

# АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

46 (8) • 2018

Возможности и перспективы применения  
диагностической технологии QPI  
в акушерстве и гинекологии

Диалог с клеткой: диагностическая  
real-time технология на основе лазерной  
интерферометрии

Применение метода интерференционной  
микроскопии для изучения  
структурных характеристик дермальных  
фибробластов в культуре

Оценка нелинейной динамики  
поврежденности клеточных структур  
как перспективный метод  
персонализированной онкодиагностики

Уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*,  
*TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* у больных с впервые  
выявленным хроническим лимфолейкозом  
до и после проведения терапии флударабином,  
циклофосфамидом и ритуксимабом

Возрастная динамика продукции  
короткоцепочечных жирных кислот  
микробиотой ротоглотки у пациентов,  
не имеющих заболеваний респираторного  
тракта и ротовой полости

Катехоламины плазмы крови у пациентов  
с ранними нелечеными стадиями  
болезни Паркинсона

Изменения спектральных характеристик  
плазмы при контакте венозной крови человека  
с гранулированными сорбентами *in vitro*

ТЕМА НОМЕРА:

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА

# АЛЬМАНАХ 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 46 • № 8 • 2018

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Палеев Филипп Николаевич**, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., заместитель генерального директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России по научно-аналитической работе (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

**Баркан Ариель**, д-р мед. наук, проф., медицинский факультет, отдел метаболизма, эндокринологии и диабета отделения нейрохирургии Мичиганского университета, содиректор Центра нейроэндокринологии и заболеваний гипофиза Мичиганского университета (Энн-Арбор, США)

**Белоусова Елена Александровна**, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения гастроэнтерологии и гепатологии, зав. кафедрой гастроэнтерологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

**Богачев-Прокофьев Александр Владимирович**, д-р мед. наук, руководитель Центра новых хирургических технологий ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск, Россия)

**Брагин Анатолий Григорьевич**, д-р биол. наук, научный сотрудник Центра по эпилепсии, отделение неврологии Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США)

**Васюк Юрий Александрович**, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой клинической функциональной диагностики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова 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, зав. хирургическим торакальным отделением НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии 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., директор ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России (Москва, Россия)

**Киров Михаил Юрьевич**, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России (Архангельск, Россия)

**Мельниченко Галина Афанасьевна**, академик РАН, д-р мед. наук, проф., директор Института клинической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» 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, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

**Пономаренко Геннадий Николаевич**, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ФГБУ ФНЦРИ им. Г.А. Альбрехта Минтруда России (Санкт-Петербург, Россия)

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

## Научный редактор выпуска

**Василенко Ирина Анатольевна**, д-р мед. наук, профессор, заведующая научно-исследовательской лабораторией ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

## Ответственный редактор

**Парпара Олеся Анатольевна** (Москва, Россия)

**Шахова Наталия Михайловна**, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофоники, отдел радиофизических методов в медицине, отделение нелинейной динамики и оптики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр ИФФ РАН» (Нижний Новгород, Россия)

**Шишацкая Екатерина Игоревна**, профессор РАН, д-р биол. наук, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, 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)

**Бухфельдер Михаэль**, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения нейрохирургии Университетской клиники г. Эрланген (Эрланген, Германия)

**Вольфенбюттель Брюс**, д-р мед. наук, профессор, руководитель Департамента эндокринологии Университетского медицинского центра Гронингена (Гронинген, Нидерланды)

**Густина Андреа**, д-р мед. наук, президент Европейского общества эндокринологов, профессор кафедры эндокринологии, Университет Вита Салюте Сан-Раффаэле (Милан, Италия)

**Де Херт Стефан**, д-р мед. наук, председатель научного комплекса Европейского общества анестезиологии, профессор кафедры анестезиологии и периперативной медицины Гентского университета (Гент, Бельгия)

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

**Литвинов Рустем Игоревич**, д-р мед. наук, профессор, старший исследователь отдела клеточной биологии и биологии развития медицинского факультета Пенсильванского университета (Филадельфия, США)

**Лобзин Юрий Владимирович**, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

**Майр Йоханнес**, д-р мед. наук, профессор, консультант по детской хирургии отделения детской хирургии Педиатрической клиники Университета Базеля (Базель, Швейцария)

**Мурешану Дафин Ф.**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой и клиникой неврологии медицинского факультета Медико-фармацевтического университета г. Клуж-Напока (Клуж-Напока, Румыния)

**Наймарк Олег Борисович**, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией физических основ прочности ИМСС УрО РАН – филиал ПОИЦ УрО РАН (Пермь, Россия)

**Райниш Уолтер**, д-р мед. наук, профессор кафедры гастроэнтерологии медицинского факультета Университета МакМастер (Гамильтон, Канада)

**Ян Чи**, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения челюстно-лицевой хирургии Шанхайского 9-го народного госпиталя, Шанхайский университет Цзяо Тун (Шанхай, Китай)

## Содержание

### Оригинальные статьи

Захаров С.Г., Голенков А.К., Мисюрин В.А.,  
Катаева Е.В., Барышникова М.А., Чуксина Ю.Ю.,  
Митина Т.А., Трифонова Е.В., Высоцкая Л.Л.,  
Черных Ю.Б., Клинушкина Е.Ф., Белоусов К.А.,  
Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В.

**Уровень экспрессии генов апоптоза FAS, TNFR2, TRAIL, DR3 и DR4/5 у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосамидом и ритуксимабом (FCR) . . . . . 734**

Наймарк О.Б., Никитюк А.С., Небогатиков В.О.,  
Гришко В.В.

**Оценка нелинейной динамики поврежденности клеточных структур как перспективный метод персонализированной онкодиагностики . . . . . 742**

Василенко И.А., Метелин В.Б., Игнатъев П.С.,  
Кардашова З.З., Лифенко Р.А.

**Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии . . . . . 748**

Лифенко Р.А., Попова О.С., Топузов А.Г.,  
Звержховский В.Д.

**Возможности и перспективы применения диагностической технологии QPI (количественный фазовый имиджинг) в акушерстве и гинекологии . . . . . 758**

Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С.,  
Самоделкин А.Г.

**Трансляционные исследования электрофоретической подвижности и фазового портрета эритроцитов с учетом развития стрессовой реакции в условиях патологического процесса . . . . . 765**

Буркова Н.В., Киричук О.П., Романчук Е.В.,  
Даванков В.А., Постнов В.Н., Кузнецов С.И.

**Изменения спектральных характеристик плазмы при контакте венозной крови человека с гранулированными сорбентами *in vitro* . . . . . 772**

Нефедова И.Ф., Россинская В.В.

**Применение метода интерференционной микроскопии для изучения структурных характеристик дермальных фибробластов в культуре . . . . . 778**

Затевалов А.М., Селькова Е.П., Гудова Н.В.,  
Оганесян А.С.

**Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой ротоглотки у пациентов, не имеющих заболеваний респираторного тракта и ротовой полости . . . . . 784**

Залялова З.А., Хасанова Д.М., Угрюмов М.В.

**Катехоламины плазмы крови у пациентов с ранними нелечеными стадиями болезни Паркинсона . . . . . 792**

Подписной индекс 81988  
Объединенный каталог «Пресса России»

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

© 2018 ГБУЗ МО МОНИКИ  
им. М.Ф. Владимирского  
[www.monikiweb.ru](http://www.monikiweb.ru)

ISSN 2072-0505 (print)  
ISSN 2587-9294 (online)

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе  
по надзору в сфере связи, информационных  
технологий и массовых коммуникаций.  
Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» входит  
в перечень рецензируемых научных изданий,  
в которых должны быть опубликованы основные  
научные результаты диссертаций на соискание  
ученой степени кандидата наук, на соискание  
ученой степени доктора наук (Перечень ВАК).  
Шифр группы научных специальностей:  
14.01.00 – клиническая медицина

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](mailto:o_papara@monikiweb.ru)  
[www.almclinmed.ru](http://www.almclinmed.ru), [www.monikiweb.ru/node/15](http://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 46 • Number 8 • 2018

---

## EDITOR-IN-CHIEF

**Filipp N. Paleev**, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Deputy General Director on Scientific and Analytical Work, Federal State Budget Organization National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Moscow, Russia)

## Deputy Chief Editor

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

## EDITORIAL BOARD

**Ariel L. Barkan**, MD, Professor of Medicine, Professor of Neurosurgery, Department of Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, Department of Neurosurgery, Co-director of Pituitary and Neurosurgery Center, University of Michigan (Ann Arbor, USA)

**Elena A. Belousova**, MD, PhD, Professor, Head of Department of Gastroenterology and Hepatology, Head of Chair of Gastroenterology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

**Alexandr V. Bogachev-Prokophiev**, MD, PhD, Head of Center of the New Surgical Technologies of NMRC named after E.N. Meshalkin (Novosibirsk, Russia)

**Anatol J. Bragin**, PhD, Epilepsy Center, Department of Neurology, University of California (Los Angeles, USA)

**Yury A. Vasyuk**, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Clinical Functional Diagnostics, MSUMD (Moscow, Russia)

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

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

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

**Oksana M. Drapkina**, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of NMRCPM (Moscow, Russia)

**Mikhail Yu. Kirov**, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Northern State Medical University (Arkhangelsk, Russia)

**Galina A. Mel'nichenko**, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Institut of Clinical Endocrinology, Endocrinology Research Center (Moscow, Russia)

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

**Alexey M. Ovezov**, MD, PhD, Head of Department of Anaesthesiology, Head of Chair of Anaesthesiology and Reanimatology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

**Gennadiy N. Ponomarenko**, MD, PhD, Professor, General Director of Federal Research Center of Prosthetics and Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht, Ministry of Labour and Social Protection (Saint Petersburg, Russia)

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

**Natalia M. Shakhova**, MD, PhD, Leading Research Fellow, Biophotonics Laboratory, IAP RAS (Nizhny Novgorod, Russia)

## Science Editor

**Irina A. Vasilenko**, MD, PhD, Professor, Head of Research Laboratory, MONIKI (Moscow, Russia)

## Managing Editor

**Olesya A. Parpara** (Moscow, Russia)

**Ekaterina I. Shishatskaya**, Professor of Russ. Acad. Sci., ScD in Biology, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Chemoautotrophic Biosynthesis, Biophysics Institute of the Siberian Branch of the RAS (Krasnoyarsk, 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)

**Michael Buchfelder**, MD, PhD, Professor, Head of Department of Neurosurgery, University Hospital Erlangen (Erlangen, Germany)

**Bruce H.R. Wolffenbutter**, MD, PhD, Professor of Endocrinology and Metabolism, Head of Department of Endocrinology, University Medical Center Groningen (Groningen, Netherlands)

**Andrea Giustina**, MD, President of European Society of Endocrinology, Professor of Endocrinology, Vita-Salute San Raffaele University (Milan, Italy)

**Stefan De Hert**, MD, PHD, Chair of ESA Scientific Committee, Professor of Department of Anaesthesiology and Perioperative Medicine, Ghent University (Ghent, Belgium)

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

**Rustem I. Litvinov**, MD, PhD, Professor, Senior Research Investigator, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA)

**Yurii V. Lobzin**, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Scientific and Clinical Center of Children's Infections (Saint Petersburg, Russia)

**Johannes Mayr**, MD, Professor of Pediatric Surgery, Department of Pediatric Surgery, University Children's Hospital Basel (Basel, Switzerland)

**Dafin F. Muresanu**, MD, PhD, MBA, FANA, Professor, Chairman of the Neurosciences Department, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (Cluj-Napoca, Romania)

**Oleg B. Naimark**, ScD in Phys.-Math., Professor, Head of Laboratory of Physical Foundation of Strength, Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Perm, Russia)

**Walter W. Reinisch**, MD, Professor, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, MacMaster University (Hamilton, Canada)

**Chi Yang**, DDS, PhD, Professor, Head of Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai, PRC)

## Content

### Articles

S.G. Zakharov, A.K. Golenkov, V.A. Misyurin,  
E.V. Kataeva, M.A. Baryshnikova, Yu.Yu. Chuksina,  
T.A. Mitina, E.V. Trifonova, L.L. Vysotskaya,  
Yu.B. Chernykh, E.F. Klinushkina, K.A. Belousov,  
Yu.P. Finashutina, A.V. Misyurin

**Expression levels of the apoptosis genes FAS, TNFR2, TRAIL, DR3 and DR4/5 in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukemia before and after treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) . . . . . 734**

O.B. Naimark, A.S. Nikityuk, V.O. Nebogatikov,  
V.V. Grishko

**Evaluation of nonlinear dynamics of the cell structure damage as a promising method for personalized cancer diagnostics . . . . . 742**

I.A. Vasilenko, V.B. Metelin, P.S. Ignat'ev, Z.Z. Kardashova,  
R.A. Lifenko

**A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry . . . . . 748**

R.A. Lifenko, O.S. Popova, A.G. Topuzov,  
V.D. Zverzhovskiy

**The potential and prospects of the quantitative phase imaging (QPI) diagnostic technology in obstetrics and gynecology . . . . . 758**

A.V. Deryugina, M.N. Ivashchenko, P.S. Ignat'ev,  
A.G. Samodelkin

**Translational studies of electrophoretic mobility and phase picture of erythrocytes with consideration of development of stress response during a pathological process . . . . . 765**

N.V. Burkova, O.P. Kirichuk, E.V. Romanchuk,  
V.A. Davankov, V.N. Postnov, S.I. Kuznetsov

**Changes in plasma spectral characteristics during the *in vitro* contact of human venous blood with granulated sorbents . . . . . 772**

I.F. Nefedova, V.V. Rossinskaya

**The use of the interference microscopy to study structural characteristics of cultured dermal fibroblasts . . . . . 778**

A.M. Zatevalov, E.P. Selkova, N.V. Gudova,  
A.S. Oganessian

**Age-related changes in production of short chain fatty acids by oropharyngeal microbiota in patients without respiratory tract and oral disorders . . . . . 784**

Z.A. Zalyalova, D.M. Khasanova, M.V. Ugrumov

**Plasma catecholamine levels in the early stages of treatment-naïve Parkinson's disease . . . . . 792**

Subscription index 81988  
in the united Pressa Rossii catalogue

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

© 2018 MONIKI  
[www.monikiweb.ru](http://www.monikiweb.ru)

ISSN 2072-0505 (print)  
ISSN 2587-9294 (online)

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](mailto:o_parpara@monikiweb.ru)  
[www.almclinmed.ru](http://www.almclinmed.ru)



Журнал  
«Альманах клинической медицины»  
доступен на сайте:

[almclinmed.ru](http://almclinmed.ru)

### План выпусков на 2019 год

Том 47. № 1. Тема номера: **клиническая генетика, орфанные заболевания**

Том 47. № 2. Тема номера: **анестезиология и реаниматология**

Том 47. № 3. Тема номера: **эндокринология**

Том 47. № 4. Тема номера: **сердечно-сосудистая хирургия**

Том 47. № 5. Тема номера: **ревматология**

Том 47. № 6. Тема номера: **гастроэнтерология и гепатология**

Том 47. № 7. Тема номера: **онкология**

Том 47. № 8. Тема номера: **биомедицинские технологии**

Подача рукописей только через  
сайт журнала [almclinmed.ru](http://almclinmed.ru)



Отправить  
рукопись







Оригинальная статья

# Уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR)

Захаров С.Г.<sup>1</sup> • Голенков А.К.<sup>1</sup> • Мисюрин В.А.<sup>2</sup> • Катаева Е.В.<sup>1</sup> • Барышникова М.А.<sup>2</sup> • Чуксина Ю.Ю.<sup>1</sup> • Митина Т.А.<sup>1</sup> • Трифонова Е.В.<sup>1</sup> • Высоцкая Л.Л.<sup>1</sup> • Черных Ю.Б.<sup>1</sup> • Клинушкина Е.Ф.<sup>1</sup> • Белоусов К.А.<sup>1</sup> • Финашутина Ю.П.<sup>2</sup> • Мисюрин А.В.<sup>2</sup>

**Захаров Сергей Геннадьевич** – науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>  
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 076 66 99.  
E-mail: hematologymoniki@mail.ru

**Голенков Анатолий Константинович** – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Мисюрин Всеволод Андреевич** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей<sup>2</sup>

**Катаева Елена Васильевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Барышникова Мария Анатольевна** – канд. фарм. наук, заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей<sup>2</sup>

**Чуксина Юлия Юрьевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Митина Татьяна Алексеевна** – д-р мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Трифопова Елена Викторовна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Высоцкая Людмила Леонидовна** – канд. мед. наук, науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Черных Юлия Борисовна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Клинушкина Елена Федоровна** – мл. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Белоусов Кирилл Александрович** – науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии<sup>1</sup>

**Финашутина Юлия Павловна** – науч. сотр., лаборатория рекомбинантных опухолевых антигенов<sup>2</sup>

**Мисюрин Андрей Витальевич** – д-р биол. наук, заведующий лабораторией рекомбинантных опухолевых антигенов<sup>2</sup>

**Актуальность.** Ранее мы показали, что экспрессия генов *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) коррелирует с клиническими проявлениями болезни: они минимальны у пациентов с высокой активностью проапоптотических генов и низкой активностью генов, блокирующих апоптоз, и более выражены у пациентов с высоким уровнем экспрессии антиапоптотических и низким уровнем экспрессии проапоптотических генов. **Цель** – сравнить уровни экспрессии генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным ХЛЛ до и после проведения курса химиотерапии комбинацией флударабина, циклофосфамида и ритуксимаба (FCR) с учетом исходных клинических данных и ответа на лечение. **Материал и методы.** В проспективное одноцентровое когортное исследование включены 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ, проходивших клинико-диагностическое обследование и лечение в период с ноября 2014 по декабрь 2017 г. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови для диагностики ХЛЛ проводили методом 4-цветной проточной цитометрии. Для исследования экспрессии генов внешнего пути апоптоза выполняли полимеразную цепную реакцию в реальном времени с обратной транскрипцией. Всем больным применяли стандартную программу лечения FCR с последующим проведением поддерживающего лечения ритуксимабом. **Результаты.** Среди 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ преобладали мужчины (n=16). Медиана возраста составила 64 года (от 47 до 77 лет). У 16 пациентов диагностированы I и II стадии ХЛЛ по Rai, у 7 – III и IV стадии. Для удобства анализа пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от уровня данного показателя. Перед началом терапии в группе больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* по сравнению с пациентами с низким уровнем данного показателя наблюдался более высокий уровень экспрессии генов *TNFR2* (p < 0,0015) и *TRAIL* (p < 0,0053). До проведения FCR-терапии в группе с низким уровнем

экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов было увеличено (p=0,0016), а эритроцитов снижено (p=0,0159). Исходно в группе с высоким уровнем экспрессии *FAS* было больше больных с I и II стадией ХЛЛ (p=0,0205). Через 3 дня после проведения 4-дневного курса FCR-терапии повышение уровня экспрессии отмечено только для генов *FAS* (p=0,0025) и *TRAIL* (p=0,0045). По завершении 1-го цикла FCR-терапии у больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов снижалось быстрее, чем в группе больных с высоким уровнем экспрессии этого гена (p=0,0019). После 6 циклов FCR-терапии полной или частичной ремиссии достигли 82% (19 из 23 пациентов), при этом у больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* было большее количество полных ремиссий (p=0,026). Нежелательных явлений, связанных с проведением FCR-терапии, не зарегистрировано. **Заключение.** Гены внешнего пути апоптоза – один из ключевых факторов опухолевого роста при ХЛЛ. Полученные нами данные о влиянии FCR-терапии на уровень экспрессии генов *FAS* и *TRAIL* дают возможность рассматривать их как мишень для данной комбинации препаратов, а также могут лечь в основу разработки новых молекулярных препаратов.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, гены апоптоза, FCR-терапия

**Для цитирования:** Захаров СГ, Голенков АК, Мисюрин ВА, Катаева ЕВ, Барышникова МА, Чуксина ЮЮ, Митина ТА, Трифонова ЕВ, Высоцкая ЛЛ, Черных ЮБ, Клинушкина ЕФ, Белоусов КА, Финашутина ЮП, Мисюрин АВ. Уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR). Альманах клинической медицины. 2018;46(8):734–41. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-734-741.

