. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(4):386–7.
8. Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(1):1–5. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.07.214](http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.214).
9. Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006;367:1–16. doi: [10.1016/j.gene.2005.10.028](http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.028).
10. Cowin SC. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):256–60.
11. Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15941–6. doi: [10.1073/pnas.0707246104](http://doi.org/10.1073/pnas.0707246104).
12. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res.* 2009;24(4):597–605. doi: [10.1359/jbmr.081210](http://doi.org/10.1359/jbmr.081210).
13. Huiskes R. If bone is the answer, then what is the question? *J Anat.* 2000;197(Pt 2):145–56. doi: [10.1046/j.1469-7580.2000.19720145.x](http://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19720145.x).
14. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C545–52. doi: [10.1152/ajpcell.00611.2005](http://doi.org/10.1152/ajpcell.00611.2005).
15. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002;23(3):279–302. doi: [10.1210/edrv.23.3.0465](http://doi.org/10.1210/edrv.23.3.0465).
16. Spencer GJ, Hitchcock IS, Genever PG. Emerging neuroskeletal signalling pathways: a review. *FEBS Lett.* 2004;559(1–3):6–12. doi: [10.1016/S0014-5793\(04\)00053-5](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00053-5).
17. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(4):1095–101. doi: [10.1016/j.bbrc.2005.06.211](http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.211).



- bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6): 975–84. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.6.975.
26. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(248):283–93.
27. Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone.* 1997;20(5):385–91. doi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00019-7).
28. Grigor'ev AI, Volozhin AI, Stupakov GP. Mineral metabolism in humans during the changed gravitation. Moscow: Nauka; 1994. 214 p. Russian.
29. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med.* 2005;11(2):76–81. doi: 10.1016/j.molmed.2004.12.004.
30. Case N, Ma M, Sen B, Xie Z, Gross TS, Rubin J. Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29196–205. doi: 10.1074/jbc.M801907200.
31. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2009;458(7237):524–8. doi: 10.1038/nature07713.
32. Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(2):460–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.193.
33. Edwards CM, Mundy GR. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci.* 2008;5(5):263–72. doi: 10.7150/ijms.5.263.
34. Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, Iwakura Y, Suda T, Matsuo K. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem.* 2009;284(21):14637–44. doi: 10.1074/jbc.M807598200.
35. Rosen CJ. Restoring aging bones. *Sci Am.* 2003;288(3):70–7.
36. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;159(1–2): 7–13. doi: [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00174-4](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00174-4).
37. Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone.* 2009;44(1):11–6. doi: 10.1016/j.bone.2008.09.017.
38. Avrunin AS. Osteocytic remodeling: question history modern representations and possibilities of the clinical estimation. *Traumatology and Orthopedics of Russia.* 2012;(1):128–34. Russian. doi: <http://dx.doi.org/10.21823/2311-2905-2012-1-128-134>.
39. Onoprienko GA, Voloshin VP. Microcirculation and regeneration of the bone tissue: theoretical and clinical aspects. Moscow: Binom; 2017. 184 p. Russian.
40. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88(6): 701–5. doi: 10.1302/0301-620X.88B6.17524.
41. Kaunitz JD, Yamaguchi DT. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):655–62. doi: 10.1002/jcb.21885.
42. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):444–51. doi: 10.1016/j.semcd.2008.07.016.
43. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964–7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
44. Koutroumpi M, Dimopoulos S, Psarra K, Kyrianiou T, Nanas S. Circulating endothelial and progenitor cells: Evidence from acute and long-term exercise effects. *World J Cardiol.* 2012;4(12):312–26. doi: 10.4330/wjcv4.i12.312.
45. Kiefer F, Siekmann AF. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(17):2811–30. doi: 10.1007/s00018-011-0677-7.
46. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3): 399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
47. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47–71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
48. Tsutsumi Y, Losordo DW. Double face of VEGF. *Circulation.* 2005;112(9):1248–50. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.566166.
49. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9(4):225–30. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8.
50. Fong GH. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(6):549–60. doi: 10.1007/s00109-009-0458-z.
51. Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res.* 2010;80(3):317–23. doi: 10.1016/j.mvr.2010.05.008.
52. Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res.* 2007;86(10):937–50. doi: 10.1177/154405910708601006.
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6): 669–76. doi: 10.1038/nm0603-669.
54. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(7):527–43.
55. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation.* 2004;109(21):2487–91. doi: 10.1161/01.CIR.0000128595.79378.FA.
56. Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation.* 2008;15(8):715–38. doi: 10.1080/10739680802095964.
57. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 2005;438(7070):937–45. doi: 10.1038/nature04479.
58. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359–71. doi: 10.1038/nrm1911.
59. Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;953:75–84. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02075.x.
60. Caplan AL, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076–84. doi: 10.1002/jcb.20886.
61. da Silva Mirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204–13. doi: 10.1242/jcs.02932.
62. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:239356. doi: 10.1155/2014/239356.
63. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012;4(2):64–8. doi: 10.1038/ijos.2012.33.
64. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272–88. doi: 10.7150/ijbs.2929.
65. McMahon MS. Bone morphogenic protein 3 signaling in the regulation of osteogenesis. *Orthopedics.* 2012;35(11):920. doi: 10.3928/01477447-20121023-02.
66. Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(2):103–8. doi: 10.1369/0022155413516347.
67. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal



- cells. *Gene*. 2006;366(1):51–7. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.011.
68. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem*. 2006;98(3):538–54. doi: 10.1002/jcb.20719.
69. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reprod Sci*. 2014;21(4):477–82. doi: 10.1177/1933719113503411.
70. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):110–20.
71. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 3:82–8.
72. Bulatov AA, Saveliev VI, Kalinin AV. Use of bone morphogenetic protein in experimental and clinic practice (literature review). *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2005;(1):46–54. Russian.
73. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499–511. doi: 10.1038/nri1391.
74. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004;40(12):845–59. doi: http://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005.
75. Zhu AJ, Scott MP. Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes Dev*. 2004;18(24):2985–97. doi: 10.1101/gad.1233104.
76. Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29355–8. doi: 10.1074/jbc.R200003200.
77. Lavrishcheva GI, Onoprienko GA. Morphological and clinical aspects of reparative regeneration of the locomotor organs and tissues. Moscow: Meditsina; 1996. 208 p. Russian.
78. Onoprienko GA. Microcirculation and regeneration of the bone tissue. In: Proceedings of IX Russian Congress of Traumatologists and Orthopaedists. Saratov, 15–17 September 2010. Saratov; 2010. Vol. 3. p. 1128–9. Russian.
79. Onoprienko GA. Bone vascularization in fractures and defects. Moscow: Meditsina; 1995. 222 p. Russian.
80. Kasperk CH, Börsök I, Schairer HU, Schneider U, Nawroth PP, Niethard FU, Ziegler R. Endothelin-1 is a potent regulator of human bone cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1997;60(4):368–74.
81. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett*. 2000;473(2):161–4. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01520-9.
82. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9656–61. doi: 10.1073/pnas.152324099.
83. Gori F, Schipani E, Demay MB. Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. *J Cell Biochem*. 2001;82(1):46–57.
84. Shevtsov VI, Diachkov AN, Migalkin NS, Ruchkina IV, Osipova EV. The study of osteogenesis in circular long bone defects (experimental study). Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. 2007;(6):163–8. Russian.
85. Poplich LS, Salkeld SL, Rueger DC. Critical and noncritical size defect healing with osteogenic protein. *Trans Orthop Res Soc*. 1997;22:600.
86. Chen X, Kidder LS, Lew WD. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res*. 2002;20(1):142–50. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00060-2.

Current concepts in physiological and reparative osteogenesis

Onoprienko G.A.¹ • Voloshin V.P.¹

Studies conducted in the recent years by biologists strongly suggest that physiological and reparative osteogenesis, as well as of the functional, adaptive, and post-traumatic reconstruction of bone tissues are based on common and stereotypical molecular and cellular mechanisms. Our experimental studies have shown that all stages of the bone microstructure morphogenesis are synchronously and continuously associated with focal and stereotypical angiogenesis (capillarogenesis). A powerful factor in the implementation of reparative osteogenesis is the osteoinductive interaction of the ends of the damaged bone segments, which positively shows itself even in cases of large diastasis between the fragments (provided that the fragments are steadily fixed). After any kind of stable osteosynthesis, by ensuring the stability of

the bone fragments for the entire period of consolidation, an endosteal cortical bone regeneration by direct osteogenesis (i.e. without fibro-cartilaginous tissue) is observed in the minimum amount at the shortest time period. Periosteal bone formation in this case is actually a reserve source of bone formation, which becomes effective during insufficiently stable conditions. The instability of the bone damage area particularly that of the metal implants results in the most severe destructive consequences.

Key words: microcirculation and regeneration of bone tissue, physiological and post-traumatic osteogenesis, direct osteogenesis, stable osteosynthesis

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-79-93

Onoprienko Gennadiy A. – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Professor of Chair of Traumatology and Orthopaedics, Postgraduate Training Faculty¹

✉ 22–118 B. Gruzinskaya ul., Moscow, 123242, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 923 12 46.

E-mail: gao-1537@mail.ru

Voloshin Viktor P. – MD, PhD, Professor; Head of Department of Traumatology and Orthopaedics, Head of Chair of Traumatology and Orthopaedics, Postgraduate Training Faculty¹

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



Матриксные металлопротеиназы-2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки: клиничко-морфологические корреляции

Герштейн Е.С.¹ • Муштенко В.В.¹ • Короткова Е.А.¹ • Бежанова С.Д.¹ • Морозов А.А.² • Алферов А.А.¹ • Казанцева И.А.² • Кушлинский Н.Е.¹

Герштейн Елена Сергеевна – д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотр., лаборатория клинической биохимии¹
✉ 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация.
Тел.: +7 (499) 324 11 59.
E-mail: esgershtein@gmail.com

Муштенко Владимир Владимирович – врач-уролог, соискатель лаборатории клинической биохимии¹

Короткова Екатерина Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория клинической биохимии¹

Бежанова Светлана Дмитриевна – аспирант отдела патологической анатомии опухолей человека¹

Морозов Алексей Андреевич – врач-уролог, отделение урологии²

Алферов Александр Андреевич – аспирант лаборатории клинической биохимии¹

Казанцева Ирина Александровна – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотр., патологоанатомическое отделение²

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии¹

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность. Причиной поздней диагностики рака почки считается долгое практически бессимптомное течение заболевания. Успехи в его лечении, достигнутые в последние годы, обусловлены использованием антиангиогенных препаратов. Тем не менее многие вопросы диагностики, прогноза и предсказания эффективности таргетной терапии до сих пор не решены. Таким образом, изучение и поиск новых молекулярных маркеров рака почки, в первую очередь показателей, связанных с ангиогенной и инвазивной активностью, по-прежнему актуальны. К таким маркерам относятся матриксные металлопротеиназы (ММП), разрушающие большинство компонентов внеклеточного матрикса и вовлеченные во все этапы опухолевого процесса. **Цель** – сравнительная оценка содержания ММП-2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора 1-го типа (ТИМП-1) в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клиничко-морфологическими особенностями новообразований. **Материал и методы.** Обследованы 99 больных раком почки (94 первичных и 5 – на фоне прогрессирования) и 10 больных доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 97 человек. Концентрацию исследуемых белков в сыворотке крови определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа (Quantikine®, R&D Systems, США). **Результаты.** Содержание ММП-7, ММП-8 и ТИМП-1 в сыворотке крови больных раком почки статистически значимо выше, чем в контроле и у больных доброкачественными опухолями. Содержание ММП-2 и ММП-9 достоверно не различалось между

обследованными группами. При пороговом уровне ММП-7, равном 3,0 нг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 84%, специфичность по отношению к «здоровому» контролю – 87,5%, к «патологическому» контролю (здоровые доноры + больные доброкачественными опухолями почки) – 73%. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности для ТИМП-1 составило 67 и 65% при пороговом уровне 315 нг/мл. Для ММП-8 не удалось найти порогового уровня с приемлемым соотношением чувствительности и специфичности. Уровни всех трех маркеров положительно коррелировали со стадией заболевания и показателями системы TNM, а уровни ММП-7 и ТИМП-1 возрастали по мере уменьшения степени дифференцировки опухоли. У 5 пациентов, обследованных на фоне прогрессирования, уровни всех маркеров были существенно выше, чем у первичных больных, и превышали рассчитанные пороговые значения. **Заключение.** Наиболее перспективным серологическим маркером рака почки следует считать ММП-7: ее содержание в сыворотке крови уже на I стадии заболевания превышает пороговый уровень в 84% случаев. ТИМП-1 обладает приемлемой чувствительностью (70% и более) только начиная со II стадии рака почки. Уровень ММП-8 увеличивается лишь при III–IV стадиях заболевания.

Ключевые слова: рак почки, матриксные металлопротеиназы 2, 7, 8, 9, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ 1-го типа, сыворотка крови, диагностические характеристики



Рак почки занимает третье место среди опухолей мочеполовой системы и составляет около 3% всех злокачественных новообразований взрослого населения во всем мире. Долгое практически бессимптомное течение заболевания становится причиной его поздней диагностики: приблизительно 40% пациентов на момент постановки диагноза имеют либо большую первичную опухоль, либо отдаленные метастазы. Более того, после хирургического лечения локализованного почечно-клеточного рака у 30% пациентов развиваются метастазы. Возможности терапевтического лечения опухолей почки до недавнего времени были ограничены их низкой чувствительностью к стандартной химио- и лучевой терапии. Достигнутый недавно прогресс в лечении рака почки, в первую очередь его наиболее распространенного светлоклеточного варианта, обусловлен использованием антиангиогенных препаратов, ингибирующих активность рецепторов VEGF и некоторых других факторов роста, вовлеченных в процесс ангиогенеза [1, 2]. Теоретической предпосылкой для применения этих препаратов у больных светлоклеточным раком почки стал тот факт, что важное место в этиологии данного заболевания занимает инактивирующая мутация в гене опухоль-супрессорного белка VHL, тесно связанного с гипоксическим фактором HIF-1 α и индукцией ангиогенеза [3].

Следует отметить: несмотря на значительные успехи антиангиогенной терапии рака почки, многие вопросы диагностики, прогноза и предсказания эффективности таргетной терапии до сих пор не решены [4]. Таким образом, изучение и поиск новых молекулярных маркеров рака почки, прежде всего показателей, сопряженных с ангиогенной и инвазивной активностью, по-прежнему актуальны.

Важное место среди потенциальных биологических маркеров различных опухолей занимают матриксные металлопротеиназы (ММП) – мультигенное семейство, состоящее из более 20 секретируемых и связанных с поверхностью клетки цинкзависимых эндопептидаз, участвующих в деградации практически всех компонентов внеклеточного матрикса [5]. К важнейшим представителям ММП относят различные коллагеназы (ММП-1, ММП-8 и др.), желатиназы А и В (ММП-2 и ММП-9 соответственно), матрилизин (ММП-7), стромелизины (ММП-3 и ММП-10). Активность ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется четырьмя тканевыми ингибиторами (ТИМП). Помимо большинства

компонентов внеклеточного матрикса субстратами ММП могут быть также другие протеазы, хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембранно-ассоциированные белки, связывающие факторы роста.

Установлено, что ММП вовлечены во все этапы опухолевого процесса, но особенно велика их роль в регуляции инвазии и метастазирования. Вместе с тем различные ММП и ТИМП играют важную роль в регуляции опухолевого ангиогенеза как посредством комплексного взаимодействия с VEGF и его рецепторами, так и независимо от этой ключевой проангиогенной системы [6]. Было показано увеличение экспрессии ММП в опухолях различного генеза, при этом ее активация происходит по паракринному механизму с участием факторов роста и цитокинов, секретируемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками опухолевой стромы. Значимые изменения тканевой экспрессии некоторых ММП обнаружены и при раке почки [7–11], тогда как публикаций о роли циркулирующих в периферической крови ММП и ТИМП при раке почки немного [12–15], но представленные в них результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения данных маркеров. Известно также, что уровни циркулирующих ММП, в первую очередь ММП-2, тесно связаны с развитием и прогнозом многих неопухолевых патологий почки [16–18], влияют на эффективность таких важных лечебных процедур, как гемодиализ [19, 20].

Цель данного исследования – сравнительная оценка содержания ММП-2, 7, 8, 9 и ТИМП-1 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями новообразований.

Материал и методы

Обследованы 99 больных раком почки (58 мужчин и 41 женщина в возрасте от 29 до 81 года, медиана – 59 лет) и 10 больных доброкачественными опухолями почки (3 мужчин и 7 женщин в возрасте от 42 до 84 лет, медиана – 60 лет). Девяносто четыре больных раком почки обследованы при первичном поступлении и 5 – на фоне прогрессирования заболевания. Диагноз рака почки подтвержден результатами планового гистологического исследования и последующего пересмотра препаратов. В контрольную группу вошли 37 практически здоровых мужчин и 60 женщин

в возрасте от 18 до 77 лет, медиана – 40 лет. Исследование было проведено согласно требованиям комиссии по этике ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Концентрацию исследуемых белков в сыворотке крови, полученной по стандартной методике с использованием пробирок с активатором свертывания до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Total MMP-2 Immunoassay, Human MMP-7 Immunoassay, Human MMP-8 Immunoassay, Human MMP-9 Immunoassay, Human TIMP-1 Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Во всех таблицах представлены показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей.

Для выявления пороговых уровней маркеров, соответствующих оптимальным диагностическим характеристикам, использовали построенные кривых ROC (receiver operating characteristic), которые представляют собой график зависимости количества (доли) истинно положительных образцов (чувствительность) от количества (доли) ложноположительных образцов (величина, равная $1 - \text{специфичность}$), наблюдаемых

при различных пороговых уровнях исследуемого маркера. Построение ROC-кривых проводили с помощью программного пакета SPSS.

Результаты и обсуждение

Содержание ММП-7 и ТИМП-1 в сыворотке крови было статистически значимо повышено по сравнению с контролем как у первичных больных раком почки, так и у пациентов, обследованных на фоне прогрессирования, а также у больных доброкачественными новообразованиями почки. Содержание ММП-8 в сыворотке крови больных первичным раком почки было статистически значимо выше, чем в контрольной группе и у больных доброкачественными опухолями. Содержание ММП-2 и ММП-9 в сыворотке крови статистически значимо не различалось между обследованными группами, хотя уровень обеих желатиназ у больных первичным раком почки был несколько ниже, чем в контроле (табл. 1).

Можно отметить, что уровни всех исследованных маркеров в сыворотке крови больных раком почки на фоне прогрессирования процесса были выше, чем у больных с впервые выявленным почечноклеточным раком, но ввиду малочисленности данной группы (5 человек) эти различия не достигли уровня статистической значимости. Особенно заметное увеличение сывороточной концентрации ММП-7 зарегистрировано на фоне прогрессирования рака почки.

Следовательно, основываясь на полученных результатах, в качестве потенциально значимых серологических маркеров рака почки можно рассматривать три показателя: ММП-7, ТИМП-1 и ММП-8 – их уровни достоверно увеличиваются при данном заболевании.

Таблица 1. Содержание (нг/мл) матричных металлопротеиназ 2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора 1-го типа в сыворотке крови больных опухолями почки и группы контроля

Обследованные группы	n	ММП-2	ММП-7	ММП-8	ММП-9	ТИМП-1
Больные первичным раком почки (группа 1)	94	402 334–602	6,3 3,6–10,0	51,4 33,2–70,4	876 704–1090	351 300–432
Больные раком почки на фоне прогрессирования (группа 2)	5	417 336–504	14,2 5,65–16,7	61,6 60,7–84,0	1010 847–1022	445 392–522
Больные доброкачественными опухолями почки (группа 3)	10	475 303–595	4,5 3,2–6,2	31,8 21,9–70,1	917 791–1116	338 294–386
Контроль (К)	97	453 348–545	2,21 1,71–2,66	35,9 24,9–63,0	967 756–1271	296 232–386
<i>p</i>			$p_{1-к} < 0,0001$ $p_{2-к} p_{3-к} < 0,001$	$p_{1-к} p_{1-3} < 0,05$		$p_{1-к} < 0,0001$ $p_{2-к} < 0,001$ $p_{3-к} p_{2-3} < 0,05$

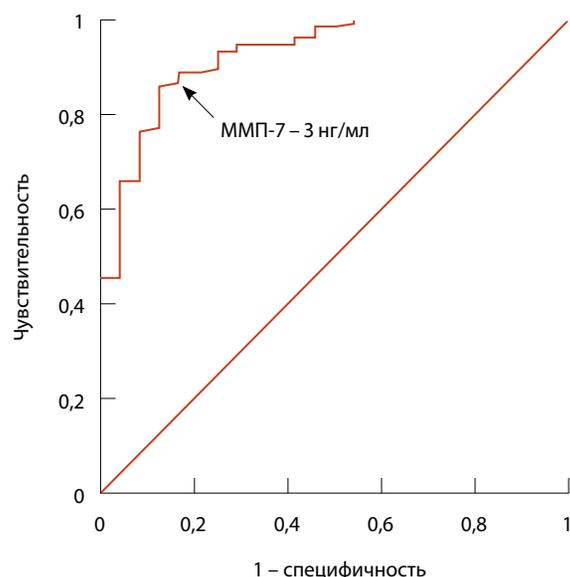
ММП – матриксная металлопротеиназа, ТИМП-1 – тканевой ингибитор 1-го типа

Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей



При пороговом уровне ММП-7, равном верхнему 90% перцентилю нормы (4,5 нг/мл) и соответствующем 90% специфичности, чувствительность выявления первичного рака почки составляет 66% (уровень превышен у 62 из 94 пациентов). У всех 5 пациентов, обследованных при прогрессировании, содержание ММП-7 в сыворотке крови было выше 4,5 нг/мл. Данный пороговый уровень был превышен и у 5 из 10 (50%) больных доброкачественными новообразованиями почки. Таким образом, очевидно, что специфичность теста при пороговом уровне 4,5 нг/мл по отношению к «патологическому» контролю недостаточна, довольно низкой при этом пороговом значении оказывается и чувствительность выявления первичного рака почки. Однако построение кривой ROC (рисунок) позволило оптимизировать диагностические характеристики ММП-7: при пороговом уровне 3,0 нг/мл диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 84%, специфичность по отношению к «здоровому» контролю – 87,5%, по отношению к «патологическому» контролю (здоровые доноры + больные доброкачественными заболеваниями почки) – 73%. Диагностические характеристики ММП-7, полученные в настоящем исследовании, совпадают с опубликованными недавно данными С. Niedworok и соавт. [15]: этот тест при пограничном уровне в плазме крови, равном 3,15 нг/мл, имеет 70% специфичность и 82% чувствительность. Эти авторы показали также, что при высоких уровнях ММП-7 происходит снижение общей и безрецидивной выживаемости пациентов. Аналогичные результаты были получены ранее А. Ramankulov и соавт. [14], исследовавшими содержание ММП-7 в плазме крови 97 больных раком почки. По их данным, оптимальный пороговый уровень ММП-7 в плазме крови составляет 2,47 нг/мл, при этом чувствительность и специфичность теста равны соответственно 76 и 72%.

Уровень 90% перцентиля нормы для ТИМП-1 составил 389 нг/мл и был превышен всего у 35 первичных больных раком (чувствительность – 37%), у 4 из 5 (80%) пациентов, обследованных при прогрессировании, и у 1 из 10 (10%) больных доброкачественными заболеваниями почки. Существенно улучшить диагностические характеристики данного теста при построении кривых ROC не удалось: наилучшее соотношение чувствительности (67%) и специфичности (65%) отмечено при пороговом уровне маркера 315 нг/мл. При этом данный уровень ТИМП-1



ROC-кривая для оценки диагностических характеристик сывороточного уровня ММП-7 при сравнении группы больных раком почки и группы контроля

превышен у всех пациентов, обследованных на фоне прогрессирования, и у 30% больных доброкачественными новообразованиями почек.

Уровень 90% перцентиля нормы для ММП-8, составивший 110 нг/мл, был превышен только у 8 первичных больных раком почки. Построение кривой ROC не выявило порогового уровня данной протеазы, обеспечивающего приемлемое соотношение чувствительности и специфичности.

Далее оценили взаимосвязь уровней изучаемых маркеров в сыворотке крови с основными показателями распространенности рака почки (табл. 2). Обнаружено высокодостоверное повышение уровня ММП-7 ($p < 0,001$) и ТИМП-1 ($p < 0,0001$) по мере увеличения стадии опухолевого процесса. При этом уровень ММП-7 постепенно увеличивался от I к IV стадии, а уровень ТИМП-1 при III и IV стадиях был практически одинаковым. Уровень ММП-7 превышал выбранное пороговое значение 3,0 нг/мл у 84% больных в I стадии, у 90% больных – II, 87% больных – III и 80% больных – в IV стадии. Уровень ТИМП-1 превышал 315 нг/мл у 55% больных в I стадии, 70% – II, 93% – III и 83% пациентов в IV стадии рака почки. Значимое увеличение уровня ММП-8 отмечено только при III и IV стадиях рака почки.

Выявлено также значительное и достоверное увеличение сывороточных концентраций ММП-7, ТИМП-1 и ММП-8 по мере увеличения индекса T, отражающего размер первичной

опухоли, и индекса N (степень вовлечения регионарных лимфатических узлов), а также достоверно более высокие уровни этих маркеров у больных с отдаленными метастазами по сравнению с пациентами без метастазов. При анализе взаимосвязи с размером опухоли (T) оказалось, что наиболее высокие уровни вышеуказанных маркеров наблюдали при T₃ (опухоль распространяется на главные вены или вторгается в надпочечник или окружающую ткань, но не прорастает почечную фасцию), а при T₄ происходит незначительное снижение уровня маркеров относительно T₃. В то же время уровни маркеров максимальны при наибольшем вовлечении в опухолевый процесс лимфатических узлов – N₂.

По гистологическому строению большинство злокачественных опухолей почки представляли собой светлоклеточный (80%), 7,5% – хромофобный, 8,5% – папиллярный (5 первого и 3 второго типа) и 3% – уротелиальный рак. Несмотря на небольшое число наблюдений в обследованных подгруппах пациентов, выявлено статистически значимое увеличение сывороточной концентрации ММП-7 при папиллярном раке по сравнению со всеми другими типами рака почки (табл. 3).

Нами также продемонстрировано увеличение сывороточных концентраций ТИМП-1 и ММП-7 с уменьшением степени дифференцировки рака почки (от G1 к G4). При этом содержание ММП-2 в сыворотке крови больных низкодифференцированным раком (G4) оказалось наиболее низким.

Таким образом, удалось выявить три показателя, уровень которых значимо увеличивается в сыворотке крови больных раком почки, однако их диагностические характеристики весьма различаются. Наиболее перспективным серологическим маркером следует считать ММП-7: содержание этой протеазы в сыворотке возрастает уже на I стадии заболевания и превышает пороговый уровень, соответствующий 87,5% специфичности относительно «здорового» и 73% специфичности относительно «патологического» контроля, у 84% больных этой подгруппы. ТИМП-1 обладает приемлемой чувствительностью (70% и более) только начиная со II стадии рака почки, специфичность при этом как относительно «здорового», так и относительно «патологического» контроля составляет всего 65%. Уровень третьего маркера – ММП-8 – увеличивается лишь при III–IV стадиях заболевания, что делает его менее информативным.

Закономерно, что уровни всех трех маркеров положительно коррелировали с основными

Таблица 2. Содержание (нг/мл) матричных металлопротеиназ 2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки в зависимости от показателей распространенности опухоли

Показатель распространенности	n	ММП-2	ММП-7	ММП-8	ММП-9	ТИМП-1
Стадия						
I	53	415 340–594	4,95 3,3–8,8	43,6 26,6–64,4	861 662–1087	319 288–368
II	10	404 334–480	6,1 3,7–9,7	38,7 36,1–52,1	823 747–1174	360 281–423
III	15	401 335–628	9,7 5,4–22,6	64,7 53,8–86,1	973 704–1192	489 341–715
IV	16	334 258–619	14,2 8,6–19,3	69,3 43,2–85,0	868 763–1049	485 394–653
p (тест Краскела – Уоллиса)		> 0,1	< 0,001	< 0,01	> 0,1	< 0,0001
Размер опухоли (T)						
T ₁	49	400 327–594	5,0 3,3–9,2	43,2 24,1–64,4	820 624–1033	317 277–365
T ₂	17	374 325–480	7,5 4,4–9,7	52,1 38,3–72,6	921 791–1174	413 382–488
T ₃	25	374 321–619	12,7 6,1–19,4	65,9 38,8–86,1	875 704–1040	481 339–653
T ₄	3	571 449–695	7,4 4,2–11,1	52,0 44,7–64,0	1209 914–1430	369 299–382
p (тест Краскела – Уоллиса)		> 0,1	< 0,01	< 0,05	> 0,1	< 0,0001
Метастазы в лимфатических узлах (N)						
N ₀	78	392 331–578	5,9 3,3–9,6	45,8 30,9–67,7	863 699–1041	340 293–413
N ₁	8	434 380–648	4,8 3,6–7,5	37,1 26,8–54,2	902 605–1100	360 268–441
N ₂	8	384 305–519	15,4 8,8–27,4	83,5 42,8–135	1020 813–1415	561 401–704
p (тест Краскела – Уоллиса)		> 0,1	< 0,05	< 0,05	> 0,1	< 0,01
Отдаленные метастазы (M)						
M ₀	84	405 335–602	6,1 3,3–9,7	47,1 30,5–68,6	868 701–1090	341 295–419
M+	10	331 258–414	10,7 8,6–19,2	74,1 52,4–83,0	1039 791–1082	507 369–640
p (тест Краскела – Уоллиса)		> 0,1	< 0,05	< 0,05	> 0,1	< 0,01

ММП – матричная металлопротеиназа, ТИМП-1 – тканевой ингибитор 1-го типа

Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей



Таблица 3. Содержание (нг/мл) матричных металлопротеиназ 2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли

Критерий	n	ММП-2	ММП-7	ММП-8	ММП-9	ТИМП-1
Гистологическое строение						
светлоклеточный рак (Св)	74	400 325–594	6,3 3,6–10,0	51,4 34,0–72,6	874 679–1087	351 301–488
хромофобный рак (Хр)	7	371 322–418	3,7 2,6–4,9	38,3 30,2–70,4	1000 791–1197	345 305–423
папиллярный рак (Пап)	8	472 349–654	10,5 9,4–32,8	65,5 46,4–103,4	1006 790–1163	416 341–715
уротелиальный рак (Ур)	3	794 700–860	2,9 2,6–3,9	12,5 12,3–68,6	701 624–1007	279 385–450
<i>p</i> (тест Манна – Уитни)		Все > 0,1	Пап–Св, Пап–Хр < 0,01 Пап–Ур < 0,05	Все > 0,1	Все > 0,1	Пап–Ур < 0,05
Степень дифференцировки						
G1	7	358 263–609	5,8 5,0–9,4	44,9 17,8–91,2	766 742–1123	304 273–518
G2	49	416 340–602	6,1 3,4–9,6	57,1 31,4–65,6	868 644–978	335 298–398
G3	12	415 365–695	8,6 5,7–15,9	65,5 47,4–79,0	1044 846–1269	369 321–478
G4	9	319 297–364	19,4 16,0–23,6	64,7 43,6–101	875 662–1257	653 526–715
<i>p</i> (тест Краскела – Уоллиса)		> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,05
<i>p</i> (тест Манна – Уитни)		$p_{III-IV} < 0,05$ $p_{II-IV} < 0,01$	$p_{II-IV} < 0,01$	Все > 0,1	Все > 0,1	$p_{II-IV} < 0,01$ $p_{II-IV} < 0,0001$

ММП – матричная металлопротеиназа, ТИМП-1 – тканевой ингибитор 1-го типа

Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей

показателями системы TNM, характеризующими размер и степень инвазии первичной опухоли (T), метастатическое поражение лимфатических узлов (N) и отдаленных органов (M). Уровни ММП-7 и ТИМП-1 в сыворотке крови возрастали также по мере уменьшения дифференцировки опухоли, а наиболее высокие уровни ММП-7 отмечены при папиллярном раке почки. Представляется важным отметить: в небольшой группе пациентов, первично обследованных уже на фоне прогрессирования заболевания, уровни всех трех вышеуказанных маркеров были существенно выше, чем у первичных больных, и превышали рассчитанные пороговые значения. Следовательно, выявленные маркеры могут быть

полезны и для послеоперационного мониторинга больных раком почки.

К сожалению, нельзя не учитывать, что уровни ММП-7 и ТИМП-1 в периферической крови повышаются не только при раке почки, но и при некоторых других злокачественных новообразованиях. В частности, в наших исследованиях оба маркера оказались диагностическими и прогностическими факторами при раке толстой кишки, а уровень ММП-7 был также значимо увеличен и коррелировал с основными показателями распространенности опухолевого процесса при раке яичников и раке желудка [5]. Кроме того, содержание ММП-7 в сыворотке крови увеличивается при некоторых неопухоловых патологиях почек, таких как диабетическая нефропатия [16].

С фундаментальной точки зрения полученные результаты стали дополнительным подтверждением того, что увеличение экспрессии ММП-7, которая помимо разрушения компонентов внеклеточного матрикса участвует в процессинге некоторых биологически важных молекул клеточной поверхности и в отличие от других ММП синтезируется преимущественно опухолевыми клетками, является универсальным изменением в системе ММП-зависимого протеолиза, характерным для опухолей различного гистогенеза.

Заключение

При исследовании содержания нескольких ММП и ТИМП-1 в сыворотке крови больных опухолями почки и здоровых доноров удалось выявить три показателя, уровень которых значимо увеличивается при раке почки, однако их диагностические характеристики различны. Наиболее перспективным серологическим маркером рака почки следует считать ММП-7, ее уровень уже на I стадии заболевания превышает пороговое значение (3,0 нг/мл) в 84% случаев. ТИМП-1 обладает приемлемой чувствительностью (70% и более) только начиная со II стадии рака почки. Уровень ММП-8 увеличивается лишь при III–IV стадиях заболевания. Необходимо отметить: уровни ММП-7 и ТИМП-1 в периферической крови повышаются не только при раке почки, но и при некоторых других злокачественных новообразованиях. С одной стороны, это указывает на универсальный характер данных изменений, с другой – снижает их значение в дифференциальной диагностике рака почки. Тем не менее мы полагаем, что данные маркеры заслуживают дальнейшего изучения в качестве компонентов комплексного обследования и мониторинга больных почечноклеточным раком. ☺



Литература

1. Ainsworth NL, Lee JS, Eisen T. Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(12):1793–805. doi: 10.1586/era.09.144.
2. Srinivasan R, Armstrong AJ, Dahut W, George DJ. Anti-angiogenic therapy in renal cell cancer. *BJU Int.* 2007;99(5 Pt B):1296–300. doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.06834.x.
3. Oya M. Renal cell carcinoma: biological features and rationale for molecular-targeted therapy. *Keio J Med.* 2009;58(1):1–11. doi: http://doi.org/10.2302/kjm.58.1.
4. Virman JP, Bono P, Luukkaala TH, Sunela KL, Kujala PM, Kellokumpu-Lehtinen PL. Combined Angiogenesis and Proliferation Markers' Expressions as Long-Term Prognostic Factors in Renal Cell Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2016;14(4):e283–9. doi: 10.1016/j.clgc.2015.12.014.
5. Герштейн ЕС, Кушлинский НЕ. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2013;68(5):16–27.
6. Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):103–20. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.017.
7. Abdel-Wahed MM, Asaad NY, Aleskandary M. Expression of matrix metalloproteinase-2 in renal cell carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2004;16(3):168–77.
8. Cheng HP, Duan YR, Li Y, Li XD, Zhu CY, Chen BP. Clinicopathological significance of

- matrix metalloproteinase-2 protein expression in renal cell carcinoma patients. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2015;37(6):353–63.
9. Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, Hong SJ, Cho SH. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003;44(5):560–6. doi: http://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00362-2.
10. Lu H, Yang Z, Zhang H, Gan M, Zhou T, Wang S. The expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 7 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2013;5(3):890–6. doi: 10.3892/etm.2012.859.
11. Qiao ZK, Li YL, Lu HT, Wang KL, Xu WH. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2013;11:1. doi: 10.1186/1477-7819-11-1.
12. Di Carlo A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in sera and urine of patients with renal carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;7(3):621–6. doi: 10.3892/ol.2013.1755.
13. Lein M, Jung K, Laube C, Hübner T, Winkelmann B, Stephan C, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2000;85(6):801–4. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000315)85:6<801::AID-IJC11>3.0.CO;2-C.
14. Ramankulov A, Lein M, Johannsen M, Schrader M, Miller K, Jung K. Plasma matrix metalloproteinase-7 as a metastatic marker and survival predictor in patients with renal cell

- carcinomas. *Cancer Sci.* 2008;99(6):1188–94. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00802.x.
15. Niedworok C, vom Dorp F, Tschirdewahn S, Rübber H, Reis H, Szucs M, Szarvas T. Validation of the diagnostic and prognostic relevance of serum MMP-7 levels in renal cell cancer by using a novel automated fluorescent immunoassay method. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(3):355–61. doi: 10.1007/s11255-015-1185-8.
16. Ban CR, Twigg SM, Franjic B, Brooks BA, Celemajer D, Yue DK, McLennan SV. Serum MMP-7 is increased in diabetic renal disease and diabetic diastolic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87(3):335–41. doi: 10.1016/j.diabres.2010.01.004.
17. Basu RK, Donaworth E, Siroky B, Devarajan P, Wong HR. Loss of matrix metalloproteinase-8 is associated with worsened recovery after ischemic kidney injury. *Ren Fail.* 2015;37(3):469–75. doi: 10.3109/0886022X.2014.996842.
18. Chang HR, Yang SF, Li ML, Lin CC, Hsieh YS, Lian JD. Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2006;366(1–2):243–8. doi: 10.1016/j.cca.2005.10.007.
19. Hsiao KC, Tsai JP, Yang SF, Lee WC, Huang JY, Chang SC, Hso CS, Chang HR. MMP-2 serum concentrations predict mortality in hemodialysis patients: a 5-year cohort study. *Clin Chim Acta.* 2016;452:161–6. doi: 10.1016/j.cca.2015.11.019.
20. Lu LC, Yang CW, Hsieh WY, Chuang WH, Lin YC, Lin CS. Decreases in plasma MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 ratios in uremic patients during hemodialysis. *Clin Exp Nephrol.* 2016;20(6):934–42. doi: 10.1007/s10157-015-1221-0.

References

1. Ainsworth NL, Lee JS, Eisen T. Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(12):1793–805. doi: 10.1586/era.09.144.
2. Srinivasan R, Armstrong AJ, Dahut W, George DJ. Anti-angiogenic therapy in renal cell cancer. *BJU Int.* 2007;99(5 Pt B):1296–300. doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.06834.x.
3. Oya M. Renal cell carcinoma: biological features and rationale for molecular-targeted therapy. *Keio J Med.* 2009;58(1):1–11. doi: http://doi.org/10.2302/kjm.58.1.
4. Virman JP, Bono P, Luukkaala TH, Sunela KL, Kujala PM, Kellokumpu-Lehtinen PL. Combined Angiogenesis and Proliferation Markers' Expressions as Long-Term Prognostic Factors in Renal Cell Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2016;14(4):e283–9. doi: 10.1016/j.clgc.2015.12.014.
5. Gershtein ES, Kushlinskii NE. Clinical prospects of tumor-associated proteases and their tissue

- inhibitors investigation in oncologic patients. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2013;68(5):16–27. doi: http://dx.doi.org/10.15690/vramn.v68i5.659.
6. Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):103–20. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.017.
7. Abdel-Wahed MM, Asaad NY, Aleskandary M. Expression of matrix metalloproteinase-2 in renal cell carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2004;16(3):168–77.
8. Cheng HP, Duan YR, Li Y, Li XD, Zhu CY, Chen BP. Clinicopathological significance of matrix metalloproteinase-2 protein expression in renal cell carcinoma patients. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2015;37(6):353–63.
9. Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, Hong SJ, Cho SH. Increased expres-

- sion of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003;44(5):560–6. doi: http://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00362-2.
10. Lu H, Yang Z, Zhang H, Gan M, Zhou T, Wang S. The expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 7 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2013;5(3):890–6. doi: 10.3892/etm.2012.859.
11. Qiao ZK, Li YL, Lu HT, Wang KL, Xu WH. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2013;11:1. doi: 10.1186/1477-7819-11-1.
12. Di Carlo A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in sera and urine of patients with renal carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;7(3):621–6. doi: 10.3892/ol.2013.1755.



13. Lein M, Jung K, Laube C, Hübner T, Winkelmann B, Stephan C, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2000;85(6):801–4. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000315)85:6<801::AID-IJC11>3.0.CO;2-C.
14. Ramankulov A, Lein M, Johannsen M, Schradler M, Miller K, Jung K. Plasma matrix metalloproteinase-7 as a metastatic marker and survival predictor in patients with renal cell carcinomas. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1188–94. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00802.x.
15. Niedworok C, vom Dorp F, Tschirdewahn S, Rübber H, Reis H, Szucs M, Szarvas T. Validation of the diagnostic and prognostic relevance of serum MMP-7 levels in renal cell cancer by using a novel automated fluorescent immunoassay method. *Int Urol Nephrol*. 2016;48(3):355–61. doi: 10.1007/s11255-015-1185-8.
16. Ban CR, Twigg SM, Franjic B, Brooks BA, Celermajer D, Yue DK, McLennan SV. Serum MMP-7 is increased in diabetic renal disease and diabetic diastolic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87(3):335–41. doi: 10.1016/j.diabres.2010.01.004.
17. Basu RK, Donaworth E, Siroky B, Devarajan P, Wong HR. Loss of matrix metalloproteinase-8 is associated with worsened recovery after ischemic kidney injury. *Ren Fail*. 2015;37(3):469–75. doi: 10.3109/0886022X.2014.996842.
18. Chang HR, Yang SF, Li ML, Lin CC, Hsieh YS, Lian JD. Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2006;366(1–2):243–8. doi: 10.1016/j.cca.2005.10.007.
19. Hsiao KC, Tsai JP, Yang SF, Lee WC, Huang JY, Chang SC, Hso CS, Chang HR. MMP-2 serum concentrations predict mortality in hemodialysis patients: a 5-year cohort study. *Clin Chim Acta*. 2016;452:161–6. doi: 10.1016/j.cca.2015.11.019.
20. Lu LC, Yang CW, Hsieh WY, Chuang WH, Lin YC, Lin CS. Decreases in plasma MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 ratios in uremic patients during hemodialysis. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20(6):934–42. doi: 10.1007/s10157-015-1221-0.

Matrix metalloproteinases 2, 7, 8, 9 and their type 1 tissue inhibitor in serum of renal cancer patients: clinical and pathologic correlations

Gershtein E.S.¹ • Mushtenko V.V.¹ • Korotkova E.A.¹ •
 Bezhanova S.D.¹ • Morozov A.A.² • Alferov A.A.¹ •
 Kazantseva I.A.² • Kushlinskii N.E.¹

Background: The cause of late diagnosis of renal cancer lies in its durable, almost asymptomatic course. Due to the use of antiangiogenic therapies much progress has been made in its treatment in recent years. Yet, many questions concerning the diagnosis, prognosis and prediction of the efficiency of targeted therapy remain unsolved. Therefore, exploration of new renal cancer molecular markers, especially those related to its angiogenic and invasive activities, are still on the agenda. Such markers include the family of matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the majority of extracellular matrix components and are involved at all stages of tumor progression. **Aim:** Comparative evaluation of MMP2, 7, 8, 9 and type 1 tissue inhibitor (TIMP-1) levels in serum of healthy individuals and patients with renal cancer or benign renal tumors, analysis of their associations with the main clinical and pathologic characteristics of the disease. **Materials and methods:** We examined 99 renal cancer patients (of those 94 with primary tumor and 5 at progression) and 10 patients with benign renal tumors. The control group included 97 healthy individuals. Levels of the proteins studied were measured using respective direct ELISA kits (Quantikine®, R&D Systems, USA). **Results:** MMP-7, MMP-8 and TIMP-1 levels in the sera of renal cancer patients were significantly higher than in the control group and in benign renal tumor patients. MMP-2 and

MMP-9 levels did not differ significantly between the study and control groups. At MMP-7 cut-off level of 3.0 ng/mL, its diagnostic sensitivity for primary renal cancer was 84%, specificity in relation to “healthy” control – 87.5%, in relation to the pathologic control (healthy donors + benign renal tumor patients) – 73%. The best sensitivity: specificity ratio for TIMP-1 was 67 and 65% at the cut-off level of 315 ng/ml. No cut-off value with acceptable sensitivity: specificity ratio was found for MMP-8. Serum levels of all these 3 markers were positively associated with disease stage and TNM indices; MMP-7 and TIMP-1 levels also increased with lower differentiation grade. In 5 patients evaluated at disease progression the levels of all the markers studied were markedly higher than in the primary patients, and exceeded the estimated cut-off values. **Conclusion:** MMP-7 should be regarded as the most promising serological renal cancer marker; its serum levels exceed the cut-off value even in 84% stage I patients. TIMP-1 has acceptable sensitivity (70% and above) only from stage II renal cancer onwards, while MMP-8 levels are increased only at stage III–IV of the disease.