Поступила 25.10.2018;  
принята к публикации 13.12.2018



**Х**ронический лимфолейкоз (ХЛЛ) представляет собой лимфопролиферативный процесс, в основе которого лежит накопление опухолевых клеток, приводящее к угнетению функций костного мозга [1]. Клиническими проявлениями болезни считаются лимфоцитоз периферической крови, лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия. Данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при хроническом лимфолейкозе свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов [2–4]. Основное внимание исследователей было сконцентрировано на изучении внутреннего сигнального пути [5–7], поскольку используемые сегодня при лечении ХЛЛ таргетные препараты направлены на блокирование путей передачи сигнала в В-клетке.

В ряде работ выявлена важная роль внешнего пути апоптоза при онкогематологических заболеваниях, в том числе наличие связи между большой опухолевой массой и снижением уровня экспрессии FAS/APO-1 на поверхности лимфоцитов [8]. Нами показано значение четырех внешних сигнальных путей для процессов апоптоза при ХЛЛ [9]. Основным механизмом является FAS-опосредованный сигнальный путь, при котором осуществляется взаимодействие FAS-лиганда и FAS-рецептора, завершающееся активацией каспаз, инициирующих процессы апоптоза [10]. Второй путь активации апоптоза – взаимодействие TNF и TNF-рецептора (TNFR1–2) [11–13]. Третий – взаимодействие TRAIL [14, 15] с его рецепторами семейства DR (DR4/5), которое может наряду с активацией апоптоза вызывать и его торможение через NF-κB. [16]. Инициация четвертого сигнального пути осуществляется за счет взаимодействия рецептора DR3 с лигандом TL1A [17–19], которое характеризуется двойным механизмом действия, то есть может активировать как апоптотический, так и антиапоптотический сигнальные пути [20, 21].

В своей предыдущей работе [9] мы также показали, что экспрессия генов *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным ХЛЛ коррелирует с клиническими проявлениями болезни: они были минимальными у пациентов с высокой активностью проапоптотических генов и низкой активностью генов, блокирующих

апоптоз, и более выраженными у пациентов с высоким уровнем экспрессии антиапоптотических и низким уровнем экспрессии проапоптотических генов.

На втором этапе нашей работы мы решили выяснить, как влияет терапия флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR) на уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным ХЛЛ в зависимости от клинических данных и ответа на лечение.

## Материал и методы

В проспективное когортное исследование вошли 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ, прошедших обследование и лечение в отделении клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с ноября 2014 по декабрь 2017 г. В исследование включали пациентов с установленным диагнозом впервые выявленного ХЛЛ в возрасте от 18 до 80 лет, со стадиями заболевания от I до IV по Rai [22] с показаниями для FCR-терапии. Установление диагноза, показаний к терапии и оценку ответа на лечение осуществляли в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по ХЛЛ (IWCLL, 2008) [22]. Критериями невключения были хроническая почечная недостаточность с клиренсом креатинина меньше 30 мл/мин, гемолитическая анемия, возраст более 80 лет, полисистемная коморбидность, тяжелые аллергические состояния в анамнезе. Критерием исключения служила непереносимость ритуксимаба.

Все больные проходили клинико-диагностическое обследование, включавшее общий и биохимический анализ крови, исследование аспиратов костного мозга до и после завершения индукционного периода противоопухолевой химиотерапии, ультразвуковое исследование лимфоузлов брюшной полости и забрюшинного пространства, а также компьютерную томографию органов грудной клетки.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови для диагностики ХЛЛ проводили в клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского методом 4-цветной проточной цитометрии (“Becton Dickinson”, США) с использованием

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

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



моноклональных антител к антигенам CD3, CD19, CD20, CD22, CD5, CD23, CD38 (“Becton Dickinson”, США). При установлении иммунофенотипического профиля, характерного для ХЛЛ, у пациентов в дебюте заболевания до начала противоопухолевой терапии дополнительно определялась экспрессия CD38. Критерием позитивности CD38 считали наличие экспрессии антигена на поверхности более чем 20% опухолевых клеток. Экспрессия CD38-антигена на В-лимфоцитах более 20% позитивных клеток свидетельствует об отсутствии соматических гипермутаций вариабельных участков генов иммуноглобулинов и коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов с ХЛЛ [23].

Для исследования экспрессии генов внешнего пути апоптоза (*FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5*) проводили полимеразную цепную реакцию в реальном времени с обратной транскрипцией в лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, как описано в работе [9].

Всем 23 пациентам применяли стандартную программу лечения FCR: ритуксимаб 1 цикл – 375 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно в 1-й день, последующие циклы – 500 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно в 1-й день; флударабин 25 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно во 2–4-й дни; циклофосфамид 250 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно во 2–4-й дни. Цикл составлял 32 дня. Индукционный период состоял из 6 циклов.

После завершения индукционной противоопухолевой FCR-терапии выполнен анализ

клинических результатов, где была зафиксирована категория ответа (ремиссия полная, частичная или стабилизация болезни). Далее последовало наблюдение за больными с проведением поддерживающего лечения ритуксимабом. Медиана наблюдения составила 33 месяца. Выбывших из исследования не было.

**Этическая экспертиза.** В соответствии со ст. 32 «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (утверждены ВС РФ от 22.07.1993 № 5487-1 в редакции от 30.12.2008) исследование проводили с письменного согласия обследуемых. Проведение исследования одобрено комитетом по этике при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол заседания от 15 декабря 2016 г.).

**Статистический анализ.** Размер выборки предварительно не рассчитывался. Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных пакетов программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Office Excel 2016. Количественные данные представлены в виде медианы (Me), минимальных и максимальных значений (min-max). Для исследования связи уровня экспрессии гена *FAS* с количественными параметрами (возраст больных, поражение лимфатических узлов, количество лимфоцитов, уровень гемоглобина, количество эритроцитов и тромбоцитов, экспрессия CD38, количество клеток с иммунофенотипом CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> и уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL*) использовали U-критерий Манна – Уитни. Для исследования связи уровня экспрессии гена *FAS* с качественными параметрами (пол, стадия заболевания

**Таблица 1.** Экспрессия генов внешнего пути апоптоза у 23 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* до проведения FCR-терапии

Параметр	Высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n=8)	Низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n=15)	Значение p
Возраст, Me (min–max), годы	63 (59–78)	65 (47–78)	0,8557*
Мужчины, %	75	73	0,9309**
<i>DR3</i> , Me (min–max), %	145 (5–1925)	169 (0–1074)	0,9645*
<i>DR4/5</i> , Me (min–max), %	599 (333–6932)	766 (416–1350)	0,3282*
<i>FAS</i> , Me (min–max), %	7717 (4617–12980)	373 (113–2550)	<0,0001*
<i>TNFR2</i> , Me (min–max), %	6868 (1587–32842)	1811 (559–2939)	0,0015*
<i>TRAIL</i> , Me (min–max), %	11775 (2111–19670)	2401 (436–14600)	0,0053*

\* U-критерий Манна – Уитни

\*\* Критерий  $\chi^2$



**Таблица 2.** Клинические показатели 23 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* до проведения FCR-терапии

Параметр	Высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n = 8)	Низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n = 15)	Значение <i>p</i>
Степень увеличения лимфатических узлов, Me (min–max), баллы	6 (0–10)	7 (2–12)	0,4411*
Степень увеличения печени, Me (min–max), баллы	0 (0–1)	1 (0–6)	0,1453*
Степень увеличения селезенки, Me (min–max), баллы	1 (0–2)	1 (0–2)	0,1876*
Количество лимфоцитов, Me (min–max), 10 <sup>9</sup> /л	5,9 (2,2–135)	92 (10,3–216)	0,0016*
Концентрация гемоглобина, Me (min–max), г/л	140 (124–149)	127 (101–135)	0,0817*
Количество эритроцитов, Me (min–max), 10 <sup>12</sup> /л	4,59 (4,2–5,42)	3,85 (1,35–5)	0,0159*
Содержание клеток с иммунофенотипом CD19 <sup>+</sup> /CD5 <sup>+</sup> /CD23 <sup>+</sup> , Me (min–max), % от всех лимфоцитов периферической крови	48,2 (0,7–82,2)	68 (6,5–94,5)	0,1673*
Содержание CD38-позитивных клеток ХЛЛ, Me (min–max), %	3,2 (0,5–7,2)	19,5 (0,7–89)	0,1246*
I–II стадия ХЛЛ по Rai, %	100	53	0,0205**

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

\* U-критерий Манна – Уитни

\*\* Критерий  $\chi^2$

I и II против стадий III и IV, клинический исход) применяли критерий  $\chi^2$ . Для анализа величины изменения таких признаков, как количество лимфоцитов, размер лимфатических узлов, печени и селезенки, а также уровня экспрессии исследованных генов использовали критерий Уилкоксона [24]. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Характеристика пациентов

Из 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ было 16 мужчин и 7 женщин, медиана возраста составила 64 года (от 47 до 77 лет). У 16 больных диагностирована I–II стадии ХЛЛ по Rai, у 7 – III–IV стадии.

У всех больных (n = 23) пальпировались увеличенные периферические лимфатические узлы, у 2 определялись конгломераты в аксиллярной и шейной областях. В 12 наблюдениях пальпировались печень и селезенка, у 6 отмечено значительное их увеличение (> 5 см из-под реберной дуги). Лимфоаденопатию средостения и брюшной полости регистрировали у 15 обследованных. В анализах периферической крови 7 пациентов отмечен уровень гемоглобина ниже 100 г/л. Гиперлейкоцитоз (уровень лейкоцитов периферической крови более  $200 \times 10^9$ /л) зафиксирован у 4 человек. Признаки опухолевой интоксикации (выраженная потливость) наблюдались у 12.

Показаниями для химиотерапии у больных с I–II стадией ХЛЛ были укороченное время удвоения лимфоцитов периферической крови и признаки опухолевой интоксикации.

Оценка уровня экспрессии генов апоптоза и клинических данных в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*

В ходе исследования мы получили данные об уровнях экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* у 23 больных до и после проведения курса FCR-терапии, а также оценили клинические

**Таблица 3.** Динамика экспрессии генов внешнего пути апоптоза у 7 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до лечения и после цикла FCR-терапии

Ген	Уровень экспрессии гена, Me (min–max), %		Значение <i>p</i> (U-критерий Манна – Уитни)
	до лечения	после курса FCR-терапии	
<i>DR3</i>	305,35 (136–1294)	1077,8 (31–7088)	0,3715
<i>DR4/5</i>	785,55 (429,6–1215)	1204 (348,9–2767)	0,2139
<i>FAS</i>	403,4 (216–857,5)	2027,1 (528–7200)	0,0025
<i>TNFR2</i>	2004,8 (559–33080)	2104,2 (559–16770)	0,9784
<i>TRAIL</i>	2803,4 (650–34250)	5851,4 (1869,1–51560)	0,0045

**Таблица 4.** Сравнение клинических показателей 23 больных с хроническим лимфолейкозом до лечения и после проведения 1-го цикла FCR-терапии

Параметр	Отношение показателя после лечения к исходному (доля)		Значение <i>p</i>
	высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> ( <i>n</i> = 8)	низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> ( <i>n</i> = 15)	
Степень увеличения лимфатических узлов, баллы	4/6 (0,7)	5,5/7 (0,8)	0,7093*
Степень увеличения печени, баллы	0/0	1/1	0,1657*
Степень увеличения селезенки, баллы	0/0	0/0	0,3839*
Количество лимфоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	1,1/5,9 (0,2)	10,25/92 (0,1)	0,0019*
Концентрация гемоглобина, г/л	128/140 (0,9)	122,5/127 (1)	0,5815*
Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л	4,64/4,59 (1)	4,1/3,85 (1)	0,0577*
Полная ремиссия после 6 циклов индукции, %	75	27	0,0263**

\*U-критерий Манна – Уитни

\*\*Критерий  $\chi^2$ 

показатели после первого и шестого циклов FCR-терапии, характеризующие ее эффективность. Для удобства анализа пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*, как определено нами в работе [9].

Результаты до проведения FCR-терапии отображены в табл. 1. Из ее данных видно, что группа больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* отличалась от группы с низким уровнем этого показателя более высоким уровнем экспрессии не только гена *FAS* ( $p < 0,0001$ ), но и генов *TNFR2* ( $p < 0,0015$ ) и *TRAIL* ( $p < 0,0053$ ), что может свидетельствовать о большей чувствительности опухолевых клеток к развитию апоптоза.

Анализ исходных клинических данных в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* (табл. 2) показал, что в группе с низким уровнем экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов было увеличено ( $p = 0,0016$ ), а эритроцитов снижено ( $p = 0,0159$ ). В группе с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* было больше больных с I–II стадией ХЛЛ ( $p = 0,0205$ ).

Через 3 дня после проведения 4-дневного курса FCR-терапии у 7 из 23 больных, отобранных случайно, без селекции по какому-либо признаку, было изучено изменение экспрессии генов внешнего пути апоптоза (табл. 3). Оказалось, что после завершения курса лечения повышение уровня экспрессии отмечено только для генов *FAS* ( $p = 0,0025$ ) и *TRAIL* ( $p = 0,0045$ ).

Клинические данные всех 23 больных ХЛЛ в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*

мы проанализировали по завершении 1-го цикла FCR-терапии (табл. 4). Наибольшие различия были установлены по динамике снижения количества лимфоцитов крови. У больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* по сравнению с высоким количество лимфоцитов снижалось быстрее ( $p = 0,0019$ ).

После 6 циклов FCR-терапии полной или частичной ремиссии достигли 82% (19 из 23 пациентов), при этом большее количество полных ремиссий отмечено у пациентов с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* ( $p = 0,026$ ).

Нежелательных явлений, связанных с проведением FCR-терапии, не зарегистрировано.

## Обсуждение

В настоящем исследовании мы получили данные, позволившие показать участие генов внешнего пути апоптоза *FAS*, *TRAIL* и *TNFR2* в достижении противоопухолевого ответа после проведения FCR-терапии у больных с впервые выявленным ХЛЛ, а также подтвердить их проапоптотическую роль [25, 26]. Важно отметить, что в группе пациентов с высокой активностью проапоптотических генов проявления болезни были менее выражены.

При анализе уровня экспрессии изучаемых генов после проведения 1-го курса FCR-терапии статистически значимое повышение показателей отмечено только для *FAS* и *TRAIL*, но не для *TNFR2*, что может быть обусловлено его способностью как активировать, так и блокировать апоптоз [10–13].



На основании вышесказанного можно предположить: комбинация препаратов флударабина, циклофосфида и ритуксимаба опосредует противоопухолевый ответ через активацию генов апоптоза *FAS* и *TRAIL*. Интересно отметить, что ритуксимаб комплементарно связывается с CD20 на мембране опухолевого В-лимфоцита при ХЛЛ, вызывая апоптоз, а также клеточную цитотоксичность [27]. Следовательно, FCR-программа имеет двойной механизм противоопухолевого действия: генопосредованный и мембранный. Активация двух ключевых генов апоптоза *FAS* и *TRAIL* под влиянием FCR-терапии

сопровождалась уменьшением клинических проявлений ХЛЛ в большей степени у больных с низким уровнем экспрессии *FAS*.

### Заключение

Гены внешнего пути апоптоза – один из ключевых факторов опухолевого роста при ХЛЛ. Полученные нами данные о влиянии FCR-терапии на уровень экспрессии генов *FAS* и *TRAIL* дают возможность рассматривать их как мишень для данной комбинации препаратов, а также могут лечь в основу разработки новых молекулярных препаратов. ©

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

## Литература

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017;92(9):946–65. doi: 10.1002/ajh.24826.
2. Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:151–71. doi: 10.1007/978-1-4614-8051-8\_7.
3. Podhorecka M, Macheta A, Bozko M, Bozko A, Malek NP, Bozko P. Deregulation of apoptosis – is it still an important issue in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia? *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):652–8. doi: 10.2174/1568009616666160427103930.
4. Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2014;5(2):309–25. doi: 10.18632/oncotarget.1480.
5. Huang X, Shen Q, Chen S, Chen S, Yang L, Weng J, Du X, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. *J Hematol Oncol*. 2011;4:23. doi: 10.1186/1756-8722-4-23.
6. Baptista MJ, Muntañola A, Calpe E, Abrisqueta P, Salamero O, Fernández E, Codony C, Giné E, Kalko SG, Crespo M, Bosch F. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5924–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771.
7. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362–74. doi: 10.1038/nri3834.
8. Барышников АЮ. Принципы и практика вакцинотерапии рака. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2004;24(2):59–63.
9. Захаров СГ, Голенков АК, Мисюрин АВ, Катаева ЕВ, Рудакова АА, Барышникова МА, Митина ТА, Трифонова ЕВ, Высоцкая ЛЛ, Черных ЮБ, Клинушкина ЕФ, Белоусов КА, Финашутина ЮП, Мисюрин ВА. Экспрессия основных генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в сравнении с клиническими данными. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):41–6. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46.
10. Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G. Mutation analysis of the *FAS* and *TNFR* apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol*. 2001;29(2):228–33. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00623-8.
11. Srivastava S, Tsongalis GJ, Kaur P. Role of microRNAs in regulation of the *TNF/TNFR* gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem*. 2016;49(16–17):1307–10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.010.
12. Aggarwal BB. Signalling pathways of the *TNF* superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56. doi: 10.1038/nri1184.
13. Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in *TNF* receptor-induced signaling to *NF-κB*, *MAP* kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. 2016;116:1–10. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.009.
14. Secchiero P, di lasio MG, Gonelli A, Barbarotto E, Melloni E, Tiribelli M, Chiaruttini C, Zauli G. Differential gene expression induction by *TRAIL* in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells showing high versus low levels of *Zap-70*. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):229–36. doi: 10.1002/jcp.21116.
15. Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human *TRAIL* gene. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(12):1143–51. doi: 10.4161/cbt.21354.
16. Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, Zauli G. *NF-κB* pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(11):2083–102. doi: 10.1007/s00018-013-1545-4.
17. Meylan F, Richard AC, Siegel RM. *TL1A* and *DR3*, a *TNF* family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol Rev*. 2011;244(1):188–96. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01068.x.
18. Cavallini C, Lovato O, Bertolaso A, Zoratti E, Malpeli G, Mimiola E, Tinelli M, Aprili F, Tecchio C, Perbellini O, Scarpa A, Zamò A, Cassatella MA, Pizzolo G, Scupoli MT. Expression and function of the *TL1A/DR3* axis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(31):32061–74. doi: 10.18632/oncotarget.5201.
19. Jablonska E, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F, Parfienczyk A, Puzewska W, Bukin M. *TNF* family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma*. 2005;46(9):1307–12. doi: 10.1080/10428190500158789.
20. Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschrwender M. Soluble *TL1A* is sufficient for activation of death receptor 3. *FEBS J*. 2016;283(2):323–36. doi: 10.1111/febs.13576.
21. McCarthy BA, Yancopoulos S, Tipping M, Yan XJ, Wang XP, Bennett F, Li W, Lesser M, Paul S, Boyle E, Moreno C, Catera R, Messmer BT, Cutrona G, Ferrarini M, Koltz JE, Allen SL, Rai KR, Rawstron AC, Chiorazzi N. A seven-gene expression panel distinguishing clonal expansions of pre-leukemic and chronic lymphocytic leukemia B cells from normal B lymphocytes. *Immunol Res*. 2015;63(1–3):90–100. doi: 10.1007/s12026-015-8688-3.
22. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
23. Зуева ЕЕ, Куртова АВ, Русанова ЕБ, Слободнюк КЮ, Горчакова МВ, Голубева ВИ, Салогуб ГН. Диагностика онкогематологических





заболеваний с помощью проточной цитометрии. СПб.: СпецЛит; 2017. 327 с.

24. Орлов АИ. Непараметрические критерии согласия Колмогорова, Смирнова, омега-квадрат и ошибки при их применении [Интернет]. Научный журнал КубГАУ. 2014;97(03):31–45. Доступно на: <http://ej.kubagro.ru/2014/03/pdf/47.pdf>.

## References

- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017;92(9):946–65. doi: 10.1002/ajh.24826.
- Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:151–71. doi: 10.1007/978-1-4614-8051-8\_7.
- Podhorecka M, Macheta A, Bozko M, Bozko A, Malek NP, Bozko P. Deregulation of apoptosis – is it still an important issue in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia? *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):652–8. doi: 10.2174/1568009616666160427103930.
- Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2014;5(2): 309–25. doi: 10.18632/oncotarget.1480.
- Huang X, Shen Q, Chen S, Chen S, Yang L, Weng J, Du X, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. *J Hematol Oncol*. 2011;4:23. doi: 10.1186/1756-8722-4-23.
- Baptista MJ, Muntañola A, Calpe E, Abrisqueta P, Salamero O, Fernández E, Codony C, Giné E, Kalko SG, Crespo M, Bosch F. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5924–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771.
- Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362–74. doi: 10.1038/nri3834.
- Baryshnikov AYu. Tumor vaccination principles and practice. *The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2004;24(2):59–63. Russian.
- Zakharov SG, Golenkov AK, Misyurin AV, Kartaeva EV, Rudakova AA, Baryshnikova MA, Mitina TA, Trifonova EV, Vysotskaya LL, Chernykh YB, Klinushkina EF, Belousov KA, Finashutina YP, Misyurin VA. Expression of the apoptosis-related genes in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia in clinical data context. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):41–6. Russian. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46.
- Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amarglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G. Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol*. 2001;29(2):228–33. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00623-8.
- Srivastava S, Tsonalis GJ, Kaur P. Role of microRNAs in regulation of the TNF/TNFR gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem*. 2016;49(16-17):1307–10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.010.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56. doi: 10.1038/nri1184.
- Borghia A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- $\kappa$ B, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. 2016;116:1–10. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.009.
- Secchiero P, di Iasio MG, Gonelli A, Barbarotto E, Melloni E, Tiribelli M, Chiaruttini C, Zauli G. Differential gene expression induction by TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells showing high versus low levels of Zap-70. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):229–36. doi: 10.1002/jcp.21116.
- Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(12): 1143–51. doi: 10.4161/cbt.21354.
- Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, Zauli G. NF- $\kappa$ B pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(11):2083–102. doi: 10.1007/s00018-013-1545-4.
- Meylan F, Richard AC, Siegel RM. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol Rev*. 2011;244(1):188–96. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01068.x.
- Cavallini C, Lovato O, Bertolaso A, Zoratti E, Malpeli G, Mimmiola E, Tinelli M, Aprilì F, Tecchio C, Perbellini O, Scarpa A, Zamò A, Cassatella MA, Pizzolo G, Scupoli MT. Expression and function of the TL1A/DR3 axis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(31): 32061–74. doi: 10.18632/oncotarget.5201.
- Jablonska E, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F, Parfienczyk A, Puzewska W, Bukin M. TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma*. 2005;46(9):1307–12. doi: 10.1080/10428190500158789.
- Wan Z, Pan H, Liu S, Zhu J, Qi W, Fu K, Zhao T, Liang J. Downregulation of SNAIL sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF- $\kappa$ B pathway. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1560–6. doi: 10.3892/or.2015.3743.
- ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia – focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):548–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0226.
- Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, Billard C. Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015;29(5):345–50. doi: 10.1016/j.blre.2015.03.005.
- Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschwender M. Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3. *FEBS J*. 2016;283(2):323–36. doi: 10.1111/febs.13576.
- McCarthy BA, Yancopoulos S, Tipping M, Yan XJ, Wang XP, Bennett F, Li W, Lesser M, Paul S, Boyle E, Moreno C, Catera R, Messmer BT, Cutrona G, Ferrarini M, Koltz JE, Allen SL, Rai KR, Rawstron AC, Chiorazzi N. A seven-gene expression panel distinguishing clonal expansions of pre-leukemic and chronic lymphocytic leukemia B cells from normal B lymphocytes. *Immunol Res*. 2015;63(1–3): 90–100. doi: 10.1007/s12026-015-8688-3.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12): 5446–56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
- Zueva EE, Kurtova AV, Rusanova EB, Slobodnyuk KYu, Gorchakova MV, Golubeva VI, Salogub GN. Flow cytometry in the diagnosis of oncohematological diseases. *Saint Petersburg: SpetsLit*; 2017. 327 p. Russian.
- Orlov AI. Nonparametric goodness-of-fit Kolmogorov, Smirnov, omegasquare tests and the errors in their application [Internet]. *Scientific Journal of KubSAU*. 2014;97(03):644–72. Russian. Available from: <http://ej.kubagro.ru/2014/03/pdf/47.pdf>.
- Wan Z, Pan H, Liu S, Zhu J, Qi W, Fu K, Zhao T, Liang J. Downregulation of SNAIL sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF- $\kappa$ B pathway. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1560–6. doi: 10.3892/or.2015.3743.
- ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia – focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):548–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0226.
- Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, Billard C. Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015;29(5):345–50. doi: 10.1016/j.blre.2015.03.005.





## Expression levels of the apoptosis genes *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* and *DR4/5* in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukemia before and after treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR)

S.G. Zakharov<sup>1</sup> • A.K. Golenkov<sup>1</sup> • V.A. Misyurin<sup>2</sup> • E.V. Kataeva<sup>1</sup> • M.A. Baryshnikova<sup>2</sup> • Yu.Yu. Chuksina<sup>1</sup> • T.A. Mitina<sup>1</sup> • E.V. Trifonova<sup>1</sup> • L.L. Vysotskaya<sup>1</sup> • Yu.B. Chernykh<sup>1</sup> • E.F. Klinushkina<sup>1</sup> • K.A. Belousov<sup>1</sup> • Yu.P. Finashutina<sup>2</sup> • A.V. Misyurin<sup>2</sup>

**Background:** We have previously shown that the *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* gene expression in patients with newly diagnosed chronic lymphoblastic leukemia (CLL) correlates with clinical manifestations of the disease: they are minimal in patients with high activity of the pro-apoptotic genes and low activity of the apoptosis-inhibiting genes, and advanced in patients with high expression of the anti-apoptotic and low expression of the pro-apoptotic genes. **Aim:** To compare the levels of expression of the external apoptosis pathway genes in patients with newly diagnosed CLL before and after chemotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR), taking into account baseline clinical data and the response to treatment. **Materials and methods:** This prospective one-center cohort study included 23 patients with newly diagnosed CLL, who underwent clinical and diagnostic assessments and treatment from November 2014 to December 2017. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes for CLL diagnosis was done by four-color flow cytometry. Expression of the external apoptosis pathway genes was assessed by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. All patients were treated with a standard FCR regimen with subsequent maintenance treatment with rituximab. **Results:** There were more men ( $n=16$ ) than women among our 23 CLL patients. Median age was 64 years (range, from 47 to 77 years). Sixteen (16) patients had CLL Rai Grade I and II, and 7 patients had CLL Grades III and IV. For convenience of analysis, all patients were divided into two groups depending on the *FAS* gene expression. At baseline, the patients with high *FAS* expression had higher *TNFR2* ( $p < 0.0015$ ) and *TRAIL* ( $p < 0.0053$ ) expression levels. Before FCR therapy, the patients with low *FAS* expression had

higher lymphocyte counts ( $p=0.0016$ ) and lower erythrocyte counts ( $p=0.0159$ ). At baseline, there were more Grade I and II patients in the group with higher *FAS* expression ( $p=0.0205$ ). At day 3 after the end of a four day FCR cycle, there was an increase only of the *FAS* ( $p=0.0025$ ) and *TRAIL* ( $p=0.0045$ ) expression. After the completion of the first FCR cycle, lymphocyte counts in the patients with low *FAS* expression decreased earlier than those in the patients with high *FAS* expression ( $p=0.0019$ ). After six FCR cycles, complete or partial remission was obtained in 82% (19/23) of the patients. The patients with high *FAS* expression had higher complete remission rate ( $p=0.026$ ). No adverse events related to FCR were registered. **Conclusion:** The external apoptosis pathway genes are one of the key factors of the tumor progression in CLL. Our data on the effect of FCR therapy on the *FAS* and *TRAIL* gene expression make it possible to consider them as a target for this combination regimen and may become the rationale to develop new pharmaceutical molecules.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, apoptosis genes, FCR regimen

**For citation:** Zakharov SG, Golenkov AK, Misyurin VA, Kataeva EV, Baryshnikova MA, Chuksina YuYu, Mitina TA, Trifonova EV, Vysotskaya LL, Chernykh YuB, Klinushkina EF, Belousov KA, Finashutina YuP, Misyurin AV. Expression levels of the apoptosis genes *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukemia before and after treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR). Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(8):734–41. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-734-741.

Received 25 October 2018;  
accepted 13 December 2018

**Sergey G. Zakharov** – MD, Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

✉ 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 076 66 99.  
E-mail: hematologymoniki@mail.ru

**Anatoliy K. Golenkov** – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Vsevolod A. Misyurin** – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors<sup>2</sup>

**Elena V. Kataeva** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Mariya A. Baryshnikova** – PhD in Pharmacology, Head of the Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors<sup>2</sup>

**Yuliya Yu. Chuksina** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Tat'yana A. Mitina** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Elena V. Trifonova** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Lyudmila L. Vysotskaya** – MD, PhD, Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Yuliya B. Chernykh** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Elena F. Klinushkina** – Junior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Kirill A. Belousov** – Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>1</sup>

**Yuliya P. Finashutina** – Research Fellow, Laboratory of Recombinant Tumor Antigens<sup>2</sup>

**Andrey V. Misyurin** – PhD, ScD in Biology, Head of the Laboratory of Recombinant Tumor Antigens<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.



Оригинальная статья

# Оценка нелинейной динамики поврежденности клеточных структур как перспективный метод персонализированной онкодиагностики

Наймарк О.Б.<sup>1</sup> • Никитюк А.С.<sup>1</sup> • Небогатиков В.О.<sup>2</sup> • Гришко В.В.<sup>2</sup>

**Актуальность.** Модуляционная интерференционная микроскопия – одна из перспективных технологий для проведения ранней персонализированной диагностики онкологических заболеваний, поскольку позволяет в режиме реального времени получать изображение живых функционирующих клеток с нанометровым разрешением, а также проводить оценку пространственно-временной динамики их субклеточных структур. **Цель** – выявить маркеры злокачественной трансформации клеток на основе многомасштабного пространственно-временного анализа данных лазерной интерферометрии *in situ* регистрации динамики субклеточных структур. **Материал и методы.** Материалом служили клеточные линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и эпителиальных клеток почки человека HEK 293, предоставленные ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва). Измерения динамики флуктуаций фазовой толщины живых клеток проводили с помощью лазерного модуляционного интерференционного микроскопа MIM-340 (АО «ПО «УОМЗ», Россия). Для оценки полученных

данных использовали алгоритм мультифрактального анализа флуктуаций с исключенным трендом (MF-DFA). **Результаты.** При сравнении спектров скейлинговых экспонент и соответствующих им спектров сингулярностей флуктуаций минимального и максимального диаметров фазовых изображений эпителиальных клеток почки культуры HEK 293 и клеток аденокарциномы молочной железы культуры MCF-7 установлено, что динамика раковых клеток обладает ярко выраженными свойствами монофрактала: линейная зависимость скейлинговых экспонент  $\tau$  от действительного параметра  $q$  и «точечный» спектр сингулярностей (ширина спектра не превышает значения 0,1). Динамика нормальных клеток демонстрирует мультифрактальные свойства: нелинейная зависимость  $\tau(q)$  и колоколообразный спектр сингулярностей (ширина спектра больше значения 0,1). **Заключение.** Предложен новый подход к оценке поврежденности субклеточных структур в процессе онкогенеза на основе анализа динамики флуктуаций фазовой толщины живых клеток в реальном времени. Объективными критериями злокачественного перерождения являются признаки

монофрактальности. Полученные результаты в дальнейшем могут оказаться перспективными в качестве ранних диагностических маркеров злокачественной трансформации (повреждения) клеток и определения чувствительности/устойчивости клеток опухоли конкретного пациента к противоопухолевым препаратам.

**Ключевые слова:** лазерная интерференционная микроскопия, клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7, эпителиальные клетки почки человека HEK 293, пространственно-временные инварианты, поврежденность раковых клеток

**Для цитирования:** Наймарк О.Б., Никитюк А.С., Небогатиков В.О., Гришко В.В. Оценка нелинейной динамики поврежденности клеточных структур как перспективный метод персонализированной онкодиагностики. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):742–7. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-742-747.

Поступила 31.05.2018;  
принята к публикации 29.11.2018

**В**ажным аспектом трансляционных исследований в онкологии признан поиск молекулярно-биологических маркеров злокачественных новообразований для оптимизации процесса профилактики, диагностики, лечения и прогнозирования исходов заболевания. Решение проблемы лежит в реализации междисциплинарного подхода, позволяющего эффективно трансформировать фундаментальные исследования в практические технологии клинической медицины. Новые возможности для проведения ранней персонализированной онкодиагностики открывает использование инновационных технических решений сверхразрешающей визуализации и количественной оценки

особенностей механобиологического состояния клеточных структур в условиях физиологической нормы и/или патологического повреждения (англ. cell damage, tissue damage).

К таким перспективным технологиям можно отнести модуляционную интерференционную микроскопию. С ее помощью можно в режиме реального времени получать изображение живых функционирующих клеток с нанометровым разрешением, а также проводить оценку пространственно-временной динамики флуктуаций «фазовых толщин» их субклеточных структур [1–4].

Цель настоящей работы – поиск новых маркеров злокачественной трансформации клеток на



основе многомасштабного пространственно-временного анализа данных лазерной интерферометрии *in situ* регистрации динамики субклеточных структур.

## Материал и методы

Материалом для исследования служили клеточные линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и эпителиальных клеток почки человека НЕК 293, предоставленные ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва).

Клетки культивировали в 25 мл флаконах с модифицированной по способу Дулбекко средой Игла (DMEM), 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 миллимоль L-глутамином и 1% гентамицином при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим (Serva, США).

Для проведения измерений клетки MCF-7 и НЕК 293 в концентрации 10<sup>5</sup> кл/мл высеивали в чашки Петри на покровные стекла и выдерживали 24 часа для их закрепления. Затем покровные стекла прижимали к кремниевой подложке с отражающей поверхностью и заранее нанесенной силиконовой смазкой Molykote 111 с целью получения плоской миникамеры. Всего было исследовано 15 клеток культуры MCF-7 и 18 клеток культуры НЕК 293.

Измерения фазовой толщины живых клеток проводили на базе лаборатории биологически активных соединений Института технической химии УрО РАН с помощью лазерного модуляционного интерференционного микроскопа МММ-340 (АО «ПО «УОМЗ», Россия). В качестве источника когерентного излучения использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 655 нм. Фазовые изображения (топограммы) исследуемых цитообъектов были получены с помощью объектива с 20-кратным увеличением. Вертикальное и поперечное разрешение составило 0,3 и 100 нм соответственно. Локальные фазовые сдвиги определяли трехшаговым методом [5]. После измерений выполняли предварительную обработку топограмм: удаляли линейный наклон, обусловленный температурным дрейфом, и фоновый шум. Частота записи изображений составляла 3 Гц.

Для исследования динамических данных в топограммах живых клеток, полученных методом модуляционной интерференционной микроскопии, выделяли диаметры (минимальный

и максимальный) и использовали алгоритм мультифрактального анализа флуктуаций с исключенным трендом (MF-DFA) [6–8].