Key words: renal cancer, matrix metalloproteinases 2, 7, 8, 9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1, serum, diagnostic characteristics

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-94-101

Gershtein Elena S. – Doctor of Biol. Sci., Professor, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Biochemistry¹

✉ 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 324 11 59.
 E-mail: esgershtein@gmail.com

Mushtenko Vladimir V. – MD, Urologist, Applicant of Laboratory of Clinical Biochemistry¹

Korotkova Ekaterina A. – PhD (in Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Biochemistry¹

Bezhanova Svetlana D. – Postgraduate Student, Department of the Pathologic Anatomy of Human Tumors¹

Morozov Aleksey A. – MD, Urologist, Department of Urology²

Alferov Aleksandr A. – Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Biochemistry¹

Kazantseva Irina A. – MD, PhD, Professor, Leading Researcher, Department of Pathologic Anatomy²

Kushlinskii Nikolay E. – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Clinical Biochemistry¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

²Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в диагностике и прогнозе множественной миеломы

Любимова Н.В.¹ • Тимофеев Ю.С.¹ • Вотякова О.М.¹ • Кушлинский Н.Е.¹

Любимова Нина Васильевна – д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотр., лаборатория клинической биохимии¹
✉ 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация.
Тел.: +7 (499) 324 11 69.
E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Тимофеев Юрий Сергеевич – врач клинической лабораторной диагностики, лаборатория клинической биохимии¹

Вотякова Ольга Михайловна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение химиотерапии гемобластозов¹

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии¹

Актуальность. Анализ свободных легких цепей иммуноглобулинов (СЛЦ) в сыворотке крови – эффективный метод диагностики множественной миеломы. Плазматические клетки синтезируют два типа СЛЦ – κ и λ. СЛЦ, не вошедшие в состав моноклональных интактных иммуноглобулинов, высвобождаются в циркуляторное русло, а затем фильтруются и метаболизируются почками в зависимости от их молекулярной массы. Циркулирующие в крови СЛЦ часто формируют гомодимеры, известные как белок Бенс-Джонса – маркер множественной миеломы Бенс-Джонса. Согласно международным рекомендациям, соотношение κ/λ СЛЦ в сыворотке крови – один из диагностических критериев множественной миеломы. **Цель** – оценка диагностического и прогностического значения исследования СЛЦ в сыворотке крови больных множественной миеломой. **Материал и методы.** Обследовали 118 больных множественной миеломой, поступивших в отделение химиотерапии гемобластозов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за период с 2010 по 2016 г., а также 68 практически здоровых мужчин и женщин. Концентрацию СЛЦ определяли в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом с использованием тест-систем Freelite Human Lambda и Freelite Human Kappa (Binding Site). **Результаты.** У больных множественной миеломой G- и A-типа, а также множественной миеломой Бенс-Джонса уровни секретиции моноклональных κ- или λ-СЛЦ были

повышены по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). Диагностическая чувствительность количественного определения СЛЦ и их соотношения при множественной миеломе достигала соответственно 87,3 и 89,8%, а при комплексном исследовании с иммуноэлектрофорезом приближалась к 100% (99,2%). Анализ выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости показал статистически значимые различия ($p < 0,04$) между группами больных в зависимости от соотношения κ/λ СЛЦ. При этом базальное значение соотношения κ/λ СЛЦ менее 0,04 или более 140 было неблагоприятным фактором прогноза. **Заключение.** Включение метода определения СЛЦ в сыворотке крови в план обследования пациентов с предполагаемой моноклональной гаммапатией позволяет увеличить диагностическую чувствительность имеющихся методов определения парапротеина, а также проводить мониторинг больных с несекретирующей множественной миеломой. Анализ СЛЦ у больных множественной миеломой приобретает особое значение в прогнозировании ремиссии, поскольку противоопухолевый ответ по результатам их определения наступает раньше по сравнению с результатами стандартных иммунохимических исследований.

Ключевые слова: множественная миелома, свободные легкие цепи иммуноглобулинов, диагностика, прогноз

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-102-108

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



Диагностика множественной миеломы до последнего времени основывалась на количественном определении циркулирующих моноклональных иммуноглобулинов. В течение длительного времени «золотым стандартом» скрининга плазмноклеточных заболеваний был анализ белков сыворотки крови и мочи на основе электрофореза с последующей иммунофиксацией [1–3]. Парапρωтеин, секретируемый злокачественным клоном множественной миеломы, может быть представлен в виде молекул интактного иммуноглобулина, свободных легких цепей (СЛЦ), а также их сочетания. Как известно, плазматические клетки синтезируют пять изоформ тяжелых цепей и два типа легких – κ- и λ-СЛЦ, при этом клеток, продуцирующих κ-СЛЦ, в 2 раза больше. В отличие от λ-СЛЦ, представляющих собой димер (50 кДа), молекулы κ-СЛЦ являются мономером (25 кДа). Оба типа СЛЦ способны образовывать высокополимеризованные формы. Нормальные и патологические плазматические клетки продуцируют больше легких цепей (до 40%), чем тяжелых, что позволяет обеспечить соответствующую конформацию молекул интактного иммуноглобулина в процессе их синтеза. СЛЦ, не вошедшие в состав молекул интактного иммуноглобулина, высвобождаются в циркуляторное русло, а затем фильтруются и метаболизируются почками в зависимости от молекулярной массы. Циркулирующие в крови СЛЦ часто формируют гомодимеры, известные как белок Бенс-Джонса – маркер множественной миеломы Бенс-Джонса [1, 4].

В связи с отсутствием секреции парапρωтеина у небольшого числа больных (3–4%) с несекретирующей множественной миеломой в 2014–2016 гг. были пересмотрены рекомендации по диагностике множественной миеломы. Согласно этому документу в качестве одного из диагностических критериев заболевания вместо уровня парапρωтеинемии было введено соотношение κ/λ СЛЦ наряду с другими лабораторными и рентгенологическими критериями [5, 6].

Одним из главных преимуществ определения СЛЦ в сыворотке крови признана возможность их использования в качестве раннего маркера терапевтического ответа. Это обусловлено более коротким периодом полураспада СЛЦ (несколько часов) по сравнению с молекулами интактного иммуноглобулина, которые находятся в циркуляторном русле от 6 до 25 дней [7–9]. Кроме того, СЛЦ продуцируются при всех типах множественной миеломы, в том числе у большинства больных

с несекретирующей формой. Методы электрофореза с иммунофиксацией являются полуколичественными, трудоемкими, результаты исследований зависят от точности сбора суточной мочи пациентом. Кроме того, эти методы имеют ограниченные возможности при обследовании пациентов с небольшой массой опухоли или небольшой продукцией СЛЦ (олигосекретирующей множественной миеломой), а также пациентов с несекретирующей множественной миеломой. Разработка высокочувствительного автоматизированного метода определения СЛЦ в сыворотке крови на основе использования специфических антител к κ- и λ-СЛЦ сделала возможным внедрение этих показателей в клиническую практику [10, 11].

Цель настоящей работы – оценка диагностического и прогностического значения исследования СЛЦ в сыворотке крови больных множественной миеломой.

Материал и методы

Обследовали 118 больных в возрасте от 23 до 80 лет с диагнозом множественной миеломы, поступивших в отделение химиотерапии гемобластозов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за период с 2010 по 2016 г. В исследуемую группу вошли 69 больных множественной миеломой с секрецией парапρωтеина иммуноглобулина (Ig) типа G (G-миелома), 19 – с секрецией IgA (A-миелома), 19 – с миеломой Бенс-Джонса, 4 – с секрецией парапρωтеина IgM (M-миелома), 3 – с биклональной секрецией парапρωтеинов IgG и IgA, а также 4 больных с несекретирующей множественной миеломой.

Диагноз устанавливали согласно международным критериям диагностики множественной миеломы [5, 6]. Обследование больных проводили до начала терапии. У 47 пациентов, не получавших высокодозную химиотерапию с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, отслежены отдаленные результаты в интервале от 1 года до 7 лет. Медиана наблюдения составила 18 месяцев. Большинство больных (44 из 47, 94%) получали лечение на основе бортезомиба, у 3 (6%) пациентов применяли другие программы. В группе больных, которым проводилось лечение по программам на основе бортезомиба, 25 (57%) пациентов получали терапию по схеме VCP (бортезомиб, циклофосфамид, преднизолон), 11 (25%) – по схеме VMP (бортезомиб, мелфалан, преднизолон). В 8 (18%) случаях использованы схемы терапии SuVorD (циклофосфамид,



Секреция свободных легких цепей иммуноглобулинов при различных типах множественной миеломы

Тип миеломы	Пациенты с вовлеченной κ-СЛЦ		Пациенты с вовлеченной λ-СЛЦ	
	n	Концентрация κ-СЛЦ, мг/л	n	Концентрация λ-СЛЦ, мг/л
G-миелома	44	242 (37,0–1600) 0,47–102640	22	374,2 (47,3–953) 0,39–12430
A-миелома	10	25,6 (16,5–37,6) 10,7–257	9	195,2 (21,3–575,3) 16,9–12936
M-миелома	3	1557 (1210–64500) 1210–64500	1	40,8
G- + A-миелома	2	47,5 и 768,9	1	273,1
Миелома Бенс-Джонса	10	4358 (946–7282) 26,3–39480	8	3418 (1465–4835) 36,7–20375
Контрольная группа	68	14,2 (11,1–16,2) 7,3–20,8	68	10,5 (9,35–12,9) 5,7–18,1

СЛЦ – свободные легкие цепи иммуноглобулинов

Результаты даны в виде медиан с квартилями (в скобках), отдельной строкой указаны минимальное и максимальное значения

бортезомиб, дексаметазон), PAD (бортезомиб, доксорубин, дексаметазон). Медиана числа курсов – 8 (от 1 до 14). Поддерживающая терапия не проводилась.

Контрольная группа состояла из 68 практически здоровых мужчин и женщин в возрасте от 25 до 82 лет.

Концентрацию κ- и λ-СЛЦ (мг/л) определяли в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе Advia 1800 с использованием тест-систем Freelite Human Lambda и Freelite Human Kappa (Binding Site, Великобритания). Результаты, выходящие за технические пределы метода, были получены путем многократных последовательных разведений в соответствии с программами.

Диагностику парапротеинемии проводили методом электрофореза с иммунофиксацией (Hydrasys, Sebia) при использовании специфических антисывороток к основным типам тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов.

Статистический анализ данных выполняли в программе Statistica 7 (Statsoft, США). Различия оценивали при помощи непараметрического

критерия Манна – Уитни. Анализ выживаемости проводили методом Каплана – Мейера с использованием критерия log-rank. Результаты в тексте приведены в виде медиан с минимальным и максимальным значениями. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При определении СЛЦ иммунотурбидиметрическим методом в сыворотке крови практически здоровых людей концентрации κ- и λ-СЛЦ были сопоставимы с референсными значениями, рекомендованными производителем [10, 11] наборов реактивов: κ-СЛЦ – 14,2 (7,3–20,8) мг/л, λ-СЛЦ – 10,5 (5,7–18,1) мг/л.

Поскольку злокачественные плазматические клетки секретируют чаще всего один тип СЛЦ (так называемые вовлеченные в патологический процесс легкие цепи), уровень секреции СЛЦ каждого типа анализировали у пациентов с соответствующими вовлеченными СЛЦ. Тип вовлеченных легких цепей, а также тип секреции тяжелых цепей иммуноглобулинов верифицировали с использованием иммуноэлектрофореза. По типу вовлеченных цепей преобладали κ-СЛЦ (69 наблюдений), вовлеченные λ-СЛЦ выявлены у 42 пациентов. У 3 больных вовлеченными оказались оба типа СЛЦ, 4 пациента не продемонстрировали моноклональной секреции по данным электрофореза и иммунофиксации.

У пациентов с вовлеченными κ-СЛЦ уровень секреции различался в зависимости от типа миеломы, однако при всех типах секретирующей миеломы уровни κ-СЛЦ были статистически значимо повышены по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). Так, наиболее высокая медиана κ-СЛЦ была в группе больных миеломой Бенс-Джонса (4358 мг/л), при этом максимальное значение достигало 39480 мг/л (таблица). В группе пациентов с G-миеломой медиана κ-СЛЦ была ниже (241,8 мг/л), однако максимальная секреция достигала 102640 мг/л. Выраженную гиперсекрецию κ-СЛЦ наблюдали и при M-миеломе, которая достигала максимального значения 64500 мг/л. В то же время при A-миеломе секреция κ-СЛЦ была ниже, чем при других типах множественной миеломы, – медиана 25,6 (10,7–256,7) мг/л.

У пациентов с вовлеченными λ-СЛЦ наиболее высокая медиана секреции также была характерна для пациентов с миеломой Бенс-Джонса (3417 мг/л). Уровни гиперсекреции λ-СЛЦ при G-миеломе (374,2; 0,39–12430 мг/л) и A-миеломе (195,2; 16,9–12936 мг/л) были ниже. При миеломе Бенс-Джонса, как и при G- и A-миеломе

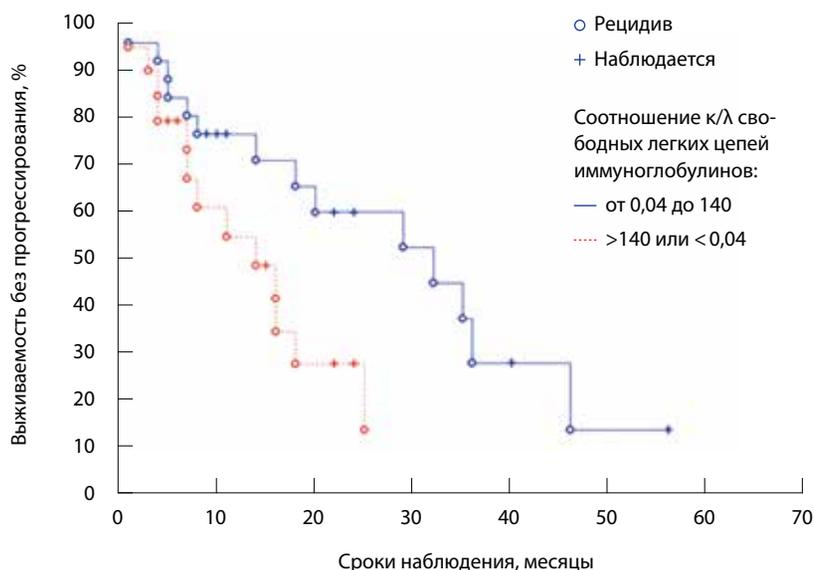


Рис. 1. Соотношение к/λ свободных легких цепей иммуноглобулинов в прогнозе выживаемости без прогрессирования

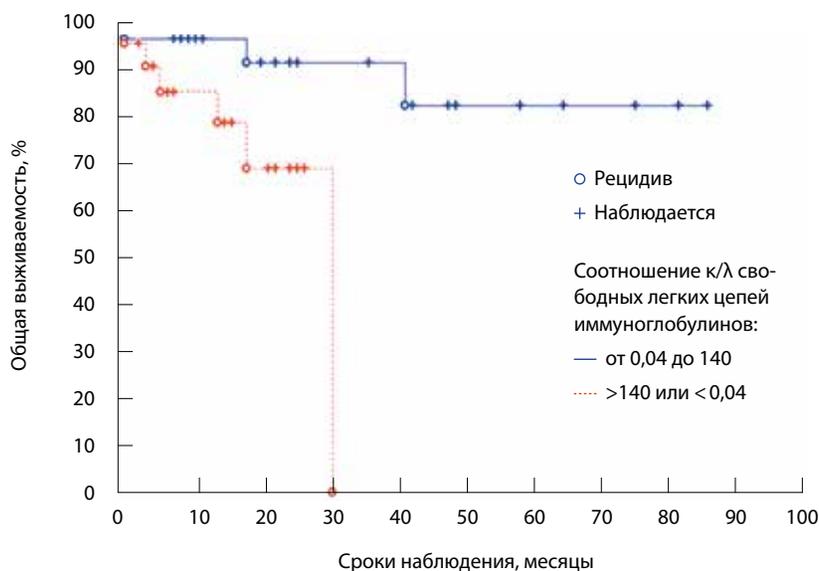


Рис. 2. Соотношение к/λ свободных легких цепей иммуноглобулинов в прогнозе общей выживаемости

с вовлеченными λ-СЛЦ, наблюдали статистически значимое повышение относительно контрольной группы ($p < 0,0001$).

У 2 из 4 пациентов с несекретирующей миеломой были выявлены повышенные значения κ-СЛЦ (22,4 и 82,4 мг/л) и в одном случае – повышение λ-СЛЦ (91,2 мг/л) при полном отсутствии электрофоретических признаков моноклональной секреции в сыворотке крови или парапротеинурии.

Для оценки диагностической значимости СЛЦ были рассчитаны их пороговые значения на основе данных, полученных в контрольной группе. Для κ-СЛЦ пороговое значение составило 21,5 мг/л, для λ-СЛЦ – 27,0 мг/л.

Анализ диагностической чувствительности в общей группе больных множественной миеломой показал: у 103 из 118 пациентов при иммунотурбидиметрическом исследовании отмечалась гиперсекреция κ- и/или λ-СЛЦ, что соответствовало диагностической чувствительности 87,3%. При этом в группе пациентов с G-миеломой диагностическая чувствительность составила 89,9%, при A-миеломе – 63,2%, тогда как при миеломе Бенс-Джонса достигала 100%.

Следует отметить, что по данным разных авторов соотношение к/λ в отличие от электрофоретических методов рассматривается количественным показателем клональности и является более чувствительным маркером моноклональной секреции, чем простое повышение уровня СЛЦ [2, 4, 6]. Были выделены пороговые значения соотношения к/λ СЛЦ, при которых патологическими считались значения ниже 0,25 и выше 1,65. При указанных пороговых значениях в общей группе больных множественной миеломой диагностическая чувствительность соотношения к/λ СЛЦ достигала 89,8%. У пациентов с G- и A-миеломой диагностическая чувствительность соотношения к/λ СЛЦ составляла соответственно 92,8 и 79,0%, что превышало такую же количественного определения κ- и λ-СЛЦ.

При комплексном исследовании, включавшем иммунотурбидиметрический анализ СЛЦ, а также иммуноэлектрофорез, чувствительность в общей группе больных множественной миеломой достигала 99,2% при практически 100% специфичности.

Помимо диагностической эффективности СЛЦ нами также проведена оценка их значимости в прогнозе выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости больных множественной миеломой. Прогностическое значение СЛЦ оценили в группе из 47 больных, не получавших высокодозной химиотерапии. Оценка прогноза проводилась с учетом соотношения базальных уровней СЛЦ, полученных до начала специфического лечения. В качестве пороговых значений при анализе прогностического значения были приняты верхний и нижний квартили соотношения к/λ СЛЦ в группе больных множественной миеломой, при этом прогностически неблагоприятными считали значения менее 0,04 или более 140.

Анализ выживаемости больных множественной миеломой без прогрессирования показал статистически значимые ($p=0,04$) различия между группами пациентов в зависимости от соотношения к/л СЛЦ (рис. 1). В группе больных множественной миеломой с соотношением к/л СЛЦ менее 0,04 или более 140 в течение 1 года ремиссия сохранялась в 55,9% наблюдений, в то время как в группе пациентов с соотношением к/л СЛЦ в пределах интервала 0,04–140 ремиссия сохранялась в большем проценте случаев (73,9%).

Анализ общей выживаемости выявил аналогичные закономерности (рис. 2). В группе больных множественной миеломой с неблагоприятным соотношением к/л СЛЦ 1- и 2-летняя общая выживаемость составила 84,2 и 64,8% соответственно. При этом у пациентов с соотношением к/л СЛЦ в пределах интервала 0,04–140 показатель общей выживаемости был статистически значимо ($p=0,03$) выше: 1-летняя общая выживаемость – 95,7%, 2-летняя – 90,1%.

Следует отметить, что уровни альбумина и бета-2-макроглобулина в сыворотке крови не показали достоверной связи с прогнозом общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования у больных множественной миеломой. Таким образом, согласно полученным нами данным, базальное значение соотношения к/л СЛЦ можно использовать для оценки выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости больных множественной миеломой, при этом соотношение менее 0,04 или более 140 было неблагоприятным фактором прогноза, что согласуется с данными других авторов [12–14].

Заключение

В последние годы анализ СЛЦ получил широкое применение при обследовании больных с гемобластозами. В ряде опубликованных нами работ продемонстрировано диагностическое значение иммунотурбидиметрического анализа СЛЦ в сыворотке крови больных моноклональными гаммапатиями [15, 16]. В отечественной литературе приведены также данные об использовании определения СЛЦ в сыворотке крови и спинномозговой жидкости в целях диагностики и мониторинга на основе иммуноферментного анализа на микропланшетах [17, 18]. Важное значение анализ СЛЦ приобретает в мониторинге больных с тлеющей миеломой и моноклональной гаммапатией неясного генеза [19, 20]. Включив определение СЛЦ в сыворотке крови в план обследования пациентов с предполагаемой моноклональной гаммапатией, можно увеличить диагностическую чувствительность имеющихся методов определения парапротеина, а также проводить мониторинг больных с несекретирующей множественной миеломой [8, 11, 15]. Исследование СЛЦ у больных множественной миеломой приобретает особое значение в прогнозировании ремиссии [12, 13, 16, 17], поскольку противоопухолевый ответ по результатам их определения наступает раньше по сравнению с результатами стандартных иммунохимических исследований.

Представленные в настоящей работе данные являются подтверждением не только диагностической, но и прогностической значимости определения СЛЦ с использованием современной автоматизированной технологии. ©

Литература

1. Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(6): 907–19. doi: 10.1515/cclm-2015-0580.
2. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA. Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem.* 2009;55(8):1523–9. doi: 10.1373/clinchem.2009.124461.
3. Misra A, Mishra J, Chandramohan J, Sharma A, Raina V, Kumar R, Soni S, Chopra A. Old but still relevant: high resolution electrophoresis and immunofixation in multiple myeloma. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2016;32(1):10–7. doi: 10.1007/s12288-015-0605-3.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia.* 2009;23(2):215–24. doi: 10.1038/leu.2008.307.
5. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastiris E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
6. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016;91(7):719–34. doi: 10.1002/ajh.24402.
7. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem.* 2005;51(5):805–7. doi: 10.1373/clinchem.2005.048017.



8. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GL, Drayson MT, Carr-Smith HD, Mead GP. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem.* 2009;55(9):1646–55. doi: 10.1373/clinchem.2009.123828.
9. van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K, Pineda-Roman M, Anaissie E, Epstein J, Shaughnessy JD Jr, Zangari M, Tricot G, Mohiuddin A, Alsayed Y, Woods G, Crowley J, Barlogie B. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood.* 2007;110(3):827–32. doi: 10.1182/blood-2007-01-067728.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem.* 2001;47(4):673–80.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem.* 2002;48(9):1437–44.
12. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia.* 2008;22(10):1933–7. doi: 10.1038/leu.2008.171.
13. Kyrtsolis MC, Maltezas D, Tzenou T, Koulieris E, Bradwell AR. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2009;46(2):110–7. doi: 10.1053/j.seminhematol.2009.02.004.
14. Bradwell A, Harding S, Fourrier N, Mathiot C, Attal M, Moreau P, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig κ /Ig λ ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia.* 2013;27(1):202–7. doi: 10.1038/leu.2012.159.
15. Любимова НВ, Турко ТА, Вотякова ОМ, Кушлинский НЕ. Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в сыворотке крови больных моноклональными гаммапатиями. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012;153(2):217–22.
16. Турко ТА, Любимова НВ, Агеева ТВ, Вотякова ОМ. Свободные легкие цепи иммуноглобулинов при множественной миеломе. Клиническая лабораторная диагностика. 2010;(9):29–29а.
17. Митина ТА, Голенков АК, Яздовский ВВ, Караулов АВ, Москалец ОВ, Клинушкина ЕФ, Катаева ЕВ, Трифонова ЕВ, Луцкая ТД, Дудина ГА, Высоцкая ЛЛ, Черных ЮБ, Захаров СГ, Белоусов КА, Фомин АМ, Когарко ИН. Кинетика свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови у пациентов с множественной миеломой в процессе проведения курсов химиотерапии, включающих леналидомид. *Иммунология.* 2014;35(6):329–32.
18. Голенков АК, Трифонова ЕВ, Митина ТА, Москалец ОВ, Белоусов КА, Катаева ЕВ, Кедров АВ, Когарко ИН, Когарко БС, Яздовский ВВ, Караулов АВ. Значение исследования свободных легких цепей в спинномозговой жидкости при множественной миеломе, осложненной миелорадикулопатией. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2016;9(3):345–6.
19. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2013;27(4):941–6. doi: 10.1038/leu.2012.296.
20. Sigurdardottir EE, Turesson I, Lund SH, Lindqvist EK, Mailankody S, Korde N, Björkholm M, Landgren O, Kristinsson SY. The Role of Diagnosis and Clinical Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance on Survival in Multiple Myeloma. *JAMA Oncol.* 2015;1(2):168–74. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.23.

References

1. Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(6):907–19. doi: 10.1515/ccml-2015-0580.
2. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA. Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem.* 2009;55(8):1523–9. doi: 10.1373/clinchem.2009.124461.
3. Misra A, Mishra J, Chandramohan J, Sharma A, Raina V, Kumar R, Soni S, Chopra A. Old but still relevant: high resolution electrophoresis and immunofixation in multiple myeloma. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2016;32(1):10–7. doi: 10.1007/s12288-015-0605-3.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia.* 2009;23(2):215–24. doi: 10.1038/leu.2008.307.
5. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
6. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016;91(7):719–34. doi: 10.1002/ajh.24402.
7. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem.* 2005;51(5):805–7. doi: 10.1373/clinchem.2005.048017.
8. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GL, Drayson MT, Carr-Smith HD, Mead GP. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem.* 2009;55(9):1646–55. doi: 10.1373/clinchem.2009.123828.
9. van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K, Pineda-Roman M, Anaissie E, Epstein J, Shaughnessy JD Jr, Zangari M, Tricot G, Mohiuddin A, Alsayed Y, Woods G, Crowley J, Barlogie B. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood.* 2007;110(3):827–32. doi: 10.1182/blood-2007-01-067728.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem.* 2001;47(4):673–80.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem.* 2002;48(9):1437–44.
12. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV. Prognostic value of the serum free light chain



- ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*. 2008;22(10):1933–7. doi: 10.1038/leu.2008.171.
13. Kyrtonis MC, Maltezas D, Tzenou T, Koulieris E, Bradwell AR. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2009;46(2):110–7. doi: 10.1053/j.seminhematol.2009.02.004.
 14. Bradwell A, Harding S, Fourrier N, Mathiot C, Attal M, Moreau P, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig κ /Ig λ ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2013;27(1):202–7. doi: 10.1038/leu.2012.159.
 15. Lyubimova NV, Turko TA, Votyakova OM, Kushlinskii NE. Serum immunoglobulin free light chains in patients with monoclonal gammopathies. *Bull Exp Biol Med*. 2012;153(2):249–54. doi: >10.1007/s10517-012-1688-6.
 16. Turko TA, Lyubimova NV, Ageeva TV, Votyakova OM. Immunoglobulin free light chains in multiple myeloma. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2010;(9):29–29a. Russian.
 17. Mitina TA, Golenkov AK, Yazdovsky VV, Karaulov AV, Moskalets OV, Klinushkina EF, Kataeva EV, Trifonova EV, Lutskey TD, Dudina GA, Vysotskay LL, Chernych JB, Zacharov SG, Belousov KA, Fomin AM, Kogarko IN. Kinetics of free light chains of immunoglobulins sera of patients with multiple myeloma in the chemotherapy process which includes lenalidomide. *Immunology*. 2014;35(6):329–32. Russian.
 18. Golenkov AK, Trifonova EV, Mitina TA, Moskalets OV, Belousov KA, Kataeva EV, Kedrov AV, Kogarko IN, Kogarko BS, Yazdovskii VV, Karaulov AV. Significance of studies of free light chain concentrations in cerebrospinal fluid for patients with multiple myeloma complicated by myeloradiculopathy. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*. 2016;9(3):345–6. Russian.
 19. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(4):941–6. doi: 10.1038/leu.2012.296.
 20. Sigurdardottir EE, Turesson I, Lund SH, Lindqvist EK, Mailankody S, Korde N, Björkholm M, Landgren O, Kristinsson SY. The role of diagnosis and clinical follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on survival in multiple myeloma. *JAMA Oncol*. 2015;1(2):168–74. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.23.

Free light chains of immunoglobulins in the diagnosis and prognosis of multiple myeloma

Lyubimova N.V.¹ • Timofeev Yu.S.¹ • Votyakova O.M.¹ • Kushlinskii N.E.¹

Background: Analysis of free light chains of immunoglobulins (FLC) in the serum is an effective method in the diagnosis of multiple myeloma. Plasma cells produce two types of FLC: κ - and λ -FLC. FLC, which are not incorporated into monoclonal intact immunoglobulins, are released into circulation, and then are filtered and reabsorbed in kidneys depending on their molecular weight. Circulating FLC commonly form homodimers, known as Bence-Jones protein, which is a biomarker of Bence-Jones multiple myeloma. According to the international guidelines, the ratio κ/λ FLC is an important diagnostic criterion of multiple myeloma. **Aim:** To evaluate the diagnostic and prognostic value of serum FLC in multiple myeloma patients. **Materials and methods:** We examined 118 patients with multiple myeloma, admitted to the Department of Hemoblastosis Chemotherapy of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center from 2010 to 2016, and 68 healthy men and women. Serum concentrations of FLC were measured with an immunoturbidimetric method using the test-system Freelite Human Lambda and Freelite Human Kappa (Binding Site Inc.). **Results:** The levels of monoclonal κ - or λ -FLC in patients with G₁, A₁-myeloma and Bence-Jones multiple myeloma were significantly

higher than those in the control group ($p < 0.005$). The diagnostic sensitivity of quantification of FLC and their ratio was 87.3% and 89.8%, and in combination with the use of immune electrophoresis it was close to 100%. Analysis of progression free survival and overall survival showed significant differences ($p < 0.04$) between the groups of patients according their κ/λ FLC ratio. The basal value of κ/λ FLC ratio of less than 0.04 and more than 140 was a predictor of unfavorable outcome. **Conclusion:** The inclusion of the determination of serum FLC into the assessment plan of patients with suspected monoclonal gammopathy makes it possible to increase diagnostic sensitivity of the available methods for paraprotein determination, as well as to monitor patients with non-secreting multiple myeloma. FLC analysis in multiple myeloma patients acquires special significance in the prognosis of remission, since the antitumor response based on their measurement is seen earlier than that based on the results of standard immunochemistry studies.

Key words: multiple myeloma, free light chains of immunoglobulins, diagnosis, prognosis

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-102-108

Lyubimova Nina V. – Doctor of Biol. Sci., Professor, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Biochemistry¹

✉ 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 324 11 69. E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Timofeev Yuriy S. – MD, Physician, Laboratory of Clinical Biochemistry¹

Votyakova Olga M. – MD, PhD, Senior Researcher, Department of Hemoblastosis Chemotherapy¹

Kushlinskii Nikolay E. – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Clinical Biochemistry¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation



Оценка фенотипа интерфазных ядер лимфоцитов методом количественного фазового имиджинга (QPI) у пациенток с эндометриоидными кистами яичников

Гаспарян С.А.¹ • Попова О.С.¹ • Василенко И.А.² • Хрипунова А.А.¹ • Метелин В.Б.²

Актуальность. Эндометриоз яичников – прогрессирующее заболевание, распространенность и тяжесть которого неуклонно возрастают. В связи с этим представляются актуальными вопросы разработки надежных неинвазивных скрининговых методов лабораторной диагностики заболевания на этапе раннего амбулаторного обследования. **Цель** – оценка возможностей метода количественного фазового имиджинга для ранней диагностики эндометриоидных кист яичников и рецидивов заболевания в послеоперационном периоде. **Материал и методы.** Проанализированы 1578 ядер лимфоцитов периферической крови 82 пациенток с эндометриоидными кистами яичников в возрасте от 21 до 37 лет (средний возраст $26,4 \pm 3,6$ года), наблюдавшихся в женской консультации (г. Ессентуки). Исследования проводили в динамике: до лапароскопической цистэктомии, через 6 и 12 месяцев послеоперационного периода на фоне или без лечения препаратами с действующим веществом диеногест. Морфофункциональное состояние ядер лимфоцитов периферической крови оценивали в режиме реального времени методом количественного фазового имиджинга (QPI) с использованием модуля фазово-интерференционной микроскопии аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Весттрейд», Москва) для клинической и лабораторной диагностики,

а также технологии морфоденситометрической сегментации. **Результаты.** При сравнительном анализе морфометрических показателей CD3⁺-клеток периферической крови соматически здоровых небеременных женщин и пациенток с эндометриоидными кистами яичников до проведения им оперативного лечения выявлено статистически значимое повышение расчетного показателя функциональной активности ядер лимфоцитов (0,898 против 0,783, $p < 0,05$). Исследование динамики дифференциально-диагностических критериев реактивных изменений ядер лимфоцитов периферической крови пациенток с эндометриоидными кистами яичников показало: по сравнению с результатами до лечения на 6-м и 12-м месяцах послеоперационного периода величина относительной интенсивности сегментов в ядрах (ΔI) снижалась на 10,3 и 14,7, 10,6 и 12,9% в группах, получавших терапию диеногестом, и без терапии диеногестом соответственно; относительное расстояние между центрами сегментов ядер (ΔL) имело тенденцию к увеличению на 0,6 и 0,9, 4,2 и 2,1%; количество сегментов в ядрах увеличилось на 18,3 и 13,4, 27,4 и 16,9%; периметр ядер уменьшался на 13,9 и 12,6, 11,9 и 7,8% соответственно. Частота безрецидивных случаев через 6 и 12 месяцев наблюдения в группах больных, получавших диеногест, составила 100%, тогда как у пациенток, не получавших

лечение диеногестом, – 97,5 и 93,5% соответственно. **Обсуждение.** Интерфазный хроматин представляет собой своеобразный биосенсор, датчик ранних изменений лимфоидной клетки. Модификации его структуры и плотности упаковки не только свидетельствуют об изменении морфофункционального состояния лимфоцита, но и могут быть спроецированы на организм в целом для ранней доклинической диагностики, оценки тяжести патологического процесса и прогноза при различных кризисных состояниях. **Заключение.** Практическое использование QPI в клиническом мониторинге больных с эндометриоидными кистами яичников способствует оперативному получению важной информации о состоянии клеточного звена иммунитета, открывает новые возможности для оценки эффективности проводимых лечебных и реабилитационных мероприятий, а также ранней доклинической диагностики рецидива заболевания.

Ключевые слова: фенотип интерфазного ядра, ядерная архитектура, хроматин, хроматиновые территории, фазово-интерференционная микроскопия, клинический мониторинг, эндометриоидные кисты яичников

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117



Эндометриозом во всем мире страдают более 170 млн женщин. На долю эндометриоза яичников, по данным разных авторов, приходится от 17 до 44% случаев, из которых около 30% представлены пациентками с диагностированным бесплодием. Эндометриозидные кисты яичников плохо поддаются медикаментозной терапии, и поэтому в комплексе лечебных мероприятий ведущая роль принадлежит хирургическим вмешательствам. Однако, несмотря на допустимую радикальность оперативного лечения, рецидив эндометриоза в среднем составляет 4,6, 9,6, 15,2, 19,3 и 17,8% за 1, 2, 3, 4 и 5 лет после оперативного вмешательства соответственно [1, 2].

Этиопатогенез заболевания – достаточно сложный и многофакторный процесс, различные составляющие которого нашли отражение в многочисленных теориях, объясняющих причины инициации и распространения эндометриозидных очагов. При этом следует отметить, что практически в каждой теории, предложенной современными авторами, отмечается в той или иной мере наличие дисфункции иммунной системы. Данный факт свидетельствует о необходимости учитывать иммунные факторы, участвующие в патогенезе этого многогранного хронического заболевания, изучать патофизиологию эндометриоза, выявлять новые терапевтические мишени для достижения эффективного лечения [3–5].

Высокая заболеваемость, сложности раннего выявления и рецидивирующий характер течения патологического процесса диктуют необходимость поиска новых способов диагностики и применения современных неинвазивных технологий. В качестве одного из решений этой проблемы видится совершенствование методов мониторинга иммунного статуса пациента. Многие исследователи единодушны во мнении, что мониторинг морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток может оказаться крайне важным для прогнозирования состояния больного, построения индивидуальных лечебных и реабилитационных программ, сравнения эффективности различных видов терапии, своевременного выявления осложнений и побочных эффектов лечения эндометриоза [6–8].

Сегодня популярным направлением в исследовании клеток и субклеточных структур считается количественный фазовый имиджинг (quantitative phase imaging – QPI). Благодаря ценным преимуществам методы QPI можно активно использовать в медико-биологических исследованиях. Они также обеспечивают возможность

Гаспарян Сусанна

Арташесовна – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии факультета дополнительного последилового образования¹

Попова Ольга

Сантроевна – аспирант кафедры акушерства и гинекологии факультета дополнительного последилового образования¹

Василенко Ирина

Анатольевна – д-р мед. наук, профессор, декан факультета математики, математической биологии и биоинформатики²
✉ 117997, г. Москва, ул. Садовническая, 33/1, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 951 54 97.
E-mail: vasilenko0604@gmail.com

Хрипунова Алеся

Александровна – канд. мед. наук, доцент кафедры общественного здоровья, организации здравоохранения и медицинской информатики¹

Метелин Владислав

Борисович – канд. биол. наук, доцент кафедры математической биологии, биоинформатики и биотехнологий²

качественной и количественной оценки функциональной морфологии живых цитообъектов. К таким преимуществам относятся возможность изучения состояния клетки без инвазивного вмешательства в условиях, наиболее приближенных к естественным; высокая скорость регистрации данных, позволяющая отслеживать динамику внутриклеточных процессов; отсутствие сложной пробоподготовки образцов, включающей фиксацию и окрашивание, и др.

В последние годы несколькими исследовательскими группами в разных странах разработаны образцы интерференционных микроскопов, которые активно применяются в биологических и медицинских исследованиях [9–12]. Эти приборы имеют практически единую платформу, но различаются техническими решениями и алгоритмами определения фазы и анализа изображений. Новые возможности, ассоциированные с развитием современных компьютерных технологий, ведут к решению целого ряда медико-биологических проблем. В частности, разработан метод определения функционального состояния клеток на основе фазово-интерференционных характеристик их ядерных структур, включая области ядрышкового организатора, которые отражают метаболическую и пролиферативную активность клеток, а также выступают маркером их злокачественной трансформации [11, 12].

В связи с этим мы сосредоточили наше внимание на возможности практического использования QPI в клиническом мониторинге больных с эндометриозидными кистами яичников и выявлении дифференциально-диагностических цитологических критериев реактивных изменений ядерных структур иммунокомпетентных клеток.

Материал и методы

Проанализированы 1578 ядер лимфоцитов периферической крови больных с эндометриозидными кистами яичников в возрасте от 21 до 37 лет (средний возраст $26,4 \pm 3,6$ года), наблюдавшихся в женской консультации (г. Ессентуки). Исследования проводили в динамике – до оперативного лечения, через 6 и 12 месяцев после операционного лечения: 1-ю группу составили 82 пациентки с эндометриозидными кистами яичников, обследованные до лапароскопической цистэктомии; 2-ю и 4-ю группы – 42 пациентки, обследованные через 6 и 12 месяцев после операции на фоне лечения диеногестом в дозе 2 мг в течение 12 месяцев; 3-ю и 5-ю группы – 40 больных, обследованных через 6 и 12 месяцев после операции, не принимавших диеногест. Все пациентки

¹ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России; 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»; 117997, г. Москва, ул. Садовническая, 33/1, Российская Федерация



были сопоставимы по возрасту, длительности и тяжести заболевания.

В группу контроля были включены 30 небеременных женщин фертильного возраста, не имевшие на момент обследования признаков обострения гинекологической и хронической соматической патологии, обратившиеся в консультацию по вопросам контрацепции.

Цельную венозную кровь забирали из кубитальной вены в объеме 5 мл в пластиковую пробирку с добавлением 25 ЕД гепарина на 1 мл для предотвращения свертывания крови. Взвесь мононуклеаров получали стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Выделение лимфоцитов из фракции мононуклеарных клеток осуществляли с помощью магнитного сепаратора MidiMACS по методике производителя (Miltenyi Biotec, Германия). Чистота выделения CD3⁺-клеток во всех случаях составляла более 95%.

Морфофункциональное состояние ядер лимфоцитов периферической крови оценивали в режиме реального времени методом количественного фазового имиджинга с использованием модуля фазово-интерференционной микроскопии аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Вестрейд», Москва) для клинической и лабораторной диагностики.

В основе принципа действия модуля, содержащего идентичные объективы в сигнальном и реперном плечах, лежит сравнение волнового фронта, прошедшего через объект, с опорным, отраженным от высококачественного зеркала. После дискретизации полученного сигнала производится запись распределения фаз в виде цифровой матрицы. Результат обратного преобразования цифрового массива в видимое изображение и восстановление фазового портрета объекта отображается на экране монитора компьютера. Пакет стандартных программ аппаратно-программного комплекса позволяет получать 2D- и 3D-визуализацию клетки и ее фрагментов, производить редактирование файлов, инверсию, вычитание кадров, картирование флуктуаций и другие операции.

Для проведения исследований использовали штатный 30-кратный микрообъектив с числовой апертурой 0,65. Увеличение в канале регистрации составляло 500 раз. Количественный анализ данных производили отдельно с помощью программных средств, разработанных в среде MATLAB. Интерферограммы обрабатывали и сохраняли фазовые изображения клеток. Для каждой клеточной популяции оценивали морфоденситометрические параметры: средние

значения диаметра, периметра, высоты, площади и объема клеток. Рассчитывали показатель функциональной активности ядра (FA) как величину обратно пропорциональную фазовой высоте (PH) каждой клетки в выборке по формуле:

$$FA = (3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1 + 0 \times n_0) / n,$$

где FA – функциональная активность ядра; n_3 – количество клеток с $PH \leq 1,5$ мкм; n_2 – с $PH > 1,5$, но ≤ 2 мкм; n_1 – с $PH > 2$, но $\leq 2,5$ мкм; n_0 – с $PH > 2,5$; n – число клеток в выборке.

Для оценки ядерного полиморфизма лимфоцитов циркулирующей популяции использовали технологию денситометрической сегментации ядер на основе цифровой обработки их фазово-интерференционных изображений с помощью алгоритма «водораздел». В качестве информативных параметров анализировали:

- относительную интенсивность сегментов ядра (ΔI) – величину, обратную оптической плотности (отношение значения интенсивности для каждой сегментированной области к максимальному значению интенсивности);
- относительное расстояние (ΔL) между центрами сегментов (отношение медианы расстояний между центрами сегментов к максимальному значению расстояний);
- количество (N) сегментов по площади ядра;
- периметр (P) ядер в пикселях (пикс).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ SPSS Statistics 21.0. Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних, а также величины дисперсии и среднего квадратичного отклонения. Сравнение двух связанных между собой групп по количественным признакам осуществляли непараметрическим методом с использованием теста согласованных пар Вилкоксона. Сравнение двух несвязанных между собой групп по количественным признакам осуществляли непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна – Уитни. При сравнении двух групп с нормальным характером распределения данных использовали t-тест для независимых группировок. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

При сравнительном анализе морфометрических показателей лимфоцитов (CD3⁺) у соматически здоровых небеременных женщин и пациенток



с эндометриодными кистами яичников до проведения оперативного лечения установлено, что при эндометриозе яичников по сравнению с группой контроля увеличены средние по популяции следующие морфометрические параметры CD3⁺-клеток: диаметр, периметр, площадь и объем (таблица). Фазовая толщина ядра (фазовая высота) оказалась сниженной на 16,2%. При этом статистически значимо повышался расчетный показатель функциональной активности ядер лимфоцитов (0,898 против 0,783, $p < 0,05$).

Полученные результаты послужили основой для исследования возможности улучшения ранней диагностики эндометриодных кист яичников и рецидивов заболевания в послеоперационном периоде посредством использования экспресс-анализа дифференциально-диагностических критериев реактивных изменений ядерных структур лимфоцитов.

При визуализации ядра лимфоцита четко определялась его округлая или овальная форма, неоднородность внутренней структуры, связанная с наличием конгломератов гетерохроматина по периферии и в центре, наличие нескольких контрастных ядрышек (рис. 1).

Рисунок 2 иллюстрирует характер изменений анализируемых дифференциально-диагностических критериев функционального состояния ядерных структур лимфоцитов через 6 и 12 месяцев после лапароскопической цистэктомии у обследуемых пациенток в группах сравнения.

У ядер лимфоцитов больных с эндометриодными кистами яичников до оперативного лечения были отмечены достаточно высокие значения относительной интенсивности сегментов ядра по сравнению с контрольной группой (0,611 против 0,504, $p < 0,05$). Данная величина характеризует анизотропию хроматина: чем выше ее значение, тем хроматин менее плотный (более рыхлый) в данной области ядра клетки. В процессе мониторинга этого показателя на 6-м и 12-м месяце постоперационного периода у пациенток, получавших диеногест, ΔI снижалась практически до нормальных значений на 10,3 и 14,7% соответственно ($p < 0,05$). В группах 3 и 5 величина ΔI также снижалась, но в меньшей степени, – на 10,6 и 12,9% соответственно ($p < 0,05$).

Аналогичные изменения отмечены в отношении относительного расстояния (ΔL) между

Морфоденситометрическая характеристика Т-лимфоцитов (CD3⁺-клеток) периферической крови практически здоровых женщин и больных с эндометриодными кистами яичников до оперативного лечения

Группа		Морфоденситометрические параметры лимфоцитов				
		диаметр (D, мкм)	периметр (P, мкм)	высота (H, мкм)	площадь (A, мкм ²)	объем (V, мкм ³)
Соматически здоровые женщины (контроль, n = 30)	max	9,43	36,25	3,59	58,13	59,24
	min	5,22	16,41	1,43	27,42	21,38
	Mean	7,02	24,15	2,42	41,56	39,96
	SD	0,54	5,11	0,44	9,12	10,15
	Median	6,81	24,13	2,46	35,15	41,12
	Fa	0,783				
Пациентки с эндометриодными кистами яичников (n = 82)	max	10,35	38,02	3,15	62,34	65,88
	min	6,95	17,13	1,12	19,89	34,45
	Mean	8,67	27,24	2,03	38,14	43,44
	SD	0,72	4,96	0,38	8,15	12,38
	Median	7,26	25,62	2,01	37,66	41,65
	Fa	0,898*				

FA – функциональная активность ядра

*Статистически значимые различия между группами пациенток и показателями практически здоровых людей ($p < 0,05$)

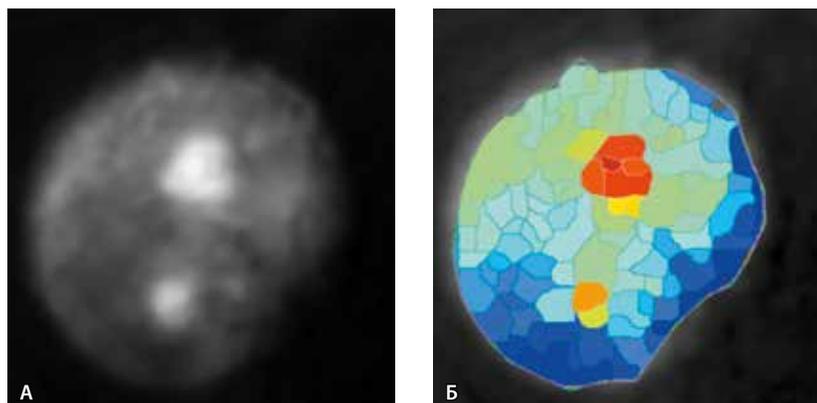


Рис. 1. Фазовый портрет ядра живого лимфоцита (А) и характер распределения хроматина в ядре, оцененный с помощью технологии денситометрической сегментации при использовании алгоритма обработки «водораздел» (Б)

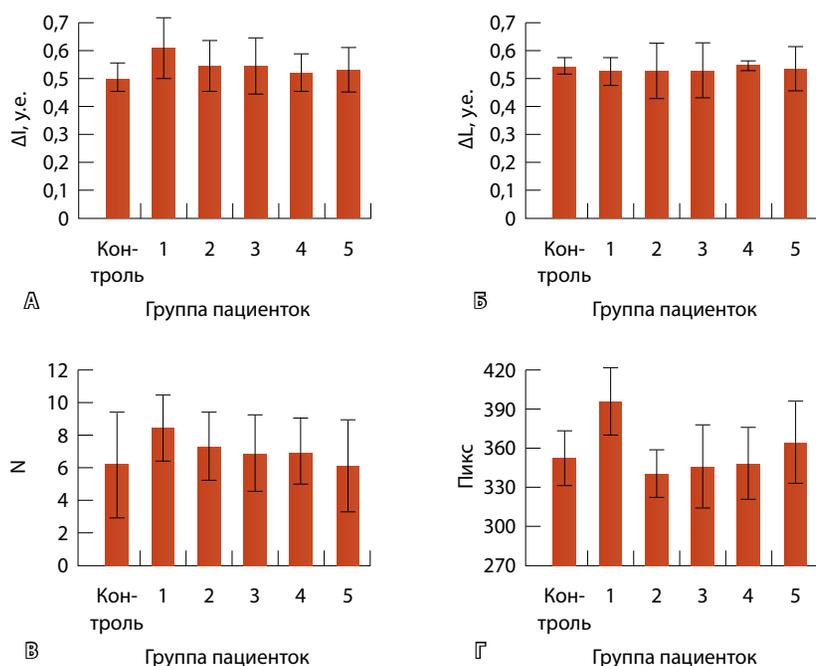


Рис. 2. Показатели реактивных изменений ядер лимфоцитов периферической крови пациенток с эндометриоидными кистами яичников до и после лечения, полученных с использованием технологии денситометрической сегментации: А – относительная интенсивность сегментов ядра (ΔI , у.е.); Б – относительное расстояние между центрами сегментов (ΔL , у.е.); В – количество сегментов по площади ядра (N); Г – периметр ядер лимфоцитов (пикс). Больные с эндометриоидными кистами яичников: группа 1 – до оперативного лечения; группа 2 – через 6 месяцев после цистэктомии на фоне лечения диеногестом; группа 3 – через 6 месяцев после цистэктомии без лечения диеногестом; группа 4 – через 12 месяцев после цистэктомии на фоне лечения диеногестом; группа 5 – через 12 месяцев после цистэктомии без лечения диеногестом

центрами сегментов ядер лимфоцитов, которое демонстрирует общую динамику распределения хроматина различной плотности в ядре клетки. Чем больше палитра (градация) плотности

хроматина в ядре и выше уровень функциональной активности клетки, тем меньше величина данного показателя: у пациенток с эндометриоидными кистами яичников до оперативного лечения ΔI составляет 0,526 против 0,545 в контрольной группе. Кроме того, это является свидетельством неоднородности распределения хроматина в ядрах таких клеток. Это связано с появлением менее крупных сегментов с большей относительной плотностью хроматина и более хаотичным их распределением по площади ядра, что характерно для клеток с высокой синтетической активностью. На фоне лечения величина показателя постепенно увеличивалась (на 0,6 и 0,9, 4,2 и 2,1% соответственно), но выявленные изменения не достигали уровня статистической значимости.

Объективным свидетельством выраженной неоднородности распределения хроматина в ядрах лимфоцитов служит подсчет количества сегментов. Так, у больных с эндометриоидными кистами яичников до оперативного лечения количество сегментов по сравнению с группой контроля было увеличенным в 1,4 раза (8,43 против 6,2 соответственно, $p < 0,05$). На фоне лечения величина этого показателя снижалась, и в группах 2 и 3 становилась практически равнозначной (6,89 и 7,3 соответственно). Через 12 месяцев терапии у пациенток 4-й группы количество сегментов в ядрах продолжало уменьшаться и в среднем составило $6,12 \pm 1,98$, а в 5-й группе, напротив, была выявлена тенденция к увеличению их числа до $7,01 \pm 2,81$.

Периметр ядер в группе контроля составил $353,6 \pm 21,4$ пикс, а у пациенток с эндометриоидными кистами яичников до оперативного лечения – $396,8 \pm 26,0$ пикс ($p < 0,05$). В послеоперационном периоде у пациенток в группах 2 и 4, которые получали лечение диеногестом в течение 6 и 12 месяцев, периметр ядер лимфоцитов по отношению к результатам до операции статистически значимо снижались до $341,2 \pm 18,3$ и $346,5 \pm 32,3$ пикс соответственно ($p < 0,05$). У больных в группах 3 и 5 изменения были аналогичными, но менее выраженными ($349,2 \pm 28,1$ и $365,4 \pm 31,2$ пикс соответственно, $p < 0,05$).

Анализ частоты рецидивов у обследованных пациенток с эндометриоидными кистами яичников после оперативного лечения показал, что через 6 и 12 месяцев число безрецидивных случаев в группах 2 и 4, получавших диеногест 2 мг, составило 100%, тогда как в группах 3 и 5, не получавших лечение данным препаратом, – 97,5 и 93,5% ($p < 0,05$) соответственно.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что прогрессирование патологического процесса у больных с эндометриоидными кистами яичников сопровождается изменением функциональной активности Т-лимфоцитарного звена иммунитета. Морфоденситометрические показатели ядер лимфоцитов могут служить критериями ранней диагностики рецидивов заболевания и эффективности проведенного лечения.

Обсуждение

Лимфоциты как объект исследования всегда привлекают пристальное внимание специалистов широким спектром функциональных возможностей, включающих контроль антигенного гомеостаза, аккумуляцию, хранение и перенос информации об адаптивных и дезадаптивных процессах в системе иммунитета. Пожалуй, самым ярким и информативным элементом клеточной организации является ядро клетки. Именно поэтому детальное изучение фенотипа интерфазного ядра, к которому относят совокупность генетически детерминированных цитологических компонентов структурно-пространственной и функциональной организации цитогенетической системы (динамическую структурно-функциональную связь хроматина с элементами ядерного матрикса и внутренней ядерной оболочкой, компартментный характер организации, неслучайное расположение хромосомных территорий и др.), представляет собой важную область фундаментальных знаний [13, 14].

В этой связи интерфазный хроматин можно рассматривать в качестве своеобразного биосенсора ранних изменений функционального состояния ядродержащей клетки. Модификации его структуры и плотности упаковки не только свидетельствуют об изменении морфофункционального состояния лимфоцита, но и могут быть спроецированы на организм в целом для ранней доклинической диагностики, оценки тяжести патологического процесса и прогноза при различных кризисных состояниях.

Количество хроматина в соматической клетке со стандартным (диплоидным) набором хромосом постоянно и не зависит от большинства факторов. В то же время в процессе активации клетки структурная упорядоченность хроматина претерпевает разнообразные конформационные превращения, в результате которых изменяются физико-химические и, соответственно, оптические (анизотропия) свойства фракций хроматина.

Известно, что коэффициент преломления всех компонентов субклеточных структур в среднем составляет 1,088. Однако его величина может меняться в зависимости от степени конденсации хроматина: при уменьшении размера комплекса белков, ДНК и РНК снижается и коэффициент преломления. Следовательно, снижение уровня анизотропии ядра лимфоцита может интерпретироваться как показатель, свидетельствующий о переходе гетерохроматина в эухроматин, что указывает на биологическую активацию хроматина и служит предпосылкой для появления матричной активности ДНК [15].

Для описания упорядоченных структурных образований хроматина было предложено понятие «хромосомные территории», которые представляют собой динамичные структурные единицы, расположенные в трехмерном пространстве ядра и характеризующие упорядоченность процессов репликации и транскрипции хроматина. Соотношение, взаимное расположение хромосомных территорий и их позиционирование относительно друг друга и центра ядра клетки могут иметь важное диагностическое и прогностическое значение как для оценки функционального состояния клетки, так и для ранней диагностики целого ряда патологических состояний [16, 17].

В свою очередь, изучение организации территорий интерфазного хроматина в диапазоне масштабов от молекулярного уровня до целого ядра требует разработки соответствующих новых экспериментальных подходов. Одним из таких достаточно эффективных подходов может оказаться метод QPI [18, 19].

Использование уникальных возможностей QPI для неинвазивного исследования живых функционирующих клеток позволило нам получить визуализации ядерных и субъядерных структур с объективной оценкой их количественных и качественных признаков. При этом особое значение приобретает показатель фазовой толщины (или фазовой высоты) моноклеарной клетки, который отражает особенность упаковки хроматина в ядре и, соответственно, активности процессов белкового синтеза. Таким образом, данная величина позволяет косвенно оценить активность ядродержащей клетки и может считаться высокочувствительным и объективным критерием оценки нарушений иммунного гомеостаза [20, 21].

Нами зарегистрирован и количественно оценен процесс декомпактизации ядра с помощью используемой технологии морфоденситометрической сегментации. Существенная разница



в величине показателей интерфазных ядер лимфоцитов (относительной интенсивности сегментов ядра (ΔI), относительного расстояния (ΔL) между центрами сегментов, количества (N) сегментов и периметра (P) ядер в условиях нормы и патологии (больные с эндометриоидными кистами яичников)) наглядно отражена в представленных гистограммах.

Кроме того, результаты ретроспективной оценки денситометрических параметров ядер лимфоцитов и исходов заболевания у обследованных пациенток через 6 и 12 месяцев после оперативного лечения и курса терапии продемонстрировали возможность их практического использования в качестве критериев эффективности проводимого лечения и прогнозирования рецидива эндометриоза.

Проблемы диагностики и лечения эндометриоидных кист яичников, встающие перед практикующим врачом, связаны в первую очередь с отсутствием высокочувствительных неинвазивных диагностических маркеров, позволяющих оценить характер вовлечения в патологический процесс окружающих тканей и органов при персистенции заболевания [22]. Важным аспектом профилактики рецидивов становится выбор наиболее эффективной тактики послеоперационной терапии и своевременной оценки ее эффективности и адекватности. В целом ряде стран специалисты рекомендуют в качестве монотерапии для предотвращения рецидивирования эндометриоидных кист яичников препараты на основе диеногеста – синтетического прогестина с выраженным прогестагенным и умеренным антигонадотропным эффектами без андрогенной, глюкокортикоидной и минералокортикоидной активности [23–25]. Представленные нами данные убедительно

подтверждают, что диеногест – высокоэффективное средство лечения эндометриоза, способствует снижению рецидивов заболевания, а морфоденситометрические показатели ядер лимфоцитов могут служить критериями эффективности терапии больных с эндометриоидными кистами яичников.

Получение важной количественной информации о состоянии клеточных объектов с применением технически доступных и малозатратных методов QPI открывает новые возможности практического использования ядер живых функционирующих клеток как перспективных биосенсоров для диагностических целей. Результаты исследования могут в будущем способствовать индивидуализации тактики ведения больных с эндометриоидными кистами яичников в послеоперационном периоде.

Заключение

Интерфазный хроматин – высокочувствительный биосенсор функциональной активности клеток. Практическое использование QPI в клиническом мониторинге больных с эндометриоидными кистами яичников способствует оперативному получению важной информации о состоянии клеточного звена иммунитета, открывает новые возможности для оценки эффективности проводимых лечебных и реабилитационных мероприятий и ранней доклинической диагностики рецидива заболевания. Важным аспектом дальнейшего развития данного направления представляется создание библиотеки фазовых образов ядер различных субпопуляций лимфоидных клеток в условиях нормы и патологии, а также совершенствование технологии цифровой обработки фазовых изображений биологических микрообъектов. ©

Литература

1. Адамян ЛВ, Азнаурова ЯБ. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза. Проблемы репродукции. 2015;21(2):66–77. doi: 10.17116/repro201521266-77.
2. Дубинская ЕД, Дутов АА, Лаптева НВ, Бабичева ИА, Колесникова СН. Эндометриоидные кисты яичников и фертильность: дискуссионные аспекты. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2015;14(5): 27–35.
3. Jerman LF, Hey-Cunningham AJ. The role of the lymphatic system in endometriosis: a comprehensive review of the literature. Biol Reprod. 2015;92(3):64. doi: 10.1095/biolreprod.114.124313.
4. Fazleabas AT, Braundmeier A, Parkin K. Endometriosis-induced changes in regulatory T cells – insights towards developing permanent contraception. Contraception. 2015;92(2):116–9. doi: 10.1016/j.contraception.2015.06.006.
5. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. Am J Reprod Immunol. 2014;72(3):262–9. doi: 10.1111/aji.12259.
6. Berbic M, Ng CH, Black K, Markham R, Russell P, Basten A, Fraser IS, Hey-Cunningham AJ. A novel pilot study of endometrial stromal cells and immune cell populations in sentinel uterine-draining lymph nodes during the menstrual cycle and in endometriosis. Reprod Sci. 2013;20(11):1339–48. doi: 10.1177/1933719113485298.
7. Лысенко МА, Метелин ВБ, Баранова НВ. Опыт применения инновационных клеточных технологий в диагностике эндометриоидных кист яичников. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2012;(2):33–6.
8. Сахаутдинова ИВ, Мустафина ГТ, Хабибуллина РН, Яркина ЕИ. Современные методы диагностики и лечения эндометриоза яичников. Медицинский вестник Башкортостана. 2015;10(1):113–7.



9. Ceballos S, Kandel M, Sridharan S, Majeed H, Monroy F, Popescu G. Active intracellular transport in metastatic cells studied by spatial light interference microscopy. *J Biomed Opt.* 2015;20(11):111209. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111209.
10. Nguyen TH, Majeed H, Popescu G. Plane-wave decomposition of spatially random fields. *Opt Lett.* 2015;40(7):1394–7. doi: 10.1364/OL.40.001394.
11. Levin GG, Vishnyakov GN, Minaev VL, Latushko MI, Pickalov VV, Demyanenko AV. Shearing interference microscopy for tomography of living cells. *Proc. SPIE.* 2015;9536:95360G.
12. Tychinsky V, Kretushev AV, Klemyashov IV, Zverzhkhovskiy VD, Vyshenskaya TV, Shtil AA. Quantitative phase imaging of living cells: application of the phase volume and area functions to the analysis of "nucleolar stress". *J Biomed Opt.* 2013;18(11):111413. doi: 10.1117/1.JBO.18.11.111413.
13. Rapkin LM, Anchel DR, Li R, Bazett-Jones DP. A view of the chromatin landscape. *Micron.* 2012;43(2–3):150–8. doi: 10.1016/j.micron.2011.11.007.
14. Rodriguez A, Bjerling P. The links between chromatin spatial organization and biological function. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1634–9. doi: 10.1042/BST20130213.
15. Spagnol ST, Armiger TJ, Dahl KN. Mechanobiology of chromatin and the nuclear interior. *Cell Mol Bioeng.* 2016;9(2):268–76. doi: 10.1007/s12195-016-0444-9.
16. Bernardi G. Genome organization and chromosome architecture. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015;80:83–91. doi: 10.1101/sqb.2015.80.027318.
17. Eagen KP, Hartl TA, Kornberg RD. Stable chromosome condensation revealed by chromosome conformation capture. *Cell.* 2015;163(4):934–46. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.026.
18. Mir M, Wang Z, Shen Z, Bednarz M, Bashir R, Golding I, Prasanth SG, Popescu G. Optical measurement of cycle-dependent cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(32):13124–9. doi: 10.1073/pnas.1100506108.
19. Lakadamyali M, Cosma MP. Advanced microscopy methods for visualizing chromatin structure. *FEBS Lett.* 2015;589(20 Pt A):3023–30. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.012.
20. Вышенская ТВ, Болотова АА, Василенко ИА, Звержковский ВД, Болдырев ДМ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Определение цитотоксического потенциала CD8⁺ Т-лимфоцитов методом когерентной фазовой микроскопии. *Биофизика.* 2016;61(3):523–7.
21. Vasilenko I, Metelin V, Nasyrov M, Kuznetsov A, Sukhenko E, Belyakov V. Quantitative phase imaging of cellular and subcellular structures for non-invasive screening diagnostics of socially significant diseases. *Proc. SPIE.* 2015;9336:93362K1–4.
22. Адамян ЛВ, ред. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных. М.; 2013. 65 с.
23. Ерофеева ЛВ. Применение комбинированного контрацептивного препарата, содержащего диеногест и этинилэстрадиол, при эндометриозе. *Медицинский совет.* 2016;(2):14–21.
24. Ярмолинская МИ, Беженарь ВФ. Опыт применения диеногеста в комбинированном лечении генитального эндометриоза. *Фарматека.* 2013;(3):48–51.
25. Park SY, Kim SH, Chae HD, Kim CH, Kang BM. Efficacy and safety of dienogest in patients with endometriosis: A single-center observational study over 12 months. *Clin Exp Reprod Med.* 2016;43(4):215–20. doi: 10.5653/cerm.2016.43.4.215.

References

1. Adamyan LV, Aznaurova YaB. Molecular aspects of endometriosis. *Problemy reproduktivnoy. 2015;21(2):66–77. Russian.* doi: 10.17116/repro201521266-77.
2. Dubinskaya ED, Dutov AA, Lapteva NV, Babicheva IA, Kolesnikova SN. Endometrioid ovarian cysts and fertility: debatable aspects. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2015;14(5):27–35. Russian.
3. Jerman LF, Hey-Cunningham AJ. The role of the lymphatic system in endometriosis: a comprehensive review of the literature. *Biol Reprod.* 2015;92(3):64. doi: 10.1095/biolreprod.114.124313.
4. Fazleabas AT, Braundmeier A, Parkin K. Endometriosis-induced changes in regulatory T cells – insights towards developing permanent contraception. *Contraception.* 2015;92(2):116–9. doi: 10.1016/j.contraception.2015.06.006.
5. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(3):262–9. doi: 10.1111/aji.12259.
6. Berbic M, Ng CH, Black K, Markham R, Russell P, Basten A, Fraser IS, Hey-Cunningham AJ. A novel pilot study of endometrial stromal cells and immune cell populations in sentinel uterine-draining lymph nodes during the menstrual cycle and in endometriosis. *Reprod Sci.* 2013;20(11):1339–48. doi: 10.1177/1933719113485298.
7. Lysenko MA, Metelyn VB, Baranova NV. New cellular technologies in diagnostics of endometrioid ovarian cysts. *Medical News of North Caucasus.* 2012;(2):33–6. Russian.
8. Sakhautdinova IV, Mustafina GT, Khabibullina RN, Yarkina EI. Current methods of endometrioma diagnosis and treatment. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana.* 2015;10(1):113–7. Russian.
9. Ceballos S, Kandel M, Sridharan S, Majeed H, Monroy F, Popescu G. Active intracellular transport in metastatic cells studied by spatial light interference microscopy. *J Biomed Opt.* 2015;20(11):111209. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111209.
10. Nguyen TH, Majeed H, Popescu G. Plane-wave decomposition of spatially random fields. *Opt Lett.* 2015;40(7):1394–7. doi: 10.1364/OL.40.001394.
11. Levin GG, Vishnyakov GN, Minaev VL, Latushko MI, Pickalov VV, Demyanenko AV. Shearing interference microscopy for tomography of living cells. *Proc. SPIE.* 2015;9536:95360G.
12. Tychinsky V, Kretushev AV, Klemyashov IV, Zverzhkhovskiy VD, Vyshenskaya TV, Shtil AA. Quantitative phase imaging of living cells: application of the phase volume and area functions to the analysis of "nucleolar stress". *J Biomed Opt.* 2013;18(11):111413. doi: 10.1117/1.JBO.18.11.111413.
13. Rapkin LM, Anchel DR, Li R, Bazett-Jones DP. A view of the chromatin landscape. *Micron.* 2012;43(2–3):150–8. doi: 10.1016/j.micron.2011.11.007.
14. Rodriguez A, Bjerling P. The links between chromatin spatial organization and biological function. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1634–9. doi: 10.1042/BST20130213.
15. Spagnol ST, Armiger TJ, Dahl KN. Mechanobiology of chromatin and the nuclear interior. *Cell Mol Bioeng.* 2016;9(2):268–76. doi: 10.1007/s12195-016-0444-9.
16. Bernardi G. Genome organization and chromosome architecture. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015;80:83–91. doi: 10.1101/sqb.2015.80.027318.
17. Eagen KP, Hartl TA, Kornberg RD. Stable chromosome condensation revealed by chromosome conformation capture. *Cell.* 2015;163(4):934–46. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.026.
18. Mir M, Wang Z, Shen Z, Bednarz M, Bashir R, Golding I, Prasanth SG, Popescu G. Optical measurement of cycle-dependent cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(32):13124–9. doi: 10.1073/pnas.1100506108.
19. Lakadamyali M, Cosma MP. Advanced microscopy methods for visualizing chromatin structure. *FEBS Lett.* 2015;589(20 Pt A):3023–30. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.012.
20. Vyshenskaya TV, Bolotova AA, Zverzhkhovskiy VD, Boldyrev DV, Kretushev AV, Evdokimov AA, Vasilenko IA. A technique for the assessment of the cytotoxic capacity of CD8⁺ lymphocytes based on phase images. *Biophys J.* 2016;61(3):440–4.



21. Vasilenko I, Metelin V, Nasyrov M, Kuznetsov A, Sukhenko E, Belyakov V. Quantitative phase imaging of cellular and subcellular structures for non-invasive screening diagnostics of socially significant diseases. Proc. SPIE. 2015;9336:93362K1–4.
22. Adamyantseva LV, editor. Endometriosis: diagnosis, treatment and rehabilitation. Federal clinical treatment guidelines. Moscow; 2013. 65 p.
23. Yerofeyeva LV. Administration of combined contraceptive containing dienogest and ethinyl estradiol for endometriosis. Meditsinskiy sovet. 2016;(2):14–21. Russian.
24. Yarmolinskaya MI, Bezhenar VF. Experience of use of dienogest in combined treatment of endometriosis. Pharmateca. 2013;(3):48–51. Russian.
25. Park SY, Kim SH, Chae HD, Kim CH, Kang BM. Efficacy and safety of dienogest in patients with endometriosis: A single-center observational study over 12 months. Clin Exp Reprod Med. 2016;43(4):215–20. doi: 10.5653/term.2016.43.4.215.

Evaluation of the lymphocyte interphase nuclei phenotype by quantitative phase imaging (QPI) in patients with endometrial ovarian cysts

Gasparyan S.A.¹ • Popova O.S.¹ • Vasilenko I.A.² • Khripunova A.A.¹ • Metelin V.B.²

Rationale: Ovarian endometriosis is a progressive disease with growing prevalence and severity. Therefore, the development of robust non-invasive laboratory screening methods for early diagnosis on the out-patient basis seems quite relevant.

Aim: To assess a potential of the quantitative phase imaging technique for early diagnosis of ovarian endometrial cysts and post-operative relapses of the disease. **Materials and methods:** We analyzed 1578 nuclei of the peripheral blood lymphocytes from 82 patients with ovarian endometrial cysts, aged 21 to 37 years (mean age 26.4±3.6 years). The patients were follow-up in a gynecology out-patient clinic (the town of Yessentuki, Russia). Assessments were made longitudinally, i.e., before a laparoscopic cystectomy, at 6 and 12 months in the post-operative period with or without treatment with dienogest-containing agents. Morphological and functional status of the nuclei from the peripheral blood lymphocytes was assessed in the real-time mode by quantitative phase imaging (QPI) with the phase-interference microscopy module of the Bioni hardware and software complex (Westgrade Ltd., Moscow) for clinical and laboratory diagnostics, and the morphodensitometric segmentation technology. **Results:** The comparative analysis of morphometric parameters of CD3⁺ cells taken from peripheral blood of healthy non-pregnant women and patients with ovarian endometrial cysts before surgery showed a significant increase of the calculated functional activities of the lymphocyte nuclei (0.898 vs 0.783, p<0.05). Assessment of changes over time in the differential diagnostic criteria of the nuclear response in the peripheral blood lymphocytes from patients with endometrial ovarian cysts showed the following. Compared to the parameters

obtained before treatment, at 6 and 12 months of the post-operative period the relative intensity of nuclear segments (ΔI) decreased by 10.3 and 14.7, 10.6 and 12.9% in the group treated with and without dienogest, respectively. Relative distance between the centers of the nuclear segments (ΔL) demonstrated a trend towards an increase by 0.6 and 0.9, 4.2 and 2.1%. The numbers of nuclear segments increased by 18.3 and 13.4, 27.4 and 16.9%, whereas the nuclear perimeter decreased by 13.9 and 12.6, 11.9 and 7.8%, respectively. In the patients treated with dienogest, the rate of non-relapse at 6 and 12 months of the follow-up was 100%, whereas in the patients without dienogest therapy, 97.5 and 93.5%, respectively. **Discussion:** Interphase chromatin is a unique biosensor of the early abnormalities in a lymphoid cell. Modification of its structure and packaging density not only indicate changes of the morphofunctional status of the lymphocyte, but can be projected to the body as a whole and used for early pre-clinical diagnosis, assessment of severity of the pathological process and prediction of the outcome in various critical states. **Conclusion:** Practical implementation of QPI for clinical monitoring of patients with ovarian endometrial cysts makes it possible to obtain important information on the cell immunity in real time. It opens new opportunities to assess the efficacy of treatment and rehabilitation activities, as well as for early pre-clinical diagnosis of relapsing disease.

Key words: interphase nucleus phenotype, nuclear architecture, chromatin, chromatin territories, phase-interference microscopy, clinical monitoring, endometrial ovarian cysts

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117

Gasparyan Susanna A. – MD, PhD, Professor, Chair of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Additional Professional Education¹

Popova Olga S. – Postgraduate Student, Chair of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Additional Professional Education¹

Vasilenko Irina A. – MD, PhD, Professor, Dean, Faculty of Mathematics, Mathematical Biology and Bioinformatics²

✉ 33/1 Sadovnicheskaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 951 54 97. E-mail: vasilenko0604@gmail.com

Khripunova Alesya A. – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Public Health, Healthcare Organization and Medical Informatics¹

Metelin Vladislav B. – PhD (in Biology), Associate Professor, Chair of Mathematical Biology, Bioinformatics and Biotechnologies²

¹ Stavropol State Medical University; 310 Mira ul., Stavropol, 355017, Russian Federation

² Russian State University named after A.N. Kosygin (Technologies. Design. Art); 33/1 Sadovnicheskaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation



Себорейный кератоз: клинические особенности и ассоциация с вирусом папилломы человека рода β

Пискалова Т.П.¹ • Костенко Е.И.² • Телешева Л.Ф.³

Актуальность. Себорейный кератоз – распространенная доброкачественная опухоль с неясной этиологией. **Цель** – изучить ассоциации клинических особенностей себорейного кератоза и его течения с количественными показателями вируса папилломы человека (ВПЧ) рода β . **Материал и методы.** Основную группу составил 91 больной себорейным кератозом (29 мужчин и 62 женщины) в возрасте от 40 до 75 лет (средний возраст $59,2 \pm 6,4$ года), контрольную – 30 условно здоровых человек в возрасте от 40 до 70 лет (средний возраст $57,6 \pm 4,1$ года). Диагноз себорейного кератоза подтвержден дерматоскопически и патоморфологически с идентифицированным акантоцитическим подтипом заболевания (в 100% случаев). Определение ВПЧ проводили методом полимеразной цепной реакции с гибридазацией-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием трех систем

олигонуклеотидов: для детекции ВПЧ $\beta 1$ (типы 5, 8, 12, 14, 19, 21, 25, 36, 47), $\beta 2$ (типы 9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80) и $\beta 3$ (типы 49, 75, 76). **Результаты.** Клинически наиболее часто выявлена пятнисто-папулезная форма себорейного кератоза (у 61 пациента из 91, 67%) с преимущественной локализацией в области головы, шеи, передней и задней поверхности туловища. В общей группе больных ВПЧ рода β встречался в 88,8% (у 24 из 27 пациентов) биоптатов себорейного кератоза ($p=0,04$) и в 66,6% (18 из 27) биоптатов здоровых тканей у тех же больных ($p=0,04$), что статистически значимо выше показателя ВПЧ-контаминации среди здоровых людей (28,7%, $p=0,02$). В опухолях у больных себорейным кератозом чаще регистрировали микст-ассоциацию ВПЧ рода β – у 21 (83,3%) из 24 ВПЧ-позитивных пациентов (различия статистически значимы в сравнении с контролем, $p=0,00001$). Максимальная (значимая) вирусная нагрузка

отмечена в группе больных себорейным кератозом с количеством пролиферативных очагов 10 и более (от $4,08 \pm 0,3 \lg/10^5$ до $5,7 \pm 0,3 \lg/10^5$). **Заключение.** Для пятнисто-папулезной формы себорейного кератоза характерна микст-инфекция ВПЧ $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, выявляемая в 77,7% случаев вне зависимости от количества очагов патологического роста. Предположительно, при одновременном наличии ВПЧ видов $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ возникает множественный себорейный кератоз (число очагов более 10) и велика вероятность появления новых очагов себорейного кератоза на неизменной коже.

Ключевые слова: себорейный кератоз, клинические особенности, вирус папилломы человека рода β , полимеразная цепная реакция

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-118-126

Эпителиальные опухоли кожи относятся к часто встречающимся новообразованиям человека, на их долю приходится от 20–24,9 до 55,4–61,7% случаев обращений по поводу кожных новообразований [1]. В нашей стране данные об эпидемиологии себорейного кератоза крайне малочисленны [2], что связано с рядом причин.

Во-первых, анализ статистических данных и публикаций в научной литературе затрудняет наличие множества синонимов заболевания: себорейная бородавка, себорейная кератома, старческая бородавка, базальноклеточная папиллома, пигментированная эпителиома, пигментированная папиллома, себорейная акантома, пигментированная базальноклеточная эпителиома,



старческая папиллома и др. Во-вторых, несмотря на то что эта доброкачественная опухоль была впервые упомянута S. Pollitzer еще в конце XIX века (1890) [3], ее детальное описание Д.И. Головиным сделано сравнительно недавно – в 1958 г. [4]. И в-третьих, до настоящего времени этиология данного пролиферативного процесса на коже не ясна. Согласно международной гистологической классификации опухолей кожи «Патология и генетика опухолей кожи», опубликованной под эгидой Международного агентства по изучению рака (Pathology and Genetics of Skin Tumors, 2005) [5], себорейный кератоз относится к доброкачественным эпителиальным опухолям и является разновидностью акантом. Заболевание практически одинаково поражает мужчин и женщин, преимущественно старше 40 лет [2, 6, 7]. Установлена четкая корреляция его дебюта с возрастом. Так, в когорте 24–49-летних распространенность себорейного кератоза составила 38%, 50–59-летних – 69%, 60–69-летних – 86%, а среди 70–79-летних – более 90% [7–10]. Заболевание чрезвычайно распространено в странах с высоким уровнем инсоляции, например, в Австралии, где у населения старше 50 лет оно встречается в 100% случаев. При этом максимальное скопление патологических элементов себорейного кератоза отмечается на открытых участках кожи, подвергающихся интенсивному воздействию инсоляции [11]. Европейские исследования указывают на несколько меньшую частоту встречаемости этой эпителиальной опухоли: 82% среди мужчин и 62% среди женщин в возрасте более 70 лет [8].

Отечественные исследователи [2, 12–16] указывают на наибольшую пораженность закрытых участков кожи, подверженных механическому воздействию (трению, давлению). У больных с многочисленными элементами себорейного кератоза нередко регистрируют положительный семейный анамнез [6, 10]. Себорейный кератоз представлен множественными очагами пролиферативного роста [17]. Проведение дерматоскопического и гистологического исследования обязательно для верификации диагноза [18, 19, 20].

Одним из ключевых факторов, способствующих активации пролиферативных процессов в коже с последующим развитием новообразований различной природы, признано инфицирование клеток кожи вирусом папилломы человека (ВПЧ) [15, 21]. Определенные характерные фрагменты ВПЧ подавляют активность гена *p53* кератиноцитов, что приводит к неконтролируемой пролиферации кератиноцитов. Показана значимость некоторых типов ВПЧ в развитии

Писклакова Татьяна Павловна – д-р мед. наук, профессор¹
✉ 454135, г. Челябинск, ул. Южный бульвар, 6–188, Российская Федерация.
Тел.: +7 (902) 892 13 07.
E-mail: pisklakova@mail.ru

Костенко Елена Игоревна – врач-дерматовенеролог, заведующая кожным отделением²

Телешева Лариса Федоровна – д-р мед. наук, профессор, проректор по научной, инновационной и международной работе³

ряда новообразований кожи [16]. Более точным индикатором пролиферации, выявляющим клетки, находящиеся в процессе подготовки к делению, в S-фазе клеточного цикла, признан белок PCNA. Данные о том, что S-фаза в клетках, пораженных ВПЧ, более продолжительна (от 18 до 20 часов), чем S-фаза в нормальных кератиноцитах эпидермиса (16 часов), подтверждены иммуногистохимическими исследованиями. ВПЧ поражает исключительно эпителиальные клетки, его репликация происходит в базальном слое эпидермиса, тогда как экспрессия белков и непосредственная сборка вируса осуществляются в ростковой зоне, клетках шиповатого и зернистого слоев эпидермиса [21]. Хронизация папилломавирусной инфекции возникает при поражении кератиноцитов базального слоя эпидермиса. ВПЧ обнаружен как в эпителиальных опухолях кожи [15, 22–26], так и при трансформации себорейного кератоза в злокачественные новообразования кожи [27, 28]. Выявляемость папилломавирусов составляет от 50 до 75% при себорейном кератозе, от 33 до 80% – при базальноклеточном раке, от 27 до 81% – при плоскоклеточном раке, от 33 до 93% – при актиническом кератозе и от 40 до 90% – при псориазе [29]. Несмотря на распространенность себорейного кератоза, многие аспекты этиологии остаются недостаточно изученными, в том числе не решен вопрос о роли ВПЧ в развитии заболевания, что определяет актуальность настоящей работы.

Цель исследования – изучить ассоциации клинических особенностей себорейного кератоза и его течения с количественными показателями ВПЧ рода β . В этой связи сформулированы следующие задачи: выявить клинические особенности себорейного кератоза; изучить частоту обнаружения ВПЧ рода β у больных себорейным кератозом как в самих опухолях, так и в здоровой коже; определить вирусную нагрузку в зависимости от количества патологических элементов.

Материал и методы

Основную группу составил 91 пациент с себорейным кератозом в возрасте от 40 до 75 лет (средний возраст $59,2 \pm 6,4$), из них 62 (68,2%) женщины и 29 (31,8%) мужчин. До начала исследования все пациенты подписали информированное согласие на участие в нем. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» (протокол № 11 от 17.11.2016). При обнаружении у больных клинических проявлений себорейного кератоза

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет); 454080, г. Челябинск, просп. В.И. Ленина, 76, Российская Федерация

² ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 3»; 454031, г. Челябинск, ул. Жукова, 35, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, Российская Федерация

диагноз подтверждался с использованием дерматоскопа HEINE 20 (Германия). В случае наличия основных дерматоскопических признаков себорейного кератоза (церебриформная структура, структура по типу отпечатков пальца, комедоноподобные отверстия, милиоподобные кисты, сосуды по типу шпилек, «изъеденный молью» край) проводили патоморфологический анализ. Во всех биоптатах ($n=91$) был идентифицирован акантоцитический подтип себорейного кератоза.

Согласно клиническим критериям все пациенты были разделены на три группы: в 1-ю вошли 18 человек с пятнистой формой себорейного кератоза, во 2-ю – 12 с папулезной и в 3-ю – 61 пациент с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза.

Контрольную группу составили 30 условно здоровых человек в возрасте от 40 до 70 лет (средний возраст $57,6 \pm 4,1$ года), обратившихся в ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 3» (Челябинск) для профилактического осмотра. Критериями включения в контрольную группу были наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании; отсутствие при осмотре жалоб, связанных с кожей, доброкачественных и злокачественных опухолей кожи, кожных и венерических заболеваний; отсутствие в анамнезе онкологической патологии; отсутствие соматической патологии в стадии обострения; отсутствие перенесенных острых инфекционных и вирусных заболеваний в течение шести недель, предшествовавших проведению исследования; отсутствие заболеваний крови, лимфопролиферативных заболеваний; отсутствие аллергических и аутоиммунных заболеваний. Отбор проводился «методом конвертов».

Для обследования участников исследования применялись общеклинические, морфологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Определение ВПЧ проводили методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, что позволило определить абсолютное количество геномов ВПЧ рода β и ДНК человека в пробе. Для выявления ДНК ВПЧ рода β были использованы три системы олигонуклеотидов: для детекции ВПЧ рода $\beta 1$ (типы 5, 8, 12, 14, 19, 21, 25, 36, 47), $\beta 2$ (типы 9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80) и $\beta 3$ (типы 49, 75, 76). Материалом для молекулярно-биологического исследования послужили биоптаты кожи 27 пациентов с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза и 7 человек из контрольной группы. Биоптаты размером $0,2 \times 0,2$ см были получены с помощью

метода соскоба или малоинвазивной модификации взятия биопсии бритвенным способом. Метод соскоба использовали для взятия материала как с пораженных, так и здоровых участков кожи больных себорейным кератозом. Забор клеток с непораженной (здоровой) кожи пациентов с себорейным кератозом осуществляли с внутренней поверхности средней трети правого плеча.

Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Статистическую значимость различий оценивали по U-критерию Манна – Уитни и критерию Фишера. Корреляционный анализ выполнен с помощью программы Statistica for Windows 6.0., непараметрических корреляций Спирмена. Для выделения значимых коэффициентов корреляции был выбран уровень значимости, принятый для медико-биологических исследований ($p < 0,05$). Математическую обработку данных проводили с помощью программы документации для метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Результаты

Проявления себорейного кератоза на коже можно описать как пятна, папулы либо комбинацию этих первичных элементов. Как следствие, выделяют пятнистую, папулезную или пятнисто-папулезную формы заболевания. У 18 (19,8%) наших пациентов диагностирована пятнистая форма, у 12 (13,2%) – папулезная, у 61 (67%) – пятнисто-папулезная (табл. 1). Статистически значимых различий по параметру среднего возраста между группами, выделенными в зависимости от клинической формы себорейного кератоза, не выявлено. Что касается распределения больных по фототипам кожи (классификация Т. Фитцпатрика), наибольшую долю составил II фототип (56%), характеризующийся генетически обусловленной гипофункцией меланоцитов кожи и высокой ее чувствительностью к ультрафиолетовому излучению (280–320 нм) (рисунок). Несколько реже определялся III фототип, более устойчивый к солнечному излучению. При сравнении встречаемости фототипов в зависимости от клинической формы себорейного кератоза оказалось: большая частота встречаемости характерна для II фототипа ($p=0,05$) при папулезной форме и III фототипа ($p=0,02$) при пятнисто-папулезной форме.