На первом шаге алгоритма вычисляли кумулятивную сумму от исходной функции  $x(t)$ :

$$u(j) = \sum_{i=1}^j (x(i) - \bar{x}), \quad (1)$$

где  $u(j)$  – кумулятивная сумма флуктуаций максимального ( $\text{diameter}_{\max}$ ) или минимального ( $\text{diameter}_{\min}$ ) диаметров клеток,  $j$  – количество клеток,  $x(i)$  – среднее значение флуктуаций диаметров отдельной клетки ( $i$ ),  $\bar{x}$  – среднее значение флуктуаций диаметров проанализированных клеток.

Далее массив значений  $u(j)$  разбивали на  $N_s = N/s$  интервалов длиной  $s$  каждый, которые обозначали как  $u_v(k) = u(l+k)$ , где  $l \leq k \leq s$ ,  $l = (v-1)s$ ,  $1 \leq v \leq N_s$ . Для всех интервалов вычисляли локальный наклон (линейный тренд  $y_v(k) = ak + b$ ) и определяли среднеквадратичные отклонения ( $F^2(v, s)$ ):

$$F^2(v, s) = \frac{1}{s} \sum_{k=1}^s (u_v(k) - y_v(k))^2, \quad (2)$$

которые, в свою очередь, усредняли по всем интервалам:

$$[F(s)]^2 = \frac{1}{N_s} \sum_{v=1}^{N_s} F^2(v, s). \quad (3)$$

Для определения мультифрактального спектра строили флуктуационные функции для различных значений  $q$ :

$$F_q(s) = \begin{cases} \left\{ \frac{1}{N_s} \sum_{v=1}^{N_s} [F^2(v, s)]^{q/2} \right\}^{1/q}, & q \neq 0 \\ \text{Exp} \left\{ \frac{1}{2N_s} \sum_{v=1}^{N_s} \ln [F^2(v, s)] \right\}, & q = 0 \end{cases} \quad (4)$$

В выражении (4)  $q$  является степенью, отражающей влияние вклада крупномасштабных (при  $q > 0$ ) и мелкомасштабных флуктуаций (при  $q < 0$ ). По полученным флуктуационным функциям  $F_q(s)$ , где  $s$  играет роль масштаба, в диапазоне масштабов  $s_{\min} \leq s \leq s_{\max}$ , на котором справедлива степенная зависимость  $F_q(s) : s^{h(q)}$ , строили обобщенные показатели Гельдера  $h(q)$ . И по ним вычисляли спектр скейлинговых экспонент  $\tau(q)$ :

$$\tau(q) = qh(q) - 1. \quad (5)$$

На заключительном шаге алгоритма с использованием преобразования Лежандра определяли мультифрактальный спектр  $f(a)$ :

**Наймарк Олег Борисович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией физических основ прочности<sup>1</sup>  
✉ 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (919) 496 15 02.  
E-mail: naimark@icmm.ru

**Никитюк Александр Сергеевич** – мл. науч. сотр. лаборатории физических основ прочности<sup>1</sup>

**Небогатиков Владимир Олегович** – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории биологически активных соединений<sup>2</sup>

**Гришко Виктория Викторовна** – канд. хим. наук, доцент, заведующая лабораторией биологически активных соединений<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Институт механики сплошных сред Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1, Российская Федерация

<sup>2</sup> «Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3, Российская Федерация

$$\begin{cases} \alpha = \frac{d\tau}{dq} \\ f(\alpha) = q\alpha - \tau(q) \end{cases} \quad (6)$$

Если спектр содержит одинаковые значения  $f(\alpha)$ , то это означает, что анализируемый сигнал обладает монофрактальными свойствами, в противном случае – мультифрактальными. Ширина спектра  $|a(q=-\infty) - a(q=+\infty)|$  определяет степень мультифрактальности, а характерные значения функции спектра сингулярностей  $f(\alpha)$  и ее производной при различных положительных значениях  $q=0, 1, 2$  и т.д. характеризуют фрактальные размерности.

Результаты обработки оригинальных данных динамики флуктуаций фазовых толщин нормальных и раковых клеток легли в основу дискриминации пространственно-временных инвариантов при оценке структурно-функциональных изменений клеток, ассоциированных с их поврежденностью в процессе иммортализации.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены типичные фазовые изображения эпителиальной клетки почки культуры НЕК 293 (см. рис. 1А) и клетки аденокарциномы

молочной железы культуры МСF-7 (см. рис. 1Б) в псевдоцвете в зависимости от фазовой толщины их субклеточных структур. Четко визуализируются границы живых функционирующих клеток, тонкий слой цитоплазмы, ядра и ядрышки, что позволяет в процессе динамического наблюдения с высокой точностью оценивать изменение их формы, размеров, плотности и т.д.

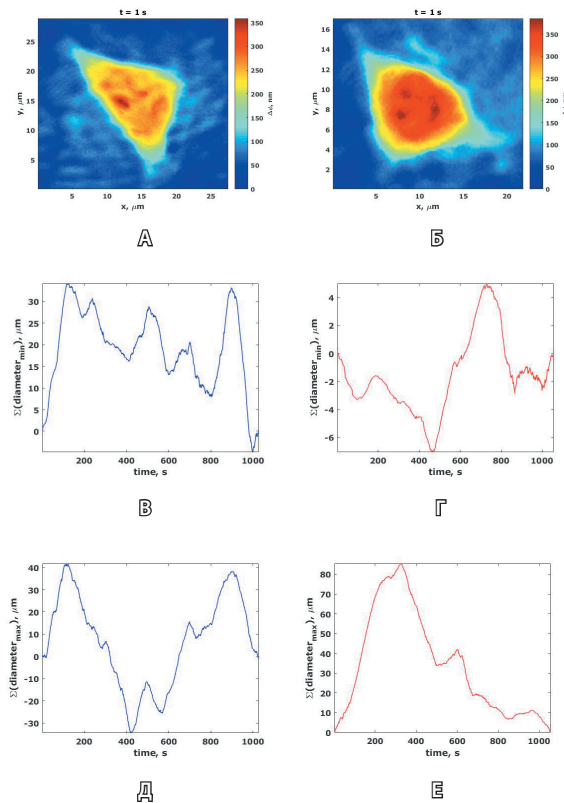
Кумулятивные суммы флуктуаций минимального и максимального диаметров фазовых изображений совокупности цитообъектов анализируемых клеточных линий (см. рис. 1В, Г, Д, Е) рассчитывали согласно соотношению (1).

Промежуточные и итоговый результаты мультифрактального анализа флуктуаций с исключенным трендом приведены на рис. 2. Флуктуационные функции рассчитывали по соотношению (4) при  $q=-2...2$ . Для определения спектра скейлинговых экспонент сначала вычисляли показатели Гельдера, а затем применяли соотношение (5). Применяв преобразование Лежандра (6), находили спектры сингулярностей анализируемых данных.

Сравнивая полученные спектры скейлинговых экспонент и соответствующие им спектры сингулярностей флуктуаций минимального и максимального диаметров фазовых изображений эпителиальных клеток почки культуры НЕК 293 и клеток аденокарциномы молочной железы культуры МСF-7, можно сделать вывод, что динамика раковых клеток обладает ярко выраженными свойствами монофрактала, в то время как динамика нормальной клетки демонстрирует мультифрактальные свойства. Монофракталу соответствуют линейная зависимость скейлинговых экспонент от действительного параметра  $q$  и «точечный» спектр сингулярностей (ширина спектра не превышает значения 0,1). Мультифракталу, напротив, соответствуют нелинейная зависимость  $\tau(q)$  и колоколообразный спектр сингулярностей (ширина спектра больше значения 0,1).

Достоверность результатов обработки и выводов об объективности критериев злокачественного перерождения подтверждается данными о ширине спектров, характеризующих мульти- и монофрактальную динамику флуктуаций минимального и максимального диаметров фазовых изображений для здоровых и раковых клеток. При этом стоит отметить, что при сравнении нормальных и раковых клеток линий МСF-7 и НЕК 293 их физиологическая принадлежность не является определяющей, так как критерий злокачественного перерождения оценивается на основе анализа динамики

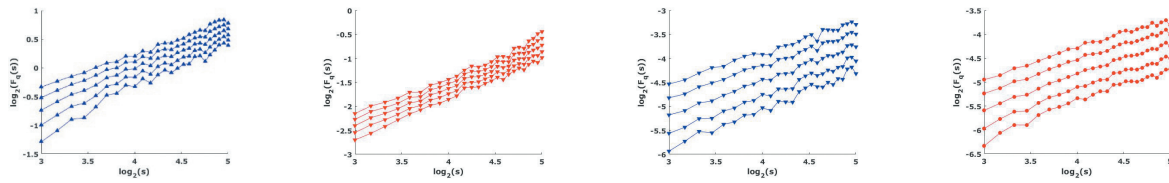
**Рис. 1.** Типичные фазовые изображения эпителиальной клетки почки культуры НЕК 293 (А) и клетки аденокарциномы молочной железы культуры МСF-7 (Б). Темно-красный цвет соответствует ядрышку или ядрышкам клеток, красный цвет – ядру, желтый – цитоплазме. Динамика кумулятивных сумм флуктуаций минимального диаметра (В, Г) и максимального диаметра (Д, Е) фазовых изображений клеток НЕК 293 и МСF-7. По оси ординат – кумулятивные суммы флуктуаций диаметров (мкм); по оси абсцисс – время регистрации динамики фазовых показателей, с



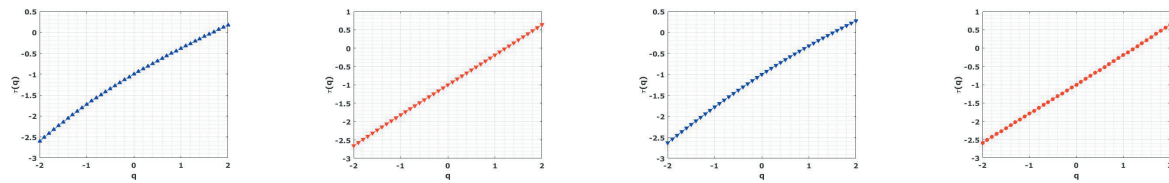




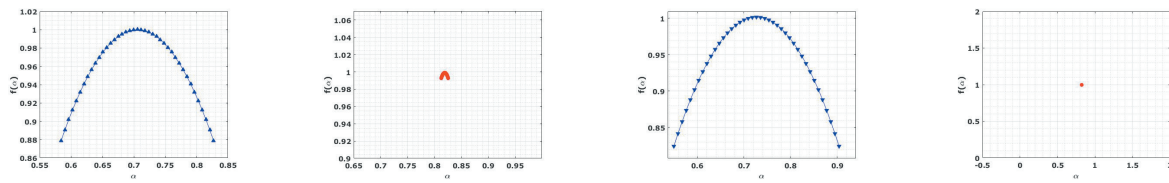
Флуктуационные функции



Спектры скейлинговых экспонент



Спектры сингулярностей



А

Б

В

Г

клеток в относительных показателях, а именно степень зависимости спектра скейлинговых экспонент и ширина спектра сингулярностей. Универсальные закономерности критичности обсуждаются в работах [6, 9].

Положительный опыт использования в онкодиагностике результатов исследования живых клеток методом динамической когерентной фазовой микроскопии ранее уже был получен группой российских онкологов [10]. Анализ галереи фазовых изображений опухолевых и фоновых клеток позволил обнаружить наиболее характерные признаки их злокачественной трансформации: были выявлены различия в количественных морфометрических параметрах и спектрах флуктуации фазовой толщины. Так, для нормальных клеток молочной железы наиболее характерными оказались интенсивные спектральные компоненты в диапазоне 0,2–6 Гц, для клеток рака молочной железы – 8–17,3 Гц.

Представленная оценка степени поврежденности клеток по данным пространственно-временной динамики флуктуаций основана на впервые установленных авторами закономерностях критичности при развитии поврежденности

в конденсированных средах – структурно-скейлинговые переходы в ансамблях дефектов [11].

Параметры порядка, ассоциированные с дефектами, характеризуют коллективные моды «открытых комплексов», представляющих собой области консолидированных разрывов водородных связей в биомолекулярных цепях, взаимодействие которых характеризует «нормальную» и критическую динамику клеток, ассоциированную с поврежденностью. Эволюция «открытых комплексов» определяется тремя установленными типами коллективных мод (бризеров, автосолитонных волн и диссипативных структур обострения), с которыми связывают динамику биологических молекул (процессы транскрипции и денатурации) и клеточных структур (пластификация, деление) [9]. Способность клетки обнаруживать спектр коллективных мод определяется ее динамической устойчивостью (мультифрактальностью). Вырождение спектра (признаки монофрактальности), соответствующее «подчинению» динамики клетки коллективным модам «обострения», может рассматриваться как признак критической динамики развития поврежденности, предшествующий неконтролируемому делению клетки в условиях иммортализации.

Рис. 2.

Мультифрактальный анализ данных модуляционной интерференционной микроскопии раковых и нераковых клеток (линий МСF-7 и НЕК 293): флуктуационные функции, спектры скейлинговых экспонент и спектры сингулярностей кумулятивной суммы флуктуаций минимального (А, Б) и максимального (В, Г) диаметров фазовых изображений эпителиальных клеток почки культуры НЕК 293 (синий цвет) и клеток аденокарциномы молочной железы культуры МСF-7 (красный цвет). По оси абсцисс на графиках флуктуационных функций отложено  $\log_2(s)$ , по оси ординат –  $\log_2(Fq(s))$ . По оси абсцисс на графиках спектров скейлинговых экспонент отложено  $q$ , по оси ординат –  $\tau(q)$ . По оси абсцисс на графиках спектров сингулярностей отложено  $\alpha$ , по оси ординат –  $f(\alpha)$





Практическое использование полученных данных в клинической практике непосредственно связано с возможностью применения новых объективных количественных критериев оценки функционального состояния нормальных или злокачественно трансформированных клеток в условиях *in situ* для ранней онкодиагностики. Метод не требует сложной предподготовки препаратов, фиксирования или окрашивания, дополнительных реактивов и оборудования, длительного времени для выполнения анализа фазовых флуктуаций. Показатели моно- или мультифрактальности исследуемых цитообъектов являются универсальными и характеризуют общие закономерности «поврежденности» клеток. Вместе с тем такой подход к оценке цитологического материала, полученного от конкретных пациентов, в ближайшей перспективе предполагает уникальную возможность определения индивидуальной чувствительности/устойчивости клеток опухоли к таргетным препаратам до назначения соответствующей терапии. Это будет способствовать выбору оптимальной тактики лечения, снижению случаев опухолевой прогрессии, риска развития

рецидивов и метастазирования при его низкой эффективности.

## Заключение

Предложен новый оригинальный подход к оценке структурно-функциональных изменений отдельных цитообъектов, ассоциированных с их поврежденностью в процессе онкогенеза, на основе данных пространственно-временной динамики флуктуаций фазовых толщин нормальных и раковых клеток.

Объективными критериями злокачественного перерождения являются признаки монофрактальности: линейная зависимость скейлинговых экспонент и «точечный» спектр сингулярностей кумулятивной суммы флуктуаций диаметров фазовых изображений анализируемых клеток.

Полученные нами результаты в дальнейшем могут оказаться перспективными не только в качестве ранних диагностических маркеров злокачественной трансформации (повреждения) клеток, но и при реализации персонального подхода к лечению онкологических больных в плане оценки чувствительности/устойчивости клеток опухоли конкретного пациента к таргетным препаратам. ☺

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-41-590235).

## Литература

1. Тychинский ВП. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? Успехи физических наук. 2007;177(5): 535–52. doi: 10.3367/UFNr.0177.200705c.0535.
2. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тychинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. Вестник последипломного медицинского образования. 2009;(3–4):64–8.
3. Majeed H, Sridharan S, Mir M, Ma L, Min E, Jung W, Popescu G. Quantitative phase imaging for medical diagnosis. J Biophotonics. 2017;10(2):177–205. doi: 10.1002/jbio.201600113.
4. Bishitz Y, Gabai H, Girshovitz P, Shaked NT. Optical-mechanical signatures of cancer cells based on fluctuation profiles measured by interferometry. J Biophotonics. 2014;7(8):624–30. doi: 10.1002/jbio.201300019.
5. Игнат'ев ПС, Индукаев КВ, Осипов ПА, Сергеев ИК. Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий. Медицинская техника. 2013;(1):27–30.
6. Naimark O. Nonlinear dynamics and damage induced properties of soft matter with application in oncology. AIP Conference Proceedings. 2017;1882(1):020052. doi: 10.1063/1.5001631.
7. Gerasimova-Chechkina E, Toner B, Marin Z, Audit B, Roux SG, Argoul F, Khalil A, Gileva O, Naimark O, Arneodo A. Comparative Multifractal Analysis of Dynamic Infrared Thermograms and X-Ray Mammograms Enlightens Changes in the Environment of Malignant Tumors. Front Physiol. 2016;7:336. doi: 10.3389/fphys.2016.00336.
8. Naimark OB, Nikitiuk AS, Baudement MO, Forne T, Lesne A. The physics of cancer: The role of epigenetics and chromosome conformation in cancer progression. AIP Conference Proceedings. 2016;1760(1):020051. doi: 10.1063/1.4960270.
9. Tsuchiya M, Selvarajoo K, Piras V, Tomita M, Giuliani A. Local and global responses in complex gene regulation networks. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications. 2009;388(8):1738–46. doi: 10.1016/j.physa.2008.12.030.
10. Чиссов ВИ, Тychинский ВП, Волченко НН, Решетов ИВ, Кретушев АВ, Вышенская ТВ, Славнова ЕН, Барыгина ВВ, Клемешов ИВ. Когерентная фазовая микроскопия опухолей на модели рака молочной железы. Российский онкологический журнал. 2006;(2):11–5.
11. Naimark OB. Defect induced transitions as mechanisms of plasticity and failure in multifield continua (review paper). In: Capriz G, Mariano P, editors. Advances in multifield theories of continua with substructure. Boston: Birkhauser; 2004. p. 75–114.
1. Tychinskii VP. Dynamic phase microscopy: is a “dialogue” with the cell possible? Phys Usp. 2007;(50):513–28. doi: 10.1070/PU2007v-050n05ABEH006222.
2. Vasilenko IA, Kardashova ZZ, Tychinskiy VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanyan BYa. Cellular diagnostics: the possibilities of vital computer microscopy. Journal of Postgraduate Medical Education. 2009;(3–4): 64–8. Russian.
3. Majeed H, Sridharan S, Mir M, Ma L, Min E, Jung W, Popescu G. Quantitative phase imaging for medical diagnosis. J Biophotonics. 2017;10(2): 177–205. doi: 10.1002/jbio.201600113.
4. Bishitz Y, Gabai H, Girshovitz P, Shaked NT. Optical-mechanical signatures of cancer cells based on fluctuation profiles measured by interferometry. J Biophotonics. 2014;7(8):624–30. doi: 10.1002/jbio.201300019.
5. Ignat'ev PS, Indukaev KV, Osipov PA, Sergeev IK. Laser interference microscopy for



- nanobiotechnologies. *Med Tekh.* 2013;(1): 27–30. Russian.
6. Naimark O. Nonlinear dynamics and damage induced properties of soft matter with application in oncology. *AIP Conference Proceedings.* 2017;1882(1):020052. doi: 10.1063/1.5001631.
7. Gerasimova-Chechkina E, Toner B, Marin Z, Audit B, Roux SG, Argoul F, Khalil A, Gileva O, Naimark O, Arneodo A. Comparative Multifractal Analysis of Dynamic Infrared Thermograms and X-Ray Mammograms Enlightens Changes in the Environment of Malignant Tumors. *Front Physiol.* 2016;7:336. doi: 10.3389/fphys.2016.00336.
8. Naimark OB, Nikitiuk AS, Baudement MO, Forne T, Lesne A. The physics of cancer: The role of epigenetics and chromosome conformation in cancer progression. *AIP Conference Proceedings.* 2016;1760(1):020051. doi: 10.1063/1.4960270.
9. Tsuchiya M, Selvarajoo K, Piras V, Tomita M, Giuliani A. Local and global responses in complex gene regulation networks. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications.* 2009;388(8): 1738–46. doi: 10.1016/j.physa.2008.12.030.
10. Chissov VI, Tychinsky VP, Volchenko NN, Reshetov IV, Kretushev AV, Vyshenskaya TV, Slavnova EN, Barygina VV, Klemeshov IV. Coherent phasic microscopy of the tumors on the model of breast cancer. *Russian Journal of Oncology.* 2006;(2):11–5. Russian.
11. Naimark OB. Defect induced transitions as mechanisms of plasticity and failure in multifield continua (review paper). In: Capriz G, Mariano P, editors. *Advances in multifield theories of continua with substructure.* Boston: Birkhauser; 2004. p. 75–114.

## Evaluation of nonlinear dynamics of the cell structure damage as a promising method for personalized cancer diagnostics

O.B. Naimark<sup>1</sup> • A.S. Nikityuk<sup>1</sup> • V.O. Nebogatikov<sup>2</sup> • V.V. Grishko<sup>2</sup>

**Background:** Modulation interference microscopy is one of the promising technologies for early personalized cancer diagnostics, while it gives the possibility to obtain real-time images of living functioning cells at a nanometer resolution, as well as to assess spatio-temporal changes of their intracellular structures. **Aim:** To identify the markers of malignant transformation of cells based on a multiple scale spatio-temporal of the data obtained by laser interferometry during *in situ* registration of changes in intracellular structures. **Materials and methods:** The study was performed with the breast adenocarcinoma MCF-7 cell line and human kidney epithelial cells HEK 293 provided by the N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology (Moscow, Russia). Changes in fluctuation of the living cell phase thickness were measured with a laser modulation interference microscope MIM-340 (PA UOMZ, Russia). The multifractal detrended fluctuation analysis (MF-DFA) was used to assess the results obtained. **Results:** By comparison of the scaling exponential spectra and corresponding spectra of the singular fluctuations in the minimal and maximal diameters of the phase pictures of HEK 293 cells and MCF-7 cells, it was shown that the cancer cell dynamics has definite monofractal properties: a linear dependency of the scaling exponents  $\tau$  from the

actual  $q$  parameter and “dotted” singularity spectrum (the spectral width does not exceed 0.1). The dynamics of healthy cell demonstrated multifractal properties, such as a non-linear dependency  $\tau(q)$  and a bell shaped singularity spectrum (the spectral width over 0.1). **Conclusion:** We have proposed a new approach to assess the intracellular structural damage during oncogenesis. The signs of monofractality are objective criteria of malignization. The results obtained seems promising as early diagnostic markers of cancer transformation (damage) of cells and determination of tumor cell sensitivity/resistance to anti-tumor agents in an individual patient.

**Key words:** laser interference microscopy, MCF-7 breast adenocarcinoma cells, human kidney epithelial cells HEK 293, spatio-temporal invariants, cancer cell damage

**For citation:** Naimark OB, Nikityuk AS, Nebogatikov VO, Grishko VV. Evaluation of nonlinear dynamics of the cell structure damage as a promising method for personalized cancer diagnostics. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018;46(8):742–7. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-742-747.

Received 31 May 2018; accepted 29 November 2018

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Funding

The work has been performed with financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant No 16-41-590235.

**Oleg B. Naimark** – ScD in Phys.-Math., Professor, Head of Laboratory of Physical Foundation of Strength<sup>1</sup>

✉ 1 Akademika Koroleva ul., Perm, 614013, Russian Federation. Tel.: +7 (919) 496 15 02.  
E-mail: naimark@icmm.ru

**Aleksandr S. Nikityuk** – Junior Research Fellow, Laboratory of Physical Foundation of Strength<sup>1</sup>

**Vladimir O. Nebogatikov** – PhD in Biology, Junior Research Fellow, Laboratory of Biological Active Compounds<sup>2</sup>

**Viktoriya V. Grishko** – PhD in Chemistry, Associate Professor, Head of Laboratory of Biological Active Compounds<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 1 Akademika Koroleva ul., Perm, 614013, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Technical Chemistry of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 3 Akademika Koroleva ul., Perm, 614013, Russian Federation



Оригинальная статья

# Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии

Василенко И.А.<sup>1,2</sup> • Метелин В.Б.<sup>1,2</sup> • Игнатьев П.С.<sup>3</sup> • Кардашова З.З.<sup>2</sup> • Лифенко Р.А.<sup>4</sup>

**Василенко Ирина Анатольевна** – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры прикладной математики и программирования; заведующая научно-исследовательской лабораторией<sup>2</sup>

✉ 117997, г. Москва, ул. Садовническая, 33–1, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 951 54 97.

E-mail: vasilenko0604@gmail.com

**Метелин Владислав Борисович** – канд. биол. наук, доцент кафедры клинической психологии<sup>1</sup>; вед. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>

**Игнатьев Павел Сергеевич** – канд. физ.-мат. наук, главный конструктор<sup>3</sup>

**Кардашова Зивер Заиддин кызы** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>

**Лифенко Роман Александрович** – канд. мед. наук, главный врач<sup>4</sup>

В статье дан обзор современных методов интерференционной микроскопии живых функционирующих клеток, позволяющих на макромолекулярном уровне исследовать динамику субклеточных микроструктур в режиме реального времени с формированием двумерных и трехмерных реконструкций изображения и проведением многопараметрового анализа данных. Показана возможность получения новой диагностической информации в рамках научной методологии так называемого интерактивного диалога с клеткой с целью выявления изменений морфофункционального состояния живых клеток при регистрации их отклика на изменение внешних условий в реальном времени. Описаны физические основы лазерной интерферометрии, проблемы и особенности интерпретации фазовых изображений клеток. В качестве иллюстрации практического использования технологии в условиях клиники представлены собственные результаты исследования морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови у пациентов со злокачественными опухолями ротовой полости и разными стадиями опухолевого процесса. Анализ циркулирующей популяции тромбоцитов с использованием технологии лазерной интерферометрии реального времени позволил выявить наличие компенсированной активации тромбоцитарного звена гемостаза у обследованных больных,

зависимость между тяжестью онкологического заболевания и изменением размерных параметров клеток (увеличение средних значений диаметра и площади циркулирующих тромбоцитов на 23,4, 26,8 и 30,3%, и на 30,2, 32,5 и 38,1% у пациентов со II, III и IV стадиями злокачественных опухолей ротовой полости соответственно;  $p < 0,05$  для всех сравнений). Отмечено, что условием масштабирования новых диагностических технологий служит проведение критической оценки эффективности их практической реализации, выявление преимуществ, недостатков и различий между существующими и предлагаемыми диагностическими платформами.

**Ключевые слова:** трансляционная медицина, диагностика, лазерная интерференционная микроскопия, тромбоциты, морфофункциональное состояние, онкология

**Для цитирования:** Василенко ИА, Метелин ВБ, Игнатьев ПС, Кардашова ЗЗ, Лифенко РА. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):748–57. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.

Поступила 17.12.2018;  
принята к публикации 19.12.2018

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

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

<sup>3</sup> АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова»; 620100, г. Екатеринбург, ул. Восточная, 33Б, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГБУЗ СК «Минераловодская районная больница»; 357202, г. Минеральные Воды, ул. Гагарина, 67А, Российская Федерация

**Т**рансляционная медицина представляет собой новый этап развития медицинской науки, в основе которого лежит междисциплинарная методология эффективного переноса (трансляции) результатов фундаментальных и прикладных исследований в сферу их практического применения. Одним из приоритетных направлений трансляционной

медицины считается разработка, совершенствование, внедрение и масштабирование инновационных диагностических технологий [1, 2]. При этом основные усилия специалистов направлены на создание высокотехнологичных методов, реализующих возможность визуализации, регистрации, мониторинга и многопараметрового анализа полученных данных с привлечением



современных математических алгоритмов восстановления и обработки медицинских изображений. Важную роль в этом процессе играют диагностические оптические системы и аппаратно-программные комплексы на основе интерференционной микроскопии и цифровой голографии, которые по сравнению с традиционными методами обладают ценными преимуществами (неинвазивность, быстродействие, сверхразрешение и др.), существенно расширяющими арсенал их применения в медико-биологических исследованиях [3–5].

Впервые возможности интерференционной микроскопии, основанной на принципах интерференции прямого и дифрагированного света в плоскости изображения, были продемонстрированы Эрнстом Аббе более 100 лет назад. Середина XX в. ознаменовалась созданием и использованием различных форм интерференционной микроскопии для качественной визуализации клеток на основе оптических схем Линника, Миро и Маха – Цандера. Однако из-за ряда технических проблем и активного развития новых методов электронной и флуоресцентной микроскопии применение интерференционной микроскопии оказалось незаслуженно ограниченным. Повторный всплеск интереса к данному методу приходится на начало 2000-х гг. и связан с совершенствованием элементной базы, развитием компьютерных технологий анализа и обработки данных [6–8].

Современные когерентные интерферометры реализуют переход от описательной к количественной морфологии живых функционирующих клеток на макромолекулярном уровне, позволяют исследователю в реальном времени отслеживать изменения субклеточных структур в широком диапазоне внешних воздействий с формированием двумерных и трехмерных реконструкций изображения и проведением многопараметрового анализа полученных данных [9–11]. А возможность представления результатов в количественной форме (квантификация), наглядность, высокая разрешающая способность, чувствительность и точность делают данный тип микроскопии универсальным инструментом для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований.

В одной из основополагающих работ, посвященных динамической лазерной интерферометрии в рамках исследовательской концепции «сигнал – структура – функция», была впервые сформулирована методология так называемого интерактивного диалога с клеткой [12]. Цель

«диалога» – выявление и максимальная объективизация бесконечно малых изменений морфофункционального состояния живых клеток и тканей при исследовании пространственно-временной динамики субклеточных структур путем регистрации в реальном времени их отклика на изменение внешних условий. В результате применения инновационного подхода на междисциплинарной платформе взаимодействия физиков, математиков, биологов и медиков получены новые фундаментальные данные по установлению причинно-следственных связей между внутриклеточными процессами в детерминированных клеточных структурах с учетом тончайших изменений морфологической, метаболической и функциональной компонент их функционирования в условиях адаптационной нормы, дизадаптации и патологии [13–16]. Эти разработки убедительно продемонстрировали, что интерференционная микроскопия представляет собой перспективный метод клеточной диагностики на уровне наноразмерных внутриклеточных структур с сохранением их нативных свойств, который может быть востребован при решении широкого круга биомедицинских проблем, связанных с оптимизацией диагностики и лечения. Наиболее значимые результаты фундаментальных научных исследований в области клеточной биофизики и физиологии, молекулярной биологии и биохимии, полученные с использованием автоматических интерференционных микроскопов нового поколения и являющиеся следствием продуктивного сотрудничества между биологами, врачами, физиками, инженерами, разработчиками программного обеспечения и математиками, послужили основой для создания инновационной биомедицинской диагностической технологии, постепенно внедряемой в клиническую практику и систему здравоохранения. В настоящее время технология лазерной интерферометрии (или компьютерный фазовый имиджинг (QPI)) уже нашла успешное применение в различных областях клинической медицины: онкологии, дерматологии, иммунологии, урологии, неврологии, акушерстве и гинекологии и т.д. [17–21]. В перечне перспективных направлений фундаментального характера – неинвазивные исследования методами сверхвысокого разрешения пространственно-временной динамики отдельных молекул, органелл и клеток, выявление взаимосвязи процессов экспрессии генов, транскрипции, синтеза и транспорта белков, их пространственно-временные характеристики, интерактивная геновая инженерия и др.



## Физические основы лазерной интерферометрии

Основная задача любого вида микроскопии при исследовании клеточных объектов – получение изображения, адекватного исследуемому образцу. Морфологические характеристики различных клеток достаточно хорошо изучены и подробно описаны с указанием широкой вариабельности их размеров и форм. С точки зрения оптики живая клетка представляет собой структурированную, оптически неоднородную анизотропную среду, окруженную достаточно плотной оболочкой, с трехмерным распределением вещества переменной плотности.

Взаимодействие клетки с оптическим излучением оценивают двумя основными физическими величинами – показателями поглощения и преломления, величина которых находится в прямой зависимости от плотности внутриклеточного вещества. Показатель поглощения света характеризует уменьшение его интенсивности за счет взаимодействия с веществом клетки и приводит к изменению (модуляции) амплитуды света. Преломление вызывает снижение скорости распространения излучения в среде относительно скорости света в вакууме и приводит к изменению фазы оптического излучения. Значения этого показателя существенно изменяются внутри клетки в зависимости от наличия субклеточных структур (ядро, ядрышки, органеллы, включения и др.). Еще одна характеристика, имеющая значение для формирования фазового изображения клетки, – когерентность, определяющая взаимную согласованность электромагнитных колебаний (света) во времени и разных точках пространства [15, 22].

Оптическое излучение, которое используется в интерференционной микроскопии в качестве зондирующего, представляет собой электромагнитное поле в диапазоне длин волн от 0,4 мкм (синий свет) до 0,8 мкм (красный свет). К основным его характеристикам, изменяющимся при прохождении через микрообъект, относятся амплитуда  $A(x, y)$  и фаза  $\phi(x, y)$ , которые описывают пространственно-временное распределение поля. До объекта, расположенного в предметной плоскости  $x, y$ , распределение амплитуды и фазы поля считается постоянным ( $A(x, y) = \text{const}$ ,  $\phi(x, y) = \text{const}$ ), после объекта происходит модуляция этих составляющих поля ( $A(x, y) = \text{var}$ ,  $\phi(x, y) = \text{var}$ ). Оптическая система микроскопа представляет собой устройство с двумя оптическими каналами – навигационным (белого света) и измерительным, которые дают возможность

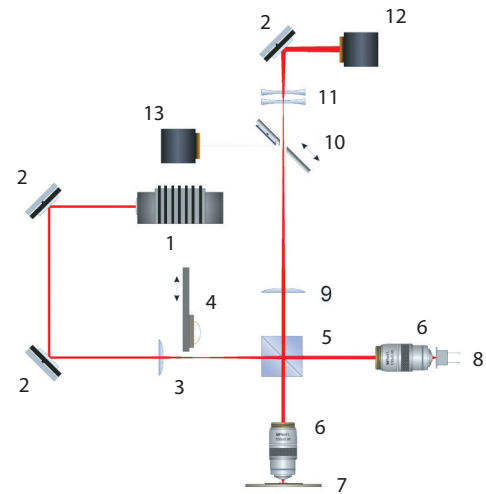


Рис. 1. Оптическая схема лазерного интерференционного микроскопа на основе интерферометра Линника (адаптирована по [23]). 1 – лазер ( $\lambda = 650$  м), 2 – поворотные зеркала, 3 – коллиматор, 4 – светодиод подсветки навигационного канала, 5 – светоделительный кубик, 6 – микрообъектив, 7 – исследуемый объект, 8 – фазовый модулятор, 9 – тубусная линза, 10 – зеркало камеры навигационного канала, 11 – проекционная система, 12 – камера лазерного измерительного канала, 13 – камера навигационного канала. Красными линиями указаны оптические пути навигационного и измерительного каналов

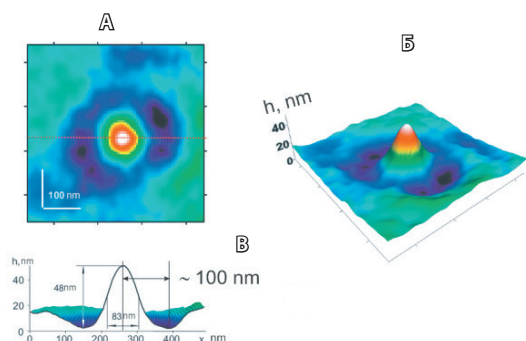
использования прибора в двух различных режимах: навигационном (поиск образца для исследования) и измерительном соответственно (рис. 1).

При интерференционной микроскопии исследователю, регистрируя интерференционный сигнал, проходящий через цитообъект, получает фазовое изображение клетки, которое представляет собой двумерное распределение фазы или оптическую разность хода (ОРХ) интерферирующих лучей. В случае прозрачных объектов, таких как нативная клетка, фазовое изображение может нести информацию не только о ее пространственных характеристиках, но и о распределении оптической плотности внутри цитообъекта.

Регистрация фазовой составляющей оптического излучения реализует важное преимущество интерференционной микроскопии – сверхразрешение. Под этим термином понимается превышение предела разрешающей способности метода, установленного критерием Рэля. Так, разрешающая способность при фазовых измерениях, определяемая дислокациями волнового фронта в областях высокого градиента, может варьировать от 10 (в латеральной плоскости) до 0,1 нм (по вертикали) [12, 24].

На рис. 2 изображена модель клетки в виде локальной неоднородности. Проходящая через





**Рис. 2.** Фазовое изображение модели клетки в псевдоцвете, демонстрирующее возможности сверхразрешения когерентной фазовой микроскопии в нанометровом диапазоне.