При себорейном кератозе обычно сначала появляются 1–2 очага. Больные их не замечают

**Таблица 1.** Характеристика пациентов и клинические особенности себорейного кератоза

Параметр	Клиническая форма себорейного кератоза			p (критерий Фишера)
	пятнистая (группа 1, n=18)	папулезная (группа 2, n=12)	пятнисто-папулезная (группа 3, n=61)	
Возраст пациентов, годы	54,4±4,5	56,4±6,4	62,4±6,1	> 0,05
Возраст появления себорейного кератоза, годы	52,3±4,6	55,8±5,6	56,8±4,3	
Фототипы кожи пациентов по Фитцпатрику, абс. (%)				
II фототип	8 (44,4)	9 (75)	34 (55,7)	
III фототип	7 (38,9)	3 (25)	25 (41)	
IV фототип	3 (16,7)		2 (3,3)	
Количество очагов, абс. (%)				
от 1 до 10	4 (22,2)	2 (16,7)	15 (24,5)	
от 11 до 50	12 (66,7)	7 (58,3)	27 (44,3)	
более 50	2 (11,1)	3 (25)	19 (31,2)	
Локализация элементов, абс. (%)				
область головы и шеи	9 (50)	10 (83,3)	60 (98,3)	0,0011–3
передняя поверхность туловища, включая аксиллярную зону	11 (61,1)	4 (33,3)	50 (81,9)	0,0012–3
задняя поверхность туловища, включая ягодичную область	5 (27,7)	3 (25)	46 (75,4)	
верхние конечности	3 (16,6)		36 (59,01)	0,0011–3
нижние конечности			21 (34,4)	
Средние размеры себорейного кератоза, см	1,2±0,2	0,92±0,12	0,87±0,13	

месяцами, иногда годами. Постепенно количество элементов увеличивается. На стадии обращения к дерматологу или косметологу заболевание представляет собой, как правило, патологический процесс на коже, проявляющийся множественными пролиферативными очагами. Клинически себорейный кератоз выглядит как множественные опухоли, которые могут быть на различных участках тела пациента. У 91 пациента, включенного в наше исследование, количество очагов себорейного кератоза варьировало от 2 до 267. Учитывая, что увеличение количества

очагов связано с длительностью патологического процесса на коже, мы распределили пациентов по 3 группам: I группу составили пациенты, у которых отмечено от 1 до 10 патологических элементов, II группу – от 11 до 50 и III группу – более 50 (см. табл. 1). В группе с пятнистой формой заболевания $\frac{2}{3}$ пациентов имели от 11 до 50 себорейных кератом. Максимальное количество патологических элементов зафиксировано у 4 пациентов с пятнисто-папулезной формой заболевания (в среднем $132,4 \pm 14,2$ элемента). Возраст начала заболевания колебался от 39 до 75 лет. Средний возраст появления первых элементов себорейного кератоза в общей группе составил $54,5 \pm 7,4$ года. После 50 лет себорейный кератоз дебютировал у 67 (80,7%) человек. При всех клинических формах к наиболее пораженным зонам можно отнести область головы, шеи, передней



Пациентка А.Б.Д., 63 года, обратилась на осмотр к дерматологу в День диагностики меланомы (Melanoma Awareness Day). Отмечает появление пигментных пятен на коже туловища в течение 20 лет, субъективные ощущения при этом отсутствуют. При осмотре на коже спины и передней поверхности грудной клетки выявлено 37 очагов себорейного кератоза в виде серых округлой или овальной формы пятен (размером от 3 до 6 мм) и неправильной формы серых, серо-коричневых, светло-коричневых, коричневых папул от 5 до 15 мм с четкими границами. Установлен диагноз: «пятнисто-папулезный себорейный кератоз (группа пациентов с количеством очагов от 11 до 50). II фототип по Фитцпатрику». Дерматоскопически и гистологически диагноз себорейного кератоза подтвержден. Больная включена в исследование (группа пациентов с пятнисто-папулезным типом высыпаний в количестве от 11 до 50 элементов на коже). В биоптате себорейного кератоза идентифицирован только вирус папилломы человека (ВПЧ) рода $\beta 3$; вирусная нагрузка $\beta 3$ составила $4,1 \text{ Ig}/10^5$ в очаге себорейного кератоза; в биоптате здоровой кожи ВПЧ не обнаружен

**Таблица 2.** Доля пациентов с выявленным вирусом папилломы человека рода β

ВПЧ* / ВПЧ	Пациенты с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза (n = 27), абс. (%)		Контроль (n = 7), абс. (%)	p (U-критерий Манна – Уитни)
	кожа с патологического участка (СК)	кожа со здорового участка (З)		
ВПЧ+	24 (88,8)	18 (66,6)	2 (28,5)	$p_{СК-К} = 0,0003$ $p_{З-К} = 0,0001$ $p_{СК-З} = 0,04$
ВПЧ-	3 (11,1)	9 (33,3)	5 (71,4)	$p_{СК-З} = 0,01$ $p_{З-К} = 0,02$
p (критерий Фишера)	0,0001	0,01	0,1	

ВПЧ+ – пациенты с положительным анализом на вирус папилломы человека, ВПЧ- – пациенты с отрицательным анализом на вирус папилломы человека

и задней поверхности туловища. При пятнисто-папулезной форме в отличие от пятнистой чаще поражалась область головы, шеи ($p = 0,0001$) и верхние конечности ($p = 0,001$). Папулезная форма по сравнению с пятнисто-папулезной чаще локализовалась на передней поверхности туловища ($p = 0,001$). Размеры себорейных кератом у одного и того же пациента могли варьировать от 0,3 до 1,5 см, в среднем – 0,8–1 см.

Согласно задачам исследования, далее проведена детекция ВПЧ рода β в клетках 54 биоптатов кожи 27 (44,2%) из 61 больного с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза и у 7 (23,3%) из 30 условно здоровых человек контрольной группы. В биопсийном материале пораженной кожи ВПЧ $\beta 1$ выявлен у 22 (81,5%) человек, $\beta 2$ – у 21 (77,8%), $\beta 3$ – у 22 (81,5%). Сочетанное поражение ВПЧ $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ обнаружено у 20 (74,1%) пациентов, ВПЧ $\beta 1$, $\beta 3$ – у 1 (3,7%). Моноинфекция определена у 3 пациентов – соответственно ВПЧ $\beta 1$, ВПЧ $\beta 2$ и ВПЧ $\beta 3$. Среди биоптатов пораженной кожи у 3 (11,1%) человек ВПЧ не был идентифицирован. В биопсийном материале здоровой кожи этих же пациентов с себорейным кератозом ВПЧ $\beta 1$ выявлен в 13 (48,1%) наблюдениях, ВПЧ $\beta 2$ – в 15 (55,6%), ВПЧ $\beta 3$ – в 11 (40,7%). Сочетанное поражение ВПЧ $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ установлено у 10 (37,1%) пациентов, ВПЧ $\beta 1$, $\beta 2$ – в 1 (3,7%) случае, моноинфекция ВПЧ $\beta 1$ определена у 2 (7,4%), ВПЧ $\beta 2$ – у 4 (14,8%), ВПЧ $\beta 3$ – у 1 (3,7%) больного. Среди биоптатов здоровой кожи пациентов с себорейным кератозом у 9 (33,3%) человек ВПЧ идентифицирован не был. Полученные данные указывают на высокую инвазию ВПЧ – 88,8% – в пораженные участки кожи (табл. 2). В контрольной группе ВПЧ-негативными оказались 5 из 7 человек; в 1 биоптате клинически здоровой кожи обнаружен ВПЧ $\beta 2$. Еще у 1 (14,3%) человека из этой группы выявлено микст-инфицирование ВПЧ $\beta 1$, $\beta 2$.

Таким образом, ВПЧ обнаружен в очаге себорейного кератоза у подавляющего большинства (88,8%) пациентов с пятнисто-папулезной формой заболевания, при этом различия с контрольной группой были статистически значимы ($p = 0,0003$). В здоровом участке кожи у этих же пациентов ВПЧ выявлен в 66,6%, что также статистически значимо отличается от показателя инфицирования кожи здорового человека – 28,5% ($p = 0,0001$). Здоровые люди из контрольной группы оказались в основном ВПЧ-негативными (в 71,4% случаев), что статистически значимо отличается от количества негативных образцов, взятых со здоровой кожи пациентов с себорейным кератозом ($p = 0,02$).

Кроме того, в группе пациентов с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза из 24 ВПЧ-положительных пациентов у 21 преобладает микст-инфицирование (77,7% из всех обследованных на ВПЧ), что является статистически значимым в сравнении с группой контроля ($p = 0,00001$); моноинфицирование ВПЧ зарегистрировано у 3 (11,1%) больных (табл. 3). У пациентов с себорейным кератозом и наличием микст-инфекции вирус статистически значимо чаще выявлялся в биоптатах, взятых с патологического участка (21 пациент), чем в здоровой коже ($p = 0,01$). Показатели моно- и микст-инфицирования в образцах кожи, взятой со здорового участка больных себорейным кератозом, статистически значимо не различались ($p = 0,15$). Среди моноинфицированных пациентов с пятнисто-папулезной формой заболевания вирус чаще определялся в образцах кожи, взятой со здорового участка ($p = 0,001$).

Как видно из данных табл. 4, частота встречаемости микст-инфицирования ВПЧ рода β преобладала во всех группах пациентов независимо от количества патологических элементов на коже.

**Таблица 3.** Доля пациентов с моно- и микст-инфекцией вирусом папилломы человека рода β

ВПЧ рода β (моно/микст)	Пациенты с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза (n = 27), абс. (%)		Контроль (n = 7), абс. (%)	p (U-критерий Манна – Уитни)
	кожа с патологического участка (СК)	кожа со здорового участка (З)		
Моноинфекция ВПЧ	3 (11,1)	7 (25,9)	1 (14,2)	$p_{СК-К} = 0,001$
Микст-инфекция ВПЧ	21 (77,7)	11 (40,7)	1 (14,2)	$p_{СК-З} = 0,00001$ $p_{СК-К} = 0,01$ $p_{З-К} = 0,0001$
p (критерий Фишера)	0,00001	0,15	–	

ВПЧ – вирус папилломы человека

Таблица 4. Доля пациентов с себорейным кератозом с моно- и микст-инфекцией вирусом папилломы человека в зависимости от числа патологических элементов на коже

ВПЧ рода β (моно/микст)	Группа I (количество очагов от 1 до 10, n = 4), абс. (%)		Группа II (количество очагов от 11 до 50, n = 7), абс. (%)		Группа III (количество очагов более 50, n = 16), абс. (%)		Контроль (n = 7), абс. (%)
	кожа с патологического участка	кожа со здорового участка	кожа с патологического участка	кожа со здорового участка	кожа с патологического участка	кожа со здорового участка	
Моноинфекция ВПЧ	0 (0)	0 (0)	2 (28,75)	2 (28,75)	1 (6,25)	5 (31,25)	1 (14,2)
Микст-инфекция ВПЧ	3 (75)	2 (50)	5 (71,4)	3 (42,8)	13 (81,25)	6 (37,5)	1 (14,2)

ВПЧ – вирус папилломы человека

При этом оказалось, что моноинфицирование ВПЧ клеток со здорового и патологически измененного образцов кожи в группе II (количество очагов от 11 до 50) было равным в процентном отношении. В группе с максимальным количеством себорейных кератом (более 50) микст-инфицирование преобладало в биоптатах, взятых с патологически измененного участка кожи. Отметим, что во всех образцах клеток кожи, взятых с патологически измененных участков, доминировало выявление сочетания всех трех генотипов ВПЧ β с различными групповыми олигонуклеотидами (1, 2, 3). Частота встречаемости моно- и микст-инфицирования у здоровых людей была одинаковой – по 1 случаю.

В группе с наименьшим количеством элементов на коже (количество очагов от 1 до 10) преобладала микст-ассоциация ВПЧ видами $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, на что указывает наличие 75% уровня инфицированности каждым из указанных вирусов (табл. 5). Аналогичная картина наблюдалась и в других изучаемых группах. Показательно, что в группе III в отношении распределения ВПЧ $\beta 2$ установлена самая большая частота инфицированности.

Показатели вирусной нагрузки, определенные в патологически измененных образцах кожи,

статистически значимо росли в зависимости от количества патологических элементов на коже – с $3,02 \pm 0,3$ до $5,7 \pm 0,3$ $\lg/10^5$ (табл. 6). Средние значения вирусной нагрузки клеток кожи со здорового участка кожи значимо не различались, составив от $2,7 \pm 1,6$ до $3,1 \pm 1,1$ $\lg/10^5$.

Обсуждение

Себорейный кератоз – наиболее частая доброкачественная опухоль кожи в разных регионах мира [1, 7, 17]. Средний возраст больных себорейным кератозом в нашем исследовании соответствует аналогичным данным других авторов [1, 2, 7]. Нам не встретились работы, в которых бы проводились исследования себорейного кератоза по отдельным клиническим группам, выделенным по формам его проявлений (пятнистая, папулезная или пятнисто-папулезная). Выделение трех групп больных себорейным кератозом позволило нам установить, что преобладающей формой заболевания является пятнисто-папулезная с гистологическим акантотическим типом. Она и была выделена для дальнейших исследований на ВПЧ.

По данным А.Ю. Кладовой и соавт. [15], при себорейном кератозе ВПЧ рода β встречается в 75% случаев, при этом в 66% выявлены 2 и более

**Таблица 5.** Доля пациентов в группах с различным числом элементов себорейного кератоза и вирусом папилломы человека рода β 1, β 2, β 3

Вид ВПЧ	Группа I (количество очагов от 1 до 10, n=4), абс. (%)	Группа II (количество очагов от 11 до 50, n=7), абс. (%)	Группа III (количество очагов более 50, n=16), абс. (%)	<i>p</i> (критерий Фишера)
ВПЧ β 1	3 (75)	6 (85,7)	13 (81,25)	$p_{I-III}=0,003$
ВПЧ β 2	3 (75)	5 (71,4)	14 (87,5)	$p_{I-III}=0,0007$
ВПЧ β 3	3 (75)	6 (85,7)	13 (81,25)	$p_{I-III}=0,003$

ВПЧ – вирус папилломы человека

Таблица 6. Показатели вирусной нагрузки у ВПЧ-позитивных пациентов с разным количеством элементов на коже, $\lg/10^5$

Группа пациентов	ВПЧ-нагрузка с патологического участка	ВПЧ-нагрузка со здорового участка кожи
Группа I (количество очагов от 1 до 10)	$3,02 \pm 0,3$	$2,7 \pm 1,6$
Группа II (количество очагов от 11 до 50)	$4,8 \pm 0,4$	$3,06 \pm 0,7$
Группа III (количество очагов более 50)	$5,7 \pm 0,3$	$3,1 \pm 1,1$
<i>p</i> (U-критерий Манна – Уитни)	$p_{I-II}=0,01$ $p_{I-III}=0,01$ $p_{II-III}=0,01$	

ВПЧ – вирус папилломы человека

подтипов ВПЧ рода β . В нашем исследовании подтверждена высокая частота обнаружения ВПЧ у больных себорейным кератозом – 88,8% ($p=0,003$ в сравнении с контрольной группой) и установлено, что в непораженной коже тех же пациентов ВПЧ встречается в 66,6% (в контрольной группе – в 28,7%). В пораженной коже пациентов с себорейным кератозом в 77,7% определяются все 3 подтипа – ВПЧ β 1, β 2 и β 3. Это позволяет предположить, что при одновременном наличии ВПЧ β 1, β 2, β 3 возникает множественный себорейный кератоз (число очагов более 10) и велика вероятность появления его новых очагов на неизменной коже.

Литература

1. Ламоткин ИА. Клиническая дерматоонкология: атлас. М.: БИНОМ: Лаборатория знаний; 2011. 499 с.
2. Молочков ВА, Киселев ВИ, Рудых ИВ, Щербо СН. Папилломавирусная инфекция: клиника, диагностика, лечение. М.: Студия «Мирада Вива»; 2005. 30 с.
3. Pollitzer S. Die seborrhoische Warze. Monatshefte für praktische Dermatologie. 1890;11:147–55.
4. Головин ДИ. Эпителиальные опухоли кожи (классификация, гистология и гистогенез). Кишинев: Госиздат Молдавии; 1958. 151 с.
5. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press; 2006. 355 p.
6. Hafner C, Vogt T, Landthaler M, Müsebeck J. Somatic FGFR3 and PIK3CA mutations are present in familial seborrhoic keratosis. Br J Dermatol. 2008;159(1):214–7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08626.x.
7. Alapatt GF, Sukumar D, Bhat MR. A clinicopathological and dermoscopic correlation of seborrhoic keratosis. Indian J Dermatol. 2016;61(6): 622–7. doi: 10.4103/0019-5154.193667.
8. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN; Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic

В настоящее время при проведении исследований отсутствуют общепринятые критерии формирования групп больных себорейным кератозом. В частности, J.M. Jackson и соавт. выделяли две группы по количеству опухолей – менее 15 и более 15 [17]. В своей работе мы первоначально разделили пациентов на 3 группы – до 10, от 11 до 50 и более 50 себорейных кератом. Результаты исследования вирусной нагрузки показали, что целесообразно вычленять две группы: до 10 и более 11 патологических элементов себорейного кератоза.

Выводы

1. У пациентов с себорейным кератозом наиболее часто выявляется пятнисто-папулезная клиническая форма (67%) с гистологически верифицированным акантотическим типом (100%) опухоли; средний возраст появления себорейного кератоза на коже у пациентов в нашем исследовании составил $54,5 \pm 7,4$ года.
2. Наибольшее количество кератом (более 50) характерно для пятнисто-папулезной формы заболевания; излюбленной локализацией опухолей являются область головы, шеи, передней и задней поверхности туловища.
3. У больных с пятнисто-папулезной формой себорейного кератоза ВПЧ рода β встречается в биоптатах пораженных клеток в 88,8% ($p=0,003$ в сравнении с контрольной группой); в здоровых тканях тех же больных – в 66,6%, что статистически значимо выше наличия ВПЧ в коже условно здоровых людей – 28,7% ($p=0,0001$). Для пятнисто-папулезной формы себорейного кератоза характерна микст-инфекция ВПЧ β 1, β 2, β 3, выявляемая в 77,7% случаев вне зависимости от количества очагов патологического роста.
4. Максимальная (значимая) вирусная нагрузка в образцах, взятых с патологически измененных участков кожи, отмечается в группе пациентов с себорейным кератозом, имеющих более 10 очагов, – от $4,08 \pm 0,3$ до $5,7 \pm 0,3 \lg/10^5$. ©



- keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2003;120(6):1087–93. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12246.x.
9. Gill D, Dorevitch A, Marks R. The prevalence of seborrheic keratoses in people aged 15 to 30 years: is the term senile keratosis redundant? *Arch Dermatol.* 2000;136(6):759–62.
 10. Requena L, Kutzner H. Seborrheic keratosis with pseudorosettes and adamantinoid seborrheic keratosis: two new histopathologic variants. *J Cutan Pathol.* 2006;33 Suppl 2:42–5. doi: 10.1111/j.1600-0560.2006.00528.x.
 11. Kwon OS, Hwang EJ, Bae JH, Park HE, Lee JC, Youn JI, Chung JH. Seborrheic keratosis in the Korean males: causative role of sunlight. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19(2):73–80. doi: 10.1034/j.1600-0781.2003.00025.x.
 12. Ламоткин ИА, Малиновский НА. О клинике и лечении себорейного кератоза. *Военно-медицинский журнал.* 2010;331(2):72.
 13. Молочков ВА, Давиденко ЕБ, Зенкевич ЕВ. Случай сочетания вульгарной пузырчатки и гигантского акантолитического себорейного кератоза. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2012;(5):29–32.
 14. Мяделец ОД, Адашкевич ВП. Морфофункциональная дерматология. М.: Медицинская литература; 2006. 752 с.
 15. Кладова АЮ, Кувейда ДА, Молочков ВА, Шипулина АЮ, Киселев ВИ, Хлебникова АН, Козлова ЕС. Встречаемость кожных типов вируса папилломы человека в патологиях кожи. *Альманах клинической медицины.* 2006;9:44–50.
 16. Кладова АЮ, Кувейда ДА, Шипулина АЮ, Киселев ВИ, Молочков ВА. Разработка и апробация количественного метода определения концентрации бета-папилломавирусов в коже. *Молекулярная медицина.* 2007;(4):33–40.
 17. Jackson JM, Alexis A, Berman B, Berson DS, Taylor S, Weiss JS. Current understanding of seborrheic keratosis: prevalence, etiology, clinical presentation, diagnosis, and management. *J Drugs Dermatol.* 2015;14(10):1119–25.
 18. Squillace L, Cappello M, Longo C, Moscarella E, Alfano R, Argenziano G. Unusual dermoscopic patterns of seborrheic keratosis. *Dermatology.* 2016;232(2):198–202. doi: 10.1159/000442439.
 19. Roh NK, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Clinical and histopathological investigation of seborrheic keratosis. *Ann Dermatol.* 2016;28(2):152–8. doi: 10.5021/ad.2016.28.2.152.
 20. Duque MI, Jordan JR, Fleischer AB Jr, Williford PM, Feldman SR, Teuschler H, Chen GJ. Frequency of seborrheic keratosis biopsies in the United States: a benchmark of skin lesion care quality and cost effectiveness. *Dermatol Surg.* 2003;29(8):796–801. doi: 10.1046/j.1524-4725.2003.29211.x.
 21. Кравец НВ. Клинико-иммунологические особенности папиллом кожи, ассоциированных с суперинвазивным описторхозом. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2012;(3):4–7.
 22. Белоусова ТА, Горячкина МВ. Папилломавирусная инфекция кожи и слизистых оболочек. *Фарматека.* 2010;(1):32–6.
 23. Файзуллина ЕВ. Папилломавирусная инфекция: современная точка зрения. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология.* 2011;(1):58–64.
 24. Waterboer T, Neale R, Michael KM, Sehr P, de Koning MN, Weissenborn SJ, Sampogna F, Abeni D, Green AC, Bouwens Bavinck JN, Pawlita M; EPI-HPV-UV-CA Group. Antibody responses to 26 skin human papillomavirus types in the Netherlands, Italy and Australia. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 8):1986–98. doi: 10.1099/vir.0.010637-0.
 25. Рахматулина МР, Нечаева ИА. Иммунотропная терапия детей с папилломавирусной инфекцией препаратом ликолипид. *Вестник дерматологии и венерологии.* 2009;(6):109–12.
 26. Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections – current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):117–24.
 27. Choi HJ, Lee JH. Multiple human papilloma virus 16 infection presenting as various skin lesions. *J Craniofac Surg.* 2016;27(4):e379–81. doi: 10.1097/SCS.0000000000002642.
 28. Wu YH, Hsiao PF, Chen CK. Seborrheic keratosis with bowenoid transformation: the immunohistochemical features and its association with human papillomavirus infection. *Am J Dermatopathol.* 2015;37(6):462–8. doi: 10.1097/DAD.0000000000000285.
 29. Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, Slu-petzky K, Iftner T, de Villiers EM, Forslund O, Pawlita M, Dillner J. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(1):189–95. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0405.
 30. the Korean males: causative role of sunlight. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19(2):73–80. doi: 10.1034/j.1600-0781.2003.00025.x.
 31. Lamotkin IA, Malinovskiy NA. Revisiting the clinical features and treatment of seborrheic keratosis. *Voенno-meditsinskiy zhurnal.* 2010;331(2):72. Russian.
 32. Molochkov VA, Davidenko EB, Zenkevich EV, Karzanov OV, Kupriyanova AG, Zaidenov VA, Bobrov MA, Chernysh ES. A case with pemphigus vulgaris paralleled by giant acantholytic seborrheic keratosis. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases.* 2012;(5):29–32. Russian.
 33. Myadelets OD, Adaskevich VP. The morphofunctional dermatology. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2006. 752 p. Russian.
 34. Kladova AYU, Kuevda DA, Molochkov VA, Shipulina OYu, Kiselev VI, Khlebnikova AN, Kozlova ES. Prevalence of the skin types of the human papillomavirus in the skin pathology. *Almanac of clinical medicine.* 2006;9:44–50. Russian.

References

1. Lamotkin IA. Clinical dermatooncology: the atlas. Moscow: BINOM: Laboratoriya znaniy; 2011. 499 p. Russian.
2. Molochkov VA, Kiselev VI, Rudykh IV, Shcherbo SN. Papillomavirus infection: clinical manifestation, diagnosis and treatment. Moscow: Studiya "Mirada Viva"; 2005. 30 p. Russian.
3. Pollitzer S. Die seborrhoische Warze. Monatshefte für praktische Dermatologie. 1890;11:147–55.
4. Golovin DI. Epithelial skin tumors (classification, histology and histogenesis). Kishinev: Gosizdat Moldavii; 1958. 151 p. Russian.
5. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press; 2006. 355 p.
6. Hafner C, Vogt T, Landthaler M, Müsebeck J. Somatic FGFR3 and PIK3CA mutations are present in familial seborrheic keratoses. *Br J Dermatol.* 2008;159(1):214–7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08626.x.



16. Kladova AYu, Kuevda DA, Shipulina OYu, Kiselev VI, Molochkov VA. Development and testing of assay for the concentration of beta-papillomaviruses in the skin. *Molecular medicine*. 2007;(4):33–40. Russian.
17. Jackson JM, Alexis A, Berman B, Berson DS, Taylor S, Weiss JS. Current understanding of seborrheic keratosis: prevalence, etiology, clinical presentation, diagnosis, and management. *J Drugs Dermatol*. 2015;14(10):1119–25.
18. Squillace L, Cappello M, Longo C, Moscarella E, Alfano R, Argenziano G. Unusual dermoscopic patterns of seborrheic keratosis. *Dermatology*. 2016;232(2):198–202. doi: 10.1159/000442439.
19. Roh NK, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Clinical and histopathological investigation of seborrheic keratosis. *Ann Dermatol*. 2016;28(2): 152–8. doi: 10.5021/ad.2016.28.2.152.
20. Duque MI, Jordan JR, Fleischer AB Jr, Williford PM, Feldman SR, Teuschler H, Chen GJ. Frequency of seborrheic keratosis biopsies in the United States: a benchmark of skin lesion care quality and cost effectiveness. *Dermatol Surg*. 2003;29(8):796–801. doi: 10.1046/j.1524-4725.2003.29211.x.
21. Kravets NV. Clinical immunological characteristics of skin papillomas associated with superinvasive opisthorchiasis. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*. 2012;(3):4–7. Russian.
22. Belousova T, Goryachkina M. Papillomavirus infection of the skin and mucosae. *Pharmateca*. 2010;(1):32–6. Russian.
23. Faizullina EV. Papillomavirus infection: the present-day point of view. *Experimental and Clinical Dermatocosmetology*. 2011;(1):58–64. Russian.
24. Waterboer T, Neale R, Michael KM, Sehr P, de Koning MN, Weissenborn SJ, Sampogna F, Abeni D, Green AC, Bouwes Bavinck JN, Pawlita M; EPI-HPV-UV-CA Group. Antibody responses to 26 skin human papillomavirus types in the Netherlands, Italy and Australia. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 8):1986–98. doi: 10.1099/vir.0.010637-0.
25. Rakhmatullina MR, Nechayeva IA. Immunotropic therapy with Licopid for children suffering from papilloma viral infection. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2009;(6):109–12. Russian.
26. Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections – current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31): 117–24.
27. Choi HJ, Lee JH. Multiple human papilloma virus 16 infection presenting as various skin lesions. *J Craniofac Surg*. 2016;27(4):e379–81. doi: 10.1097/SCS.0000000000002642.
28. Wu YH, Hsiao PF, Chen CK. Seborrheic keratosis with bowenoid transformation: the immunohistochemical features and its association with human papillomavirus infection. *Am J Dermatopathol*. 2015;37(6):462–8. doi: 10.1097/DAD.0000000000000285.
29. Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, Slu-petzky K, Iftner T, de Villiers EM, Forslund O, Pawlita M, Dillner J. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):189–95. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0405.

Seborrheic keratosis: clinical characteristics and an association with the β -genus human papillomavirus

Pisklakova T.P.¹ • Kostenko E.I.² • Telesheva L.F.³

Background: Seborrheic keratosis is a common benign tumor of unclear etiology. **Aim:** To study associations between clinical characteristics of seborrheic keratosis and its course with quantitative parameters of the β -genus human papillomavirus (β -HPV). **Materials and methods:** The main study group included 91 patients with seborrheic keratosis (29 male and 62 female), aged 40 to 75 years (mean \pm SD, 59.2 \pm 6.4 years). The control group included 30 healthy individuals persons aged 40 to 70 years (mean 57.6 \pm 4.1 years). The diagnosis of seborrheic keratosis was confirmed by dermoscopy and pathomorphological assessment, with 100% of patients having the acanthotic type of seborrheic keratosis. HPV was identified by polymerase chain reaction with hybridization fluorescent detection in real time mode with use of three oligonucleotide systems for detection of HPV genus β 1 (subtypes 5, 8, 12, 14, 19, 21, 25, 36, 47); β 2 (subtypes 9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80), and β 3 (subtypes 49, 75, 76). **Results:** The most frequent clinical type of seborrheic keratosis was the maculopapular one (61/91 patients, 67%) localized mainly on head, neck, anterior and posterior trunk. β -HPV was found in 88.8% biopsy samples taken from the seborrheic keratosis areas in 24 of 27 patients

and in 66.6% biopsy samples taken from the normal skin areas of the same patients ($p=0.04$). This is significantly more frequent that the HPV contamination among healthy individuals, which was 28.7% ($p=0.02$). Mixed association of β -HPV was also more frequent in the HPV-positive patients (21/24, or 83.3%; compared to the control group, $p=0,00001$). The maximal (significant) viral load was found in the subgroup of seborrheic keratosis patients with the number of proliferative lesions of 10 and more ($4.08 \pm 0.3 \lg/10^5$ to $5.7 \pm 0,3 \lg/10^5$). **Conclusion:** The maculopapular type of seborrheic keratosis is characterized by mixed HPV β 1, β 2, β 3 infection found in 77.7% of cases irrespective of the number of proliferative lesions. It could be hypothesized that multiple seborrheic keratosis (more than 10 lesions) develops in simultaneous presence of HPV β 1, β 2, β 3 and is associated with a higher probability of new seborrheic keratosis lesions on intact skin.

Key words: seborrheic keratosis, clinical characteristics, β -genus human papillomavirus, polymerase chain reaction

Pisklakova Tatiana P. – MD, PhD, Professor¹
✉ 6–188 Yuzhny bul'var ul., Chelyabinsk, 454135, Russian Federation. Tel.: +7 (902) 892 13 07.
E-mail: pisklakova@mail.ru

Kostenko Elena I. – MD, Dermatovenerologist, the Head of Skin Department²

Telesheva Larisa F. – MD, PhD, Professor, Vice-rector for Science, Innovation and International Relations³

¹South Ural State University (National Research University); 76 V.I. Lenina prospect, Chelyabinsk, 454080, Russian Federation

²Chelyabinsk Regional Clinical Skin-Venereal Dispensary No. 3; 35 Zhukova ul., Chelyabinsk, 454031, Russian Federation

³South Ural State Medical University; 64 Vorovskogo ul., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation



Фенотипическая характеристика биологических свойств коагулазонегативных стафилококков, выделенных в кардиохирургическом стационаре

Граничная Н.В.^{1,2} • Зайцева Е.А.² • Бондарь В.Ю.³

Актуальность. Значительную часть послеоперационных инфекционных осложнений в сердечно-сосудистой хирургии вызывают стафилококки, при этом возросла роль *Staphylococcus epidermidis*. **Цель** – выявить биологические особенности коагулазонегативных стафилококков, выделенных из различных биотопов в кардиохирургическом стационаре, для оценки их патогенного потенциала. **Материал и методы.** Объектом исследования были изоляты стафилококков ($n=73$), выделенные в кардиохирургическом стационаре в 2015–2016 гг. Биохимическая идентификация культур проводилась с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 compact (BioMérieux, Франция) и тест-систем «Стафи-тест» (ERBA Lachema, Чехия). Биологические свойства стафилококков определялись классическими микробиологическими методами. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения «Микроб-2». **Результаты.** В кардиохирургическом стационаре выявлены *S. aureus* и 6 видов коагулазонегативных стафилококков, среди которых доминировал

S. epidermidis. Больше всего *S. epidermidis* было выделено из послеоперационных ран ($n=16$, $30,8 \pm 6,4\%$) и смывов с поверхностей окружающей пациентов среды ($n=11$, $21,1 \pm 5,7\%$). Все исследуемые *S. epidermidis* ($n=52$) гидролизуют до кислоты без газа мальтозу, не ферментировали глюкозу, трегалозу, не разлагали маннит в аэробных условиях (за исключением стафилококков, выделенных с объектов окружающей среды и у медицинского персонала), у них отсутствовала β -галактозидаза (кроме культур, выделенных из послеоперационных ран). По отношению к лактозе и сахарозе биохимическая активность *S. epidermidis* была переменной. Гемолитической активностью (чаще β -типа) обладали $69,2 \pm 6,4\%$ культур *S. epidermidis*. Большинство культур ($92,4 \pm 3,6\%$) показали протеолитическую активность независимо от вида стафилококка и места выделения. Липолитическая активность чаще наблюдалась у изолятов стафилококков, выделенных из клинического материала (отделяемого дыхательных путей медицинского персонала (9 культур из 10), пациентов (9 из 10 культур)

и послеоперационных ран (16 культур из 20)), чем из объектов внешней среды. Обнаружена прямая статистически значимая связь между липазной активностью и наличием β -галактозидазы ($\phi=0,40$), липазной и протеолитической активностями ($\phi=0,33$), β -галактозидазой и разжижением желатины ($\phi=0,65$), гемолитической и протеолитической активностями ($\phi=0,37$). **Заключение.** Доминирующим микроорганизмом, встречающимся во всех экотопах кардиохирургического стационара, был *S. epidermidis*. Биохимические свойства коагулазонегативных стафилококков и их ферментативная активность, связанная с факторами патогенности, различались в зависимости от места изоляции, что показывает их участие в развитии воспалительного процесса в определенном биотопе.

Ключевые слова: кардиохирургия, инфекционные осложнения, коагулазонегативные стафилококки, *Staphylococcus epidermidis*, факторы патогенности

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-127-132

Несмотря на внедрение новейших технологий в кардиохирургии, остается актуальной проблема послеоперационных инфекционных осложнений [1], в частности инфекции стерильного доступа [2]. Ее основной причиной выступает грамположительная флора. По-прежнему наибольшую значимость имеет *Staphylococcus aureus*, факторы вирулентности которого хорошо изучены [3–5]. Однако в последние годы на лидирующие позиции по высеваемости выходят коагулазонегативные стафилококки [6, 7]. Не обладая столькими факторами патогенности, как *S. aureus*, они играют все большую роль вследствие

широкого использования разнообразных высокоинвазивных медицинских вмешательств [8–10]. Вместе с тем известно, что такие факторы патогенности коагулазонегативных стафилококков, как протеазы, гемолизины, липазы и другие, обеспечивают сохранение этих микроорганизмов не только на кожных покровах, но и в патологических очагах [9]. Именно поэтому для диагностики, профилактики и терапии инфекционных осложнений в сердечно-сосудистой хирургии необходимо проводить определение биологических свойств коагулазонегативных стафилококков, в том числе их патогенного потенциала.



Граничная Надежда Васильевна – врач-бактериолог¹, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии²

Зайцева Елена Александровна – д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии²
✉ 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, Российская Федерация. Тел.: +7 (902) 524 57 20. E-mail: elza200707@mail.ru

Бондарь Владимир Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры хирургии факультета повышения квалификации и постдипломной профессиональной специализации с курсами эндоскопической, пластической и сердечно-сосудистой хирургии³

Цель – выявить биологические особенности коагулазонегативных стафилококков, выделенных из различных биотопов (пациентов, медицинского персонала, объектов окружающей среды) в кардиохирургическом стационаре, для оценки их патогенного потенциала.

Материал и методы

Объектом исследования были 73 изолята стафилококков, выделенные из биологического материала пациентов (20 из послеоперационных ран, 11 из операционных ран, 6 из крови и плевральной жидкости, 10 из отделяемого дыхательных путей), медицинского персонала (n=10), а также из смывов с поверхностей окружающей пациентов среды (n=16) в кардиохирургическом стационаре в 2015–2016 гг. Биохимическая идентификация культур проводилась с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 compact (BioMerieux, Франция) и тест-систем «Стафи-тест» (ERBA Lachema, Чехия). Биологические свойства стафилококков определялись классическими микробиологическими методами.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программного обеспечения «Микроб-2». Из показателей описательной статистики рассчитывали частоту (M) и стандартную ошибку частоты (m, %) в операционной системе Windows 2010 с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0. Оценка степени взаимосвязи проводилась с помощью корреляционного анализа Пирсона (R) с расчетом коэффициента сопряженности (φ) и статистической значимости (p). Сопряженность считается слабой при $0,2 < φ \leq 0,5$, средней – $0,5 < φ \leq 0,7$, сильной – $0,7 < φ \leq 0,9$, очень сильной – $0,9 < φ \leq 1,0$.

Результаты

При бактериологическом исследовании материала были выделены стафилококки семи видов: *S. aureus* (n=9), *S. epidermidis* (n=52), *S. hominis* (n=4), *S. haemolyticus* (n=3), *S. saprophyticus* (n=2), *S. warneri* (n=2), *S. capitis* (n=1). В зависимости от локуса выделения все изоляты были разделены на 6 групп: на культуры, выделенные 1) из послеоперационных ран грудины (стернотомный шов) и сосудов, 2) из операционных ран средостения, сосудов, ложа электрокардиостимуляторов, 3) из крови и плевральной жидкости, 4) из отделяемого дыхательных путей пациентов, 5) из смывов с поверхностей окружающей среды и 6) из слизистого отделяемого носа медицинского персонала.

S. aureus выявлялся из биоматериала пациентов (операционных ран ложа электрокардиости-

муляторов, крови, отделяемого дыхательных путей) и медицинского персонала (слизистой носа). *S. epidermidis* встречался во всех исследуемых биотопах, однако наиболее часто – в послеоперационных ранах (n=16, $30,8 \pm 6,4\%$) и смывах с поверхностей (n=11, $21,1 \pm 5,7\%$). С одинаковой частотой ($13,5 \pm 4,7\%$) *S. epidermidis* обнаруживали в операционных ранах (n=7), отделяемом дыхательных путей пациентов (n=7) и медицинского персонала (n=7).

Два вида коагулазонегативных стафилококков – *S. hominis* и *S. capitis* – выделялись только из биоматериала пациентов (операционных, послеоперационных ран грудины и плевральной жидкости). Вид *S. haemolyticus* обнаружен в отделяемом дыхательных путей и послеоперационной ране грудины пациентов, а также в смывах с поверхностей окружающей пациентов среды. Виды *S. saprophyticus* и *S. warneri* встречались только в смывах с поверхностей.

Изучение биологических свойств стафилококков показало: они были типичными по морфологии (грамположительные кокки), каталазоположительны. Что касается биохимической активности *S. epidermidis* (100% культур), культуры, изолированные из биоматериала пациентов (с 1-й по 4-ю группу), не разлагали маннит в аэробных условиях, за исключением стафилококков, выделенных с объектов окружающей среды и у медицинского персонала. Независимо от локуса выделения все исследуемые *S. epidermidis* (n=52) гидролизуют до кислоты без газа мальтозу, не ферментировали глюкозу, трегалозу, у них отсутствовала β-галактозидаза, кроме культур, выделенных из послеоперационных ран. Маннозу ферментировали *S. epidermidis* (n=21), кроме культур, изолированных из послеоперационных ран, – у них не определялась β-галактозидаза (за исключением 4 культур из этой группы). По отношению к лактозе и сахарозе биохимическая активность *S. epidermidis* была переменной.

Среди других коагулазонегативных стафилококков маннит разлагали *S. capitis* (1 культура), *S. haemolyticus* (2 культуры из 3) и *S. warneri* (обе культуры). При этом обе культуры *S. warneri* ферментировали остальные исследуемые углеводы, и в отличие от других коагулазонегативных стафилококков у них не определялась β-галактозидаза и уреазы.

Способностью редуцировать метиленовую синь в молоке обладали $64,7 \pm 6,6\%$ (n=33) исследованных культур коагулазонегативных стафилококков. Среди различных видов это свойство определялось у $48,1 \pm 6,9\%$ культур *S. epidermidis* (n=25), всех исследуемых культур *S. haemolyticus*, *S. warneri* и *S. capitis*, реже *S. hominis* (1 из 4 культур), а также у большинства *S. aureus* (5 из 6 культур).

¹ ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России (г. Хабаровск); 680009, г. Хабаровск, ул. Краснодарская, 2 В, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России; 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России; 680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35, Российская Федерация



В зависимости от локуса выделения наиболее выраженную способность редуцировать метиленовую синь в молоке показали культуры коагулазонегативных стафилококков, выделенные из послеоперационных ран пациентов ($65,0 \pm 10,9\%$, $n = 13$) и смывов с поверхностей окружающей среды ($54,5 \pm 15,7\%$, $n = 10$), а также стафилококки, изолированные из операционных ран (2 культуры из 2).

Гемолитической активностью (чаще β -типа) обладали $75,0 \pm 5,4\%$ коагулазонегативных стафилококков, из них $69,2 \pm 6,4\%$ культур *S. epidermidis* (таблица). При этом культуры *S. warneri*, выделенные с объектов окружающей среды, имели наиболее выраженную зону просветления (β -гемолиз) на кровяном агаре по сравнению с другими видами коагулазонегативных стафилококков, изолированных из разных локусов.

Липолитическая активность выявлялась у $74,2 \pm 5,5\%$ коагулазонегативных стафилококков, чаще у *S. epidermidis* ($72,5 \pm 6,2\%$), *S. haemolyticus* (у всех исследуемых культур), *S. hominis* (у 3 культур). Из 9 исследуемых культур *S. aureus*, выделенных из различных биотопов, 7 обладали липолитической активностью. При этом липолитическая активность чаще наблюдалась у изолятов стафилококков, выделенных из клинического материала (отделяемого дыхательных путей медицинского персонала (9 культур из 10), пациентов (9 культур из 10) и послеоперационных ран (16 культур из 20)), чем из объектов внешней среды.

При изучении протеолитической активности отметили: коагулазонегативные стафилококки чаще ферментировали молоко ($90,9 \pm 7,3\%$ исследуемых культур) и реже разжижали желатин ($22,8 \pm 7,0\%$ культур) независимо от вида стафилококков и локуса изоляции культур. Среди *S. aureus* также большинство культур чаще ферментировали молоко (8 культур из 9) и реже разжижали желатин (2 культуры из 8).

Обсуждение

Стафилококки – представители нормальной микрофлоры кожи, слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов, обитают в окружающей среде. Они могут вызывать тяжелые гнойно-септические осложнения в хирургических стационарах. В литературе описан и феномен конкурентных взаимоотношений между *S. aureus* и *S. epidermidis*. Известно, что вещества, продуцируемые *S. epidermidis* (аутоиндукторы), блокируют образование токсинов у многих штаммов *S. aureus*, тогда как ферменты, синтезируемые *S. aureus*, не ингибируют пролиферацию *S. epidermidis* [11].

В нашем исследовании в кардиохирургическом стационаре выявлены *S. aureus* и 6 видов коагулазонегативных стафилококков, среди которых доминировал *S. epidermidis* (81,2%). Этот вид стафилококка встречался во всех исследуемых экотопах, чаще в отделяемом послеоперационных ран (80%) и в смывах с объектов окружающей пациента среды (68,7%).

Ферментативная активность стафилококков, связанная с патогенностью

Вид стафилококка	Наличие активности							
	гемолитическая		липолитическая		протеолитическая			
					ферментация молока		ферментация желатины	
	n	абс. (M ± m, %)	n	абс. (M ± m, %)	n	абс. (M ± m, %)	n	абс. (M ± m, %)
Коагулазонегативные стафилококки								
<i>S. epidermidis</i>	52	36 (69,2 ± 6,4)	51	37 (72,5 ± 6,2)	34	32 (94,1 ± 4,04)	27	4 (14,8 ± 6,8)
<i>S. hominis</i>	4	4	3	3	3	3	3	2
<i>S. haemolyticus</i>	3	3	3	3	3	2	2	2
<i>S. capitis</i>	1	1	1	1	1	1	но	но
<i>S. saprophyticus</i>	2	2	2	1	1	0	1	0
<i>S. warneri</i>	2	2	2	1	2	2	2	0
Всего	64	48 (75 ± 5,4)	62	46 (74,2 ± 5,5)	44	40 (90,9 ± 7,3)	35	8 (22,8 ± 7,0)
<i>S. aureus</i>	9	9	9	7	9	9	7	1

В скобках указаны частота (M) и стандартная ошибка частоты (m, %) Но – не определяли

Другими исследователями установлено, что биологические свойства стафилококков, выделенных из клинического материала, могут изменяться в зависимости от биотопа [12]. В нашей работе мы наблюдали различия по биохимической активности у стафилококков в зависимости от локуса изоляции. Например, маннит не ферментировали стафилококки, полученные из биоматериала пациентов, но этим свойством обладали культуры, изолированные с объектов окружающей среды (4 культуры из 16) и у медицинского персонала (5 культур из 10). Отмечались различия в биохимической активности среди разных видов коагулазонегативных стафилококков. При этом большую активность по отношению к углеводам (лактозе и сахарозе) показали культуры *S. epidermidis*, выделенные из операционных, послеоперационных ран (47,8 и 100% соответственно), крови (2 культуры из 5 – к лактозе и 4 культуры из 5 – к сахарозе) и смывов с объектов окружающей среды (72,7%), а также *S. warneri* (изолированные из смывов с объектов окружающей среды).