**А** – топограмма (фазовое изображение микрообъекта в плоскости сканирования); **Б** – 3D-реконструкция; **Б'** – профиль фазовой толщины клетки вдоль выбранной линии сечения;  $h$  – фазовая толщина

клетку волна когерентного источника испытывает искривление волнового фронта (пространственную модуляцию), которое преобразуется в распределение ОРХ или фазовой толщины. Эта исходная информация в цифровом виде закодирована в топограмме.

Необходимо отметить еще одно достоинство метода интерференционной микроскопии – количественный характер получаемых данных. В отличие от традиционных методов оптической и электронной микроскопии, где изображение представляет собой распределение яркости (интенсивности) излучения в плоскости фотоприемника, фазовый портрет характеризуется распределением нормированной статистически значимой величины – фазовой толщины объекта, не зависящей от внешних факторов и настроек прибора.

Однако не следует забывать об особенности фазово-интерференционных изображений. Как и любые другие функциональные изображения, получаемые фазовые портреты живых функционирующих клеток несколько необычны и непривычны для традиционного восприятия. Для корректной интерпретации интерферограмм необходим некоторый опыт исследователя и определенная априорная информация о цитообъекте.

### Особенности интерпретации фазовых изображений

Несмотря на уникальную возможность количественно измерять прозрачные структуры при

работе с нативными функционирующими клетками, широкое применение интерференционной микроскопии в медицинских и биологических исследованиях несколько ограничено из-за несовершенства алгоритмов извлечения количественной информации о цитообъекте по его фазовому изображению.

Для характеристики клеток традиционно используют комплекс оптико-геометрических параметров, генерирующих ее фазовый портрет: фазовый диаметр, периметр, толщина (высота), объем, фазовая площадь поверхности; отношение фазовой площади к объему и сухой массе; отношение проекции площади к объему; фазовые статистические параметры (дисперсия фазы и фазовый эксцесс); эксцентриситет (степень отклонения от окружности). Кроме того, значения оптической толщины, полученные методом интерференционной микроскопии, дают возможность рассчитать концентрацию вещества, причем не только всей клетки, но и отдельных органелл, а также реальную физическую толщину анализируемого объекта [25].

Почти всегда требуется несколько этапов для преобразования исходных данных в необходимый исследователю формат. Пакет оригинальных программ интерференционной микроскопии позволяет получать топограммы, 3D-фазовые изображения объектов и их фрагментов, проводить редактирование файлов, инверсию, вычитание кадров, картирование флуктуаций и другие операции. Некоторые лаборатории для обработки, просмотра и анализа полученных результатов используют комбинацию коммерческих, открытых и пользовательских программных продуктов.

В перспективе необходимы определенные организационные усилия для обеспечения стандартизации процедур обработки и анализа интерферограмм, полученных в отдельных лабораториях, создания унифицированных аналитических инструментов доступа к данным различных форматов и обеспечения их функциональной совместимости. Например, уже сейчас активно используются стандартные биоформаты для открытия, просмотра, поиска, аннотирования и загрузки файлов фазовых изображений в хранилищах данных микроскопии, представленных мировым научным сообществом [26, 27]. Благодаря этому становится возможным проведение совместной работы в научных международных проектах на основе исследовательских технологий и стабильных инструментов анализа полученных данных.

## Неинвазивная диагностика нарушений тромбоцитарного гемостаза у онкологических больных с использованием технологии лазерной интерферометрии

В качестве иллюстрации практического использования технологии лазерной интерферометрии в условиях клиники приводим результаты исследования морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови у онкологических больных.

К настоящему времени уже накоплено достаточное количество убедительных данных о том, что свертывающая система крови оказывает существенное влияние на рост опухолей, скорость формирования их стромы и диссеминацию опухолевых клеток [28]. В этой связи исследование способности тромбоцитов к активации, выявление их структурных и функциональных нарушений представляется актуальным для адекватной оценки тяжести состояния пациента. Понимание механизмов, лежащих в основе этих изменений, расширяет возможности профилактики и коррекции нарушений в системе гемостаза, которые не только отягощают течение онкологического заболевания, но и нередко определяют его исход.

### Материал и методы

Нами однократно обследованы 30 пациентов со злокачественными опухолями ротовой полости (ЗОРП) (средний возраст  $60,1 \pm 11,9$  года), проходивших лечение в отделении радиологии ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского в течение 2015–2017 гг. Формирование клинических

групп по стадиям опухолевого процесса проводили согласно международной классификации «TNM, Классификация злокачественных опухолей» (шестое издание, перевод и редакция проф. Н.Н. Блинова, 2003). У 11 пациентов диагностировали II стадию онкологического заболевания, у 12 – III стадию, у 7 – IV стадию. Контрольную группу составили 30 практически здоровых человек (средний возраст  $52,3 \pm 9,7$  года). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского (заседание № 3 от 19 марта 2015 г.).

Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, цельную кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Взвесью клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имеет зеркальное напыление. После 3–5-минутного интервала, необходимого для оседания клеток, проводили сканирование изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки составлял 50–100 клеток. Время измерения одного интерференционного поля размером  $20 \times 20$  мкм ( $m = n = 128$  пикселей), соответствующего изображению одной клетки, – 14 секунд. Результат обратного преобразования цифрового массива в видимое изображение и восстановление фазового портрета объекта отображались на мониторе компьютера. Результаты расчетов выводили на дисплей в виде таблицы параметров каждого объекта и серии графиков.

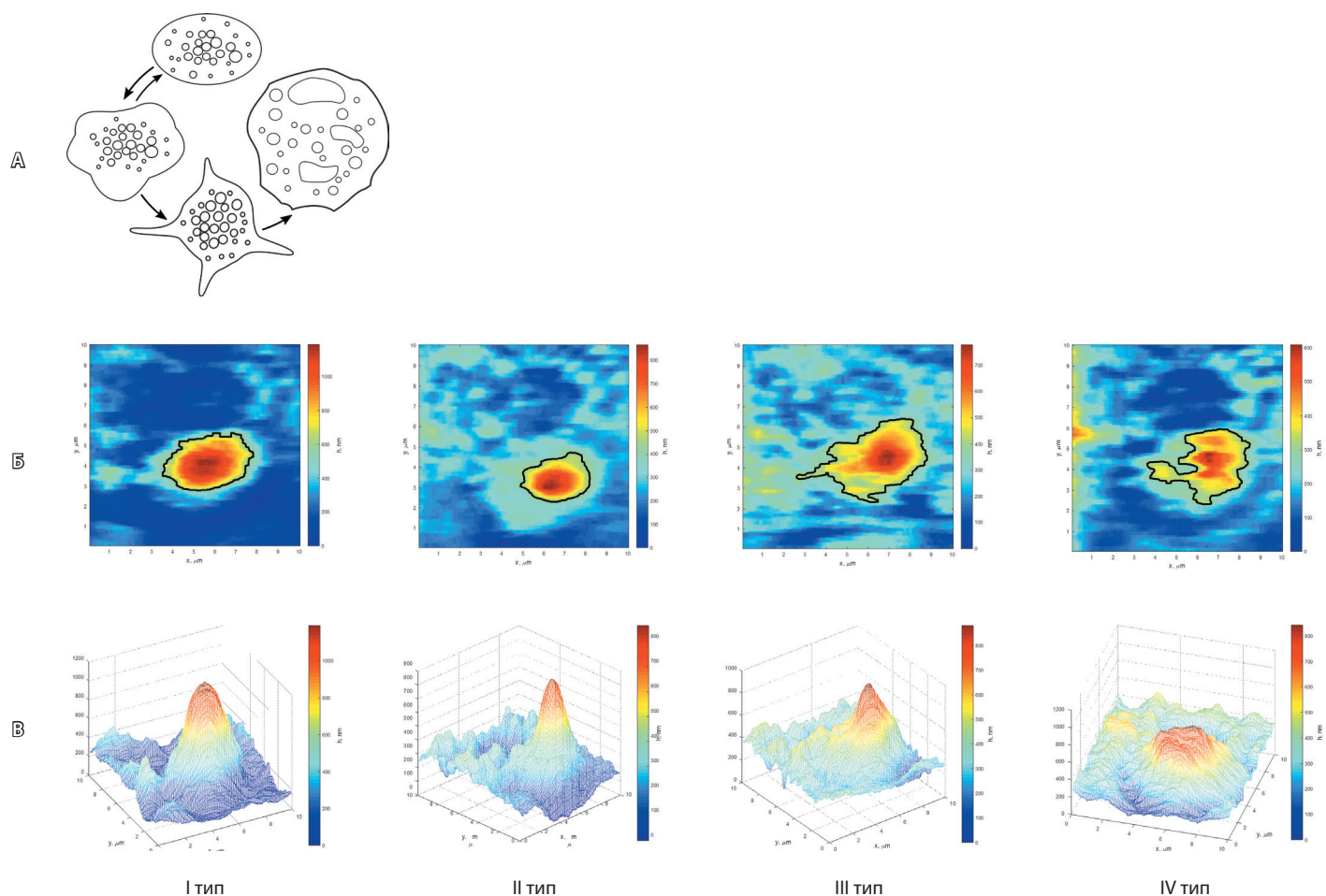
Статистический анализ проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и прикладных программ SPSS Statistics 21.0. Стандартная обработка

Состояние тромбоцитарного гемостаза у здоровых добровольцев и пациентов со злокачественными новообразованиями ротовой полости ( $M \pm \sigma$ )

Показатель	Здоровые добровольцы	Больные со злокачественными опухолями ротовой полости		
		II стадия	III стадия	IV стадия
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	$268,5 \pm 27,3$	$246,3 \pm 31,8$	$284,3 \pm 33,5$	$329,5 \pm 37,4$
Функциональные типы, %				
I	$62,9 \pm 4,9$	$21,7 \pm 1,9^*$	$32,7 \pm 3,1^*$	$28,4 \pm 2,2^*$
II	$21,2 \pm 2,3$	$48,8 \pm 3,1^*$	$39,9 \pm 2,5^*$	$44,5 \pm 3,5^*$
III	$11,9 \pm 1,2$	$25,8 \pm 2,2^*$	$25,1 \pm 1,7^*$	$25,6 \pm 1,9^*$
IV	$4 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1^*$
Морфометрические параметры				
D, мкм	$2,61 \pm 0,82$	$3,22 \pm 0,74^*$	$3,31 \pm 0,84^*$	$3,4 \pm 0,79^*$
P, мкм	$8,25 \pm 3,41$	$9,7 \pm 2,81$	$10,01 \pm 3,25^*$	$10,28 \pm 2,63^*$
H, мкм	$1,23 \pm 0,51$	$1,25 \pm 0,41$	$1,29 \pm 0,35$	$1,28 \pm 0,52$
A, мкм <sup>2</sup>	$4,67 \pm 2,12$	$6,08 \pm 6,29^*$	$6,19 \pm 3,36^*$	$6,45 \pm 3,01^*$
V, мкм <sup>3</sup>	$1,81 \pm 1,33$	$2,96 \pm 4,62^*$	$3,1 \pm 1,92^*$	$3,03 \pm 1,83^*$

D – диаметр, P – периметр, H – высота, A – площадь, V – объем

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями контроля (здоровые добровольцы)



**Рис. 3.** Морфологические типы живых тромбоцитов периферической крови, идентифицированные методом лазерной интерферометрии. **А** – схема активации тромбоцитов; **Б** – топограммы живых тромбоцитов в псевдочетве; **В** – 3D-реконструкция фазово-интерференционного портрета тромбоцитов. I тип – тромбоцит «покоя», II тип – тромбоцит с низким уровнем активности, III тип – высоко активированный тромбоцит, IV тип – дегенеративно измененный тромбоцит. Справа у рисунков Б и В представлена шкала соответствия цветового градиента фазовой высоте цитообъекта

выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, а также величины дисперсии и стандартного отклонения. Сравнение показателей 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 при условии совпадения дисперсий. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Полученная нами ранее библиотека фазово-интерференционных образов клеток и данные современной литературы позволили выделить и идентифицировать 4 основных морфологических типа

живых тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации (рис. 3). Основой для дискриминации структурно измененных клеток служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина [15, 29, 30].

Мы не обнаружили статистически значимых различий в количественных показателях тромбоцитов между группами пациентов. Можно говорить только о тенденции к увеличению числа тромбоцитов у больных с ЗОРП III и IV стадии (таблица).

При анализе морфологической структуры циркулирующей популяции установлено, что в норме 63% тромбоцитов представлены клетками «покоя», 21% – тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество высоко

активированных клеток с длинными отростками-«антеннами» составляет 12% (III тип), а дегенеративно измененных (IV тип) – всего 4%.

У обследованных больных со злокачественными опухолями ротовой полости во всех группах сравнения зарегистрировано резкое снижение форм покоя (дискоцитов) в циркулирующей популяции тромбоцитов: 21,7, 32,7 и 28,4% при II, III и IV стадиях заболевания соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений). Практически в 2 раза возрастает число активированных тромбоцитов: клетки с низким уровнем активности – 48,8, 39,9 и 28,4% соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений); высоко активированные тромбоциты – 25,8, 25,1 и 25,6% соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений). При этом, однако, не прослеживается зависимости данных изменений с тяжестью заболевания. В то же время процент дегенеративных форм с увеличением стадии патологического процесса статистически значимо снижается при ЗОРП IV степени до 1,5% ( $p < 0,05$ ). Следовательно, функциональное состояние тромбоцитарного звена гемостаза у обследованных пациентов можно характеризовать как компенсированную активацию.

При сравнении морфометрических параметров тромбоцитов группы контроля и больных ЗОРП было установлено, что средние в циркулирующей популяции размерные показатели клеток статистически значимо превышали нормативные значения. Обращало внимание увеличение средних значений диаметра циркулирующих тромбоцитов на 23,4, 26,8 и 30,3% ( $p < 0,05$  для всех сравнений) и площади – на 30,2, 32,5 и 38,1% ( $p < 0,05$  для всех сравнений) у пациентов со II, III и IV стадиями ЗОРП соответственно.

Анализируя морфометрические параметры тромбоцитов, важно отметить, что по величине диаметра, периметра и площади можно не только судить о возрастном составе клеточной популяции (молодые клетки обладают большими размерными показателями по сравнению со зрелыми и старыми тромбоцитами), но и косвенно оценить их активационный статус (распластывание, сферолизацию, появление отростков). Кроме того, величина фазовой высоты и объема позволяет охарактеризовать полноценность гранулярного аппарата: реакция выброса активированного тромбоцита отражается на снижении фазовой высоты клетки.

Выполнение тромбоцитами своей важнейшей роли – поддержания физиологического гемостаза – осуществляется благодаря характерным для них 4 функциям: адгезии, агрегации, реакции

освобождения и ретракции. Активация тромбоцитов приводит к изменению их формы из дисков, покоящихся клеток в циркулирующей крови, в сферы – активированные клетки с повышенной способностью к адгезии, агрегации и секреции биологически активных соединений, непосредственно участвующих или влияющих на гемостаз. Активируясь, тромбоциты быстро адгезируют, агрегируют и формируют тромбоцитарный тромб, а также способствуют запуску каскада свертывания [31].

Полученные нами результаты продемонстрировали определенную зависимость между тяжестью онкологического заболевания и изменением морфофункционального статуса тромбоцитов периферической крови: увеличением размерных параметров, повышением активационного статуса.

Данные современной литературы позволяют говорить об активации системы гемостаза с угрозой хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у онкологических больных [32]. При этом состояние гиперкоагуляции может быть обусловлено как развитием самой опухоли, так и повышением уровня тканевого фактора (TF), раковых прокоагулянтов, активирующих факторы VII и X, и дисбалансом в системе цитокинов. Кроме того, немаловажным усугубляющим фактором выступает локальный стаз, который может быть связан с несколькими причинами: длительной иммобилизацией пациентов вследствие распространенности и тяжести неопластического процесса, непосредственного прорастания опухоли в сосудистую стенку или проведения оперативного вмешательства [32, 33].

Очевидно, что патогенетические механизмы, обуславливающие развитие тромботических осложнений, основаны на взаимодействии опухоли, больного и системы гемостаза. При этом уровень активации тромбоцитарного компонента соответствует тяжести онкологического заболевания. Для профилактики и своевременной диагностики тромботических осложнений у онкологических пациентов необходимо учитывать изменения количества тромбоцитов, морфологические особенности и степень активности тромбоцитарного звена гемостаза. Интерференционная микроскопия в рамках одного метода предоставляет возможность оперативно оценить индивидуальные изменения размерных показателей и уровня функциональной полноценности циркулирующих тромбоцитов, проанализировать структуру популяционного состава клеточного





звена гемостаза с достаточной степенью объективности и информативности. Использование метода в клинике может способствовать улучшению диагностики, оценки тяжести заболевания и своевременному назначению адекватной терапии.

## Заключение

Темпы развития технологий визуализации живых функционирующих клеток в режиме реального времени открывают новые возможности для проведения фундаментальных научных исследований и повышения эффективности диагностического процесса в практическом здравоохранении. В основе эффективного анализа должны быть только количественные параметры для объективной оценки морфологических, метаболических и функциональных особенностей клеток и различных субклеточных структур, позволяющие отразить динамику процесса во времени. При этом важными условиями, отвечающими современным требованиям к диагностическому оборудованию, являются широкая универсальность, обеспечение неинвазивного подхода, высокая разрешающая способность, точность, чувствительность и информативность.

Интерференционная микроскопия позволяет получать новую информацию о внутренней структуре различных объектов и биологических систем без специальной подготовки проб и использования контрастирующих или флуоресцентных зондов, изучать биологические объекты на уровне наноразмерных внутриклеточных структур с сохранением их нативных свойств, что делает возможным поиск новых информативных биомаркеров для ранней диагностики заболеваний и оценки эффективности проводимого лечения.

Вместе с тем необходимо критично оценивать эффективность практической реализации новых технологий, выявлять их преимущества и недостатки, различия между существующими и предлагаемыми диагностическими платформами. Именно в этой плоскости лежат задачи трансляционной медицины, призванной обеспечить дальнейшее масштабирование научных исследований и прогрессивных медицинских технологий, привлечение финансовой поддержки от государства и частных инвесторов, пересмотр и разработку правовых и этических норм для ускорения внедрения достижений фундаментальной науки в клиническую практику. ©

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

## Литература

1. Шляхто ЕВ, Конради АО, Галагудза ММ. Трансляционная медицина: вчера, сегодня, завтра. Вестник Росздравнадзора. 2016;(1):47–51.
2. Wafi A, Mirnezami R. Translational-omics: Future potential and current challenges in precision medicine. *Methods*. 2018;151:3–11. doi: 10.1016/j.jymeth.2018.05.009.
3. Park Y, Choi W, Yaqoob Z, Dasari R, Badizadegan K, Feld MS. Speckle-field digital holographic microscopy. *Opt Express*. 2009;17(15):12285–92. doi: 10.1364/OE.17.012285.
4. Черная ВВ, Боровицкий ВН. Сравнительный анализ современных голографических и интерференционных микроскопов. Виміррювальна та обчислювальна техніка в технологічних процесах. 2010;(2):36–43.
5. Вишняков ГН, Левин ГГ, Минаев ВЛ, Цельмина ИЮ. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Экспериментальные исследования. Оптика и спектроскопия. 2014;116(1):170–5. doi: 10.7868/S003040341401022X.
6. Тычинский ВП. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов. Успехи физических наук. 2001;171(6):649–62. doi: 10.3367/UFNr.0171.200106e.0649.
7. Garini Y, Vermolen BJ, Young IT. From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(1):3–12. doi: 10.1016/j.copbio.2005.01.003.
8. Shaked NT, Zhu Y, Rinehart MT, Wax A. Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells. *Opt Express*. 2009;17(18):15585–91. doi: 10.1364/OE.17.015585.
9. Tychinsky VP, Tikhonov AN. Interference microscopy in cell biophysics. 1. Principles and methodological aspects of coherent phase microscopy. *Cell Biochem Biophys*. 2010;58(3):107–16. doi: 10.1007/s12013-010-9114-z.
10. Anna T, Srivastava V, Mehta DS, Shakher C. High-resolution full-field optical coherence microscopy using a Mirau interferometer for the quantitative imaging of biological cells. *Appl Opt*. 2011;50(34):6343–51. doi: 10.1364/AO.50.006343.
11. Swedlow JR. Innovation in biological microscopy: current status and future directions. *Bioessays*. 2012;34(5):333–40. doi: 10.1002/bies.201100168.
12. Тычинский ВП. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? Успехи физических наук. 2007;177(5):535–52. doi: 10.3367/UFNr.0177.200705c.0535.
13. Казакова ТА, Новиков СМ, Левин ГГ, Максимов ГВ. Исследование состояния цитоплазмы нейрона методом динамической фазовой микроскопии. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2014;(4):25–31.
14. Вышенская ТВ, Болотова АА, Василенко ИА, Звержховский ВД, Болдырев ДВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Метод определения цитотоксического потенциала по фазовым изображениям CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. *Биофизика*. 2016;61(3):523–7.
15. Jiang W, Yin Z. Seeing the invisible in differential interference contrast microscopy images. *Med Image Anal*. 2016;34:65–81. doi: 10.1016/j.media.2016.04.010.
16. Cherkezyan L, Zhang D, Subramanian H, Capoglu I, Taflove A, Backman V. Review of interferometric spectroscopy of scattered light for the quantification of subdiffractional structure of biomaterials. *J Biomed Opt*. 2017;22(3):30901. doi: 10.1117/1.JBO.22.3.030901.
17. Власова ЕА, Василенко ИА, Суслов ВП, Пашкин ИН. Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран. *Урология*. 2011;(2):36–41.
18. Лысенко МА, Метелин ВБ, Баранова НВ. Опыт применения инновационных клеточ-





- ных технологий в диагностике эндометри-  
оидных кист яичников. Медицинский вест-  
ник Северного Кавказа. 2012;2(26):33–6.
19. Золотовская ИА, Давыдкин ИЛ, Лимаре-  
ва ЛВ, Сустретов АС. Взаимосвязь эндоте-  
лиальной дисфункции и параметров окси-  
генации мембран эритроцитов у пациентов  
с фибрилляцией предсердий, перенесших  
кардиоэмболический инсульт. Успехи ге-  
ронтологии. 2018;31(3):379–86.
20. Gjørloff-Wingren A. Quantitative phase-con-  
trast imaging-A potential tool for future cancer  
diagnostics. *Cytometry A*. 2017;91(8):752–3.  
doi: 10.1002/cyto.a.23104.
21. Bettenworth D, Bokemeyer A, Poremba C,  
Ding NS, Ketelhut S, Lenz P, Kemper B. Quan-  
titative phase microscopy for evaluation of  
intestinal inflammation and wound healing  
utilizing label-free biophysical markers. *Histol  
Histopathol*. 2018;33(5):417–32. doi: 10.14670/  
HH-11-937.
22. Левин ГГ, Золотаревский СЮ. Количествен-  
ная фазовая микроскопия на основе прин-  
ципов интерференционной рефрактоме-  
трии. *Метрология*. 2008;(3):15–21.
23. Игнатъев ПС, Индукаев КВ, Лопарев АВ, Оси-  
пов ПА. Исследование оптических свойств  
наноструктур методом модуляционной ин-  
терференционной микроскопии. *Оптичес-  
кий журнал*. 2011;78(1):26–31.
24. Булыгин ФВ, Золотаревский СЮ, Кононо-  
гов СА, Илюшин ЯА, Левин ГГ, Лясковский Л.  
Анализ методов сверхразрешения в опти-  
ческой интерференционной микроскопии.  
*Метрология*. 2013;(8):22–30.
25. Болотова АА, Звержовский ВД, Вышен-  
ская ТВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Ин-  
формативность фазовых изображений  
биологических клеток. В: Булатов МФ, ред.  
*Информатика и технологии. Инновацион-  
ные технологии в промышленности и ин-  
форматике («МНТК ФТИ-2017»)*. Сборник  
научных трудов. Вып. 23. М.: МИРЭА; 2017.  
с. 616–9.
26. Kvilekval K, Fedorov D, Obara B, Singh A, Man-  
junath BS. Bisque: a platform for bioimage  
analysis and management. *Bioinformatics*.  
2010;26(4):544–52. doi: 10.1093/bioinformat-  
ics/btp699.
27. Hiner MC, Rueden CT, Eliceiri KW. SCIFIO: an  
extensible framework to support scientific im-  
age formats. *BMC Bioinformatics*. 2016;17(1):  
521. doi: 10.1186/s12859-016-1383-0.
28. Contursi A, Grande R, Dovizio M, Bruno A,  
Fullone R, Patrignani P. Platelets in cancer  
development and diagnosis. *Biochem Soc  
Trans*. 2018;46(6):1517–27. doi: 10.1042/  
BST20180159.
29. Василенко ИА, Гаспарян СА, Антонова ИШ,  
Савушкин АВ, Бабакова СВ. Динамика пока-  
зателей тромбоцитарного звена гемостаза  
при физиологическом течении беременно-  
сти. Вопросы гинекологии, акушерства и пе-  
ринатологии. 2006;5(4):5–12.
30. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM.  
Platelet-based coagulation: different popula-  
tions, different functions. *J Thromb Haemost*.  
2013;11(1):2–16. doi: 10.1111/jth.12045.
31. Osman A, Hitzler WE, Provost P. The platelets'  
perspective to pathogen reduction tech-  
nologies. *Platelets*. 2018;29(2):140–7. doi:  
10.1080/09537104.2017.1293806.
32. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory  
role of platelets in cancer. *Platelets*. 2018;29(6):  
569–73. doi: 10.1080/09537104.2018.1453059.
33. Сомонова ОВ, Маджуга АВ, Елизарова АЛ.  
Тромбозы и тромбоэмболии в онкологии.  
Современный взгляд на проблему. Злока-  
чественные опухоли. 2014;(3):172–6. doi:  
10.18027/2224-5057-2014-3-172-176.
15. Jiang W, Yin Z. Seeing the invisible in differ-  
ential interference contrast microscopy im-  
ages. *Med Image Anal*. 2016;34:65–81. doi:  
10.1016/j.media.2016.04.010.
16. Cherkezyan L, Zhang D, Subramanian H, Capo-  
glu I, Taflove A, Backman V. Review of interfer-  
ometric spectroscopy of scattered light for the  
quantification of subdiffractional structure of  
biomaterials. *J Biomed Opt*. 2017;22(3):30901.  
doi: 10.1117/1.JBO.22.3.030901.
17. Vlasova EA, Vasilenko IA, Suslov VP, Pashkin IN.  
Dynamics of morphometric parameters of pe-  
ripheral blood platelets as a criterion in assess-  
ing thrombogenicity of dialysis membranes.  
*Urologiia*. 2011;(2):36–41. Russian.
18. Lysenko MA, Metelyn VB, Baranova NV. New  
cellular technologies in diagnostics of endo-  
metrioid ovarian cysts. *Medical News of the  
North Caucasus*. 2012;2(26):33–6. Russian.
19. Zolotovskaia AI, Davydkin IL, Lymareva LV, Sus-  
tretov AS. Interrelation of endothelial dysfunc-  
tion and parameters of erythrocyte membrane  
oxygenation in patients with atrial fibrillation,  
after cardioembolic stroke. *Advances in Geron-  
tology*. 2018;31(3):379–86. Russian.
20. Gjørloff-Wingren A. Quantitative phase-con-  
trast imaging-A potential tool for future cancer  
diagnostics. *Cytometry A*. 2017;91(8):752–3.  
doi: 10.1002/cyto.a.23104.
21. Bettenworth D, Bokemeyer A, Poremba C,  
Ding NS, Ketelhut S, Lenz P, Kemper B. Quan-  
titative phase microscopy for evaluation of  
intestinal inflammation and wound healing  
of live cells. *Opt Express*. 2009;17(18):15585–  
91. doi: 10.1364/OE.17.015585.
9. Tychinsky VP, Tikhonov AN. Interference mi-  
croscopy in cell biophysics. 1. Principles and  
methodological aspects of coherent phase  
microscopy. *Cell Biochem Biophys*. 2010;58(3):  
107–16. doi: 10.1007/s12013-010-9114-z.
10. Anna T, Srivastava V, Mehta DS, Shakher C.  
High-resolution full-field optical coherence  
microscopy using a Mirau interferometer for  
the quantitative imaging of biological cells.  
*Appl Opt*. 2011;50(34):6343–51. doi: 10.1364/  
AO.50.006343.
11. Swedlow JR. Innovation in biological micro-  
scopy: current status and future directions.  
*Bioessays*. 2012;34(5):333–40. doi: 10.1002/  
bies.201100168.
12. Tychinskii VP. Dynamic phase microscopy: is  
a “dialogue” with the cell possible? *Phys Usp*.  
2007;50(5):513–28. doi: 10.1070/PU2007v-  
050n05ABEH006222.
13. Kazakova TA, Novikov SM, Levin GG, Maksi-  
mov GV. Using the dynamic phase micro-  
scopy for neuron cytoplasm studies. *Vestnik  
Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologi-  
ya*. 2014;(4):25–31. Russian.
14. Vyshenskaya TV, Bolotova AA, Vasilenko IA,  
Zverzhovskiy VD, Boldyrev DV, Kretushev AV,  
Evdokimov AA. A technique for the assessment  
of the cytotoxic capacity of CD8<sup>+</sup> lymphocytes  
based on phase images. *Biophysics*. 2016;61(3):  
440–4. doi: 10.1134/S0006350916030222.



utilizing label-free biophysical markers. *Histol Histopathol.* 2018;33(5):417–32. doi: 10.14670/HH-11-937.

22. Levin GG, Zolotarevskiy SYu. Quantitative phase microscopy based on interferential refractometry principles. *Metrologiya.* 2008;(3): 15–21. Russian.

23. Ignat'ev PS, Loparev AV, Indukaev KV, Osipov PA. Investigating the optical properties of nanostructures by modulation interference microscopy. *Journal of Optical Technology.* 2011;78(1):19–24. doi: 10.1364/JOT.78.000019.

24. Bulygin FV, Zolotarevskiy SYu, Kononogov SA, Ilyushin YaA, Levin GG, Lyaskovsky L. Analysis of superresolution methods in optical interference microscopy. *Metrologiya.* 2013;(8):22–30. Russian.

25. Bolotova AA, Zverzhkhovskiy VD, Vyshenskaya TV, Kretushev AV, Evdokimov AA. Informative phase images of biological cells. In: Bula-

tov MF, editor. *Informatics and technologies. Innovative technologies in industry and informatics ("MNTK PTI-2017").* Collection of scientific papers. Issue 23. Moscow: MIREA; 2017. p. 616–9. Russian.

26. Kvilekval K, Fedorov D, Obara B, Singh A, Manjunath BS. Bisque: a platform for bioimage analysis and management. *Bioinformatics.* 2010;26(4):544–52. doi: 10.1093/bioinformatics/btp699.

27. Hiner MC, Rueden CT, Eliceiri KW. SCIFIO: an extensible framework to support scientific image formats. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(1): 521. doi: 10.1186/s12859-016-1383-0.

28. Contursi A, Grande R, Dovizio M, Bruno A, Fullone R, Patrignani P. Platelets in cancer development and diagnosis. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(6):1517–27. doi: 10.1042/BST20180159.

29. Vasilenko IA, Gasparyan SA, Antonova ISh, Savushkin AV, Babakova SV. Dynamics of platelet

hemostasis during the physiological course of pregnancy. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2006;5(4):5–12. Russian.

30. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):2–16. doi: 10.1111/jth.12045.

31. Osman A, Hitzler WE, Provost P. The platelets' perspective to pathogen reduction technologies. *Platelets.* 2018;29(2):140–7. doi: 10.1080/09537104.2017.1293806.

32. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets.* 2018;29(6): 569–73. doi: 10.1080/09537104.2018.1453059.

33. Somonova OV, Madzhuga AV, Elizarova AL. Thromboembolism in oncology. Modern view on the problem. *Malignant Tumours.* 2014;(3): 172–6. Russian. doi: 10.18027/2224-5057-2014-3-172-176.

## A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry

I.A. Vasilenko<sup>1,2</sup> • V.B. Metelin<sup>1,2</sup> • P.S. Ignat'ev<sup>3</sup> • Z.Z. Kardashova<sup>2</sup> • R.A. Lifenko<sup>4</sup>

The paper presents a review of current techniques of the interference microscopy of living functioning cells that allow for assessment of the real-time changes of subcellular microstructures with 2D and 3D reconstructions of the images and multifactorial data analysis. It has been shown that new diagnostic information can be obtained within the research methodology of the so-called interactive dialogue with the cell to identify changes in the morphofunctional state of living cells through registration of their real-time response to environmental fluctuations. We describe physical basis of laser interferometry, problems and specifics of interpretation of cell phase pictures. As an illustration to the practical use of the technique in the clinic we present the results of studies on morphofunctional state of peripheral blood platelets in patients with oral malignancies (OM) and various stages of the tumor. Analysis of circulating platelets with a real-time technique of laser interferometry allowed for identification of compensated activation of the platelet compartment of hemostasis in these patients, as well as an association between the severity of cancer and changes of dimensional

cell parameters (an increase of the mean diameter and area of circulating platelets by 23.4, 26.8 and 30.3%, and by 30.2, 32.5 and 38.1% in the patients with OM grades II, III and IV, respectively ( $p < 0,05$  for all comparisons)). The necessary condition for a wider implementation of new diagnostic technologies is a critical evaluation of the efficacy of their use in routine practice, identification of their advantages, disadvantages and differences between current and proposed diagnostic platforms.

**Key words:** translational medicine, diagnostics, laser interference microscopy, platelets, morphofunctional state, oncology

**For citation:** Vasilenko IA, Metelin VB, Ignat'ev PS, Kardashova ZZ, Lifenko RA. A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018;46(8):748–57. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.

Received 17 December 2018;  
accepted 19 December 2018

**Irina A. Vasilenko** – MD, PhD, Professor, Department of Applied Mathematics and Programming<sup>1</sup>; Head of Research Laboratory<sup>2</sup>

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

**Vladislav B. Metelin** – PhD in Biology, Associate Professor, Chair of Clinical Psychology<sup>1</sup>; Leading Research Fellow, Research Laboratory<sup>2</sup>

**Pavel S. Ignat'ev** – PhD in Physics and Mathematics, Chief Designer<sup>3</sup>

**Ziver Z. Kardashova** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Research Laboratory<sup>2</sup>

**Roman A. Lifenko** – MD, PhD, Chief Physician<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>JSC "Production Association "Ural Optical and Mechanical Plant named after Mr. E.S. Yalamov" (UOMZ); 33B Vostochnaya ul., Ekaterinburg, 620100, Russian Federation

<sup>4</sup>Mineralnye Vody District Hospital; 67A Gagarina ul., Mineralnye Vody, 357202, Russian Federation

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.



Оригинальная статья

# Возможности и перспективы применения диагностической технологии QPI (количественный фазовый имиджинг) в акушерстве и гинекологии

Лифенко Р.А.<sup>1</sup> • Попова О.С.<sup>2</sup> • Топузов А.Г.<sup>3</sup> • Звержховский В.Д.<sup>4</sup>

**Актуальность.** Важная роль иммунологических факторов в патогенезе эндометриоза позволяет рассматривать их в качестве диагностических и прогностических маркеров заболевания. Перспективный подход в диагностике иммунологических нарушений – неинвазивная клеточная диагностическая технология количественного фазового имиджинга (quantitative phase imaging – QPI), в основе которой лежат принципы лазерной интерферометрии и голографии. **Цель** – оценить возможности QPI для выявления диагностических критериев уровня нарушений в клеточном звене иммунной системы у пациенток с наружным эндометриозом. **Материал и методы.** Проведена количественная оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов периферической крови 22 пациенток с эндометриоидными кистами яичников (средний возраст  $27,1 \pm 3,4$  года), 20 больных лейомиомой матки (средний возраст  $29,3 \pm 4,1$  года) и 20 практически здоровых небеременных женщин фертильного возраста (средний возраст  $28,7 \pm 3,6$  года) с использованием неинвазивной технологии количественного фазового имиджинга, реализованной на основе модуля

фазово-интерференционной микроскопии отечественного аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Весттрейд», Россия). **Результаты.** Изучены фазово-интерференционные портреты нативных лимфоцитов, выявлены морфологические и денситометрические особенности, характерные для клеток с фенотипом  $CD4^+$  и  $CD8^+$ . В популяции цитотоксических лимфоцитов выделены 2 группы клеток, различающихся величинами фазовой толщины  $N_{\text{cvt}}$  и площади  $S_{\text{cvt}}$  примембранной области цитоплазмы, содержащей гранулы перфорины. Установлено, что в условиях физиологической нормы содержание перфорин-позитивных  $CD8^+$  лимфоцитов, реализующих цитотоксический (перфориновый) потенциал, составляет  $37,1 \pm 5,15\%$ , у пациенток с эндометриозом –  $29,8 \pm 6,34\%$ , а с лейомиомой матки –  $42,6 \pm 5,89\%$ . **Обсуждение.** Оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов посредством количественного определения клеток, содержащих перфориновые гранулы, может служить важным диагностическим и прогностическим критерием течения заболевания. **Заключение.** Исследование внутриклеточных структур

лимфоцитов с использованием неинвазивной и безреагентной технологии QPI позволяет не только детально изучать патогенетические механизмы трансформации иммунокомпетентных клеток в условиях развития патологического процесса, но и в перспективе предложить новые подходы к функциональной диагностике состояния иммунной системы на основе полученных результатов.