По нашим данным, культуры *S. epidermidis* (7 культур из 7), изолированные из операционных ран и из крови (4 культуры из 5), ферментируют сахарозу, маннозу и мальтозу, обладают уреазной активностью, тогда как культуры, полученные из послеоперационных ран, расщепляют мальтозу и не гидролизуют сахарозу и маннозу. При этом у *S. epidermidis* выявлена прямая статистически значимая связь между гидролизом маннозы и наличием уреазной активности ($\phi=0,41$, $p=0,0025$), а также обратная статистически значимая связь между ферментацией маннита и сахарозы ($\phi=0,47$, $p=0,0004$), маннита и редукцией метиленовой сини ($\phi=0,43$, $p=0,0015$), маннозы и редукцией метиленовой сини ($\phi=0,36$, $p=0,0093$).

S. aureus считают наиболее вирулентным представителем рода, способным вызывать инфекционные процессы любой локализации. В нашем исследовании культуры *S. aureus*, изолированные из отделяемого дыхательных путей пациентов и медицинского персонала, обладали выраженной биохимической, гемолитической, липазной и протеолитической активностями.

Различные виды стафилококков, в том числе *S. aureus*, продуцируют несколько типов гемолизин, способных разрушать эритроциты и другие эукариотические клетки [13–15]. Самым активным признан α -гемолизин, который при взаимодействии с цитоплазматической мембраной вызывает лизис клетки и чаще обнаруживается у клинических изолятов стафилококков. Другие виды гемолизин менее активны, β -гемолизин

оказывает умеренное действие на эритроциты [13]. В проведенном исследовании у большинства культур стафилококков (85,9 \pm 4,6%), выделенных из разных локусов, выявлен гемолиз β -типа. Гемолитическую активность α -типа показали *S. aureus*, полученные из слизистой носа медицинского персонала, и *S. epidermidis*, изолированные из объектов окружающей среды, реже – операционных, послеоперационных ран и слизистой носа медицинского персонала. При этом у культур *S. epidermidis* установлена прямая статистически значимая связь между гемолитической активностью и ферментацией маннозы ($\phi=0,58$, $p=0,0000$).

Обращают на себя внимание стафилококки вида *S. warneri* с определенной биохимической активностью (разлагали маннит, рамнозу, маннозу) и патогенным потенциалом (ферментировали молоко и не разжижали желатин), показавшие ярко выраженный гемолиз.

Стафилококки, обладающие протеолитической активностью, более агрессивны и, распространяясь в организме, вызывают токсическое повреждение тканей [16]. В нашей работе независимо от вида стафилококка и места выделения большинство исследуемых культур (92,4 \pm 3,6%) характеризовались протеолитической активностью (ферментировали молоко). Установлена прямая статистически значимая связь у *S. epidermidis* между наличием β -галактозидазы и разжижением желатины ($\phi=0,65$, $p=0,0000$), гемолитической активности и ферментацией молока ($\phi=0,37$, $p=0,0065$) и разжижением желатины ($\phi=0,30$, $p=0,0281$), что свидетельствует о важном значении определенных факторов патогенности *S. epidermidis* в развитии воспалительного процесса.

Липаза может быть потенциальным фактором вирулентности микроорганизмов [17, 18]. Липазная активность также выявлялась у большинства (74,6 \pm 5,1%) культур стафилококков, чаще – у *S. epidermidis* (72,5 \pm 6,2%), выделенных из операционных ран (у 5 культур из 7), послеоперационных ран (75,0 \pm 10,8%), отделяемого дыхательных путей пациентов (у 6 из 7 культур) и медицинского персонала (у 6 из 7 культур). Выявлена прямая статистически значимая связь между липазной активностью (ферментация твина 60) и наличием β -галактозидазы ($\phi=0,40$, $p=0,0033$), липазной (ферментация твина 60) и протеолитической (разжижение желатины: $\phi=0,33$, $p=0,0157$) активностями, что говорит о сочетанном воздействии этих факторов у *S. epidermidis* на определенном этапе инфекционного процесса.



Выводы

1. Доминирующим микроорганизмом, встречающимся во всех экотопах кардиохирургического стационара, является *S. epidermidis*.
2. Биохимические свойства стафилококков и их ферментативная активность, связанная с факторами патогенности, различались в зависимости от места изоляции, что показывает их участие в развитии воспалительного процесса в определенном биотопе.

3. Выявленная у *S. epidermidis* статистически значимая связь между липазной активностью и наличием β -галактозидазы, липазной и протеолитической активностями, наличием β -галактозидазы и разжижением желатины, гемолитической и протеолитической активностями указывает на сочетанное действие этих факторов на определенном этапе инфекционного процесса. ©

Литература

1. Казачек ЯВ, Помешкина СА, Барбараш ОЛ. Профилактика инфекционных осложнений в кардиохирургии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2014;(4): 62–9. doi: <http://dx.doi.org/10.17802/2306-1278-2014-4-62-69>.
2. Кузнецов МС, Козлов БН, Насрашвили ГТ, Панфилов ДС, Андриянова АВ, Петлин КА, Шипулин ВМ. Сравнительный анализ результатов применения методик элиминации стерильной инфекции в кардиохирургии. Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2016;(2):51–9.
3. Гостев ВВ, Гончаров АЕ, Грачева МА, Сидоренко СВ. Распространение генов комплекса Immune evasion cluster и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013;(15(4)):270–8.
4. Фалова ОЕ. Особенности лецитиназной активности *Staphylococcus* spp. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013;(8–3):112–3.
5. Чуенко ЭА, Усвятцов БА. Характеристика антикардиозной активности разных видов стафилококков. Вестник Оренбургского государственного университета. 2005;(12):63–5.
6. Tegnell A, Arén C, Ohman L. Coagulase-negative staphylococci and sternal infections after cardiac operation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(4): 1104–9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(99\)01563-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(99)01563-5).
7. Богомолова НС, Большаков ЛВ, Кузнецова СМ, Орешкина ТД. Динамика устойчивости к антибиотикам и частота выделения стафилококков и энтерококков у больных отделения реконструктивной хирургии. Антибиотики и химиотерапия. 2011;56(5–6):37–45.
8. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*. 1994;19(2): 231–43.
9. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*. 2009;134(1–2):45–54. doi: [10.1016/j.vetmic.2008.09.009](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.009).
10. Ishak MA, Gröschel DH, Mandell GL, Wenzel RP. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):1025–9. doi: [0095-1137/85/121025-05502.00/0](http://dx.doi.org/10.1092-05502.00/0).
11. Козлова НС, Баранцевич НЕ, Иванова ЛВ, Гоик ВГ, Шварц АП, Мокрова ЕВ, Баранцевич ЕП. Чувствительность к антибактериальным препаратам стафилококков, циркулирующих в многопрофильном стационаре. Проблемы медицинской микологии. 2015;17(4):58–62.
12. Шаркова ВА, Лайман ЕФ. Генетические маркеры патогенности и антибиотикорезистентности штаммов *S. epidermidis* и *S. aureus*, изолированных из различных биотопов. Дальневосточный медицинский журнал. 2013;(3):28–31.
13. Флуер ФС. Стафилококковые энтеротоксины, их свойства и роль в качестве факторов патогенности. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2012;(2): 99–108.
14. Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK 3rd, Schleimer R, Kern RC. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope*. 2005;115(9):1580–5. doi: [10.1097/01.mlg.0000168111.11802.9c](http://dx.doi.org/10.1097/01.mlg.0000168111.11802.9c).
15. Стукова ЕИ, Кениксфест ЮВ. Патогенетическое значение золотистого стафилококка при атопическом дерматите. Фундаментальные исследования. 2013;(7–3):680–7.
16. Баязитова ЛТ, Тюрин ЮА, Сукманская ЕО, Куликов СН. Фенотипические характеристики кокковой микрофлоры кожи при атопическом дерматите. Практическая медицина. 2007;(4):41–3.
17. Huvenne W, Hellings PW, Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(4): 304–14. doi: [10.1159/000350329](http://dx.doi.org/10.1159/000350329).
18. Коленчукова ОА, Смирнова СВ, Лаптева АМ. Количественный и качественный состав микрофлоры слизистой оболочки носа при полипозном риносинусите. Инфекция и иммунитет. 2016;6(4):366–72. doi: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-366-372>.
1. Kazachek YaV, Pomeshkina SA, Barbarash OL. Prevention of infectious complications in cardiac surgery. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2014;(4):62–9. doi: <http://dx.doi.org/10.17802/2306-1278-2014-4-62-69>. Russian.
2. Kuznetsov MS, Kozlov BN, Nasrashvili GG, Panfilov DS, Andriyanova AV, Petlin KA, Shipulin VM. Methods for elimination of sternal infections in cardiac surgery. Comparative analysis of the outcomes. *Clinical and Experimental Surgery*. Petrovsky Journal. 2016;(2):51–9. Russian.
3. Gostev VV, Goncharov AE, Grachyova MA, Sidorenko SV. Distribution of immune evasion cluster genes and genes encoding other virulence factors among *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;15(4):270–8. Russian.
4. Falova OE. Specifics of the lecithinase activity of *Staphylococcus* spp. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013;(8–3):112–3. Russian.
5. Chuenko EA, Usvyatsova BYa. Characteristic of anticarosine activity of different kinds of *Staphylococcus*. *Vestnik of the Orenburg State University*. 2005;(12):63–5. Russian.
6. Tegnell A, Arén C, Ohman L. Coagulase-negative staphylococci and sternal infections after cardiac operation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(4): 1104–9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(99\)01563-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(99)01563-5).
7. Bogomolova NS, Bolshakov LV, Kuznetsova SM, Oreshkina TD. Antibiotic resistance dynamics and isolation rate of staphylococci and enterococci from patients of reconstructive surgery units. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2011;56(5–6):37–45. Russian.



8. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*. 1994;19(2): 231–43.
9. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*. 2009;134(1–2):45–54. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.009.
10. Ishak MA, Gröschel DH, Mandell GL, Wenzel RP. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):1025–9. doi: 0095-1137/85/121025-05\$02.00/0.
11. Kozlova NS, Barantsevich NE, Ivanova LV, Shvarz AP, Goik VG, Mokrova EV, Barantsevich EP. Susceptibility to antibiotics in nosocomial staphylococci from multidisciplinary hospital. *Problems in medical mycology*. 2015;17(4):58–62. Russian.
12. Sharkova VA, Laiman EF. Pathogenesis genetic markers and antibiotic-resistance of *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from different biotopes. *Far East Medical Journal*. 2013;(3): 28–31. Russian.
13. Fluor FS. Staphylococcus enterotoxins, their properties and role as pathogenicity factors. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2012;(2):99–108. Russian.
14. Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK 3rd, Schleimer R, Kern RC. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope*. 2005;115(9):1580–5. doi: 10.1097/01.mlg.0000168111.11802.9c.
15. Stukova EI, Keniksfest YV. Pathogenic significance of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *Fundamental Research*. 2013;(7–3): 680–7. Russian.
16. Bayazitova LT, Tyurin YuA, Sukmanskaya EO, Kulikov SN. Phenotypic characteristics of the cocci microflora of the skin in atopic dermatitis. *Practical Medicine*. 2007;(4):41–3. Russian.
17. Huvenne W, Hellings PW, Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(4): 304–14. doi: 10.1159/000350329.
18. Kolenchukova OA, Smirnova SV, Lapteva AM. Nasal mucous membrane microflora in patients with polypous rhinosinusitis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(4): 366–72. Russian. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-366-372.

Phenotypic characterization of the biological properties of coagulase-negative staphylococci isolated in a cardiac surgery department

Granichnaya N.V.^{1,2} • Zaitseva E.A.² • Bondar V.Yu.³

Rationale: A significant proportion of post-operative infectious complications in cardiovascular surgery is caused by *Staphylococcus* spp, with an increasing role of *Staphylococcus epidermidis*. **Aim:** To identify biological characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from various biotopes in a cardiac surgery department, in order to assess their pathogenic potential. **Materials and methods:** The study was performed with *Staphylococcus* isolates (n = 73) obtained in a cardiac surgery department in 2015–2016. Biochemical identification of the cultures was done with the use of Vitek 2 compact microbiological analyzer (BioMerieux, France) and test systems Staphytest (ERBA Lachema, Czech Republic). The biological properties of staphylococci were assessed by classical microbiological techniques. Statistical analysis was done with the Microbe-2 software package. **Results:** *S. aureus* and 6 strains of coagulase-negative staphylococci with predominance of *S. epidermidis* were isolated in the department of cardiac surgery. In most cases *S. epidermidis* was isolated from post-operative wounds (n = 16, 30.8 ± 6.4%) and environmental swabs (n = 11, 21.1 ± 5.7%). All *S. epidermidis* studied (n = 52) hydrolyzed maltose with formation of the acid without gas, could ferment glucose and trehalose, and were lacking β-galactosidase (except the cultures isolated from post-operative wounds). They also could not degrade mannitol in aerobic environment (excluding staphylococci isolated from the

environmental objects and from the medical staff). *S. epidermidis* displayed variable biochemical activity towards lactose and saccharose. Hemolytic activity (more often of the β-type) was characteristic for 69.2 ± 6.4% of *S. epidermidis* cultures. The majority of cultures (92.4 ± 3.6%) displayed proteolytic activity irrespective of the type of staphylococci and the source of isolation. Lipolytic activity was more frequent in staphylococci isolated from clinical materials (airway secretions of the medical personnel [9/10 cultures], patients [9/10 cultures] and post-operative wounds [16/20 cultures]), than in those isolated from the environmental objects. There was a direct significant correlation between the lipase activity and the presence of β-galactosidase (φ = 0.40), lipase and proteolytic activities (φ = 0.33), β-galactosidase and gelatin liquation (φ = 0.65), hemolytic and proteolytic activities (φ = 0.37). **Conclusion:** *S. epidermidis* was the most prevalent pathogen in all ecotopes of the department of cardiac surgery. Biochemical properties of coagulase-negative staphylococci and their fermentative activity related to factors of pathogenicity were different depending on the site of isolation. This illustrates their contribution in the development of inflammation in a given biotope.

Key words: cardiac surgery, infectious complications, coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus epidermidis*, virulence factors

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-127-132

Granichnaya Nadezhda V. – MD, Bacteriologist¹; Postgraduate Student, Chair of Microbiology and Virology²

Zaitseva Elena A. – MD, PhD, Professor, Chair of Microbiology and Virology¹

✉ 2 Ostryakova prospekt, Vladivostok, 690002, Russian Federation. Tel.: +7 (902) 524 57 20. E-mail: elza200707@mail.ru

Bondar Vladimir Yu. – MD, PhD, Professor, Chair of Surgery, Advanced Training Faculty and Staff Training with Endoscopy, Plastic and Cardiovascular Surgery Courses³

¹ Federal Center for Cardiovascular Surgery (Khabarovsk); 2 Krasnodarskaya ul., Khabarovsk, 680009, Russian Federation

² Pacific State Medical University; 2 Ostryakova prospekt, Vladivostok, 690002, Russian Federation

³ Far Eastern State Medical University; 35 Murav'eva-Amurskogo ul., Khabarovsk, 680000, Russian Federation



Железозависимость биологических свойств *Candida albicans*

Леонов В.В.¹ • Миронов А.Ю.²

Леонов Вадим Вячеславович – канд. техн. наук, доцент кафедры микробиологии лечебного факультета¹

Миронов Андрей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела микробиологии²

✉ 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 380 20 19.
E-mail: andy.60@mail.ru

Актуальность. Кандидозы возникают у иммунокомпromетированных лиц с дефектами гуморального или клеточного звеньев иммунитета. Любые нарушения обмена железа способствуют развитию иммунодефицита и изменению инфекционной чувствительности. Возможность изменения биологических свойств грибов рода *Candida* при нарушениях обмена железа не обсуждалась. **Цель** – выяснить влияние нарушений обмена железа на модификацию биологических свойств *C. albicans*. **Материал и методы.** С помощью турбидиметрического метода изучалась кинетика роста референтного штамма (24433 ATCC) и клинических изолятов *C. albicans* в бульоне (n=20) в зависимости от концентрации ионов Fe²⁺ и в сыворотке крови доноров с разным вариантом обмена железа (n=2). Определялась экспрессия гена адгезии (*als3*), генов фосфолипаз C (*plb1*, *plb2*, *plc*), гена аспартильной протеазы (*sap1*) в сыворотке крови доноров с разным содержанием железа. **Результаты.** Активность роста всех изученных штаммов *C. albicans* зависит от концентрации железа в питательной среде. Расчет значений константы сродства к ионам Fe²⁺ (K_s) для штаммов *C. albicans* показал, что они изменяются от 179,5 до 1863,3 мкМ. Клинические

изоляты отличаются большей железозависимостью (179,5 < K_s < 1000 мкМ) по сравнению с референтным штаммом 24433 ATCC (K_s = 1199,5 ± 28,3 мкМ). Оптимальная концентрация железа для роста в бульоне составляет 30–50 мкМ. Сыворотка крови с нормальным обменом железа ингибирует ростовую активность *C. albicans* и увеличивает экспрессию всех изученных генов патогенности. Культивирование *C. albicans* в железodefицитной и железонагруженной сыворотках увеличивает скорость роста до 0,017 ч⁻¹ и 0,012 ч⁻¹ соответственно, но уменьшает экспрессию основных генов патогенности. **Заключение.** Биологические свойства *C. albicans* изменяются в зависимости от состояния обмена железа организма хозяина. При нормальном обмене железа иммунная система подавляет развитие кандид. Избыточное накопление железа способствует возникновению кандидоза, при дефиците железа исход инфекции будет зависеть от состояния иммунного статуса организма хозяина.

Ключевые слова: *Candida albicans*, кандидоз, обмен железа, биопленки, кинетика роста, фосфолипазы C, адгезия, аспартильные протеазы

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137

¹ БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия»; 628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, 40, Российская Федерация

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, Российская Федерация

Грибы рода *Candida* входят в состав нормальной микробиоты организма человека. Для возникновения кандидозов нужны условия, при которых эти грибы начинают проявлять свои патогенные свойства. Факторы,

способствующие развитию кандидозов, разделяют на экзогенные и эндогенные. Результатом заболевания, патогенез которого обусловлен активацией факторов эндогенного происхождения, становится иммунодефицит организма хозяина

[1]. Нарушения обмена железа как в сторону избыточного его накопления, так и дефицита угнетают клеточное и гуморальное звенья иммунитета, ведя к изменению инфекционной чувствительности организма хозяина [2, 3]. Опубликовано немало работ, посвященных биологии грибов рода *Candida* и кандидозам [1]. Возможность изменения биологических свойств грибов рода *Candida* при нарушениях обмена железа не обсуждалась. Цель нашей работы – выяснить влияние нарушений обмена железа на изменение биологических свойств *C. albicans*.

Материал и методы

Изучены биологические свойства 20 штаммов *C. albicans*, выделенных из фекалий, крови, влагалища, мокроты, раневого отделяемого больных Окружной клинической больницы г. Ханты-Мансийска. В качестве референтного использовали штамм *C. albicans* 24433 АТСС. Для всех штаммов изучалась кинетика роста в бульоне и сыворотке крови. Определение ростовой активности грибов осуществлялось посевом в физиологическом растворе микробной взвеси, стандартизированной до 3 McF в бульон Сабуро с разным содержанием железа и сыворотку доноров с разными вариантами обмена железа. Посевы выращивали с помощью прибора Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при 37 °С, позволяющего контролировать турбидиметрическим методом рост микроорганизмов в автоматическом режиме ($\lambda = 540$ нм). Скорость экспоненциального роста (μ) определяли по тангенсу угла наклона касательной к начальному участку кривой роста, построенной в полулогарифмических координатах. Для характеристики железозависимости штаммов рассчитаны константы сродства *C. albicans* к железу – K_s (мкМ). Значения K_s позволяют судить о степени железозависимости штамма [2, 4]: чем оно меньше, тем больше сродство *C. albicans* к железу, и наоборот.

Сыворотку крови получали общепринятыми методами. Для экспериментов по изучению кинетики роста использовали сыворотку доноров с нормальным обменом железа, железodefицитной анемией, а также избытком железа, который создавался искусственно путем добавления стерильного раствора цитрата железа. Контроль параметров обмена железа (содержание гемоглобина – Hb, ферритина, сывороточного железа – $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{сыв.}}$, общая железосвязывающая способность сыворотки – ОЖСС) осуществляли на автоматическом биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU480 (США) и феррозиновым способом с применением

набора IRON (ChronolabAG, Швейцария). Для подтверждения истинной железodefицитной анемии, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, использовали следующие показатели: $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{сыв.}} < 10$ мкМ и ОЖСС > 70 мкМ на фоне снижения уровней ферритина и Hb. Содержание $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{сыв.}}$ от 10 до 25 мкМ принимали за норму, $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{сыв.}} \geq 50$ мкМ считали избыточным.

Изучение экспрессии генов патогенности в зависимости от концентрации сывороточного железа проводилось в сыворотке здоровых доноров, в которую добавляли цитрат железа (II) до $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{сыв.}} \geq 50$ мкМ (моделирование избытка) и хелатора железа – феррозина (моделирование дефицита железа). Данный эксперимент позволил нивелировать влияние прочих условий на экспрессию генов. Для изучения экспрессии генов факторов патогенности *C. albicans* выбраны: ген *als3* – фактор адгезии; гены фосфолипаз *C plb1*, *plb2*, *plc*, ген аспартильной протеазы *sap1*. Считается, что этим факторам принадлежит главная роль в патогенезе кандидозов разной локализации [5, 6]. В качестве гена «домашнего хозяйства» использован ген изоцитратлиазы – *icl*. Праймеры и наборы для обратной транскрипции произведены ЗАО Евроген (Россия). Для проведения полимеразной цепной реакции использован термоциклер CFX 96 (Bio-Rad, США). Данные проанализированы ΔC_t -методом с применением референт-гена, который используется для относительной количественной оценки экспрессии генов [7]. Уровень экспрессии генов выражался в условных единицах. Структура праймеров и условия полимеразной цепной реакции описаны в работах [8–10].

Все исследования проведены в соответствии с принципами надлежащей клинической и лабораторной практики (Good Clinical Practice – GCP, Good Laboratory Practice – GLP), одобрены на заседании локального этического комитета БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» (рег. номер 106 от 11.05.2016).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Рассчитывали средние арифметические значения (M) и доверительные интервалы (δ). Для расчета границ доверительного интервала использовали t -критерий при доверительной вероятности $p=0,95$ и числе степеней свободы $f=2$ (кинетика роста) и 4 (экспрессия генов).

Результаты и обсуждение

Для всех штаммов *C. albicans* зависимость удельной скорости роста от $[\text{Fe}^{2+}]$ в питательной среде описывалась кривой с экстремумом (рис. 1).



Рост эталонного штамма *C. albicans* ATCC 24433, в отличие от клинических изолятов, мало зависел от $[Fe^{2+}]$, скорость роста изменялась от 0,65 до 0,67 ч⁻¹. Для штамма 273 (кровь) кривая зависимости скорости роста от концентрации железа была наиболее выражена, наименьшая скорость роста 0,62 ч⁻¹ наблюдалась при отсутствии железа в среде, увеличение $[Fe^{2+}]$ до 50 мкМ вело к возрастанию скорости роста до максимального значения – 0,75 ч⁻¹. Ингибирование роста этого штамма при $[Fe^{2+}] = 60$ мкМ происходило сильнее, чем для других. Можно предположить, что штамм 273 более железозависим. Оптимальная $[Fe^{2+}]$ для роста всех исследованных штаммов *C. albicans* составляла 30–50 мкМ, увеличение концентрации до 60 мкМ вело к ингибированию роста.

Расчет значений K_s к ионам Fe^{2+} для штаммов *C. albicans* показал, что они изменяются от 179,5 мкМ для штамма 273 до 1863,3 мкМ для штамма 192 (влагалище). В соответствии со значениями K_s все штаммы *C. albicans* разделены на две группы:

- $K_s < 1000$ мкМ – сильно железозависимые;
- $K_s \geq 1000$ мкМ – слабо железозависимые.

Из 20 исследованных штаммов *C. albicans* все штаммы, выделенные от пациентов, за исключением 192, отнесены к группе сильно железозависимых. Сравнение значений K_s с аналогичными показателями для бактерий ($K_s = 3–211$ мкМ) [4] позволяет сделать заключение, что *C. albicans* – микроорганизм, менее зависимый от содержания железа в среде культивирования.

Для приближения эксперимента к условиям *in vivo* на следующем этапе исследования изучалась кинетика роста и экспрессия специфических факторов патогенности *C. albicans* в сыворотках крови

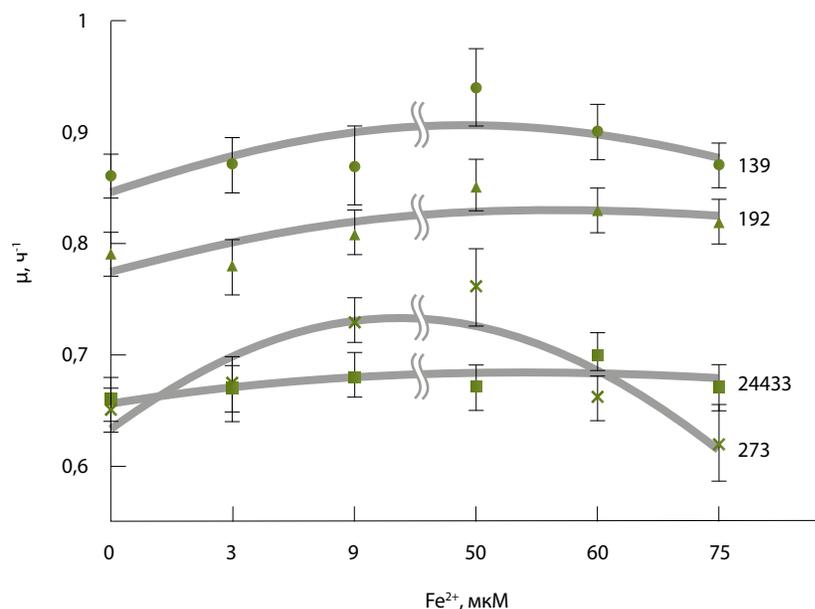


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста для штаммов *C. albicans* от $[Fe^{2+}]$ в питательной среде; μ – удельная скорость роста штамма, ч⁻¹; $[Fe^{2+}]$ – концентрация ионов Fe^{2+} в питательной среде, мкМ

здоровых доноров и доноров с нарушениями обмена железа.

Рост *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке с нормальным обменом железа не наблюдался в течение всего периода культивирования (рис. 2). Скорость роста *C. albicans* 24433 ATCC в железодефицитной сыворотке составляла 0,017 ч⁻¹ и была незначительно выше скорости роста в сыворотке с избыточным содержанием железа 0,012 ч⁻¹. Несмотря на это, кривая роста кандид в железонагруженной сыворотке быстрее достигала стационарной фазы роста

Экспрессия генов патогенности *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке крови в зависимости от содержания железа

Ген	$[Fe^{2+}]_{сыв.}$, мкМ	
	0*	50,5 ± 0,01***
<i>als3</i>	2,8 ± 0,2	193,0 ± 3,3
<i>plc</i>	0,9 ± 0,3	17,2 ± 2,5
<i>plb1</i>	0,6 ± 0,3	1,9 ± 0,8
<i>plb2</i>	3,9 ± 0,5	82,8 ± 0,2
<i>sap1</i>	5,1 ± 1,6	385,9 ± 54,5

Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) и 95% доверительного интервала (δ)

* сыворотка с хелатором железа

** сыворотка с нормальным содержанием железа

*** сыворотка с цитратом железа (II)

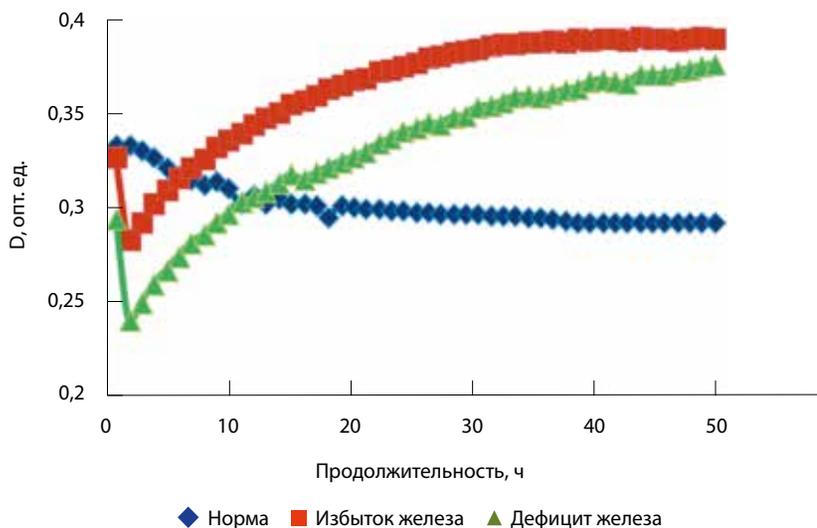


Рис. 2. Кривые роста *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке крови доноров с разным содержанием железа

и урожай культуры в железонагруженной сыворотке был выше, чем в сыворотке с дефицитом железа. Продолжительность лаг-фазы составляла 2,5–3 ч. Максимальная плотность популяции достигалась через 25–30 ч культивирования для *C. albicans* 24433 ATCC. Результаты принципиально не изменились при использовании клинических изолятов *C. albicans* и замене донора крови.

Изучена экспрессия наиболее важных факторов патогенности *C. albicans* в сыворотке в зависимости от варианта обмена железа (таблица). В железodefицитных условиях значения экспрессии факторов патогенности *C. albicans* очень низки. Таким образом, экспрессия этих генов в железodefицитной сыворотке практически не происходит. Сыворотка с нормальным содержанием железа (18,3 мкМ) инициировала экспрессию генов *als3*, *plb2*, *plc*, *sap1*, изменение экспрессии гена фосфолипазы *C plb1* не достоверно. Наибольшая зависимость от концентрации железа наблюдалась для генов *als3*, *plb2*, *sap1*, их экспрессия при увеличении концентрации

сывороточного железа возрастала в 199, 167, 335 раз соответственно. Наименьшая железозависимость экспрессии наблюдалась для гена *plc*, его экспрессия в указанных условиях увеличивалась лишь в 22 раза. Аналогичные тенденции выявлены при использовании вместо референтного штамма 24433 клинического изолята 9583 (кровь).

Несмотря на стимуляцию экспрессии факторов патогенности сывороткой с нормальным обменом железа, рост кандид подавляется эффекторными механизмами врожденного иммунитета. Нарушения обмена железа в сторону избыточного накопления стимулируют активность роста *C. albicans* и экспрессию ведущих генов патогенности. При дефиците сывороточного железа подавляется экспрессия всех изученных генов патогенности при одновременной стимуляции активности роста. Полученные результаты позволяют высказать предположение об инфектологических механизмах возникновения кандидозной инфекции на фоне нарушений обмена железа. При нормальном обмене железа гуморальные и клеточные механизмы врожденного иммунитета подавляют развитие кандидоза. Избыточное накопление железа способствует возникновению кандидоза, при дефиците железа исход инфекции будет зависеть от активности механизмов врожденного иммунитета.

Заключение

Биологические свойства *C. albicans* изменяются в зависимости от обмена железа организма хозяина. Оптимальная концентрация железа для роста в бульоне составляет 30–50 мкМ. Клинические изоляты отличаются большей железозависимостью по сравнению с референтным штаммом 24433 ATCC. Сывороточное железо регулирует экспрессию генов патогенности *als3*, *sap1*, *plb1*, *plb2*, *plc*, кодирующих наиболее важные факторы адгезии и инвазии *C. albicans*; максимальная экспрессия данных генов наблюдается при $[Fe^{2+}]_{сыв.}$, соответствующей физиологической норме, и уменьшается при избытке и дефиците $[Fe^{2+}]_{сыв.}$ Ⓔ

Литература

1. Реброва РН. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина; 1989. 132 с.
2. Леонов ВВ, Миронов АЮ. Железо и микроорганизмы. Ханты-Мансийск: Печатный мир г. Ханты-Мансийск; 2016. 190 с.
3. Миронов АЮ, Леонов ВВ. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микробов. Успехи современной биологии. 2016;136(3):301–10.
4. Леонов ВВ, Молчанова ТН. Влияние железа на ростовые характеристики условно-патогенных бактерий. Медицинская наука и образование Урала. 2011;(4):41–3.
5. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguene E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun*. 1997;65(2):551–6.
6. Чеботарь ИВ. Аспаратат протеазы грибов рода *Candida* – потенциальная мишень для антивирулентной терапии. Клиническая дерматология и венерология. 2012;10(1): 33–8.
7. Ермилова ЕВ, Залуцкая ЖМ, Лапина ТВ, Матвеева ТВ. Количественный анализ экспрессии генов. Учебное пособие. СПб.: ТЕС-СА; 2010. 104 с.
8. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from



women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(2):179–83.
 9. Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth

and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*. 2013;8(5):e62902. doi: 10.1371/journal.pone.0062902.
 10. Леонов ВВ, Булатов ИА, Миронов АЮ. Рост и экспрессия факторов вирулентности

условно-патогенных микроорганизмов в сыворотке крови при разных вариантах гомеостаза железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(8):498–501. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501.

References

1. Rebrova RN. Fungi of the genus *Candida* fungus-free at disease etiology. Moscow: Meditsina; 1989. 132 p. Russian.
2. Leonov VV, Mironov AYU. Iron and microorganisms. *Khanty-Mansiysk: Pechatnyy mir g. Khanty-Mansiysk*; 2016. 190 p. Russian.
3. Mironov AYU, Leonov VV. Iron, virulence and intermicrobial interactions of opportunistic pathogens. *Biology Bulletin Reviews*. 2016;136(3):301–10. Russian.
4. Leonov VV, Molchanova TN. Effect of iron on the growth characteristics of opportunistic bacteria. *Medical Science and Education of Ural*. 2011;(4):41–3. Russian.
5. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun*. 1997;65(2):551–6.
6. Chebotar' IV. Aspartate proteases of *Candida* fungi – a potential target for anti-virulent therapy. *The Russian Journal of Dermatology and Venereology*. 2012;10(1):33–8. Russian.
7. Ermilova EV, Zalutskaya ZhM, Lapina TV, Matveeva TV. Quantitative analysis of gene expression. Saint Petersburg: TESSA; 2010. 104 p. Russian.
8. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yobakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(2):179–83.
9. Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*. 2013;8(5):e62902. doi: 10.1371/journal.pone.0062902.
10. Leonov VV, Bulatov IA, Mironov AYU. The increasing and expression of virulence factors of opportunistic microorganisms in blood serum under various alternatives of iron homeostasis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(1):498–501. Russian. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501.

Iron-dependency of biological properties of *Candida albicans*

Leonov V.V.¹ • Mironov A.Yu.²

Background: Candidal infections occur in individuals with humoral or cell immunity deficiency. Any disorders of iron metabolism promote immune deficiency and abnormal sensitivity to infections. Potential modification of biological properties of *Candida* spp. in disorders of iron metabolism has not been discussed. **Aim:** To clarify the effects of iron metabolism disorders on the modification of biological properties of *C. albicans*. **Materials and methods:** Growth kinetics of reference strain (24433 ATCC) and clinical isolates of *C. albicans* (n=20) depending on the concentration of Fe²⁺ ions in the broth and serum of blood donors with various types of iron metabolism (n=2) was studied by turbidimetry. We also assessed the expression of the adhesion gen (*als3*), hemolytic phospholipase C genes (*plb1*, *plb2*, *plc*) and aspartic protease gene (*sap1*) in serum of donors with various iron levels. **Results:** Growth parameters of all *C. albicans* strains studied depends on the iron levels in the medium. The calculated constant of affinity to Fe²⁺ (K_s) for *C. albicans* strains was in the range from 179.5 to 1863.3 μM. Clinical isolates are more iron-dependent (179.5 < K_s < 1000 μM), compared to the

reference strain ATCC 24433 (K_s = 1199.5 ± 28.3 μM). The optimal concentration of iron for the growth in the broth is 30 to 50 μM. The serum from individuals with normal iron metabolism inhibits the growth activity of *C. albicans* and is associated with overexpression of all virulence genes studied. Incubation of *C. albicans* with iron-deficient and iron-loaded sera results in an increase in the growth rate up to 0.017 h⁻¹ and 0.012 h⁻¹, respectively, but is associated with a reduction in expression of the major virulence genes. **Conclusion:** Biological properties of *C. albicans* are modified depending on the iron metabolism of the host. In those with normal iron metabolism, immune system suppresses *Candida* growth. Excess iron levels may promote candidiasis, whereas in iron deficient states the outcome of infection depends on the immune status of the host.

Key words: *Candida albicans*, candidiasis, iron metabolism, biofilm, growth kinetics, phospholipases C, adhesion, aspartic proteases

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137

Leonov Vadim V. – PhD (in Engineering), Associate Professor, Chair of Microbiology¹

Mironov Andrey Yu. – MD, PhD, Professor, Chief of Department of Microbiology²

✉ 10 Admirala Makarova ul., Moscow, 125212, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 380 20 19. E-mail: andy.60@mail.ru

¹ Khanty-Mansiysk State Medical Academy; 40 Mira ul., Khanty-Mansiysk, 628011, Russian Federation

² G.N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 10 Admirala Makarova ul., Moscow, 125212, Russian Federation



Антибиотикорезистентность культур *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в 2013–2016 гг. в хозяйствах Российской Федерации, и детекция у них генов резистентности к ванкомицину

Светоч Э.А.¹ • Теймуразов М.Г.¹ • Тазина О.И.¹ • Абаимова А.А.¹ • Лев А.И.¹ • Асташкин Е.И.¹ • Леонова Е.С.¹ • Карцев Н.Н.¹ • Детушев К.В.¹ • Ерусланов Б.В.¹ • Дятлов И.А.¹ • Фурсова Н.К.¹

Актуальность. Энтерококки – ведущая причина ряда внутрибольничных и внебольничных заболеваний человека. В последнее десятилетие эти патогены приобретают устойчивость к антибактериальным препаратам, в том числе к ванкомицину. Энтерококки с множественной лекарственной устойчивостью выделяются также от сельскохозяйственных животных во многих странах мира, что вызывает настороженность ученых из-за возможного горизонтального переноса генетических детерминант резистентности. **Цель** – определить чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в Российской Федерации в 2013–2016 гг., детектировать в их геномах гены устойчивости к ванкомицину. **Материал и методы.** Восемьдесят семь изолятов энтерококков, принадлежащих к *E. faecalis* (n=47, 54%), *E. faecium* (n=25, 28,7%) и другим видам

(n=15, 17,2%), выделены из клинических образцов 297 голов промышленной птицы (печень, легкие, сердце, селезенка, содержимое пазух носовых синусов) из 17 птицеводческих хозяйств Северо-Западного, Центрального, Приволжского, Уральского и Южного федеральных округов Российской Федерации. Чувствительность энтерококков к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом и методом микроразведений в бульоне. Гены устойчивости к ванкомицину (*van*) выявляли методом полимеразной цепной реакции со специфичными праймерами. **Результаты.** Большинство изолятов энтерококков были устойчивы к эритромицину (74 из 87, 85,1%), гентамицину (70 из 87, 80,5%), цефтриаксону (61 из 87, 70,1%), ципрофлоксацину (56 из 87, 64,4%), тетрациклину (57 из 87, 65,5%) и рифампицину (48 из 87, 55,2%), а также к триметоприму (38 из 87, 43,7%), ампициллину (28 из 87, 32,2%),

линезолиду (15 из 87, 17,2%) и хлорамфениколу (5 из 87, 5,7%). У 10 изолятов были обнаружены гены типа *vanC* (*vanC1* и *vanC2/3*). Минимальные подавляющие концентрации ванкомицина для этих изолятов составили 2–8 мг/л. Выделение от птицы и идентификация изолята *E. faecium* с геном *vanC1*, по всей вероятности, является первым в мировой практике. **Заключение.** Промышленная птица птицефабрик Российской Федерации – важный резервуар и источник антибиотикорезистентных популяций энтерококков, в том числе энтерококков с генами ванкомицинрезистентности *vanC1* и *vanC2/3*.

Ключевые слова: промышленная птица, энтерококки, *E. faecalis*, *E. faecium*, антибиотикорезистентность, ванкомицинрезистентность, *vanC1*, *vanC2/3*

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-138-146

Род *Enterococcus* включает в себя более 20 видов, среди которых имеются генетические линии, способные вызывать у человека и сельскохозяйственных животных различные патологические процессы. Энтерококки – ведущая причина ряда внутрибольничных и внебольничных заболеваний, таких как инфекции мочевыводящих и желчевыводящих путей, простатит, бактериемия и сепсис, эндокардит, абсцессы брюшной полости, малого таза. При этом в 70–80% случаев этиологическим фактором заболевания у человека становятся виды *E. faecalis* и *E. faecium*, значительно реже – *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* и *E. cecorum* [1, 2]. У промышленной птицы

энтерококки тех же видов являются причиной бактериемии, сепсиса, эндокардита, артритов, асциты и других заболеваний [3].

В последнее десятилетие серьезную озабоченность у специалистов вызывают распространившиеся среди промышленной птицы многих стран популяции энтерококков с множественной лекарственной устойчивостью и различными наборами факторов вирулентности, представляющие определенную опасность для человека [4–7]. Распространение таких штаммов ученые объясняют высокой устойчивостью энтерококков к вредным факторам внешней среды, интенсивным использованием антибиотиков в птицеводстве и способностью энтерококков активно



обмениваться генетической информацией как между разными видами рода, так и с гетерологичными микроорганизмами [2, 8–10].

Важным с научной и практической точек зрения представляется вопрос распространения среди птичьих энтерококков устойчивости к ванкомицину. Этот антибиотик относится к группе резервных, используется для лечения стафилококковых, энтерококковых и других инфекций. Ванкомицинрезистентные энтерококки впервые были выделены в Великобритании и Франции в 1980-х гг. [11, 12]. За последние 20 лет они признаны значимыми нозокомиальными патогенами. Для инфекций, обусловленных ванкомицинрезистентными энтерококками, характерны быстрое распространение и сравнительно высокие уровни заболеваемости и смертности среди инфицированных пациентов. Одна из причин высокой смертности – существенные ограничения, связанные с выбором эффективных этиотропных средств лечения для борьбы с указанными возбудителями [13]. Доля ванкомицинрезистентных среди всех выделяемых штаммов энтерококков наиболее высока в отделениях реанимации и интенсивной терапии. В США этот показатель составляет более 28,5%, в европейских странах – 2–3% [14]. В Российской Федерации в последние годы данный показатель оценивается в 7–20% [15]. Увеличение числа инфекций, обусловленных ванкомицинрезистентными энтерококками, в США объясняется широким использованием ванкомицина в медицине [16], тогда как в странах Европы – использованием гликопептидного антибиотика авопарцина в сельском хозяйстве [17]. В Российской Федерации появлению энтерококков, устойчивых к ванкомицину, по всей вероятности, способствовали и использование гликопептидов в сельском хозяйстве, в частности, бацитрацина, и применение ванкомицина в медицине. К сожалению, производство и использование бацитрацина в сельском хозяйстве нашей страны до сих пор не запрещено. Важно заметить, что спустя некоторое время после обнаружения ванкомицинрезистентных *Enterococcus* spp. от больных стали выделять штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивые к ванкомицину. Этот феномен рассматривается исследователями как результат горизонтальной передачи генов резистентности к ванкомицину от энтерококков к золотистым стафилококкам [18].

Описано девять фенотипов ванкомицинрезистентности у энтерококков: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM и VanN. Среди них наиболее распространен VanA – тип,

Светоч Эдуард Арсеньевич – д-р вет. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

Теймуразов Марат Георгиевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

Тазина Ольга Ивановна – лаборант-исследователь лаборатории антимикробных препаратов¹

Абаимова Алена Алексеевна – стажер-исследователь лаборатории антимикробных препаратов¹

Лев Анастасия Игоревна – мл. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

Асташкин Евгений Ильич – канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

Леонова Екатерина Сергеевна – стажер-исследователь лаборатории антимикробных препаратов¹

Карцев Николай Николаевич – науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

Детушев Константин Владимирович – науч. сотр. отдела коллекционных культур¹

Ерусланов Борис Васильевич – вед. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов¹

обеспечивающий высокий уровень устойчивости к ванкомицину и тейкопланину. Фенотип устойчивости VanA наиболее часто ассоциирован с *E. faecium*. Сельскохозяйственные животные, особенно промышленная птица, могут быть резервуаром ванкомицинрезистентных энтерококков и играть существенную роль в распространении и передаче их человеку. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные в ряде стран [19–21]. Вместе с тем в последние годы появились публикации, в которых показано, что ванкомицинрезистентные энтерококки, выделенные от животных и человека, не являются идентичными, а демонстрируют специфичность в зависимости от вида макроорганизма-хозяина [5, 22].

Российская Федерация – один из ведущих в мире производителей бройлерной птицы. Потребление куриного мяса в стране в 2015 г. составляло 18 кг на человека, что соответствует трети объема необходимых человеку мясных продуктов. Учитывая постоянное присутствие энтерококков в кишечнике птицы, а также интенсивное использование в птицеводстве антимикробных препаратов для профилактики и лечения бактериальных инфекций, существует реальная опасность передачи человеку «птичьих» энтерококков, носителей генов антибиотикорезистентности и вирулентности. Передача может происходить при контакте с инфицированной птицей, мясной и яичной продукцией, при употреблении неправильно приготовленных продуктов. Однако, несмотря на важность и практическую значимость проблемы распространения антибиотикорезистентных популяций микроорганизмов на птицефабриках нашей страны, мы имеем недостаточно объективных данных о «птичьих» энтерококках как возможном резервуаре и источнике генов антибиотикорезистентности для патогенов человека, в том числе генов ванкомицинрезистентности. Отсутствуют данные о видовом составе *Enterococcus* spp., циркулирующих в птицеводческих хозяйствах, и роли отдельных видов в распространении генов устойчивости к антимикробным препаратам.

Цель настоящей работы – изучить распространение антибиотикорезистентности среди изолятов *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в Российской Федерации в 2013–2016 гг., и поиск в их геномах генов устойчивости к ванкомицину.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. Мы изучили 87 изолятов *Enterococcus* spp., выделенных в 2013–2016 гг.

¹ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, Российская Федерация



при исследовании 297 образцов клинического материала от промышленной птицы (печень, легкие, сердце, селезенка, содержимое пазух носовых синусов) из 17 птицеводческих хозяйств Северо-Западного, Центрального, Приволжского, Уральского и Южного федеральных округов Российской Федерации. Выделение энтерококков осуществляли на питательных средах – энтерококкагаре (Оболенск, Россия), менингоагаре (Himedia, Индия) с 5% бараньей дефибрированной крови для питательных сред (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) и на шоколадном агаре (Оболенск, Россия), содержащем 5–10% бараньей дефибрированной крови. Культивировали посе- вы при температуре 37 °С в течение 24–48 ч.

Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью тест-систем API 20 STREP (BioMerieux, Inc., Франция), Enterococcus-test (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехия) и программно-аппаратного комплекса MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Чувствительность изолятов к антибактериальным препаратам – к ампициллину (10 мкг), гентамицину (10 мкг), эритромицину (15 мкг), рифампицину (5 мкг), цефтриаксону (30 мкг), линезолиду (30 мкг), хлорамфениколу (30 мкг), триметоприму (25 мкг), тетрациклину (30 мкг), ципрофлоксацину (5 мкг), ванкомицину (30 мкг) – определяли диско-диффузионным методом, используя диски (Bioanalyse, Турция). При постановке диско-диффузионного метода использовали питательный агар Мюллера – Хинтона (Himedia, Индия), для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) ванкомицина в отношении изолятов с ванкомицинрезистентным фенотипом применяли метод серийных микроразведений в жидком питательном бульоне Мюллера – Хинтона (Himedia, Индия). В качестве препаратов ванкомицина использовали субстанции данного антибиотика (ОАО «Красфарма», Россия; Teva, Венгрия). Одновременно МПК ванкомицина для изолятов определяли на приборе Vitek Compact (BioMerieux, Франция). В качестве контрольных штаммов, чувствительных к ванкомицину, использовали *E. faecalis* ATCC29212 и *E. faecalis* ATCC49532, а в качестве ванкомицинрезистентных контрольных штаммов – панель ATCC Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) Panel, ATCC®MP-1. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2. 18-90-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам» (http://www.antibiotic.ru/ctmac/pdf/6_4_306.pdf) и с клиническими рекомендациями Межрегиональной ассоциации по

Дятлов Иван Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор¹
Фурсова Надежда Константиновна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов¹
✉ 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ, Российская Федерация. Тел.: +7 (4967) 36 00 79. E-mail: fursova@obolensk.org

клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», Версия-2015-02 (<http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>).

Детекцию генетических детерминант устойчивости к ванкомицину осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров на гены *vanA*, *vanB*, *vanC1* и *vanC2/3* [23]. Реакцию проводили в термоциклере Applied Biosystem 2700 (GeneAmp PCR System 2700) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 пмоль каждого праймера, 500 мМ каждого трифосфата (dATP, dCTP, dGTP и dTTP) и 2 ед. *Taq* ДНК-полимеразы в сульфатном буфере для ПЦР (Fermentas, Литва). Режим амплификации: предварительная денатурация 5 минут при 94 °С; 30 циклов, включающих в себя денатурацию при 94 °С – 1 минута, отжиг праймеров при 54 °С – 1 минута и элонгацию при 72 °С – 1 минута; завершающая элонгация при 72 °С – 10 минут, хранение при температуре 10 °С. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. В качестве тест-штаммов на наличие генов *van* использовали штаммы панели ванкомицинрезистентных энтерококков ATCC Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) Panel, ATCC® MP-1. В международной базе данных GenBank размещены нуклеотидные последовательности генов *vanC1* (GenBank KY652165, KY652167, KY652169, KY658720) и *vanC2/3* (GenBank KY658721).

Результаты и обсуждение

В течение 2013–2016 гг. при микробиологическом анализе клинических образцов от 297 голов промышленной птицы, полученных из 17 птицефабрик пяти федеральных округов Российской Федерации, нами было выделено 87 изолятов энтерококков. При идентификации выделенных изолятов *Enterococcus* spp. установлено, что подавляющая часть из них принадлежит двум видам: *E. faecalis* (47, 54%) и *E. faecium* (25, 28,7%); остальные изоляты (15, 17,2%) представлены видами *E. gallinarum*, *E. casseiflavus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. uberis* и *E. italicus* (табл. 1). Преимущественное выделение *E. faecalis* в нашем исследовании совпадает с опубликованными ранее данными Р. Роета и соавт. из Португалии [24], но не согласуется с результатами S.A. Ali и соавт. [6] и J. Champagne и соавт. [25], которые сообщали об *E. faecium* как о самом распространенном виде энтерококков, выделяемом от птицы в Канаде и Пакистане.

¹ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, Российская Федерация



Оценка чувствительности 87 изолятов энтерококков к антимикробным препаратам показала: подавляющее большинство были устойчивы к эритромицину, гентамицину, цефтриаксону, ципрофлоксацину, тетрациклину и рифампицину. Общее количество изолятов, резистентных и с промежуточной устойчивостью к каждому из перечисленных выше антибиотиков, составляет более 80%. Меньшая доля изолятов энтерококков была устойчива к триметоприму и к ампициллину. Наименьшее количество изолятов были резистентны к линезолиду и хлорамфениколу (см. табл. 1). Обнаружено 3 изолята, резистентных к ванкомицину, и 11 изолятов с МПК ванкомицина 2–4 мг/л (табл. 1, 2). При анализе полученных результатов обращает на себя внимание не только исключительно высокий процент изолятов, устойчивых к шести функциональным классам антимикробных препаратов, широко используемым в практике медицины и ветеринарии (макролидам, аминогликозидам, цефалоспорином, фторхинолонам, тетрациклином и рифамицином), но и сравнительно большой процент устойчивых изолятов к ампициллину и линезолиду – препаратам, используемым для лечения энтерококковой инфекции. Особую тревогу вызывает появление энтерококков, резистентных к линезолиду, представителю группы оксазолидинонов, активному в отношении многих грамположительных аэробов и анаэробов, включая

метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), метициллинрезистентные *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) и ванкомицинрезистентные энтерококки [26]. Следует заметить, что сообщения об использовании оксазолидинонов в птицеводстве нашей страны отсутствуют.

Полученные нами данные по распространению антибиотикорезистентных энтерококков близки к соответствующим показателям доли резистентных энтерококков, выделенных от промышленной птицы в других странах [5, 6, 22, 24]. Столь высокий процент выделения в последнее десятилетие от птицы антибиотикорезистентных энтерококков стал основанием для исследователей высказать опасение, что *Enterococcus* spp. становятся важным фактором для приобретения человеком и распространения среди населения устойчивых к антибиотикам популяций патогенов [7, 27].

Большой интерес для науки и практики имеют также сведения о распространении среди промышленной птицы клонов энтерококков, резистентных к ванкомицину, препарату выбора для лечения инфекций, вызываемых MRSA, MRSE, а также энтерококками, резистентными к ампициллину и аминогликозидам [26]. В нашей работе из 87 изолятов 14 (16,1%) проявляли устойчивость и «промежуточную устойчивость» к ванкомицину: 9 из них принадлежали к виду *E. faecalis*, 3 – к *E. casseliflavus*, 1 – к *E. faecium*,

Таблица 1. Количество изолятов *Enterococcus* spp. с разными уровнями чувствительности к антимикробным препаратам

Антимикробный препарат	<i>E. faecalis</i> (n=47)			<i>E. faecium</i> (n=25)			<i>E. gallinarum</i> (n=7)			<i>E. casseliflavus</i> (n=3)			Другие виды <i>Enterococcus</i> spp.* (n=5)			Итого (n=87)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Ампициллин	12	0	35	11	0	14	3	0	4	0	0	3	2	0	3	28	0	59
Гентамицин	40	5	2	18	4	3	7	0	0	2	1	0	3	1	1	70	11	6
Эритромицин	41	2	4	20	4	1	7	0	0	3	0	0	3	1	1	74	7	6
Рифампицин	27	9	11	15	6	4	4	1	2	0	0	3	2	2	1	48	18	21
Цефтриаксон	35	8	4	17	6	2	5	2	0	1	2	0	3	1	1	61	19	7
Линезолид	10	15	22	3	4	18	1	0	6	0	0	3	1	2	2	15	21	51
Хлорамфеникол	2	6	39	2	1	22	0	2	5	0	0	3	1	1	3	5	10	72
Триметоприм	20	0	27	10	0	15	5	0	2	0	0	3	3	0	2	38	0	49
Тетрациклин	32	0	15	14	0	11	6	0	1	2	0	1	3	0	2	57	0	30
Ципрофлоксацин	25	17	5	20	3	2	6	1	0	1	2	0	4	1	0	56	24	7
Ванкомицин	2	7	42	0	1	24	1	0	6	0	3	0	0	0	5	3	11	73

R – резистентность, I – промежуточный уровень устойчивости, S – чувствительность

* *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. italicus*, *E. uberis*



1 – к *E. gallinarum*, то есть 10 из 14 изолятов относились к двум видам – *E. faecalis* и *E. faecium*, которые, как известно, являются доминирующими среди нозокомиальных ванкомицин-резистентных энтерококков, выделяемых от людей [6, 10]. Методом ПЦР-детекции в 10 из 14 изолятов ванкомицинрезистентных энтерококков были обнаружены гены *vanC*-типа: у 3 изолятов *E. faecalis* гены *vanC1*, у 2 – *vanC2/3*; у изолятов *E. faecium* и *E. gallinarum* детектированы гены *vanC1*; 3 изолята *E. casseiflavus* имели гены *vanC2/3*. Принадлежность каждого из детектированных генов *vanC1* и *vanC2/3* подтверждена их секвенированием, пять из них депонированы в международную базу данных GenBank (KY652165, KY652167, KY652169, KY658720, KY658721). У четырех изолятов ванкомицинрезистентных энтерококков *van*-гены детектировать не удалось. По всей вероятности,

их ванкомицинрезистентность контролируется другими детерминантами, выявление которых, безусловно, представляет научный интерес.

Полученные нами данные по обнаружению *vanC*-генов у изолятов *E. gallinarum* и *E. casseiflavus* не являются чем-то необычным, поскольку именно эти виды считаются природными носителями и источниками генов *vanC* для других микроорганизмов [28]. Об этом свидетельствует также то, что до недавнего времени обнаружение генов *vanC1* у энтерококков исследователи использовали для идентификации вида *E. gallinarum* [29]. Обнаружение же *vanC*-генов у видов *E. faecalis* и *E. faecium* следует рассматривать как результат горизонтального обмена генами *vanC* между различными энтерококками. Полученные нами данные согласуются с результатами работ, в которых также продемонстрировано присутствие

Таблица 2. Минимальная подавляющая концентрация ванкомицина для изолятов *Enterococcus* spp. с генами ванкомицинрезистентности и контрольных штаммов

Изолят	Дата выделения	Источник	Регион	Гены <i>van</i>	МПК, мг/л	Интерпретация
<i>E. casseiflavus</i> 153	август 2015	1-суточный цыпленок	СО	<i>vanC1</i>	2	I
<i>E. casseiflavus</i> 161	январь 2016	внутренние органы птицы	РД	<i>vanC2/3</i>	2	I
<i>E. casseiflavus</i> 188	июнь 2016	глаз крупного рогатого скота	БО	<i>vanC2/3</i>	2	I
<i>E. faecalis</i> 19	июль 2014	внутренние органы цыпленка	БО	<i>vanC1</i>	8	R
<i>E. faecalis</i> 24	июль 2015	комбикорм	БО	<i>vanC2/3</i>	2	I
<i>E. faecalis</i> 59	апрель 2016	внутренние органы птицы	ЛО	<i>vanC1</i>	8	R
<i>E. faecalis</i> 97	март 2016	1-суточный цыпленок	ТО	<i>vanC1</i>	4	I
<i>E. faecalis</i> 99	ноябрь 2016	1-суточный цыпленок	ТВ	<i>vanC2/3</i>	2	I
<i>E. faecium</i> 185	ноябрь 2016	внутренние органы цыпленка	РМ	<i>vanC1</i>	2	I
<i>E. gallinarum</i> 181	август 2016	внутренние органы цыпленка	СО	<i>vanC1</i>	8	R
Контрольные штаммы						
<i>E. faecium</i> ATCC BAA2316				<i>vanA</i>	> 200	R
<i>E. faecalis</i> ATCC51575				<i>vanB</i>	> 200	R
<i>E. gallinarum</i> ATCC49610				<i>vanC1</i>	4	I
<i>E. casseiflavus</i> ATCC700668				<i>vanC2/3</i>	2	I
<i>E. faecalis</i> ATCC49532				–	0,5	S
<i>E. faecalis</i> ATCC29212				–	1	S

СО – Саратовская область, РД – Республика Дагестан, БО – Белгородская область, ЛО – Ленинградская область, ТО – Тюменская область, ТВ – Тверская область, РМ – Республика Мордовия; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительность, I – промежуточный уровень устойчивости, R – резистентность, «–» – нет гена

**Таблица 3.** Чувствительность изолятов *Enterococcus* spp., несущих гены *vanC*-типа, к антимикробным препаратам разных функциональных классов

Изолят	Ген	AMP	GEN	ERI	RIF	CEF	LIN	CHL	THR	TET	CIP
<i>E. casseliflavus</i> 153	<i>vanC2/3</i>	S	R	R	S	R	S	S	S	R	I
<i>E. casseliflavus</i> 161	<i>vanC2/3</i>	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
<i>E. casseliflavus</i> 188	<i>vanC2/3</i>	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i> 19	<i>vanC1</i>	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i> 24	<i>vanC2/3</i>	S	I	R	S	I	S	S	R	R	R
<i>E. faecalis</i> 59	<i>vanC1</i>	I	R	R	R	R	S	S	S	R	I
<i>E. faecalis</i> 97	<i>vanC1</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i> 99	<i>vanC2/3</i>	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecium</i> 185	<i>vanC1</i>	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>E. gallinarum</i> 181	<i>vanC1</i>	I	R	R	S	R	S	I	R	R	R

AMP – ампициллин, GEN – гентамицин, ERI – эритромицин, RIF – рифампицин, CEF – цефтриаксон, LIN – линезолид, CHL – хлорамфеникол, THR – триметоприм, TET – тетрациклин, CIP – ципрофлоксацин; S – чувствительность, I – промежуточный уровень устойчивости; R – резистентность

vanC-генов в изолятах *E. faecalis*, выделенных от свиней, из фекалий бройлеров и из овечьего молока [30–32]. В этих же публикациях показано, что у «птичьих» энтерококков ген *vanC1* был локализован на плазмиде, у изолятов от свиней – на хромосоме.

По всей вероятности, нами впервые в мировой практике выделен от птицы и идентифицирован изолят *E. faecium* с *vanC1*-генами. Недавно было опубликовано сообщение о выделении штамма *E. faecium* с геном *vanC1* от человека [33]. Приведенные выше факты указывают на то, что хромосомная локализация *vanC*-генов у *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и других энтерококков не является препятствием для их передачи гетерологичным микроорганизмам.

Обнаруженные нами энтерококки с генами *vanC1* и *vanC2/3* были устойчивы к ванкомицину в концентрации 2–8 мг/л (см. табл. 2), что согласуется с данными литературы. Известно, что VanC-фенотип экспрессируется у энтерококков конститутивно или под влиянием определенных индукторов [28]. Кластер генов, контролирующих этот фенотип, локализован на хромосоме и обеспечивает сравнительно невысокий, в отличие от VanA- и VanB-фенотипов, уровень резистентности к ванкомицину (2–32 мг/л) и не обеспечивает устойчивости ко второму представителю гликопептидов – тейкопланину и новым синтетическим липогликопептидам: оритаванцину и телаванцину [28]. Тем не менее VanC-фенотип энтерококков, особенно патогенных, может создавать серьезную проблему для

лечения энтерококковых инфекций у сельскохозяйственной птицы и человека. Этиологическая значимость энтерококков с VanC-фенотипом может быть отягощена дополнительной их резистентностью к другим антимикробным препаратам. Как показали наши исследования (табл. 3), ванкомицинрезистентность изолятов с VanC-фенотипом часто ассоциирована с устойчивостью их к эритромицину, гентамицину, цефтриаксону, ципрофлоксацину, тетрациклину и другим антибиотикам.

Заключение

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что в настоящее время на птицефабриках различных регионов Российской Федерации среди промышленной птицы циркулируют популяции патогенных энтерококков (все 87 изолятов выделены от птицы, больной или павшей от системной энтерококковой инфекции), для которых характерна множественная устойчивость к антимикробным препаратам. Так, более 80% изученных нами изолятов *Enterococcus* spp. были резистентны или имели промежуточную устойчивость к таким антибиотикам, как гентамицин, эритромицин, цефтриаксон, ципрофлоксацин, рифампицин и тетрациклин. Значительный процент энтерококков оказался устойчивым к антимикробным препаратам, используемым при лечении энтерококковых инфекций: к ампициллину (32,2%), линезолиду (17,2%) и ванкомицину (16,1%). Показано, что ванкомицинрезистентность у 10 изолятов

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках Федеральной темы НИР 049 Роспотребнадзора «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» (2016–2020 гг.).



обусловлена генами *vanC1* и *vanC2/3*, обеспечивающими клеткам-хозяевам устойчивость к ванкомицину в концентрации 2–8 мг/л. Отметим: половина изолятов с *VanC*-фенотипом принадлежит к видам *E. faecalis* и *E. faecium*, основным возбудителям энтерококковой инфекции у человека. По всей вероятности, нам впервые удалось выделить от птицы изолят *E. faecium* с геном *vanC1*, что еще раз свидетельствует о происходящих *in vivo* процессах обмена генами антибиотикорезистентности между энтерококками разных видов.

Благодарности

Авторы благодарны Ю.И. Хатюшину, инженеру-технологу ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболенск, Россия) за техническую помощь в работе.

На вопрос, насколько популяция антибиотикорезистентных «птичьих» энтерококков, изученных нами, опасна как этиологический агент для человека, можно будет ответить лишь после сравнительного генотипирования энтерококков, выделяемых в нашей стране от человека и промышленной птицы, а также изучения у них детерминант вирулентности. Опасность же антибиотикорезистентных популяций «птичьих» энтерококков как резервуара и источника генов резистентности, в том числе *vanC*-генов, для микробиоты человека неоспорима. ☺

Литература

- Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46–65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46.
- Poulsen LL, Bisgaard M, Son NT, Trung NV, An HM, Dalsgaard A. Enterococcus faecalis clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1096–100. doi: 10.3201/eid1807.111754.
- Velkers FC, van de Graaf-Bloois L, Wagenaar JA, Westendorp ST, van Bergen MA, Dwars RM, Landman WJ. Enterococcus hirae-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *Vet Q.* 2011;31(1):3–17. doi: 10.1080/01652176.2011.570107.
- Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Zięba P, Gnat S. Determination of resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis and E. faecium strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *Poult Sci.* 2016. pii: pew365. doi: 10.3382/ps/pew365.
- Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Abdul Aziz S. Genetic variability of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates from humans, chickens, and pigs in Malaysia. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(15):4528–33. doi: 10.1128/AEM.00650-13.
- Ali SA, Hasan KA, Bin Asif H, Abbasi A. Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. *Lett Appl Microbiol.* 2013;58(5):423–32. doi: 10.1111/lam.12208.
- Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(24):8033–43. doi: 10.1128/AEM.01545-10.
- Ellerbroek L, Mac KN, Peters J, Hultquist L. Hazard potential from antibiotic-resistant commensals like Enterococci. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004;51(8–9):393–9. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00782.x.
- Giridhara Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umaphathy BL. Review of virulence factors of Enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(4):301–5. doi: 10.4103/0255-0857.55437.
- van Schaik W, Willems RJ. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):527–32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03201.x.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus faecium. *N Engl J Med.* 1988;319(3):157–61. doi: 10.1056/NEJM198807213190307.
- Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988;1(8575–6):57–8. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(88)92993-5.
- Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):555–62. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x.
- Napolitano LM. Emerging issues in the diagnosis and management of infections caused by multi-drug-resistant, gram-positive cocci. *Surg Infect (Larchmt).* 2005;6 Suppl 2:S5–22. doi: 10.1089/sur.2005.6.s2-5.
- Богомолова НС, Большаков ЛВ, Кузнецова СМ, Орешкина ТД. Динамика устойчивости к антибиотикам и частота выделения стафилококков и энтерококков у больных отделений реконструктивной хирургии. Антибиотики и химиотерапия. 2011;56(5–6):37–45.
- Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 3:iii13–21. doi: 10.1093/jac/dkg272.
- Capita R, Alonso-Calleja C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(1):11–48. doi: 10.1080/10408398.2010.519837.
- Xu HT, Tian R, Chen DK, Xiao F, Nie ZY, Hu YJ, Zhang XZ, Li JM. Nosocomial spread of hospital-adapted CC17 vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a tertiary-care hospital of Beijing, China. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(4):498–503.
- Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):6457–61. doi: 10.1128/AEM.68.12.6457-6461.2002.
- Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, Donabedian S, Jensen LB, Francia MV, Baquero F, Peixe L. Human and swine hosts share vancomycin-resistant Enterococcus faecium CC17 and CC5 and Enterococcus faecalis CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):925–31. doi: 10.1128/JCM.01750-10.
- Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, Wegener HC. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible Enterococcus faecium isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(5):677–80.
- Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, Manero A, Taylor H, Caplin J, Dominguez L, Herrero IA, Moreno MA, Möllby R. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):5383–90. doi: 10.1128/AEM.71.9.5383-5390.2005.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):24–7.
- Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006;53(5):203–8. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00941.x.
- Champagne J, Diarra MS, Rempel H. Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(8):2625–33. doi: 10.1128/AEM.00263-11.



26. Страчунский ЛС, Козлов СН. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. М.: Боргес; 2002. 432 с.
27. Kaszanyitzky EJ, Tenk M, Ghidán A, Fehérvári GY, Papp M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(1):119–23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.004.
28. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):21–5. doi: 10.1128/AAC.49.1.21-25.2005.
29. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36(2):119–24. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00126-1.
30. Schwaiger K, Bauer J, Hörmansdorfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, Bauer-Unkauf I, Bischoff M, Hölzel C. Presence of the resistance genes vanC1 and pbp5 in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist.* 2012;18(4):434–9. doi: 10.1089/mdr.2011.0227.
31. Moura TM, Cassenego AP, Campos FS, Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon AP. Detection of vanC1 gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):453–6. doi: 10.1590/S0074-0276108042013009.
32. de Garnica ML, Valdezate S, Gonzalo C, Saez-Nieto JA. Presence of the vanC1 gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from ewe bulk tank milk. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 3):494–5. doi: 10.1099/jmm.0.052274-0.
33. Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the vanC1 gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(6):712–5. doi: http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140019.
1. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46–65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46.
2. Poulsen LL, Bisgaard M, Son NT, Trung NV, An HM, Dalsgaard A. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1096–100. doi: 10.3201/eid1807.111754.
3. Velkers FC, van de Graaf-Bloois L, Wagenaar JA, Westendorp ST, van Bergen MA, Dwars RM, Landman WJ. *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *Vet Q.* 2011;31(1):3–17. doi: 10.1080/01652176.2011.570107.
4. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościarczyk A, Zięba P, Gnat S. Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *Poult Sci.* 2016. pii: pew365. doi: 10.3382/ps/pew365.
5. Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Abdul Aziz S. Genetic variability of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from humans, chickens, and pigs in Malaysia. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(15):4528–33. doi: 10.1128/AEM.00650-13.
6. Ali SA, Hasan KA, Bin Asif H, Abbasi A. Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. *Lett Appl Microbiol.* 2013;58(5):423–32. doi: 10.1111/lam.12208.
7. Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(24):8033–43. doi: 10.1128/AEM.01545-10.
8. Ellerbroek L, Mac KN, Peters J, Hultquist L. Hazard potential from antibiotic-resistant commensals like *Enterococci*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004;51(8–9):393–9. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00782.x.
9. Giridhara Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umashathy BL. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(4):301–5. doi: 10.4103/0255-0857.55437.
10. van Schaik W, Willems RJ. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):527–32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03201.x.
11. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319(3):157–61. doi: 10.1056/NEJM198807213190307.
12. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988;1(8575–6):57–8. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(88)92993-5.
13. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):555–62. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x.
14. Napolitano LM. Emerging issues in the diagnosis and management of infections caused by multi-drug-resistant, gram-positive cocci. *Surg Infect (Larchmt).* 2005;6 Suppl 2:S5–22. doi: 10.1089/sur.2005.6.s2-5.
15. Bogomolova NS, Bolshakov LV, Kuznetsova SM, Oreshkina TD. Antibiotic resistance dynamics and isolation rate of *Staphylococci* and *Enterococci* from patients of reconstructive surgery units. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2011;56(5–6):37–45. Russian.
16. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 3:iii13–21. doi: 10.1093/jac/dkg272.
17. Capita R, Alonso-Calleja C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(1):11–48. doi: 10.1080/10408398.2010.519837.
18. Xu HT, Tian R, Chen DK, Xiao F, Nie ZY, Hu YJ, Zhang XZ, Li JM. Nosocomial spread of hospital-adapted CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a tertiary-care hospital of Beijing, China. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(4):498–503.
19. Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):6457–61. doi: 10.1128/AEM.68.12.6457-6461.2002.
20. Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, Donabedian S, Jensen LB, Francia MV, Baquero F, Peixe L. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):925–31. doi: 10.1128/JCM.01750-10.
21. Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, Wegener HC. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(5):677–80.
22. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, Manero A, Taylor H, Caplin J, Domínguez L, Herrero IA, Moreno MA, Möllby R. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):5383–90. doi: 10.1128/AEM.71.9.5383-5390.2005.
23. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):24–7.



24. Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006;53(5):203–8. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00941.x.
25. Champagne J, Diarra MS, Rempel H. Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(8):2625–33. doi: 10.1128/AEM.00263-11.
26. Strachunsky LS, Kozlov SN. Modern antimicrobial chemotherapy. Manual for physicians. Moscow: Borges; 2002. 432 p. Russian.
27. Kaszanyitzky EJ, Tenk M, Ghidán A, Fehérvári GY, Papp M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. *Int J Food Microbiol*. 2007;115(1):119–23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.004.
28. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):21–5. doi: 10.1128/AAC.49.1.21-25.2005.
29. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Tøye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36(2):119–24. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00126-1.
30. Schwaiger K, Bauer J, Hörmansdorfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, Bauer-Unkauf I, Bischoff M, Hölzel C. Presence of the resistance genes *vanC1* and *pbp5* in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist*. 2012;18(4):434–9. doi: 10.1089/mdr.2011.0227.
31. Moura TM, Cassenego AP, Campos FS, Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon AP. Detection of *vanC1* gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(4):453–6. doi: 10.1590/S0074-0276108042013009.
32. de Garnica ML, Valdezate S, Gonzalo C, Saez-Nieto JA. Presence of the *vanC1* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from ewe bulk tank milk. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 3):494–5. doi: 10.1099/jmm.0.052274-0.
33. Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the *vanC₁* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):712–5. doi: http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140019.

Antibacterial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry of the Russian Federation farms in 2013–2016, and identification of vancomycin resistance genes

Svetoch E.A.¹ • Teymurazov M.G.¹ • Tazina O.I.¹ • Abaimova A.A.¹ • Lev A.I.¹ • Astashkin E.I.¹ • Leonova E.S.¹ • Kartsev N.N.¹ • Detushev K.V.¹ • Eruslanov B.V.¹ • Dyatlov I.A.¹ • Fursova N.K.¹

Rationale: Enterococci are the leading cause of a number of nosocomial and community-acquired human diseases. In the last decade, these pathogens are becoming resistant to antibacterials, including vancomycin. Multidrug-resistant enterococci have been also isolated from agricultural animals in many countries worldwide, which raises concern of scientists because of possible horizontal transfer of resistance genes. **Aim:** To assess antibacterial sensitivity of *Enterococcus* spp. isolates collected from the poultry in the Russian Federation from 2013 to 2016, and to identify vancomycin-resistance genes in their genomes. **Materials and methods:** Eighty-seven enterococci isolates belonging to *E. faecalis* (n=47, 54%), *E. faecium* (n=25, 28.7%) and other species (n=15, 17.2%) were collected from clinical samples of 297 heads of poultry (liver, lungs, heart, spleen, contents of the nasal and sinus cavities) from 17 poultry farms of the Northwest, Central, Volga, Ural and Southern Federal districts of the Russian Federation. Sensitivity of enterococci to antibacterials was determined by disk-diffusion and broth microdilution methods. Vancomycin resistance genes *van* was detected by polymerase

chain reaction with specific primers. **Results:** Most enterococci isolates were resistant to erythromycin (74/87, 85.1%), gentamicin (70/87, 80.5%), ceftriaxone (61/87, 70.1%), ciprofloxacin (56/87, 64.4%), tetracycline (57/87, 65.5%), and rifampicin (48/87, 55.2%), fewer ones to trimethoprim (38/87, 43.7%), ampicillin (28/87, 32.2%), linezolid (15/87, 17.2%) and chloramphenicol (5/87, 5.7%). The *vanC* type genes (*vanC1* and *vanC2/3*) were identified in 10 isolates. Vancomycin minimal inhibitory concentrations for these isolates were 2 to 8 mg/L. *E. faecium* with *vanC1* gene was isolated from poultry probably for the first time ever. **Conclusion:** Commercial poultry in the Russian poultry farms is an important reservoir and source of antibiotic-resistant enterococci populations, including enterococci carrying *vanC1* and *vanC2/3* vancomycin resistance genes.

Key words: commercial poultry, enterococci, *E. faecalis*, *E. faecium*, antibacterial resistance, vancomycin resistance, *vanC1*, *vanC2/3*

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-138-146

Svetoch Eduard A. – VD, PhD, Professor, Chief Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Teymurazov Marat G. – PhD (in Biology), Senior Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Tazina Ol'ga I. – Assistant Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Abaimova Alena A. – Trainee Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Lev Anastasiya I. – Junior Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Astashkin Evgeniy I. – MD, PhD, Leading Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Leonova Ekaterina S. – Trainee Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Kartsev Nikolay N. – Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Detushev Konstantin V. – Researcher, Collection Cultures Department¹

Eruslanov Boris V. – Leading Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory¹

Dyatlov Ivan A. – MD, PhD, Professor, Member of Russian Academy of Sciences, Director¹

Fursova Nadezhda K. – PhD (in Biology), Head of Antimicrobial Agents Laboratory¹

✉ SRCAMB, Obolensk, Serpukhovskiy rayon, Moskovskaya oblast', 142279, Russian Federation. Tel.: +7 (4967) 36 00 79.

E-mail: fursova@obolensk.org

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Serpukhovskiy rayon, Moskovskaya oblast', 142279, Russian Federation



Особенности биологических свойств бактерий вида *Listeria innocua*, выделенных на территории Приморского края

Зайцева Е.А.¹

Актуальность. Большинство случаев заболевания листериозом связаны с патогенным видом *Listeria monocytogenes*. В литературе появились сообщения о выделении из пищевых продуктов *L. innocua* с факторами патогенности, а также о случаях заболевания у людей, вызванных этим видом. **Цель** – оценить биологические свойства, в том числе патогенный потенциал *L. innocua*, выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды. **Материал и методы.** Проведено микробиологическое исследование культур *L. innocua*, изолированных из пищевых продуктов (n=35) и объектов окружающей среды (n=15) на территории Приморского края, а также исследование их антибиотикочувствительности. **Результаты.** У исследуемых культур *L. innocua* отмечена стабильность фенотипических проявлений биологических свойств – морфология, типичный рост колоний на питательных средах с характерным кисломолочным запахом, голубое

или голубовато-зеленое свечение в косо проходящем свете, наличие каталазной активности и отсутствие оксидазной. Подвижность при 22 °C показали только 38±6,9% *L. innocua*. Культуры *L. innocua* не ферментировали маннит (100% культур), разлагали до кислоты без газа рамнозу (70±6,5%) и ксилозу (42,8±7%). Листерии, выделенные из овощей и объектов внешней среды, с большей частотой ферментировали рамнозу (92,8±7,2% исследуемых культур) и реже – ксилозу (28,5±12,5%) по сравнению с изолятами *L. innocua*, полученными из мясных и рыбных продуктов. Отмечена вариабельность биохимической активности *L. innocua* по отношению к маннозе (92±3,8%), сахарозе (85,7±7,8%) и мелицитозе (76,2±9,5%). Выявлены культуры *L. innocua* (34±6,7%) с гемолитической активностью (α- или β-типа), чаще у изолятов, выделенных из рыбной продукции. Липаза определялась у всех листерий независимо от источника выделения. Культуры

L. innocua, выделенные из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, показали высокую чувствительность к антимикробным препаратам из групп пенициллинов (ампициллин, карбенициллин, комбинированный препарат амоксициллина и клавулановой кислоты), аминогликозидов (гентамицин, амикацин), карбапенемов (меропенем), фторхинолонов (офлоксацин). **Заключение.** Отмечена вариабельность некоторых биологических свойств *L. innocua* в зависимости от источника выделения. Выявление на территории Приморского края культур листерий с атипичными свойствами требует более глубокого изучения микроорганизмов данного вида.

Ключевые слова: *Listeria innocua*, гемолитическая активность, атипичные штаммы, факторы патогенности, антибиотикочувствительность

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-147-153

Листерииоз – инфекционное заболевание человека и животных, вызванное бактериями рода *Listeria*. Большинство случаев листериоза у человека связано с видом *Listeria monocytogenes*, у животных – *L. ivanovii* [1]. Появляются публикации о заболеваниях, причиной которых становятся другие виды листерий, ранее считавшиеся непатогенными [2–5]. Так, у взрослого пациента с острым гнойным менингитом выделена *L. seeligeri*, спустя год после выздоровления у него развились тяжелые неврологические осложнения (эпилепсия, гидроцефалия) [6]. Сообщается о смертельном случае 62-летней пациентки после септицемии, вызванной *L. innocua* на фоне холангита [7]. В литературе описаны случаи выделения *L. welshimeri* [8] и *L. grayi* [4] у взрослых пациентов.

Наиболее генетически близким видом к *L. monocytogenes* считается *L. innocua*. Именно поэтому этот вид листерий рассматривается как индикатор возможного присутствия в продуктах питания *L. monocytogenes* [1]. Исследования последних лет показали возможность проявления патогенности со стороны *L. innocua* [7, 9–11]. Еще совсем недавно оставшаяся в тени *L. innocua*

все больше выходит на первый план, постепенно вытесняя другие виды листерий [12]. Ранее нами установлено, что на территории Приморского края выделяются разнообразные виды листерий [13]. Пищевые продукты, распространяемые через торговую сеть (магазины, рынки) г. Владивостока, контаминированы такими видами листерий, как *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* [13]. Бактерии вида *L. seeligeri* встречались в продуктах из рыбы (горбуши, волосозуба), *L. welshimeri* – из мяса. *L. innocua* изолировали из мясной продукции (замороженного фарша, замороженных полуфабрикатов и копченой продукции, готовой к употреблению), рыбной продукции (соленой, сырокопченой, охлажденной и замороженных полуфабрикатов), а также из овощей (лука, капусты, картофеля, свеклы), хранящихся в овощехранилищах. Кроме пищевых продуктов вид *L. innocua* на территории края выделили из силоса, органов мышевидных грызунов [13]. Такое повсеместное активное распространение *L. innocua* способствует приспособлению этих бактерий к меняющимся условиям окружающей среды и появлению штаммов с атипичными свойствами [10, 11, 14]. Изучение



свойств *L. innocua* становится актуальным еще и в связи с тем, что появляются случаи листериоза, вызванного этим видом, не только у человека, но и животных [7, 15, 16].

Цель – оценить биологические свойства, в том числе патогенный потенциал *L. innocua*, выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Материал и методы

Нами исследованы культуры *L. innocua*, изолированные из пищевых продуктов (n=35) и объектов окружающей среды (n=15) на территории Приморского края.

Микробиологические исследования проводили по общепринятым методам, а также согласно ГОСТ Р 51921-2002 и МУК 4.2.1122-02 для выделения листерий. Для изучения биологических свойств (в том числе факторов патогенности) *L. innocua* использовали: для определения 1) подвижности – 0,3% полужидкий агар, модифицированную среду для определения подвижности с добавлением 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ); 2) биохимической (сахаролитической) активности – среды Гисса с определенным сахаром и индикатором, тест-систему API Listeria (BioMerieux); 3) каталазной активности – 3–5% перекись водорода; 4) протеолитической активности – питательные среды, содержащие молоко; 5) лецитиназной активности – среду ГРМ (г. Оболенск) с добавлением 5% желточной эмульсии с активированным углем и без него; 6) гемолитической активности – кровяной агар: Колумбийский агар (НИЦФ, г. Санкт-Петербург), 5% взвесь эритроцитов барана; 7) липолитической активности – ГРМ-агар с добавлением к нему 10% раствора хлорида кальция и твин-субстратов (20; 60; 80).

Молекулярно-генетические методы. Нами использовались олигонуклеотидные праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (г. Москва). Определение принадлежности выделенных культур к бактериям рода *Listeria* проводили методом амплификации ДНК бактерий при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами prs₁, prs₂, как в работе [17]. Для типирования культур листерий с помощью мультиплексной ПЦР использовали бактериальные лизаты, приготовленные из суточных культур листерий по методике согласно [17]. ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по программе, описанной в [17]. Электрофорез продуктов амплификации осуществляли в 1,7% агарозном геле.

Зайцева Елена Александровна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры микробиологии и вирусологии¹
✉ 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (902) 524 57 20.
E-mail: elza200707@mail.ru

Чувствительность листерий к антимикробным препаратам определяли на среде Мюллера – Хинтона (BioMerieux) диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Полученные данные обработаны при помощи пакета прикладных программ Statistica 10.0 в операционной системе Windows 2010 с применением метода параметрического анализа: рассчитывались относительные значения (%) и их стандартные ошибки.

Результаты

Для сравнительного анализа все исследуемые культуры *L. innocua* разделили на группы в зависимости от источника выделения: в одну группу вошли изоляты листерий из пищевых продуктов (n=35), в другую – из объектов внешней среды: смывов с производственного оборудования (n=6) и наземных растений (n=9). При изучении биологических свойств *L. innocua* отмечена стабильность фенотипических проявлений – морфология (встречались короткие, беспорядочно расположенные палочки, кокковидные формы и овоидные бактерии, которые окрашивались по Граму положительно), типичный рост колоний на питательных средах с характерным кисло-молочным запахом, голубое или голубовато-зеленое свечение в косо проходящем свете, наличие каталазы и отсутствие оксидазной активности.

Из всех исследованных культур подвижность при 22 °С показали только 38 ± 6,9% *L. innocua*. Выявлены культуры *L. innocua*, у которых подвижность отсутствовала или определялась при двух температурах: 22 °С и 37 °С (20 ± 5,7% и 42 ± 7% соответственно).

Известно, что листерии вариабельны по биохимической активности. В настоящее время для дифференциации разных видов листерий определяются ферментативные свойства в отношении трех углеводов – рамнозы, ксилозы и маннита [1]. В ходе настоящего исследования установлено: культуры *L. innocua* не ферментировали маннит (100% культур), разлагали до кислоты без газа рамнозу (70 ± 6,5%) и реже – ксилозу (42,8 ± 7%). При этом листерии, выделенные из овощей и объектов внешней среды, с большей частотой ферментировали рамнозу (92,8 ± 7,2% исследуемых культур) и реже – ксилозу (28,5 ± 12,5%) по сравнению с изолятами *L. innocua*, полученными из мясных и рыбных продуктов (рис. 1).

При анализе других биохимических свойств определили, что все исследуемые культуры *L. innocua* (n=21), независимо от источника выделения, через 24 часа разлагали до кислоты без газа

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России; 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, Российская Федерация

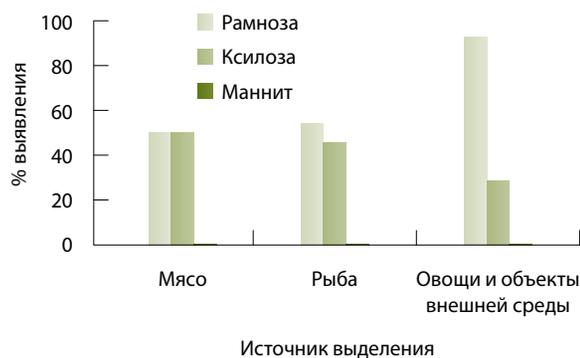


Рис. 1. Ферментативная активность *Listeria innocua*



Рис. 2. Липазная активность *Listeria innocua*

эскулин, глюкозу, фруктозу, маннозу, мальтозу, салицин и не ферментировали мочевины, дульцит, адонит, раффинозу, мелибиозу, арабинозу, крахмал. Отмечено медленное кислотообразование в отношении мальтозы (до 4 суток), лактозы (от 1 до 13 дней), мелицитозы (от 1 до 24 суток), медленное и слабое кислотообразование

Таблица 1. Факторы патогенности бактерий вида *Listeria innocua*, изолированных в Приморском крае

Признак/ ферментативная активность	Источник, % выявления			Всего выявлено, абс./ количество исследованных культур (%)
	мясные продукты (n = 24)	рыбные продукты (n = 11)	овощи и объекты окружающей среды (n = 15)	
Каталазная	100	100	100	50/50 (100)
Лецитиназная	0	0	0	0/50 (0)
ДНКазная	58,3 ± 10,3	100	33,3 ± 12,6	30/50 (60 ± 6,9)
Гемолитическая	26,1 ± 9,4	58,3 ± 14,8	26,7 ± 11,8	17/50 (34 ± 6,7)
Липолитическая				
твин 20	90 ± 10	83,3 ± 16,6	90,9 ± 9	24/27 (88,9 ± 6,2)
твин 60	100	100	54,5 ± 15,7	22/27 (81,5 ± 7,6)
твин 80	80 ± 13,3	100	81 ± 12,4	23/27 (85,2 ± 6,9)

Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки (M ± m)

в отношении галактозы (от 2 до 15 дней). По отношению к другим углеводам (маннозе, сахарозе и мелицитозе) листерии показали переменные результаты. Мелицитозу разлагали до кислоты без газа 76,2 ± 9,5% культур, маннозу – 92 ± 3,8%, сахарозу – 85,7 ± 7,8% исследуемых *L. innocua*.

У всех культур изучался *in vitro* ряд ферментов, которые могут участвовать в развитии инфекционного процесса (каталаза, ДНКазная, лецитиназная, липолитическая и гемолитическая активности) (табл. 1). Все *L. innocua* были каталазоположительны, большинство культур показали ДНКазную активность, у них отсутствовала лецитиназная активность. Липаза определялась у всех культур *L. innocua* независимо от источника выделения, но отношение к твинам было переменным. При этом 59,3 ± 9,6% культур листерий ферментировали все три твин-субстрата. Большинство изолятов *L. innocua* (66,7 ± 9,2%) длительно гидролизуют твины (от 5 до 14 дней), что согласуется с данными литературы о длительности ферментации твинов до 10–14 дней* (рис. 2).

Выявлены культуры *L. innocua* (34 ± 6,7%) с гемолитической активностью (α- или β-типа), что не является характерным свойством для листерий данного вида. Обращают на себя внимание культуры листерий, выделенные из рыбной продукции, которые обладают не только гемолитической, но и ДНКазной активностью. Культуры листерий, показавшие гемолитическую активность, были дополнительно протипированы с помощью теста API Listeria и ПЦП для подтверждения их принадлежности к роду *Listeria* и виду *L. innocua*, при этом расхождений в результатах не наблюдалось.

Анализ антибиотикорезистентности изолятов листерий показал: все исследуемые *L. innocua* (100%) были чувствительны к препаратам групп пенициллинов (ампициллину, карбенициллину, комбинированному препарату амоксициллина и клавулановой кислоты), аминогликозидов (гентамицину, амикацину), карбапенемов (меропенему), фторхинолонов (офлоксацину) и резистентны к налидиксовой кислоте (табл. 2).

Обсуждение

Известно, что бактерии рода *Listeria* широко распространены в окружающей среде, обладают двойственной природой и способны в зависимости от среды обитания вести как сапрофитный, так и паразитический образ жизни. Огромному

* Бакулов ИА, Васильев ДА. Бактериологический контроль пищевых продуктов на наличие листерий: метод, рекомендации. Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина; 1999. 38 с. (далее – Бакулов И.А., Васильев Д.А., 1999).

Таблица 2. Чувствительность бактерий вида *Listeria innocua* к антимикробным препаратам

Препарат	Количество исследованных культур, n	Антибиотикочувствительность бактерий, абс. (%)		
		чувствительные	с промежуточной резистентностью	резистентные
Группа макролидов				
klarитромицин	38	37 (97,4±2,6)	0	1 (2,63±2,6)
рокситромицин	38	37 (97,4±2,6)	0	1 (2,63±2,6)
эритромицин	38	36 (94,7±3,6)	1 (2,63±2,6)	1 (2,63±2,6)
азитромицин	38	37 (97,4±2,6)	1 (2,6±2,6)	0
Группа фторхинолонов				
налидиксовая кислота	25	0	0	25 (100)
офлоксацин	38	38 (100)	0	0
ципрофлоксацин	38	33 (86,8±5,5)	1 (2,6±2,6)	4 (10,5±5)
пемфлоксацин	38	25 (65,8±7,7)	2 (5,3±3,6)	11 (28,9±7,4)
норифлоксацин	38	28 (73,7±7,1)	5 (13,2±5,5)	5 (13,2±5,5)
ломефлоксацин	38	21 (55,3±8)	16 (42,1±8)	1 (2,63±2,6)
левофлоксацин	27	26 (96,3±3,7)	0	1 (3,7±3,7)
спарфлоксацин	27	16 (59,3±9,6)	10 (37,04±9,5)	1 (3,7±3,7)
Группа пенициллинов				
карбенициллин	38	38 (100)	0	0
ампициллин	38	38 (100)	0	0
пенициллин	38	37 (97,4±2,6)	0	1 (2,63±2,6)
амоксциллин	27	26 (96,3±3,7)	0	1 (3,7±3,7)
амоксциллин + клавулановая кислота	25	25 (100)	0	0
Группа ансамицинов				
рифампицин	38	37 (97,4±2,6)	0	1 (2,63±2,6)
Группа аминогликозидов				
амикацин	38	38 (100)	0	0
гентамицин	38	38 (100)	0	0
Группа тетрациклинов				
доксциклин	38	33 (86,8±5,5)	2 (5,3±3,6)	3 (7,9±4,4)
тетрациклин	38	29 (76,3±6,9)	6 (15,8±5,9)	3 (7,9±4,4)
Группа цефалоспоринов				
цефазолин	38	35 (92,1±4,4)	1 (2,63±2,6)	2 (5,3±3,6)
цефалексин	27	18 (66,7±9,1)	5 (18,5±7,6)	4 (14,8±6,9)
цефуросим	38	25 (65,8±7,7)	9 (23,7±6,9)	4 (10,5±5)
цефотаксим	38	16 (42,1±8)	15 (39,5±7,9)	7 (18,4±6,3)
цефтазидим	36	3 (8,33±4,6)	3 (8,33±4,6)	30 (83,3±6,2)
цефоперазон	38	33 (86,8±5,5)	5 (13,2±5,5)	0
цефтриаксон	27	14 (51,8±9,8)	9 (33,3±9,2)	4 (14,8±6,9)
Группа трициклических гликопептидов				
ванкомицин	38	37 (97,4±2,6)	0	1 (2,63±2,6)
Группа левомицетинов				
хлорамфеникол	27	23 (85,2±6,8)	4 (14,8±6,9)	0
Группа карбапенемов				
меропенем	27	27 (100)	0	0
Группа полимиксинов				
полимиксин	27	4 (14,8±6,9)	2 (7,4±5,1)	21 (77,8±8)

*Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки (M±m)



многообразию условий сред обитания этих бактерий соответствует широкий спектр их адаптационных возможностей (существовать в большом диапазоне температуры, влажности, рН среды), увеличивающий их шансы на выживание в различных экологических условиях. Многие зарубежные авторы считают преобладающим распространение *L. innocua* среди морепродуктов [12, 18]. В наших исследованиях этот вид листерий также часто выделяли из мясной продукции (говядины, свинины, пельменей, мясных палочек). Почти вся мясная продукция, из которой были выделены *L. innocua*, была замороженной, тогда как большинство рыбной продукции и овощей – охлажденными или свежими. Среди мясной продукции и овощей преобладали полуфабрикаты, рыбной – продукция, готовая к употреблению [13].

Необходимо отметить, что многие исследователи говорят о преобладании *L. innocua* в морской воде по сравнению с другими видами листерий, особенно много их в прибрежных водах. Наличие атипичных *L. innocua* в морской воде может стать причиной контаминации рыб, кальмаров, ракообразных и других животных (морепродукты), что, в свою очередь, может представлять опасность для людей [18].

Листерии вариабельны по биохимической активности, и выделенным культурам листерий присуще непостоянство их биохимических и биологических признаков. Практически все тесты по ферментации листериями углеводов, кроме эскулина, не дают 100% идентификации микроорганизма до вида. В настоящее время для дифференциации разных видов листерий определяются ферментативные свойства в отношении трех углеводов – рамнозы, ксилозы и маннита [1]. Известно, что для вида *L. innocua* характерно отсутствие ферментации маннита, L-рамнозы, D-ксилозы и наличие гидролиза α-метил-D-маннозида [1]. Данные, полученные нами при изучении фенотипических проявлений биологических свойств *L. innocua*, выделенных из пищевых продуктов и объектов внешней среды в Приморском крае, показали вариабельность некоторых из них в зависимости от источника выделения культуры (наличие подвижности или ее отсутствие при двух температурах, биохимическую активность). В ходе настоящего исследования установлено, что *L. innocua* не ферментировали маннит, но разлагали рамнозу ($70 \pm 6,5\%$) и ксилозу ($42,8 \pm 7\%$). В большей степени это было характерно для листерий, выделенных из овощей и объектов внешней среды, чем для изолятов, полученных из мясных и рыбных продуктов.

Выявлены вариабельные свойства *L. innocua* по отношению к маннозе, сахарозе и мелицитозе. Большинство исследуемых культур листерий гидролизировали маннозу ($92 \pm 3,8\%$), сахарозу ($85,7 \pm 7,8\%$) и мелицитозу ($76,2 \pm 9,5\%$). Отмечено медленное кислотообразование в отношении мальтозы (до 4 суток), лактозы (от 1 до 13 дней), мелецитозы (от 1 до 24 суток), медленное и слабое в отношении галактозы (от 2 до 15 дней). Вместе с тем по данным литературы у *L. innocua* медленное кислотообразование установлено только в отношении мальтозы.

Отечественные ученые рекомендуют при идентификации листерий учитывать их способность разлагать глюкозу, салицин, рамнозу, маннозу и мальтозу наряду с отсутствием разложения дульцита, инулина и арабинозы (Бакулов И.А., Васильев Д.А., 1999). В нашей работе все изученные культуры *L. innocua* ($n=21$), независимо от источника выделения, через 24 часа разлагали до кислоты без газа кроме глюкозы, салицина, мальтозы еще и эскулин, фруктозу, и не ферментировали мочевины, дульцит, адонит, раффинозу, мелибиозу, арабинозу, крахмал. Возможно, выявленные особенности фенотипических проявлений биохимической активности *L. innocua*, выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, свидетельствуют о появлении атипичных штаммов и помогут в дальнейшем дифференцировать их от других видов листерий.

При изучении факторов патогенности у *L. innocua* выявили нехарактерную для бактерий этого вида гемолитическую активность. Отмечено 17 культур, у которых на кровяном агаре наблюдалась гемолитическая активность (α- или β-типа), чаще среди *L. innocua*, выделенных из рыбы. При помощи теста API Listeria и ПЦР было получено подтверждение, что данные культуры действительно относятся к виду *L. innocua* (определена биохимическая активность и генетическая структура, характерные именно для *L. innocua*) [17]. Выявленная нами у *L. innocua* гемолитическая активность указывает на появление атипичных свойств. Это согласуется с выводами других исследователей, связывающих гемолитическую активность атипичных штаммов *L. innocua* с наличием в их геноме кластеров генов, аналогичных *L. monocytogenes* [10, 14].

В процессе адаптации микроорганизма к определенным условиям существования немаловажное значение отводится антибиотикорезистентности бактерий, которые могут приобретать новые признаки, ранее для них не характерные. В нашем исследовании культуры *L. innocua* сохраняют высокую чувствительность

Благодарность

Автор выражает благодарность С.М. Стародумовой за совместное проведение молекулярно-генетических исследований по типированию листерий, д.б.н. Л.С. Бузолевой за предоставленную возможность проводить исследования на базе лаборатории экологии патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», а также сотрудникам экспериментально-производственной лаборатории НИИЭМ им. Г.П. Сомова – инженеру Л.Н. Фатеевой и лаборанту С.И. Тарабановой.



к антимикробным препаратам, широко используемым в настоящее время.

В заключение отметим: полученные нами данные показали вариабельность фенотипических проявлений биологических свойств *L. innocua* в зависимости от источника выделения, выявлены культуры с атипичными свойствами, что диктует необходимость дальнейшего более глубокого изучения микроорганизмов данного вида.

Выводы

1. Анализ биологических свойств листерий, изолированных из различных источников,

Конфликт интересов
Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование
Исследование проводилось без привлечения спонсорских средств.

показал, что из пищевых продуктов и объектов окружающей среды выявляются культуры *L. innocua* с атипичными свойствами.

2. Отмеченная вариабельность подвижности, биохимической и ферментативной активности факторов патогенности свидетельствует о фенотипической неоднородности *L. innocua*, выделенных на территории Приморского края.
3. Культуры *L. innocua*, изолированные из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, сохраняют высокую чувствительность к антимикробным препаратам из разных групп. ☺

Литература

1. Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Ермолаева СА. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002. 200 с.
2. Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. Eur J Intern Med. 2006;17(4):286–7. doi: 10.1016/j.ejim.2005.12.006.
3. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scortti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Leclercq M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):136–8. doi: 10.3201/eid1601.091155.
4. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2008;10(6):434–6. doi: 10.1111/j.1399-3062.2008.00333.x.
5. Salimnia H, Patel D, Lephart PR, Fairfax MR, Chandrasekar PH. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2010;12(6):526–8. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00539.x.
6. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. Schweiz Med Wochenschr. 1986;116(8):248–51.
7. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5308–9. doi: 10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003.
8. Andre P, Genicot A. First isolation of *Listeria welshimeri* in a human. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A. 1987;263(4):605–6.
9. Montazeri N, Himelbloom BH, Oliveira AC, Leigh MB, Crapo CA. Refined liquid smoke: a potential anti-*Listeria* additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J Food Prot. 2013;76(5):812–9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-368.
10. Volokhov DV, Duperrier S, Neverov AA, George J, Buchrieser C, Hitchins AD. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2007;73(6):1928–39. doi: 10.1128/AEM.01796-06.
11. Johnson J, Jinneman K, Stelma G, Smith BG, Lye D, Messer J, Ulaszek J, Evsen L, Gendel S, Bennett RW, Swaminathan B, Pruckler J, Steigerwalt A, Kathariou S, Yildirim S, Volokhov D, Rasooly A, Chizhikov V, Wiedmann M, Fortes E, Duvall RE, Hitchins AD. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Appl Environ Microbiol. 2004;70(7):4256–66. doi: 10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004.
12. El-Shenawy M, El-Shenawy M, Mañes J, Soriano JM. *Listeria* spp. in Street-Vended Ready-to-Eat Foods. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2011;2011:968031. doi: 10.1155/2011/968031.
13. Зайцева ЕА, Ермолаева СА, Пуховская НМ, Мусатов ЮС, Иванов ЛИ, Сомов ГП. Распространение *Listeria monocytogenes* и ее роль в инфекционной патологии на Дальнем Востоке России. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010;(4):19–23.
14. Clayton EM, Daly KM, Guinane CM, Hill C, Cotter PD, Ross PR. Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. BMC Microbiol. 2014;14:58. doi: 10.1186/1471-2180-14-58.
15. Rocha PR, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, Capucchio MT. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res Vet Sci. 2013;94(1):111–4. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.017.
16. Fentahun T, Fresebehat A. Listeriosis in small ruminants: a review. Advan Biol Res. 2012;6(6):202–9. doi: 10.5829/idosi.abr.2012.6.6.66159.
17. Стародумова СМ, Зайцева ЕА. Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплексной ПЦР. Тихоокеанский медицинский журнал. 2014;(1):95–7.
18. El-Shenawy MA. *Listeria* spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea. Epidemiol Infect. 2006;134(4):752–7. doi: 10.1017/S0950268805005601.

References

1. Tartakovskiy IS, Maleev VV, Ermolaeva SA. *Listeria*: their role in infectious disease in humans and laboratory diagnostics. Moscow: Meditsina dlya vsekh; 2002. 200 p. Russian.
2. Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. Eur J Intern Med. 2006;17(4):286–7. doi: 10.1016/j.ejim.2005.12.006.
3. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scortti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Leclercq M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):136–8. doi: 10.3201/eid1601.091155.
4. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2008;10(6):434–6. doi: 10.1111/j.1399-3062.2008.00333.x.
5. Salimnia H, Patel D, Lephart PR, Fairfax MR, Chandrasekar PH. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient.



- Transpl Infect Dis. 2010;12(6):526–8. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00539.x.
6. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116(8):248–51.
 7. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5308–9. doi: 10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003.
 8. Andre P, Genicot A. First isolation of *Listeria welshimeri* in a human. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1987;263(4):605–6.
 9. Montazeri N, Himelbloom BH, Oliveira AC, Leigh MB, Crapo CA. Refined liquid smoke: a potential anti-*Listeria* additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J Food Prot.* 2013;76(5):812–9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-368.
 10. Volokhov DV, Duperrier S, Neverov AA, George J, Buchrieser C, Hitchins AD. The presence of the internalin gene in natural atypical hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1928–39. doi: 10.1128/AEM.01796-06.
 11. Johnson J, Jinneman K, Stelma G, Smith BG, Lye D, Messer J, Ulaszek J, Evsen L, Gendel S, Bennett RW, Swaminathan B, Pruckler J, Steigerwalt A, Kathariou S, Yildirim S, Volokhov D, Rasooly A, Chizhikov V, Wiedmann M, Fortes E, Duvall RE, Hitchins AD. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(7):4256–66. doi: 10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004.
 12. El-Shenawy M, El-Shenawy M, Mañes J, Soriano JM. *Listeria* spp. in Street-Vended Ready-to-Eat Foods. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2011;2011:968031. doi: 10.1155/2011/968031.
 13. Zaitseva EA, Ermolaeva SA, Pukhovskaya NM, Musatov YuS, Ivanov LI, Somov GP. Spreading *Listeria monocytogenes* and its role in infectious pathology in the Russian Far East. *Pacific Medical Journal.* 2010;(4):19–23. Russian.
 14. Clayton EM, Daly KM, Guinane CM, Hill C, Cotter PD, Ross PR. Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. *BMC Microbiol.* 2014;14:58. doi: 10.1186/1471-2180-14-58.
 15. Rocha PR, Dalmasso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, Capucchio MT. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res Vet Sci.* 2013;94(1):111–4. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.017.
 16. Fentahun T, Fresebehat A. Listeriosis in small ruminants: a review. *Advan Biol Res.* 2012;6(6):202–9. doi: 10.5829/idosi.abr.2012.6.6.66159.
 17. Starodumova SM, Zaitseva EA. The way of a quick identification of bacteria genus *Listeria* and pathogenic species of *Listeria monocytogenes* by means of the multiplex polymerase chain reaction. *Pacific Medical Journal.* 2014;(1):95–7. Russian.
 18. El-Shenawy MA. *Listeria* spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea. *Epidemiol Infect.* 2006;134(4):752–7. doi: 10.1017/S0950268805005601.

Specific biological properties of *Listeria innocua* spp. isolated in Primorye Territory

Zaitseva E.A.¹

Rationale: Most cases of listeriosis are caused by the pathogenic *Listeria monocytogenes*. Some cases of isolation of *L. innocua* with pathogenicity factors from foods have been published, as well as on the cases of the disease in humans caused by this species. **Aim:** To assess biological properties including potential pathogenicity of *L. innocua*, isolated from food and environmental objects. **Materials and methods:** We performed microbiological study of *L. innocua* cultures isolated from foods (n=35) and environmental objects (n=15) on the territory of Primorye Territory (Russian Federation), as well as assessment of their sensitivity to antibiotics. **Results:** The studied *L. innocua* cultures showed stable phenotypic features of their biological properties, such as morphology, typical colony growth on the medium with characteristic odor of fermented milk, blue or blue-green luminescence induced by inclined light, presence of catalase activity and absence of the oxidase activity. Only 38±6.9% of *L. innocua* demonstrated movements at T 22 °C. *L. innocua* cultures did not ferment mannitol (100% of cultures); they degraded ramnose to its acid without gas (70±6.5%) and degraded xylose (42.8±7%). *Listeria* isolated from vegetables and environmental objects could

ferment ramnose (92.8±7.2% of the studied cultures) and xylose (28.5±12.5%) more frequently than *L. innocua* isolated from meat and fish foods. *L. innocua* demonstrated variable biochemical activities towards mannose (92±3.8%), saccharose (85.7±7.8%) and melisitose (76.2±9.5%). *L. innocua* cultures with hemolytic activity (34±6.7%) (α or β type) were isolated, more commonly from fish products. All *Listeria* irrespective of their isolation source showed lipase activity. *L. innocua* cultures from foods and environmental objects were highly sensitive to antimicrobials from the following classes: penicillins (ampicillin, carbenicillin, combined amoxicillin and clavulanic acid), aminoglycosides (gentamycin, amikacin), carbapenems (meropenem), and fluoroquinolones (ofloxacin). **Conclusion:** Some biological properties of *L. innocua* were variable depending on the source of isolation. Isolation of *Listeria* with atypical properties in the territory of Primorye Territory requires that these microorganisms should be studied in more detail.

Key words: *Listeria innocua*, hemolytic activity, atypical strains, pathogenicity factors, antibiotic sensitivity

Zaitseva Elena A. – MD, PhD, Professor, Chair of Microbiology and Virology¹
 ✉ 2 Ostryakova prospekt, Vladivostok, 690002, Russian Federation. Tel.: +7 (902) 524 57 20.
 E-mail: elza200707@mail.ru



Способность к адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

Харсеева Г.Г.¹ • Алиева А.А.¹ • Сылка О.И.¹ • Тюкавкина С.Ю.¹ • Алексеева Л.П.²

Актуальность. Адгезия и способность к образованию биопленки рассматриваются среди ведущих факторов патогенности *Corynebacterium diphtheriae*, обуславливающих формирование бактерионосительства. Именно за счет бактерионосительства осуществляется циркуляция штаммов возбудителя дифтерии в межэпидемический период. **Цель** – определение и сравнительный анализ адгезивной активности типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. **Материал и методы.** Исследованы типовые и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры штаммов *C. diphtheriae*. Их тестирование на способность формировать биопленку проводили по методике Р. Watnick (2000). Способность к адгезии исследовали на культуре клеток карциномы фарингеального

эпителия Нер-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 часов). Количество *C. diphtheriae*, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путем посева смыва на 20% сыровоточный агар с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. **Результаты.** Все типовые и биопленочные культуры исследованных штаммов токсигенных *C. diphtheriae* обладали адгезивной активностью разной степени выраженности. При этом наиболее высокие показатели адгезии обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (от $0,26 \pm 0,01$ до $203,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл), что отличалось от аналогичных показателей у других исследованных штаммов (от $0,03 \pm 0,003$ до $0,20 \pm 0,01$ КОЕ/мл). Наименьшей адгезивной активностью при 2-часовой экспозиции

культивирования обладали как типовая, так и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, при 8- и 18-часовой – штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269. У всех культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* способность к адгезии в динамике статистически значимо ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му часу культивирования. **Заключение.** Наиболее выраженные адгезивные свойства из всех исследованных токсигенных штаммов возбудителя дифтерии характерны для циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, адгезия, типовые и биопленочные культуры

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-154-158

Циркуляция токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в популяции сохраняется несмотря на проведение вакцинопрофилактики дифтерийным анатоксином. Это связано с тем, что он не содержит компонентов поверхностных структур бактериальной клетки, не способен прерывать процесс адгезии возбудителя дифтерии и, как следствие, формирование бактерионосительства [1].

Адгезия *C. diphtheriae* играет важнейшую роль в колонизации возбудителем слизистой оболочки зева, а это необходимое условие для дальнейшего развития инфекционного процесса [2]. Способность к адгезии у возбудителя дифтерии рассматривается как один из ведущих факторов патогенности [3, 4]. Различная способность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* к адгезии

обусловлена непосредственно компонентами клеточной стенки, а также поверхностными структурами коринебактерий – пили (фимбрии), липоарабиноманнан (CdiLAM), поверхностные белки DIP0733 (или 67-72p) и DIP1281 [5, 6]. Главным структурным компонентом коринебактерий, способствующим их адгезии, признаны пили (фимбрии), которые ковалентно связаны с пептидогликаном клеточной стенки. CdiLAM, расположенный на поверхности клеточной оболочки *C. diphtheriae*, определяет связывание с эпителиальными клетками хозяина и активирует дендритные клетки и Т-хелперы, взаимодействуя с TLR2 [5, 7]. Белок DIP0733 (или 67-72p), обнаруженный у штаммов *C. diphtheriae*, лишенных фимбрий [7–9], способен распознавать и специфически связываться не только с клетками респираторного тракта, но и с эритроцитами человека,



вызывая их агрегацию [8]. Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* обладают более выраженными адгезивными свойствами, чем нетоксигенные [10].

Одним из факторов, предрасполагающих к длительной персистенции бактерий в человеческом организме, считается их способность образовывать биопленки. Однако биопленкообразующая активность возбудителя дифтерии в литературе описана не достаточно [11, 12]. Предположительно, способность к биопленкообразованию играет важную роль в генезе дифтерийного бактерионосительства. В составе биопленки *C. diphtheriae* обладают меньшими размерами, располагаясь в виде плотно сцепленных кластеров, покрытых общим матриксом. Они оказывают ингибирующее воздействие на функциональную активность макрофагов, индуцируя процессы их апоптоза, а также становятся более устойчивыми к воздействию антибиотиков [12–15].

В связи с этим целью настоящего исследования было определение и сравнительный анализ адгезивной активности типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Материал и методы

Исследованы типовые и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, полученных из Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича; *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного с диагнозом локализованной формы дифтерии бактериологической лабораторией ФГУ «1002 центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Северо-Кавказского военного округа» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный в полимеразной цепной реакции при определении гена дифтерийного токсина), предоставленного МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко города Ростова-на-Дону».

Культивирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли в стеклянных (гидрофильных) пробирках, содержащих 3 мл 20% сывороточного бульона. Тестирование штаммов *C. diphtheriae* на способность формировать биопленку проводили по методике Р. Watnick и соавт. (2000) [16]. Предварительно по стандарту Мак-Фарланда готовили микробную взвесь *C. diphtheriae* густотой

10⁹ КОЕ/мл. Полученную микробную взвесь в разведении 1:100 вносили в объеме 0,1 мл в пробирку с 3 мл 20% сывороточного бульона и инкубировали в термостате при +37 °С 120 и 720 часов.

Способность к адгезии штаммов *C. diphtheriae* исследовали в соответствии с указаниями L. Ott и соавт. [3, 17] на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия НЕр-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 часов). Непосредственно перед опытом *C. diphtheriae* культивировали на кровяном агаре (рН 7,6–7,8) в течение 18 часов. Взвесь *C. diphtheriae* густотой 10⁹ КОЕ/мл вносили в сывороточный бульон (рН 7,6–7,8), выдерживали в термостате (+37 °С) в течение 24 часов. Готовили взвесь дифтерийных микробов в среде RPMI-1640 с добавлением 5% сыворотки эмбриональной бычьей в концентрации 10⁶ КОЕ/мл и по 1 мл вносили в лунки с разреженным монослоем НЕр-2. Количество *C. diphtheriae*, адгезированных на клетках НЕр-2, определяли путем посева смыва на 20% сывороточный агар с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой статистической значимости показателей и различий по критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при $p \leq 0,05$. В тексте и таблицах результаты экспериментов представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

В проведенных нами ранее исследованиях [12, 15] установлено, что пик образования межмикробного матрикса музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 приходился на ранние сроки (120-й час культивирования), а циркулирующим – на более поздние (720-й час культивирования). В соответствии с этим и было проведено исследование адгезивных свойств 120- и 720-часовых биопленочных культур различных токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Все типовые и биопленочные культуры исследованных токсигенных штаммов *C. diphtheriae* обладали адгезивной активностью разной степени выраженности (таблица), при этом наиболее высокие показатели адгезии ($(КОЕ \pm m) \times 10^2$) среди всех культур обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*. Так, при 2-часовой экспозиции культивирования типовой культуры

Харсеева Галина Георгиевна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2¹

Алиева Анна Александровна – старший лаборант кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹
✉ 344015, г. Ростов-на-Дону, ул. Еременко, 58–74, Российская Федерация.
Тел.: +7 (928) 192 02 06.
E-mail: anna1976rita@mail.ru

Сылка Ольга Ивановна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹

Тюкавкина Светлана Юрьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹

Алексеева Людмила Павловна – д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией гибридом²

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, Российская Федерация

² ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора; 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, Российская Федерация

Адгезивные свойства типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae* при различных экспозициях, (КОЕ ± m) × 10²

Штаммы	Типовые культуры			120-часовые биопленочные культуры			720-часовые биопленочные культуры		
	2 часа	8 часов	18 часов	2 часа	8 часов	18 часов	2 часа	8 часов	18 часов
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	0,26 ± 0,01	33,3 ± 3,3**	193,3 ± 3,3**	0,24 ± 0,01	32,3 ± 3,3**	203,3 ± 3,3**	0,26 ± 0,01	34,12 ± 0,14**	201,41 ± 0,35**
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665	0,13 ± 0,01	26,8 ± 0,36**	113,3 ± 3,3**	0,14 ± 0,01	27,8 ± 0,36**	120,0 ± 0,01**	0,17 ± 0,02	20,72 ± 0,24**	112,0 ± 0,1**
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 6765	0,03 ± 0,003	20,2 ± 2,86**	60,0 ± 5,8**	0,096 ± 0,01	20,2 ± 2,87**	61,0 ± 0,6**	0,05 ± 0,05	19,87 ± 0,17**	60,6 ± 0,57**
<i>C. diphtheriae gravis</i> с «молчащим» tox-геном	0,20 ± 0,01	14,5 ± 0,1**	27,7 ± 0,34**	0,21 ± 0,01	13,7 ± 0,1**	26,7 ± 0,31**	0,19 ± 0,01	15,96 ± 0,08**	18,0 ± 0,01**
<i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> № 269	0,17 ± 0,01	18,02 ± 0,04**	18,9 ± 0,27**	0,22 ± 0,09	17,8 ± 0,04**	19,6 ± 0,22**	0,23 ± 0,01	13,03 ± 0,14**	25,0 ± 0,01**

* Статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между типовыми и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции** Статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между экспозициями 2 часа и 8 часов, 2 часа и 18 часов для каждой культуры (типовой и биопленочной)

циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* этот показатель составил $0,26 \pm 0,01$ КОЕ/мл, что отличалось ($p \leq 0,05$) от результатов определения адгезии других исследованных штаммов (от $0,03 \pm 0,003$ до $0,20 \pm 0,01$ КОЕ/мл). Аналогичные результаты получены при 8- и 18-часовых экспозициях культивирования типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур *C. diphtheriae*. Наименьшей адгезивной активностью при 2-часовой экспозиции культивирования обладали как типовая, так и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, при 8- и 18-часовой – штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269.

При исследовании адгезивных свойств типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур внутри каждой временной экспозиции (2, 8, 18 часов) при культивировании в течение 2 часов статистически значимых различий обнаружено не было. При 8-часовой экспозиции культивирования адгезивные свойства биопленочных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae* не изменялись по сравнению с типовыми, за исключением 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, у которых адгезивность снижалась ($p \leq 0,05$). К 18-му часу культивирования адгезивная активность увеличивалась ($p \leq 0,05$) у 120- и 720-часовых биопленочных культур

штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), 120-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и 720-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269. Снижение адгезивных свойств отмечено у 720-часовой биопленочной культуры *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном.

Изучение способности к адгезии в динамике показало: и у типовых, и у биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* она статистически значимо ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му часу культивирования.

Обсуждение

Как известно, токсигенные штаммы возбудителя дифтерии обладают более выраженными адгезивными свойствами, чем нетоксигенные. Однако процесс адгезии более интенсивно протекает у убитых культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем у живых, что сопряжено с повреждающим действием дифтерийного экзотоксина на клетки [3, 17]. В связи с этим в нашем исследовании мы использовали культуру клеток карциномы фарингеального эпителия НЕр-2, не чувствительную к действию токсина. Установлено, что при исследовании типовых культур *C. diphtheriae* наиболее высокие показатели адгезии при всех временных экспозициях обнаружены у циркулирующего



штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, низкие – у штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765 (при экспозиции 2 часа), а также *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269 (при экспозиции 8 и 18 часов). Аналогичные результаты получены при изучении биопленочных культур *C. diphtheriae*. Таким образом, адгезивный потенциал циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного, выше такового не только штаммов биовара *mitis*, но и музейных *C. diphtheriae gravis tox⁺*, а также штамма *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном, не способного продуцировать токсин. Поскольку межмикробный матрикс при формировании биопленки возбудителем дифтерии

имеет преимущественно белковую природу, можно предположить, что в его образовании важную роль играют адгезины.

Заключение

Наиболее выраженные адгезивные свойства из всех исследованных токсигенных штаммов возбудителя дифтерии обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, у которого высока и интенсивность биопленкообразования. Выраженная способность к адгезии и, как следствие, к биопленкообразованию позволяет возбудителю колонизировать слизистую оболочку зева и длительно персистировать в организме при бактерионосительстве. ☺

Литература

- Харсеева ГГ, Москаленко ЕП, Трухачев АЛ, Митрофанова ТВ. Патогенные свойства *C. diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;(6):6–9.
- Костюкова НН, Карась СР. Адгезивная активность дифтерийных штаммов в зависимости от особенностей вызываемого ими инфекционного процесса. Журнал микробиологии. 1991;(11):24–7.
- Ott L, Höller M, Gerlach RG, Hensel M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. BMC Microbiol. 2010;10:2. doi: 10.1186/1471-2180-10-2.
- Rogers EA, Das A, Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. Adv Exp Med Biol. 2011;715:91–103. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_6.
- Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. ISRN Microbiol. 2013;2013:935736. doi: 10.1155/2013/935736.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. Trends Microbiol. 2008;16(1):33–40. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
- Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL, Andrade AF. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. Arch Microbiol. 2008;190(5):521–30. doi: 10.1007/s00203-008-0398-y.
- Colombo AV, Hirata R Jr, de Souza CM, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. FEMS Microbiol Lett. 2001;197(2):235–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10609.x.
- Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, Dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, Dos Santos AL, Tauch A, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. Microb Pathog. 2012;52(3):165–76. doi: 10.1016/j.micpath.2011.12.003.
- Харсеева ГГ, Алиева АА. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;(4):109–17.
- Sued BP, Pereira PM, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KR, Seabra SH, Hirata R Júnior, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JA. Sphingomonomers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(3):188–95. doi: 10.1590/0074-02760160381.
- Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Фролова ЯН, Лабушкина АВ. Биологические свойства *Corynebacterium diphtheriae* в составе биопленки. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012;(4):88–91.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell. 2006;124(4):715–27. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
- Харсеева ГГ, ред. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина; 2014. 241 с.
- Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Фролова ЯН, Лабушкина АВ. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;(2):36–8.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000;182(10):2675–9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- Ott L, Höller M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Hensel M, Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. BMC Microbiol. 2010;10:257. doi: 10.1186/1471-2180-10-257.
- Harseeva GG, Moskalenko EP, Truhachev AL, Mitrofanova TV. Pathogenic properties of *Corynebacterium diphtheriae* circulating in Rostov-on-Don city and Rostov Region during interepidemic period. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2006;(6):6–9. Russian.
- Kostyukova NN, Karas' SR. Adhesivity of diphtheria strains depending on specifics of related infectious process. Journal of Microbiology. 1991;(11):24–7. Russian.
- Ott L, Höller M, Gerlach RG, Hensel M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. BMC Microbiol. 2010;10:2. doi: 10.1186/1471-2180-10-2.
- Rogers EA, Das A, Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. Adv Exp Med Biol.



- 2011;715:91–103. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_6.
5. Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol.* 2013;2013:935736. doi: 10.1155/2013/935736.
 6. Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 2008;16(1):33–40. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
 7. Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL, Andrade AF. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Arch Microbiol.* 2008;190(5):521–30. doi: 10.1007/s00203-008-0398-y.
 8. Colombo AV, Hirata R Jr, de Souza CM, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;197(2):235–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10609.x.
 9. Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, Dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, Dos Santos AL, Tauch A, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microb Pathog.* 2012;52(3): 165–76. doi: 10.1016/j.micpath.2011.12.003.
 10. Kharseeva GG, Alieva AA. Adhesion of *Corynebacterium diphtheriae*: the role of surface structures and formation mechanism. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2014;(4):109–17. Russian.
 11. Sued BP, Pereira PM, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KR, Seabra SH, Hirata R Júnior, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JA. Sphigmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(3): 188–95. doi: 10.1590/0074-02760160381.
 12. Kharseeva GG, Mironov AJ, Frolova JN, Labushkina AV. Biological properties of *Corynebacterium diphtheriae* in the composition of biofilm. *Immunopathology, allergology, infectious pathology.* 2012;(4):88–91. Russian.
 13. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 2006;124(4): 715–27. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
 14. Kharseeva GG, editor. *Diphtheria: microbiological and immunological aspects.* Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. 241 p. Russian.
 15. Kharseeva GG, Mironov AY, Frolova YaN, Labushkina AV. The ability of diphtheria causative agent to form biofilm. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2013;(2):36–8. Russian.
 16. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000;182(10):2675–9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
 17. Ott L, Höller M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Hensel M, Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. *BMC Microbiol.* 2010;10:257. doi: 10.1186/1471-2180-10-257.

Adhesivity of standard and biofilm cultures of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains

Kharseeva G.G.¹ • Alieva A.A.¹ • Sylka O.I.¹ • Tyukavkina S.Yu.¹ • Alekseeva L.P.²

Background: Adhesion and ability to form a biofilm are considered among the leading pathogenicity factors of *Corynebacterium diphtheriae*, responsible for bacterial carriage. It is exactly bacterial carriage that ensures the circulation of diphtheria pathogen strains in the inter-epidemic periods. **Aim:** To assess and compare adhesivity of standard and biofilm cultures of toxigenic *C. diphtheriae* strains. **Materials and methods:** We studied standard and biofilm (120 and 720 hour) cultures of *C. diphtheriae* strains. Their ability to form a biofilm was tested according to P. Watnick (2000). Adhesivity was assessed in the pharyngeal epithelial carcinoma Hep-2 cell culture with various time exposures (2, 8, and 18 hours). The amounts of *C. diphtheriae* adhered to Hep-2 cells were measured by culturing the swabs in the 20% serum agar with subsequent calculation of mean numbers of colony-forming units (CFU) per 1 mL. **Results:** All standard and biofilm cultures of the studied toxigenic strains of *C. diphtheriae* had adhesive properties of various degrees. The highest adhesivity was

found in a circulating strain *C. diphtheriae gravis tox⁺* (from 0.26 ± 0.01 to 203.3 ± 3.3 CFU/mL), which differed from the same parameters in other strains studied (from 0.03 ± 0.003 to 0.20 ± 0.01 CFU/mL). The lowest adhesivity after a 2-hour exposure was found both in the standard and biofilm cultures of *C. diphtheriae gravis tox⁺* 6765, whereas after the exposure of 8 and 18 hours, the lowest adhesion properties were demonstrated by *C. diphtheriae gravis* with a “silent” tox gene and *C. diphtheriae mitis tox⁺* 269. All cultures of toxigenic *C. diphtheriae* strains showed a statistically significant increase in their adhesivity (p ≤ 0.05) by 8 and 18 hour of cultivation. **Conclusion:** Circulating *C. diphtheriae gravis tox⁺* strain demonstrated the highest adhesivity among all toxigenic strains of the diphtheria pathogens studied.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, adhesion, typical and biofilm cultures

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-154-158

Kharseeva Galina G. – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Alieva Anna A. – Senior Laboratory Assistant, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

✉ 58–74 Eremenko ul., Rostov-on-Don, 344015, Russian Federation. Tel.: +7 (928) 192 02 06. E-mail: anna1976rita@mail.ru

Sylka Olga I. – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Tyukavkina Svetlana Yu. – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Alekseeva Lyudmila P. – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of the Laboratory of Hybridomas²

¹ Rostov State Medical University; 29 Nakhichevskiy pereulok, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

² Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; 117/40 M. Gor'kogo ul., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation



Методика расчета энергетической ценности питательных сред на основе стехиометрических закономерностей процесса биологического окисления

Хохлова О.Б.¹ • Кузнецова Е.Д.¹ • Сапожникова Н.Г.¹

Предлагаемая методика расчета энергетической ценности питательных сред использует стехиометрические закономерности реакций биологического окисления в клетке и позволяет оценить пищевую ценность органических субстратов на основе их элементного состава. В третьей стадии катаболизма, универсальном пути биологического окисления органических соединений, являющихся питательными субстратами, участвуют три элемента-органогена: углерод, водород и кислород. Их содержание в составе органического соединения (пищевого субстрата) позволяет рассчитать количество энергии, превращенной в работу в процессе метаболизма клетки. Идея расчета энергетической ценности пищевого субстрата опирается на принцип энергетического сопряжения, согласно которому в клетке полезная энергия пищевых субстратов аккумулируется

в макроэргических связях аденозинтрифосфата (АТФ), образованных за счет биологического окисления данного субстрата. При расчете пищевой ценности органических субстратов традиционно используется величина энергии абиотического окисления. Доля полезной энергии, превращенной в работу, в данном случае не рассматривается. Проблема применения данного подхода в том, что количество АТФ рассчитано только для нескольких универсальных метаболитов, путь окисления которых известен (пировиноградная кислота, уксусная кислота). Предложенная нами методика опирается на стехиометрические закономерности и позволяет рассчитать количество АТФ по элементному составу соединений или массовым долям углерода, водорода и кислорода. Результаты расчета энергии биологического окисления по нашей методике совпадают с данными

литературы для метаболитов процесса биологического окисления в цикле трикарбонных кислот. Представленная методика, опираясь на состав соединений, позволяет рассчитать энергетическую ценность для любого пищевого субстрата или питательной среды, содержащей самые разнообразные органические соединения, в том числе и в случае, когда их метаболический путь биологического окисления неизвестен и расчет биоэнергетической ценности не представляется возможным.

Ключевые слова: аденозинтрифосфат (АТФ), стехиометрические соотношения, биологическое окисление, энергетическое сопряжение, метаболиты, глюкоза, пируват

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-159-162

Питательные среды для микроорганизмов, а также пищевые продукты более высокоорганизованных биологических структур, включая человека, являются органическими соединениями, содержащими солнечную энергию, аккумулированную в процессе фотосинтеза, и служат источником энергии для гетеротрофов. Требования, предъявляемые к микробным питательным средам, помимо прочих условий (содержание воды и элементов питания, кислотность среды, окислительно-восстановительный потенциал) должны учитывать энергетическую ценность субстрата как источника питания [1–3]. Если критерии содержания минеральных элементов достаточно просто определить по элементному составу самих микроорганизмов, то подбор органических соединений может вызывать затруднение [1, 2]. Во-первых, органические соединения при нешироком разнообразии качественного состава, включающего основные элементы-органолены, обнаруживают бесконечное разнообразие строения и количественного состава. Во-вторых,

они содержат различное количество энергии, необходимой для гетеротрофов, к которым, в частности, относятся патогенные микроорганизмы [1, 2]. Именно поэтому при подборе органических компонентов для питательных сред целесообразно учитывать не только вещественный состав органической компоненты, но и ее энергетический потенциал. Классический подход для оценки энергии, аккумулированной в органическом веществе субстрата, базируется на расчете теплоты реакции полного абиотического окисления (сгорания) органического вещества до CO_2 и H_2O . На этом процессе построены все расчеты энергетической ценности для микробных сред, а также пищевого рациона человека. Однако данный подход не учитывает различия между биологическим и абиотическим окислением. Так, при стандартных условиях теплота сгорания глюкозы составляет $\Delta G = 2816$ кДж/моль, а при полном биологическом окислении в клетке в макроэргических связях аденозинтрифосфата (АТФ) аккумулируется всего $\Delta G = 1098$ кДж/моль, остальное рассеивается в виде тепла [4]. Таким



Хохлова Ольга

Борисовна – д-р с.-х. наук, доцент кафедры биологической и общей химии¹

✉ 150014, г. Ярославль, проспект Толбухина, 6–103, Российская Федерация.
Тел.: +7 (915) 988 16 37.
E-mail: obxoxlova@mail.ru

Кузнецова Елена

Дмитриевна – канд. хим. наук, доцент кафедры биологической и общей химии¹

Сапожникова Наталья

Гапдрашитовна – канд. хим. наук, старший преподаватель кафедры биологической и общей химии¹

образом, клеткой в свободную энергию, способную совершать работу, трансформируется менее 40% потенциальной энергии, аккумулированной в глюкозе.

Это явление давно известно – еще в середине XX века были открыты биоэнергетические закономерности трансформации энергии в клетке (А.Н. Бах, Г. Кребс, В.А. Энгельгардт, В.И. Палладин, С.Е. Северин, В.П. Скулачев и др.). На их основе был сформулирован принцип энергетического сопряжения, согласно которому в клетке все процессы с затратой энергии идут за счет энергии экзотермических, а точнее, экзергонических реакций. Экзергоническими называют реакции биологического окисления, идущие с выделением энергии. Основная часть энергии выделяется на третьей стадии катаболизма, включающей окислительное декарбоксилирование пирувата и цикл трикарбоновых кислот. Этот путь является общим для гетеротрофов, использующих энергию органических субстратов. Перенос энергии от одних процессов к другим осуществляется через универсального посредника АТФ, в концевой ангидридной связи которого аккумулируется примерно 30,5 кДж/моль [4]. Следовательно, рассчитав количество АТФ, которое образуется в организме за счет полного биологического окисления органического субстрата до углекислого газа, можно рассчитать биоэнергетическую ценность данного соединения. А значит, критерием энергетической ценности данного питательного субстрата может служить количество АТФ [4–6]. Из этого следует, что питательная ценность органического субстрата, рассчитанная через энергию абиотического окисления, не может служить объективным показателем его энергетической ценности. Тем не менее сегодня при расчете питательной или энергетической ценности любого пищевого продукта (в том числе питательных сред) по-прежнему используют энергетические расчеты абиотического окисления. Проблема в том, что количество АТФ, которое может быть образовано в результате полного биологического окисления субстрата, получено только для основных метаболитов, поскольку пути их трансформации в клетке хорошо изучены. Многообразие же органических соединений, как и метаболических путей микроорганизмов, затрудняет такую оценку.

С нашей точки зрения, эти расчеты можно максимально унифицировать, если использовать законы стехиометрии, лежащие в основе любых химических превращений (количественное соотношение всех элементов до и после превращения должно быть неизменным). Исходя из элементного состава любого органического соединения,

рассчитывается количество АТФ, которое может синтезироваться в клетке в результате полного окисления данного соединения. Количество биогенной энергии напрямую зависит от содержания и соотношения элементов-органогенов: водорода, углерода и кислорода [4]. На данной стадии катаболизма участвуют только эти три элемента. Их содержание рассчитывается исходя из общего состава соединения, куда входят и другие элементы, в том числе азот. Классические расчеты энергии биологического окисления основных метаболитов хорошо известны, для углеводов они опираются на реакции гликолиза (аэробное окисление глюкозы до пирувата), окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетата и полное окисление ацетата в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 . Полученная в этих процессах энергия в виде «горячих» электронов передается в дыхательную цепь, где используется в конечном итоге для синтеза АТФ. Энергия двух электронов идет на синтез не более трех молекул АТФ [4, 6–8]. Следует учитывать, что в клетке все ферментативные реакции окисления сопровождаются снятием не только электронов, но и протонов (H^+) с окисляемого субстрата ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$). За основу расчетов мы взяли следующее соотношение: снятие двух протонов и двух электронов с субстрата в процессе биологического окисления обеспечивает энергию для синтеза трех молекул АТФ [4, 8].

Все вышесказанное позволяет рассчитать количество АТФ, синтезируемого за счет энергии биологического окисления, на основе стехиометрических закономерностей данных реакций по количеству элементного водорода в органическом соединении. Однако рассчитать количество АТФ только на основе количества водорода в составе органической молекулы невозможно. В процессах биологического окисления участвуют протоны, полученные не только из органического субстрата, но и из воды, которая является метаболитом в данных процессах и служит источником кислорода для превращения органического углерода в CO_2 . На образование CO_2 в процессах биологического окисления идет не молекулярный кислород воздуха, как в процессе горения, а элементный кислород, входящий в состав органического (питательно-го) субстрата, и элементный кислород воды [4, 7, 8]. С помощью стехиометрии можно рассчитать количество воды, необходимой для полного окисления органического соединения, по количеству углерода в органическом субстрате и соответственно по количеству CO_2 , выделившегося в процессе биологического окисления. Таким образом, количество воды напрямую зависит от содержания элементного кислорода в органическом субстрате.

¹ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5, Российская Федерация



Например, метан CH_4 первоначально окисляется до CH_3OH , в процессе участвует одна молекула H_2O , при этом происходит снятие $2\bar{e}$, одного протона от субстрата и второго протона от молекулы воды. Передача двух протонов и электронов в цепь дыхания обеспечивает образование трех молекул АТФ [4, 7, 8]. Согласно стехиометрии то же количество всех составляющих, выраженное в молях, эквивалентно энергии 91,5 кДж/моль. При полном окислении метанола до CO_2 количество протонов равно 8, количество АТФ – 12, количество биогенной энергии – 366 кДж/моль. Для всех универсальных метаболитов заключительной стадии катаболизма, энергия биологического окисления которых известна и пути биологического окисления хорошо изучены, расчеты, проведенные по предложенной методике, совпадают с данными литературы. Так, биологическое окисление основного энергетического метаболита – глюкозы – до пирувата в процессе аэробного гликолиза предоставляет энергию для синтеза 6 молекул АТФ в процессе окислительного фосфорилирования. Далее идет окислительное декарбокислирование пирувата до ацетата с выделением энергии для 3 молекул АТФ (2 молекулы пирувата – 6 АТФ). В цикле трикарбоновых кислот идет полное окисление ацетата до CO_2 , выделяется энергия для синтеза 15 молекул АТФ как в процессе окислительного, так и субстратного фосфорилирования (2 молекулы ацетата, соответственно, эквивалентны 30 АТФ). Следовательно, при полном биологическом окислении глюкозы выделяется энергия, аккумулированная в конечных макроэнергетических связях 36 молекул АТФ [4, 7, 8].

Расчет энергии полного биологического окисления глюкозы по предложенной методике сводится к следующей схеме: в процессе полного биологического окисления глюкозы $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ образуется 6 CO_2 . Для этого требуется 12 атомов кислорода, 6 из которых предоставляет глюкоза, а остальные 6 – вода. В результате выделяется 24H ($\text{H}^+ + \bar{e}$). Каждая пара водорода ($\text{H}^+ + \bar{e}$) предоставляет энергию для синтеза 3 молекул АТФ. 24H (12 пар) = 36 АТФ = 1098 кДж/моль. Расчет энергии для ацетата дает 12 АТФ, для пирувата – 15 АТФ. Это полностью соответствует приведенным выше данным литературы.

Предлагаемая методика позволяет только на основе элементного состава органического субстрата, без изучения путей биологического окисления, рассчитать биоэнергетическую ценность любого органического соединения. Методику расчета, если известен элементный состав конкретного соединения, можно свести к алгоритму, представленному в таблице.

Состав органической молекулы	$\text{C}_m\text{H}_n\text{O}_z$ *
Количество углекислого газа, образованного в результате полного биологического окисления углерода молекулы	$m \text{CO}_2$
Количество атомов кислорода, необходимое для окисления углерода	$2m$
Количество воды как источника кислорода, недостающего для окисления углерода	$(2m - z) \text{H}_2\text{O}$
Суммарное количество атомов водорода, полученное в результате полного окисления углерода, эквивалентно количеству электронов – источника энергии для синтеза АТФ ($1\text{H}^+ = 1\bar{e}$)	$(n + 4m - 2z) \text{H}$
Количество АТФ, синтезированное за счет данного количества энергии водорода	$3(n + 4m - 2z) / 2$ АТФ

Алгоритм расчета энергии органической молекулы, аккумулирующейся в аденозинтрифосфате, в процессе биологического окисления

АТФ – аденозинтрифосфат

* m, n, z – количество атомов углерода, водорода и кислорода в молекуле соответственно

В конечном итоге расчет сводится к следующей стехиометрической формуле:

$$E = 183C + 45,75H - 91,5O \quad (\text{кДж/моль}) \quad (1),$$

где C, H и O – атомные доли или индексы элементов углерода, водорода и кислорода в молекуле органического субстрата.

Если известны массовые доли элементов в веществе, то формула приобретает следующий вид:

$$E = \frac{(15,25C + 45,75H - 5,71875O)}{(C + H + O)} \quad (\text{кДж/г}) \quad (2),$$

где C, H, O – массовые доли элементов углерода, водорода и кислорода в веществе (%).

Таким образом, предлагаемая методика и проведенный анализ данных литературы позволяют использовать для оценки энергетической ценности питательных сред и пищевых продуктов расчет биогенной энергии через количество АТФ, которое может синтезироваться клеткой за счет энергии полного биологического окисления данного субстрата. На основе стехиометрических закономерностей химических реакций можно рассчитать количество АТФ для любого питательного органического субстрата, включающего в свой состав элементы-органогены – углерод, водород и кислород. Новизна методики заключается в том, что в стехиометрических расчетах помимо элементного водорода органического субстрата учитывается элементный водород метаболической воды, необходимой для полного окисления субстрата. Предложенная методика реализуется в представленных формулах (1, 2), по которым, зная элементный состав органического субстрата, можно рассчитать его пищевую ценность для гетеротрофных микроорганизмов. Безусловно, данная методика



имеет ряд ограничений. Так, расчет энергии проводится для стандартных условий (давление, температура, концентрация) и при их изменении количество энергии будет меняться. Не каждый путь протонов и электронов в дыхательной цепи

соответствует стехиометрии $2H^+ + 2e^- / 3 \text{ATP}$. Однако при всех ограничениях предложенная методика позволяет достаточно легко и точно рассчитать полезную энергию пищевых субстратов на основе их элементного состава. ☺

Литература

1. Герхардт Ф, ред. Методы общей бактериологии. В 3 т. Пер. с англ. М.: Мир; 1983.
2. Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2008. 352 с.
3. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов. Методические

указания. Томск: Изд-во Томского политехнического университета; 2015. 19 с.

4. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3 т. Пер. с англ. Т. 2. М.: Мир; 1985. 368 с.
5. Скулачев ВП. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука; 1969. 440 с.

6. Энгельгардт ВА. Познание явлений жизни. М.: Наука; 1984. 304 с.

7. Ленгелер Й, Дреус Г, Шлегель Г, ред. Современная микробиология. Прокариоты. Пер. с англ. Т. 1. М.: Мир; 2005. 656 с.
8. Северин ЕС, ред. Биохимия. 5-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016. 768 с.

References

1. Gerhardt P, editor. Manual of methods for general bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1981. 316 p.
2. Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. Culture media for medical and sanitary microbiology. Saint Petersburg: ELBI-SPb; 2008. 352 p. Russian.

3. Preparation of culture media and pathogen cultivation: procedural guidelines. Tomsk: Tomsk Polytechnic University; 2015. 19 p. Russian.

4. Lehninger A. Short course in biochemistry. New York: Worth Publishers; 1973. 420 p.
5. Skulachev VP. Energy accumulation in the cell. Moscow: Nauka; 1969. 440 p. Russian.

6. Engelgardt VA. The gnosis of life events. Moscow: Nauka; 1984. 304 p. Russian.

7. Lengeler J, Dreus G, Schlegel H, editors. Biology of prokaryotes. Oxford: Blackwell Science; 1999. 328 p.
8. Severin ES, editor. Biochemistry. 5th edition. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. 768 p. Russian.

The method for calculation of the energy density of culture media based on stoichiometrical patterns of the biological oxidative process

Khokhlova O.B.¹ • Kuznetsova E.D.¹ • Sapozhnikova N.G.¹

The proposed method for calculation of the energy value of culture media is based on stoichiometric properties of biological oxidative reactions in the cell and allows for assessment of the nutritional value of organic substrates with consideration of their elemental composition. Three organogen elements (carbon, hydrogen and oxygen) participate in the third stage of catabolism, which is the universal way of biological oxidation of organic nutritive substrate compounds. Their content in the composition of an organic compound (or food substrate) allows for calculation of the amount of energy converted into work during cellular metabolism. The idea to calculate the energy value of a food substrate is based on the principle of energetic conjugation, according to which the useful energy of food substrates within the cell is accumulated in the energy-rich adenosine triphosphate (ATP) bonds formed by biological oxidation of the substrate. Calculation of the energy values of organic substrate is traditionally based on the energy of the abiotic oxidation. The proportion of the useful energy converted into work is not considered in this case. The inherent problem of this

approach is that the amount of ATP has been calculated only for several universal metabolites with known oxidative pathways, such as pyruvate and acetate. The proposed method is based on stoichiometric patterns and makes it possible to calculate the amount of ATP from the elemental composition of compounds and the mass fractions of carbon, hydrogen and oxygen. The results of calculation of biological oxidation energy obtained by this method coincide with the published data on biological oxidation metabolites in the citric acid cycle. The presented method, based on the composition of the compounds, allows for calculation of the energy value of any food substrate or culture medium containing a variety of organic compounds, including the case when their metabolic pathway of biological oxidation is unknown and the calculation of the bioenergetic value seems impossible.

Key words: adenosine triphosphate (ATP), stoichiometric ratio, biological oxidation, energetic conjugation, metabolite, glucose, pyruvate

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-159-162

Khokhlova Ol'ga B. – PhD, Dr. Agr. Sci., Associate Professor, Chair of Biological and General Chemistry¹
✉ 6–103 Tolbukhina prospekt, Yaroslavl, 150014, Russian Federation. Tel.: +7 (915) 988 16 37.
E-mail: obxoxlova@mail.ru

Kuznetsova Elena D. – PhD (in Chemistry), Associate Professor, Chair of Biological and General Chemistry¹

Sapozhnikova Natal'ya G. – PhD (in Chemistry), Senior Lecturer, Chair of Biological and General Chemistry¹

¹ Yaroslavl State Medical University;
5 Revolyutsionnaya ul., Yaroslavl, 150000, Russian Federation



Анализ люминесценции в мутных биологических средах

Гусева И.А.^{1,2} • Рогаткин Д.А.^{1,3} • Бувалая Е.С.^{1,4}

Гусева Ирина Андреевна – техник лаборатории медико-физических исследований¹, аспирант факультета экспериментальной и теоретической физики²

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–9, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 681 89 84.

E-mail: gusevairinaand@gmail.com

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований¹, научный руководитель программ и проектов³

Бувалая Екатерина Сергеевна – лаборант лаборатории медико-физических исследований¹, магистр физического факультета⁴

Актуальность. Количественный люминесцентный анализ широко используется в биологии, лабораторной диагностике и клинической медицине для исследования объектов на различных уровнях. Однако существующие упрощенные алгоритмы расчета концентрации люминофоров в разбавленных линейных растворах не могут быть применены к условиям мутных сред с сильным светорассеянием, к которым относятся большинство живых биологических тканей. Сегодня развитие люминесцентного анализа в медицине идет по пути создания неразрушающих и неинвазивных методик контроля *in vivo*. В этой связи вопрос о постановке задачи исследования и разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемому спектру люминесценции в условиях мутных сред представляется актуальным. **Цель** – формулировка и обоснование задачи разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемому спектру люминесценции в условиях оптически мутных сред. **Материал и методы.** Рассматривалось физико-математическое моделирование процесса формирования вынужденного излучения флуоресценции в светорассеивающей среде на основе модифицированной двухпоточковой модели Кубелки – Мунка. Проводилась серия лабораторных

экспериментов с макрооднородными светорассеивающими модельными средами на основе натуральных препаратов крови для выяснения характера реальной зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флуоресценции от фактора светорассеяния и концентрации флуорофора в среде. **Результаты.** И теоретические, и экспериментальные результаты демонстрируют сложную нелинейную зависимость регистрируемой интенсивности флуоресценции от оптических свойств среды и концентрации флуорофора в среде. Эта зависимость сильно отличается от известного линейного решения Паркера для прозрачных сред, что приводит к невозможности его применения в условиях оптически мутных сред. **Заключение.** Необходимо дальнейшее развитие исследований в направлении поиска замкнутого аналитического решения обратной задачи оптики светорассеивающих и флуоресцирующих сред для вычисления по регистрируемому потоку люминесценции концентрации люминофора в светорассеивающей среде.

Ключевые слова: спектроскопия, люминесценция, концентрация, оптически мутная среда

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-163-169

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; 115409, г. Москва, Каширское шоссе, 31, Российская Федерация

³ ООО «Центр исследований и разработок ЭОС-Медика»; 117246, г. Москва, Научный проезд, 8/1, Российская Федерация

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ); 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1–2, Российская Федерация

Явление люминесценции основано на возбуждении атомов и/или молекул, возникающем в среде вследствие перехода электронов на новый энергетический уровень после поглощения энергии падающих фотонов и переизлучения квантов света с большей длиной волны при переходе возбужденных атомов и/или молекул назад в основное состояние [1]. В зависимости от энергетического уровня, с которого атом или молекула переходит в основное состояние, люминесценцию принято разделять на флуоресценцию и фосфоресценцию [2]. Регистрируя излучение люминесценции, можно получать информацию о содержании и динамике накопления различных люминофоров в клетках и тканях [3, 4]. Методы люминесцентного анализа нашли широкое применение в области исследования биологических сред на различных уровнях благодаря их высокой чувствительности [1, 3]. Самые простые качественные методы анализа используются для визуального определения факта наличия тех или иных веществ в объекте [1, 5]. Но современные компьютеризированные лабораторные спектральные приборы позволяют осуществлять и количественный анализ состава исследуемых сред, для чего используют различные калибровочные кривые и/или аналитические модели расчета концентраций люминофоров в растворах [3–6].

Сегодня развитие люминесцентного анализа в медицине идет уже по пути создания неразрушающих и неинвазивных методик мониторинга и контроля *in vivo* [4, 7]. В частности, такие методики лазерной флуоресцентной спектроскопии находят свое применение в диагностике при процедурах фотодинамической терапии, во флуоресцентной навигации при хирургическом

удалении опухолей головного мозга, в контроле потребления лекарственных препаратов, оценке содержания коллагена в тканях, порфирина при гипоксических состояниях и т.д. [7–11]. Однако существующие упрощенные алгоритмы калибровки и расчета концентрации люминофоров в разбавленных линейных растворах *in vitro* не могут быть применены к условиям мутных сред с сильным светорассеянием. А к таким средам относятся большинство живых биологических тканей. В этой связи важным представляется вопрос о постановке задачи исследования и разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемым спектрам люминесценции в условиях мутных сред. Особенно актуален количественный анализ при определении содержания витаминов, гормонов, антибиотиков в таких биологических объектах, как кровь, моча, мягкие ткани и др. [5, 6].

В данной статье формулируется и обосновывается проблема количественного определения концентрации люминесцирующих веществ в мутных биологических тканях и средах на примере лазерной флуоресцентной спектроскопии в режиме регистрации обратно рассеянного света.

Материал и методы

Проводилась серия лабораторных экспериментов с модельными средами для выяснения характера существующей зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флуоресценции от фактора светорассеяния. В качестве модельной среды использовались гомогенные растворы разных концентраций в диапазоне 0–350 нг/мл фталоцианина алюминия в физиологическом растворе



Рис. 1. Геометрия измерения флуоресценции с поверхности модельных растворов с помощью оптоволоконного зонда в режиме регистрации обратно рассеянного излучения



Рис. 2. Лазерный диагностический комплекс ЛАКК-М

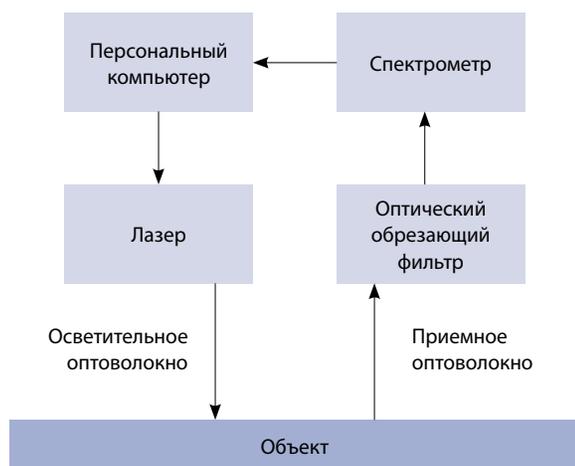


Рис. 3. Упрощенная блок-схема измерений на основе лазерного спектроскопического комплекса ЛАКК-М

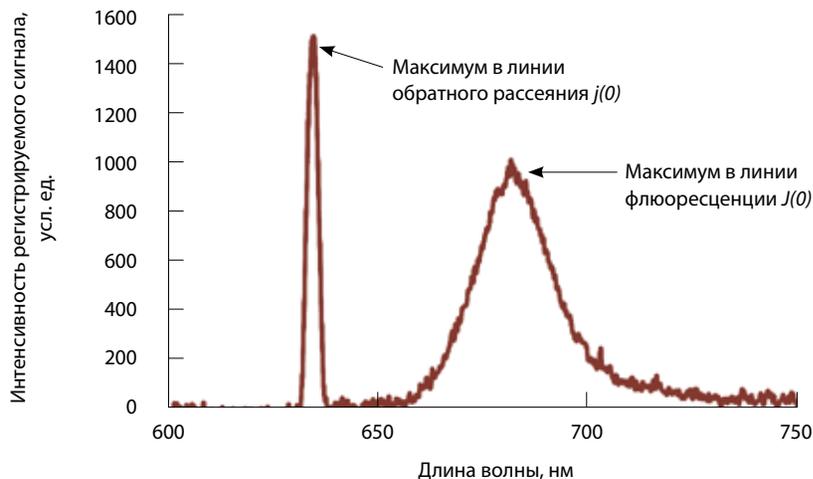


Рис. 4. Регистрируемый суммарный спектр вторичного излучения

(стандартный флуоресцирующий препарат-фотосенсибилизатор Фотосенс, разрешенный для клинического применения), в которые добавлялись различные небольшие объемы крови группы 1 – 0,6, 1,15 и 2,3% от общего объема раствора. Полученные модельные среды-суспензии помещались в микропробирку объемом 1,5 мл. К ее поверхности подводился дистальный конец диагностического оптоволоконного зонда регистрирующей лазерной спектроскопической системы ЛАКК-М. В отличие от использовавшихся в нашей предыдущей теоретической работе [12] искусственных светорассеивающих модельных мер с одной большой неоднородностью внутри, которые моделировали опухоль, в данном исследовании изучалась макрооднородная светорассеивающая модельная среда на основе натуральных препаратов крови.

Измерения спектров флуоресценции проводились с помощью многофункционального лазерного спектроскопического комплекса ЛАКК-М [8], который имеет в своем составе канал регистрации флуоресценции (рис. 1). Комплекс ЛАКК-М разрешен к применению в медицине именно для целей неинвазивной лазерной клинической диагностики *in vivo*. Режим работы комплекса в данном исследовании – «Флуоресценция» (рис. 2).

Для возбуждения флуоресценции в исследуемых объектах комплекс оснащен тремя маломощными непрерывными лазерами с разными длинами волн. В нашем исследовании для возбуждения флуоресценции фталоцианина алюминия в модельной среде использовался полупроводниковый лазер с длиной волны

$\lambda_e = 635$ нм, мощность которого была порядка 5 мВт с выхода оптического волокна. Блок-схема измерений в режиме регистрации обратно рассеянного излучения приведена на рис. 3.

Излучение от лазера доставляется к поверхности исследуемого объекта по осветительному оптоволоконному волокну – одной из жил многожильного оптоволоконного зонда. Другая жила – приемное оптическое волокно. Оно собирает от объекта обратно рассеянное вторичное излучение и излучение флуоресценции и доставляет их совместно через обрезной оптический фильтр в спектрометр. Обрезающий оптический фильтр необходим для ослабления обратно рассеянного излучения лазера на длине волны генерации до уровней, соизмеримых с уровнями излучения флуоресценции. В противном случае слабое излучение флуоресценции не будет видно на фоне яркого излучения лазера (коэффициент ослабления фильтра примерно равен $k = 1000$). Далее в спектрометре происходит разложение прошедшего фильтра излучения в оптический спектр, и весь этот спектр одновременно регистрируется линейным фотоприемником, преобразуясь в электрический сигнал, который затем усиливается и через стандартное устройство сопряжения подается для обработки в управляющий персональный компьютер. Спектр вторичного излучения, включая спектр флуоресценции, в этой схеме можно сразу наблюдать на экране монитора компьютера в реальном времени (рис. 4). При обработке результатов измерений диапазон длин волн флуоресценции выбирался равным области максимума флуоресценции фталоцианина алюминия в районе длины волны $\lambda_f = 680$ нм.

В теоретическом плане рассматривалось физико-математическое моделирование процесса распространения оптического излучения в мутных флуоресцирующих биологических тканях и средах. Использовалась одномерная модифицированная модель Кубелки – Мунка [12]. Приведем постановку задачи. В качестве модели биологической ткани была взята однослойная полубесконечная среда с равномерным распределением внутри нее флуорофора, рассеивателей и поглотителей света. Возбуждающий поток лазерного излучения Φ_0 с длиной волны возбуждения флуоресценции λ_e падает на левую границу среды ($x=0$) (рис. 5). Внутри среды этот поток распространяется слева направо вдоль оси x (обозначен как $i(x)$), поглощается хромофорами ткани и рассеивается на неоднородностях, формируя таким образом поток обратно рассеянного излучения $j(x)$. Часть суммарно распространяющегося в среде излучения ($i(x) + j(x)$), поглощенная флуорофором, индуцирует вынужденную флуоресценцию флуорофора на длине волны флуоресценции λ_f . Излучение флуоресценции также распространяется в среде в обоих направлениях (потоки флуоресценции обозначены $I(x)$ и $J(x)$), рассеивается и поглощается. Рассеивающие и поглощающие свойства среды на любой длине волны λ задаются коэффициентами затухания и обратного рассеяния $\beta_1(\lambda)$ [мм^{-1}] и $\beta_2(\lambda)$ [мм^{-1}] соответственно. Флуорофор, распределенный внутри биологической среды, характеризуется своей относительной объемной концентрацией C_f , выраженной в относительных единицах ($0 < C_f < 1$), а также коэффициентом поглощения излучения μ_{af} , который зависит от длины волны излучения λ . Требуется найти явный вид зависимости регистрируемых

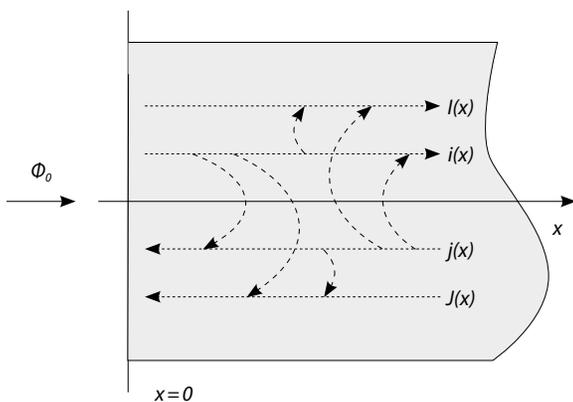


Рис. 5. Постановка задачи моделирования распространения света в светорассеивающей и флуоресцирующей биологической среде (объяснения в тексте)

с внешней поверхности среды потоков $j(x=0)$ и $J(x=0)$ как функций оптических свойств среды распространения излучения и концентрации флуорофора в ней.

Результаты и обсуждение

Полученные теоретические результаты наиболее наглядно могут быть продемонстрированы в сравнении с классическим решением для прозрачной среды без рассеяния. В среде без рассеяния излучение распространяется прямолинейно, обратно рассеянного потока не образуется, поэтому измерение обычно проводится на просвет. Для этой ситуации еще в 1968 г. С. Parker в своей классической книге [13] подробно описал и проанализировал решение задачи для регистрируемого излучения флуоресценции. С использованием введенных нами в предыдущем разделе обозначений это решение в режиме измерения «на просвет» может быть записано в виде:

$$I(x=H) = 2,3 \cdot \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \mu_{af}(\lambda_e) \cdot C_f \cdot H, \quad (1)$$

где $I(x)$ – регистрируемое излучение флуоресценции, $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ – квантовый выход флуоресценции, H – толщина просвечиваемого раствора, обычно равная 1 см.

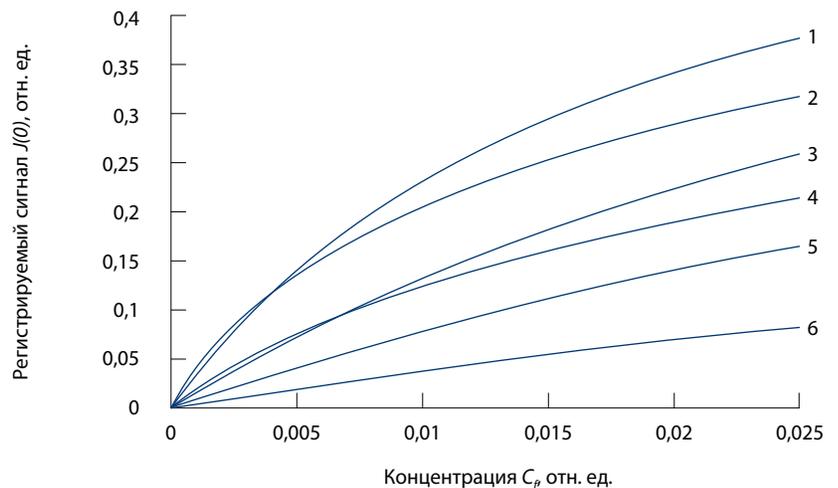


Рис. 6. Расчетное семейство нелинейных соотношений согласно уравнению (2). Исходные данные для расчета при $C_f = 0$:

- 1) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$,
- 2) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 13,3 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 13,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 2,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 1,5 \text{ мм}^{-1}$,
- 3) $\mu_{af} = 150 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 6,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$,
- 4) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 43,8 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 43,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 12,2 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 10,2 \text{ мм}^{-1}$,
- 5) $\mu_{af} = 150 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 18,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 13,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 2,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 1,5 \text{ мм}^{-1}$,
- 6) $\mu_{af} = 100 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 48,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 43,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 22,8 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 20,8 \text{ мм}^{-1}$.



Подход Паркера фактически сегодня признан «золотым стандартом» в лабораторной клинической диагностике. Он до сих пор излагается как базовый в различных учебных материалах (см., например, [5]), а уравнение (1) неизменно используется во многих биологических и медицинских исследованиях. Несмотря на то что применимость формулы (1) ограничена условием малой оптической плотности раствора и решение (1) не учитывает нелинейные эффекты (нелинейные члены разложения экспоненты уравнения Бугера – Ламберта – Бира, лежащего в основе решения Паркера, в ряд по малому параметру показателя степени), ее широкое применение на практике вполне оправдано. Оно обусловлено тем, что на основании формулы (1) легко решить обратную задачу, а именно: выразить из нее и вычислить концентрацию флюорофора в среде C_f , зная (регистрируя) мощность излучения флюоресценции $I(x)$.

К сожалению, для оптически мутных сред и для излучения флюоресценции $J(0)$, регистрируемого в режиме обратного рассеяния с передней (освещаемой) поверхности ткани, это решение неприменимо. На основе модифицированной модели Кубелки – Мунка для случая мутных сред в рамках данной работы нами было получено и проанализировано следующее более общее решение [12]:

$$J(0) = \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot A_f(\lambda_e) \cdot \gamma, \quad (2)$$

$$\text{где } \gamma = \frac{(1 + r_{\infty \lambda_e})(1 + r_{\infty \lambda_f})}{2(\alpha_{\lambda_e} + \alpha_{\lambda_f})}; \quad r_{\infty \lambda} = \frac{\beta_2(\lambda)}{\beta_1(\lambda) + \alpha_\lambda};$$

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\beta_1^2(\lambda) - \beta_2^2(\lambda)};$$

$$A_f(\lambda_e) = \{\beta_1(\lambda_e) - \beta_2(\lambda_e)\}_{C_f \neq 0} - \{\beta_1(\lambda_e) - \beta_2(\lambda_e)\}_{C_f = 0}. \quad (3)$$

Как видно, структура этого решения (уравнение (2)) аналогична уравнению Паркера, но имеются и существенные отличия. Первое значимое отличие заключается в том, что коэффициент γ с размерностью [мм], представляющий собой вместо H некую эффективную толщину среды, с которой снимается полезный сигнал флюоресценции в случае мутной среды, в отличие от фиксированного и известного значения H , здесь является сложной функцией оптических свойств среды и заранее не известен. Второе отличие обнаруживается в описании количества поглощенного флюорофором возбуждающего излучения. Если в (1) это количество определяется известной

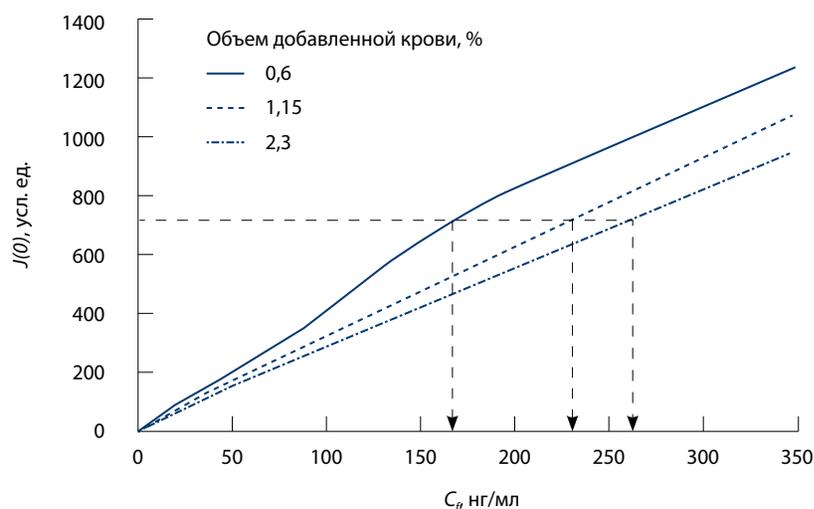


Рис. 7. Экспериментальные зависимости регистрируемой интенсивности флюоресценции $J(0)$ от концентрации фотосенсибилизатора Фотосенс при различных объемах добавленной крови

константой флюорофора μ_{af} то в (2), как было показано в [12], доля поглощенного возбуждающего излучения определяется выражением (3) по разности оптических свойств среды распространения излучения с учетом и без учета наличия флюорофора в среде (для концентраций, соответственно, $C_f = 0$ и $C_f \neq 0$). Это различие небольшое, порядка 5–10%, но оно есть и усложняет задачу.

В целом оба эти отличия приводят к тому, что вместо одной простой линейной зависимости от регистрируемого сигнала флюоресценции от концентрации флюорофора C_f в виде (1) для мутной биологической среды мы получаем семейство сложных нелинейных соотношений, определяемых оптическими свойствами $\beta_1(\lambda)$ и $\beta_2(\lambda)$ среды распространения излучения (рис. 6).

Полученные экспериментальные данные подтверждают сделанные теоретические выкладки и расчеты. Семейство полученных экспериментальных зависимостей регистрируемой интенсивности флюоресценции от концентрации флюорофора в модельной светорассеивающей среде при разных объемах добавленной крови представлено на рис. 7.

Качественное сходство двух графиков очевидно. Следовательно, для мутных биологических тканей и сред, в которых большое влияние на процессы распространения света оказывает многократное внутреннее рассеяние, вопрос количественного определения концентрации флюорофора в среде по регистрируемому сигналу флюоресценции существенно усложняется. Если неизвестны оптические параметры среды,



а они априори точно неизвестны, то, регистрируя сигнал флюоресценции с поверхности исследуемых образцов, как показано на рис. 7, например, в 700 усл. ед., концентрация фотосенсибилизатора будет определена в диапазоне от 160 (примерно) до 260 нг/мл. Разброс (погрешность) оценки составит порядка 50%, что нельзя считать приемлемым. Именно поэтому необходимо более точное решение обратной задачи на основе уравнения (2) с учетом дополнительных измерений оптических свойств конкретного исследуемого образца. Собственно, такая постановка задачи в оптической неинвазивной диагностике известна: устройства для такой диагностики строятся с учетом реализации принципа решения обратных задач оптики светорассеивающих сред [14, 15]. Однако применительно к уравнению (2) авторам сегодня такое конкретное аналитическое решение задачи относительно концентрации флюорофора не известно. Оно должно быть дополнительно получено, обосновано, исследовано на точность, линейность, на соответствие результатам эксперимента и т.д. прежде, чем задача может считаться решенной. Безусловно, сегодня можно сделать определенные выкладки на основе уравнений (2) и (3). Тем не менее представляется, что это тема отдельного исследования в продолжение приведенных выше экспериментальных результатов и сформулированных теоретических положений.

Заключение

В проведенном исследовании на примере лазерной флюоресцентной спектроскопии в режиме регистрации обратно рассеянного света рассматривалась проблема определения концентрации флюоресцирующих компонентов в биологических тканях и средах по результатам измерения излучения флюоресценции. Экспериментально на модельных средах на основе натуральных препаратов крови и фотосенсибилизатора Фотосенс изучался реальный характер зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флюоресценции от фактора светорассеяния и концентрации флюорофора в среде. В теоретическом плане были получены аналитические уравнения, описывающие формирование потока излучения флюоресценции на поверхности среды в условиях сильного светорассеяния. И экспериментальные, и теоретические результаты показали некорректность использования классических вычислительных алгоритмов, предназначенных для прозрачных сред, в ситуации биологических тканей, в которых нельзя пренебречь процессами многократного рассеяния света. Таким образом, необходимо дополнительное решение задачи поиска аналитического алгоритма определения концентрации люминофора по регистрируемым спектрам люминесценции в условиях оптически мутных сред. ☼

Литература

1. Гладков АА. Люминесцентный анализ в медицине. Кишинев: КГУ; 1958. 389 с.
2. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press; 1983. 488 p.
3. Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. New York, London: Academic Press; 1962. 517 p.
4. Рогаткин ДА. Физические основы лазерной клинической флюоресцентной спектроскопии in vivo. Медицинская физика. 2014;(4): 78–96.
5. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера; 2007. 368 с.
6. Siraj N, El-Zahab B, Hamdan S, Karam TE, Haber LH, Li M, Fakayode SO, Das S, Valle B, Strongin RM, Patonay G, Sintim HO, Baker GA, Powe A, Lowry M, Karolin JO, Geddes CD, Warner IM. Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence. Anal Chem. 2016;88(1): 170–202. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04109.
7. Myscek MA, Pogue BW, editors. Handbook of biomedical fluorescence. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. 665 p.
8. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. Photonics & Lasers in Medicine. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
9. Smirnova OD, Rogatkin DA, Litvinova KS. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. J Innov Opt Health Sci. 2012;(5):250010. doi: http://dx.doi.org/10.1142/S1793545812500101.
10. Rogatkin DA, Tereshchenko SG, Lapaeva LG, Gorenkov RV. Complex therapeutic-diagnostic endoscopy with laser irradiation and in-Situ spectrophotometry of erosive-ulcerative impairments of upper part of the gastrointestinal tract. Proc. SPIE 4613. Optical Biopsy IV; 286 (May 7, 2002). doi: 10.1117/12.465257.
11. Sunar U, Rohrbach DJ, Morgan J, Zeitouni N, Henderson BW. Quantification of PpIX concentration in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma models using spatial frequency domain imaging. Biomed Opt Express. 2013;4(4):531–7. doi: 10.1364/BOE.4.000531.
12. Rogatkin D, Guseva I, Lapaeva L. Nonlinear behavior of the autofluorescence intensity on the surface of light-scattering biotissues and its theoretical proof. J Fluoresc. 2015;25(4): 917–24. doi: 10.1007/s10895-015-1572-7.
13. Parker CA. Photoluminescence of solutions. Amsterdam: Elsevier; 1968. 510 p.
14. Rogatkin DA, Sokolovski SG, Fedorova KA, Stewart NA, Sidorov VV, Rafailov EU. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry. Proc. SPIE 7890. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems IX, 78901H (February 21, 2011). doi: 10.1117/12.874258.
15. Рогаткин ДА. Базовые принципы организации системного программного обеспечения многофункциональных неинвазивных спектрофотометрических диагностических приборов и комплексов. Медицинская техника. 2004;(2):8–12.



References

1. Gladkov AA. Luminescent analysis in medicine. Kishinev: KGU; 1958. 389 p. Russian.
2. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press; 1983. 488 p.
3. Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. New York, London: Academic Press; 1962. 517 p.
4. Rogatkin DA. Physical foundations of laser clinical fluorescence spectroscopy in vivo. Medical Physics. 2014;(4):78–96. Russian.
5. Shmidt V. Optic spectroscopy for chemists and biologists. Moscow: Tekhnosfera; 2007. 386 p.
6. Siraj N, El-Zahab B, Hamdan S, Karam TE, Haber LH, Li M, Fakayode SO, Das S, Valle B, Strongin RM, Patonay G, Sintim HO, Baker GA, Powe A, Lowry M, Karolin JO, Geddes CD, Warner IM. Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence. Anal Chem. 2016;88(1): 170–202. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04109.
7. Mycek MA, Pogue BW, editors. Handbook of biomedical fluorescence. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. 665 p.
8. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. Photonics & Lasers in Medicine. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
9. Smirnova OD, Rogatkin DA, Litvinova KS. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. J. Innov. Opt. Health Sci. 2012;(5):250010. doi: http://dx.doi.org/10.1142/S1793545812500101.
10. Rogatkin DA, Tereshchenko SG, Lapaeva LG, Gorenkov RV. Complex therapeutic-diagnostic endoscopy with laser irradiation and in-Situ spectrophotometry of erosive-ulcerative impairments of upper part of the gastrointestinal tract. Proc. SPIE 4613. Optical Biopsy IV; 286 (May 7, 2002). doi: 10.1117/12.465257.
11. Sunar U, Rohrbach DJ, Morgan J, Zeitouni N, Henderson BW. Quantification of PpIX concentration in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma models using spatial frequency domain imaging. Biomed Opt Express. 2013;4(4):531–7. doi: 10.1364/BOE.4.000531.
12. Rogatkin D, Guseva I, Lapaeva L. Nonlinear behavior of the autofluorescence intensity on the surface of light-scattering biotissues and its theoretical proof. J Fluoresc. 2015;25(4): 917–24. doi: 10.1007/s10895-015-1572-7.
13. Parker CA. Photoluminescence of solutions. Amsterdam: Elsevier; 1968. 510 p.
14. Rogatkin DA, Sokolovski SG, Fedorova KA, Stewart NA, Sidorov VV, Rafailov EU. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry. Proc. SPIE 7890. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems IX, 78901H (February 21, 2011). doi: 10.1117/12.874258.
15. Rogatkin DA. Basic principles of organization of system software for multifunctional non-invasive spectrophotometric diagnostic devices and systems. Biomedical Engineering. 2004;38(2):61–5.

Analysis of luminescence in turbid biological media

Guseva I.A.^{1,2} • Rogatkin D.A.^{1,3} • Buvalaya E.S.^{1,4}

Background: Quantitative luminescent analysis is widely used in biology, laboratory diagnostics and clinical medicine to study objects at various levels. However, the existing simplified algorithms for calculation of the luminophore concentration in diluted linear solutions cannot be applied to the turbid media with strong light scattering, which include the majority of living biological tissues. Today, the development of luminescence analysis in medicine goes towards the creation of non-destructive and non-invasive methods of *in vivo* monitoring. Therefore, the urgent question is about a formulation of the research purpose and the development of algorithms to compute the luminophore concentration based on the luminescence spectra recorded in the turbid media. **Objective:** To formulate and justify the tasks of elaboration of the algorithms to compute the luminophore concentration based on the luminescence spectra recorded under conditions of the optically turbid media. **Materials and methods:** We looked upon the physico-mathematical simulation of the process of formation of the induced fluorescence emission in the light-scattering medium based on the modified 2-flux Kubelka-Munch model. We

conducted a series of laboratory experiments with macro-homogenous light-scattering model media to determine characteristics of the dependence of the fluorescence intensity detected from the surface of an optically turbid biological medium upon the factor of light scattering and the concentration of the fluorophore in the medium. **Results:** Both theoretical and experimental results demonstrate complex nonlinear dependence of the fluorescence intensity detected upon the optical properties and a concentration of a fluorophore in the turbid media. This dependence is very different from the known linear C. Parker's solution for transparent media, which makes it impossible to use it in the optically turbid media. **Conclusion:** Further studies searching a closed-form analytical solution of the inverse optical problem for light-scattering and fluorescent media are necessary to calculate the luminophore concentration in a light-scattering media based on the recorded luminescence spectra.

Key words: spectroscopy, luminescence, concentration, optically turbid media

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-163-169

Guseva Irina A. – Technician, Laboratory of Medical and Physics Research¹; Postgraduate Student, Faculty of Experimental and Theoretical Physics²
✉ 61/2–9 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.
E-mail: gusevairinaand@gmail.com

Rogatkin Dmitriy A. – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research¹; Director of the Research Programs and Projects³

Buvalaya Ekaterina S. – Laboratory Assistant, Laboratory of Medical and Physics Research¹; Master of Faculty of Physics⁴

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russian Federation

³ Research & Development Center EOS-Medica Ltd.; 8/1 Nauchnyy proezd, Moscow, 117246, Russian Federation

⁴ Lomonosov Moscow State University; 1–2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation



ФБУН ГНЦ ПМБ

производит питательные среды для санитарной и клинической микробиологии

ФБУН Государственный Научный Центр Прикладной Микробиологии и Биотехнологии

Производит питательные среды
для проведения бактериологических исследований
в области клинической и санитарной микробиологии по
следующим направлениям:



- диагностика инфекционных болезней, в т.ч. особо опасных инфекций;
- определение чувствительности микроорганизмов к анти-микробным препаратам;
- санитарно-микробиологический анализ воды питьевой и воды различных источников;
- санитарно-микробиологический анализ почвы и других объектов окружающей среды;
- микробиологический контроль пищевых продуктов и кормов для животных;
- микробиологический контроль мяса и мясных продуктов;
- микробиологический контроль лекарственных препаратов;
- микробиологический контроль парфюмерно-косметической продукции.

Более 100 наименований продукции

Компоненты питательных сред

Экспресс-тесты для диагностики инфекционных заболеваний

142279 Россия Московская область, Серпуховский р-н, п.Оболensk

Тел./ факс +7(4967) 36-01-16, 31-21-65, 31-19-27

www.sredy-obolensk.ru

www.obolensk.org



Журнал
«Альманах клинической медицины»
теперь доступен на сайте:

almclinmed.ru

Возможности для читателей:

- свободный доступ к архиву журнала
- удобство поиска: по ключевым словам, по выпускам, по авторам, по заглавиям

Возможности для авторов:

- ознакомиться с планом выпусков журнала на год и выбрать тематический номер для подачи рукописи
- изучить правила для авторов, подробно регламентирующие требования к статье
- отправить статью в выбранный номер через личный кабинет
- оставить комментарий для редакторов
- отслеживать количество просмотров своих публикаций в журнале и ссылки на них в личном кабинете