**Ключевые слова:** фазово-интерференционная микроскопия, эндометриоидные кисты яичников, лимфоциты, цитотоксический потенциал, перфориновые гранулы

**Для цитирования:** Лифенко РА, Попова ОС, Топузов АГ, Звержховский ВД. Возможности и перспективы применения диагностической технологии QPI (количественный фазовый имиджинг) в акушерстве и гинекологии. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):758–64. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-758-764.

Поступила 02.05.2018;  
принята к публикации 26.11.2018

Эффективная организация акушерско-гинекологической помощи населению непосредственным образом зависит не только от уровня квалификации специалистов, применения современных программ скрининга и рациональных схем лечения, но и от внедрения инновационных лечебно-диагностических технологий, которые позволяют оптимизировать процесс обследования пациентов, устранить возможные диагностические ошибки, снизить показатели гинекологической заболеваемости.

К одному из распространенных в мире гинекологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста относят эндометриоз. При этом, по мнению специалистов, наиболее часто

встречающимися формами заболевания вне зависимости от возраста, этнической принадлежности и социально-экономических условий считаются эндометриоидные поражения тела матки и яичников [1, 2]. Современная концепция патогенеза эндометриоза представляет его как генетически детерминированное хроническое дисгормональное и иммунозависимое заболевание с признаками автономного роста гетеротипий и нарушением функциональности клеток эндометрия [3–5].

Несмотря на активно проводимые междисциплинарные исследования, молекулярные механизмы прогрессирования эндометриоза остаются не ясными. Однако наличие местных и системных нарушений в иммунном ответе пациенток



является установленным. В работах отечественных и зарубежных авторов сообщается об изменении функциональной полноценности клеточных элементов иммунитета (макрофагов, моноцитов, лимфоцитов), увеличении секреции и синтеза провоспалительных медиаторов, факторов роста, наличии низкого уровня апоптоза и повышенной пролиферативной активности клеток [6–9]. Важная роль иммунологических факторов в патогенезе эндометриоза позволяет рассматривать их в качестве диагностических и прогностических маркеров заболевания. С этой целью предлагаются различные показатели, диагностические методы, новые алгоритмы обследования пациенток. Внедрение в практическое здравоохранение современных компьютерных технологий позволяет осуществлять диагностику патологического процесса на клеточном и субклеточном уровнях. Перспективным подходом в диагностике целого ряда заболеваний видится неинвазивная клеточная диагностическая технология количественного фазового имиджинга (quantitative phase imaging – QPI), в основе которой лежат принципы лазерной интерферометрии и голографии. Технология QPI в течение последних лет уже активно используется в практическом здравоохранении для исследования тромбоцитарного гемостаза при неразвивающейся беременности [10, 11], мониторингования морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток при эндометриозе [12–14] и др. Разработка новых технических решений, создание современных алгоритмов определения фазы и анализа изображений открывают новые перспективы применения технологии QPI в акушерско-гинекологической практике.

Цель настоящей работы – оценить возможности QPI для выявления диагностических критериев уровня нарушений в клеточном звене иммунной системы у пациенток с наружным эндометриозом.

## Материал и методы

Исследованы клетки периферической крови 42 пациенток, составивших две клинические группы: в 1-ю группу (основную) были включены 22 пациентки с эндометриоидными кистами яичников в возрасте от 21 до 37 лет (средний возраст  $27,1 \pm 3,4$  года); 2-ю группу (сравнения) составили 20 больных с лейомиомой матки в возрасте от 23 до 42 лет (средний возраст  $29,3 \pm 4,1$  года). Всех пациенток привлекали к обследованию однократно до проведения хирургического лечения. Для определения показателей нормы (группа

**Лифенко Роман Александрович** – канд. мед. наук, главный врач<sup>1</sup>  
✉ 357202,  
г. Минеральные Воды,  
ул. Кисловодская, 59,  
Российская Федерация.  
Тел.: +7 (87922) 6 78 87.  
E-mail: hadik202@gmail.com

**Попова Ольга Сантроевна** – аспирант кафедры акушерства и гинекологии факультета дополнительного последилового образования<sup>2</sup>

**Топузов Александр Георгиевич** – главный врач<sup>3</sup>

**Звержковский Владислав Дмитриевич** – инженер специализированной учебно-научной лаборатории когерентной фазовой микроскопии<sup>4</sup>

контроля) были изучены клетки периферической крови 20 практически здоровых небеременных женщин фертильного возраста (от 22 до 37 лет), не имевших на момент обследования острых и/или хронических гинекологических и соматических заболеваний. Средний возраст в группе контроля был  $28,7 \pm 3,6$  года.

Критериями включения в исследование служили клинически и инструментально верифицированный диагноз эндометриоза яичников и лейомиомы матки, репродуктивный возраст.

Критериями исключения были эндометриоз других локализаций, наличие сопутствующих гинекологических заболеваний, злокачественные опухоли органов репродуктивной системы, отказ пациентки от участия в исследовании.

Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 38 от 29 мая 2014 г.) и проводились с получением добровольного и информированного согласия пациенток.

Венозную кровь из кубитальной вены заготавливали в пробирки вакуумные (VACUETTE)  $13 \times 100$  мм с наполнителем с К2 ЭДТА. Взвесь мононуклеаров выделяли стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque ( $p = 1,077$  г/см<sup>3</sup>). Получение субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов из общей фракции мононуклеаров осуществляли методом магнитной сепарации по методике производителя (Miltenyi Biotech, Германия). К суспензии мононуклеарных клеток добавляли магнитные частицы, конъюгированные с анти-CD4 и анти-CD8 антителами соответственно, и инкубировали в течение 15 минут при +40 °С. Затем клетки отмывали и осуществляли выделение позитивных фракций с помощью магнитного сепаратора AutoMACS (Miltenyi Biotech, Германия). Чистота выделения во всех случаях составляла более 95%.

Исследования клеток проводили в режиме реального времени с использованием технологии количественного фазового имиджинга, реализованной на основе модуля фазово-интерференционной микроскопии отечественного аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Весттрейд», Москва) для клинической и лабораторной диагностики. Оптическая схема модуля представляет собой модификацию схемы микроинтерферометра Линника с источником света He-Ne-лазером ( $\lambda = 633$  нм, 1 мВт). Фазовый портрет живой функционирующей клетки получали путем преобразования цифровой матрицы распределения фаз полученного сигнала при сравнении волнового фронта, прошедшего через

<sup>1</sup> ГБУЗ СК «Минераловодская районная больница»; 357202, г. Минеральные Воды, ул. Гагарина, 67А, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России; 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГБУЗ СК «Минераловодский межрайонный родильный дом»; 357200, г. Минеральные Воды, Февральский пер., 21, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; 119454, г. Москва, пр-т Вернадского, 78, Российская Федерация



клетку, с референтным, отраженным без искажений от высококачественного зеркала. В соответствии с протоколом технологии QPI получали 2D- и 3D-визуализацию клетки и ее фрагментов. Для каждой клеточной субпопуляции оценивали комплекс стандартных морфоденситометрических параметров. Показатель функциональной активности ядра (FA) лимфоцитов рассчитывали по формуле [15]:

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

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

Количественную оценку цитотоксического потенциала лимфоцитов выполняли в соответствии с оригинальными алгоритмами определения параметров фазового изображения клеток [16].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 21.0. Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, а также величины дисперсии и стандартного отклонения. Сравнение показателей 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 при условии совпадения дисперсий. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Морфологические особенности, характерные для клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, выявлены при анализе фазово-интерференционных портретов нативных лимфоцитов. На топограммах и 3D-реконструкциях хорошо визуализируется круглое, овальное или бобовидное ядро с неоднородной глыбчатой структурой хроматина (рис. 1). Вокруг ядра ободок цитоплазмы, который может иметь различную ширину, что позволяет выделить узко- или широкоплазменные лимфоциты. В цитоплазме некоторых широкоплазменных лимфоцитов можно определить наличие зернистости.

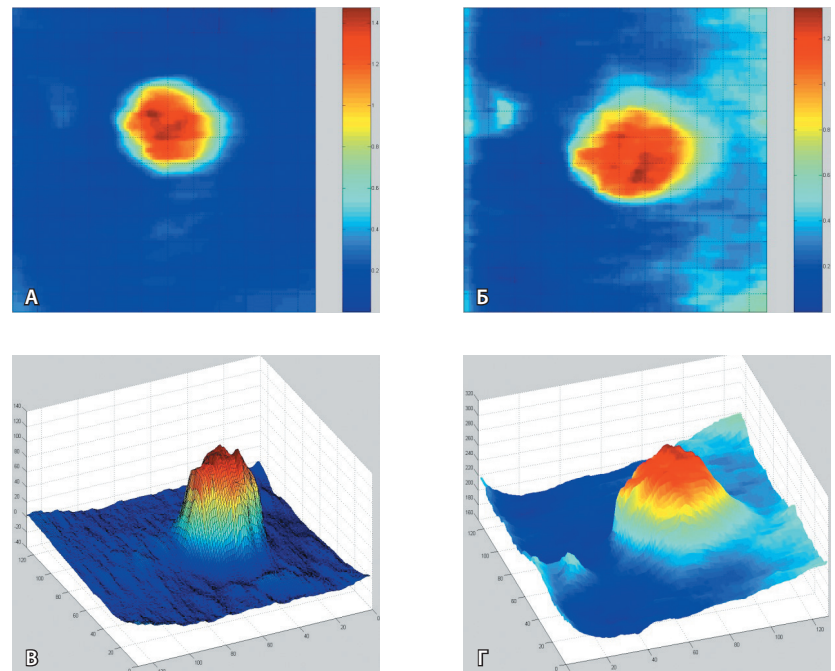
Средние по популяции морфоденситометрические параметры CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов приведены в табл. 1. В контрольной группе CD4-позитивные клетки имели тенденцию

к снижению средних в популяции значений диаметра, периметра, высоты (фазовой толщины), площади и объема клеток по сравнению с CD8<sup>+</sup> лимфоцитами. FAN клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup> составил 1,88, а с фенотипом CD8<sup>+</sup> – практически

**Таблица 1.** Морфоденситометрические параметры лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>

Группа	Параметр, M ± σ				
	диаметр, мкм	периметр, мкм	высота, мкм	площадь, мкм <sup>2</sup>	объем, мкм <sup>3</sup>
<b>Контроль</b>					
CD4 <sup>+</sup>	6,42 ± 0,49	18,35 ± 1,41	1,81 ± 0,29	35,98 ± 3,12	22,95 ± 4,78
CD8 <sup>+</sup>	6,74 ± 0,85	18,93 ± 3,12	1,73 ± 0,31	39,15 ± 6,03	26,91 ± 5,12
<b>Эндометриодные кисты яичников</b>					
CD4 <sup>+</sup>	6,73 ± 0,92	18,95 ± 2,28	1,64 ± 0,23*	32,64 ± 3,16	24,47 ± 3,12
CD8 <sup>+</sup>	6,25 ± 0,98	19,42 ± 2,46	1,77 ± 0,15	35,72 ± 4,69	27,11 ± 5,34
<b>Лейомиома матки</b>					
CD4 <sup>+</sup>	6,59 ± 0,78	19,11 ± 2,35	1,78 ± 0,31	37,25 ± 3,41	22,41 ± 3,31
CD8 <sup>+</sup>	7,15 ± 1,03	20,95 ± 3,04	1,66 ± 0,28	41,3 ± 5,24	28,35 ± 3,46

\*p < 0,05 по сравнению с показателями контроля



**Рис. 1.** Фазово-интерференционные портреты Т-лимфоцитов периферической крови (интерференционное поле 20 × 20 мкм): топограммы в псевдоцвете узкоплазменного (А) и широкоплазменного (Б) лимфоцитов; 3D-реконструкции узкоплазменного (В) и широкоплазменного (Г) лимфоцитов





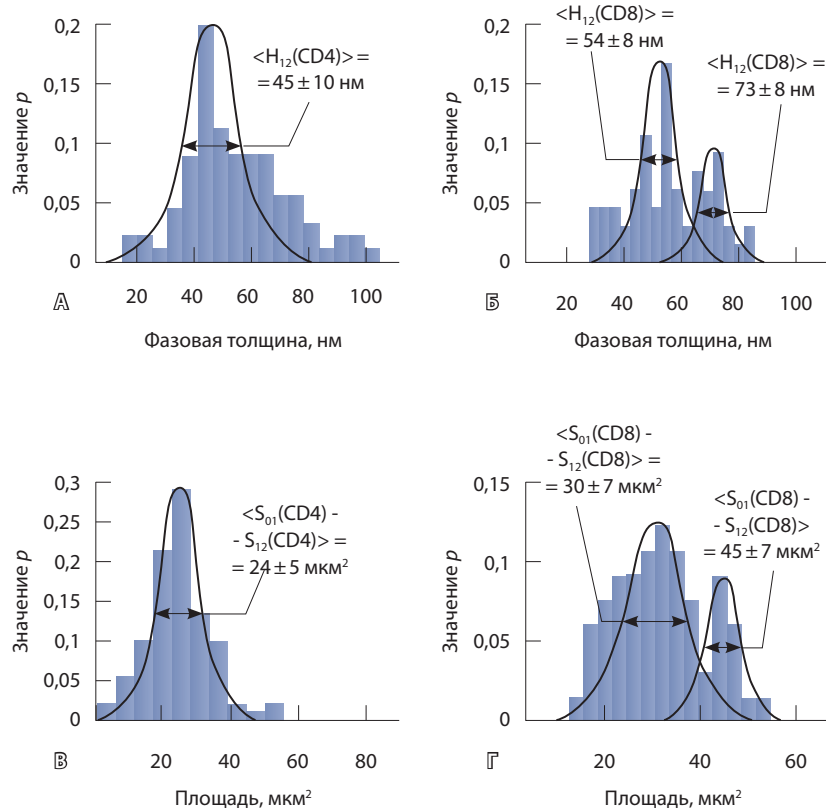
на 5,1% больше (1,98). Данный факт может свидетельствовать о несколько более высокой функциональной активности цитотоксических лимфоцитов.

Для морфоденситометрических параметров  $CD4^+$  лимфоцитов периферической крови пациенток с эндометриоидными кистами яичников характерна тенденция к незначительному увеличению средних в популяции значений диаметра,

**Таблица 2.** Показатели фазовой толщины ( $H_{\text{цит}}$ ) и площади ( $S_{\text{цит}}$ ) зоны тонкой цитоплазмы цитотоксических лимфоцитов

Группа	Параметр, $M \pm \sigma$	
	фазовая толщина, мкм	площадь, мкм <sup>2</sup>
Контроль	$0,63 \pm 0,08$	$37,5 \pm 7,25$
Эндометриоидные кисты яичников	$0,54 \pm 0,09^*$	$34,9 \pm 6,83$
Лейомиома матки	$0,69 \pm 0$	$40,1 \pm 8,12$

\* $p < 0,05$  по сравнению с показателями контроля



**Рис. 2.** Гистограммы распределения  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов периферической крови по величинам фазовой толщины ( $H_{\text{цит}}$ ) (А, Б) и площади ( $S_{\text{цит}}$ ) (В, Г) примембранной зоны цитоплазмы ( $M \pm \sigma$ ). В популяции  $CD8^+$  клеток выделены две отдельные группы лимфоцитов, различающиеся значениями  $H_{\text{цит}}$  (Б) и  $S_{\text{цит}}$  (Г)

периметра и площади клеток ( $p > 0,05$ ). Фазовая высота (толщина) снизилась на 9,4% по отношению к показателям контрольной группы. В субпопуляции  $CD8^+$  лимфоцитов, напротив, диаметр, периметр и площадь клеток оказались несколько меньше контрольных значений, а фазовая высота (толщина) и объем имели тенденцию к повышению. FAN клеток с фенотипом  $CD4^+$  был 2,03. Снижение величины FAN у  $CD8^+$  лимфоцитов до 1,91 может свидетельствовать о подавлении функциональной активности цитотоксических клеток.

У пациенток с лейомиомой матки не выявлено значимых изменений параметров  $CD4^+$  лимфоцитов. FAN составил 1,85. В субпопуляции клеток с фенотипом  $CD8^+$  зарегистрирована тенденция к увеличению диаметра, периметра и площади ( $p > 0,05$ ), средние значения фазовой высоты (толщины) клеток были снижены на 7%. FAN  $CD8^+$  клеток увеличился до 2,08, демонстрируя повышение функциональной активности цитотоксических лимфоцитов.

Методом интегральных функций оценили денситометрические особенности плазменной примембранной области  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов. В качестве информативных параметров использовали величины фазовой толщины  $H_{\text{цит}}$  и площади  $S_{\text{цит}}$  зоны тонкой цитоплазмы, прилегающей к мембране клетки и содержащей гранулы (рис. 2).

Гистограмма распределения  $CD4^+$  клеток по величине  $S_{\text{цит}}$  подчиняется нормальному закону и имеет унимодальную симметрическую форму. В гистограмме распределения по величине  $H_{\text{цит}}$  при сохранении унимодального характера отмечается незначительная правосторонняя асимметрия.

Гистограммы распределения  $CD8^+$  лимфоцитов по анализируемым показателям, напротив, имеют выраженную бимодальность, демонстрируя наличие в популяции цитотоксических лимфоцитов двух групп клеток, различающихся величинами  $H_{\text{цит}}$  и площади  $S_{\text{цит}}$ .

В табл. 2 приведены средние значения фазовой толщины  $H_{\text{цит}}$  и площади  $S_{\text{цит}}$  зоны тонкой цитоплазмы цитотоксических лимфоцитов у обследованных пациенток.

Подсчет процента цитотоксических клеток с наличием гранул показал, что в контрольной группе содержание  $CD8^+$  лимфоцитов с наличием гранул в примембранной зоне тонкой цитоплазмы составило  $37,1 \pm 5,15\%$ , в группе пациенток с эндометриоидными кистами яичников –  $29,8 \pm 6,34\%$ , а у женщин с лейомиомой матки –  $42,6 \pm 5,89\%$ .



## Обсуждение

Последние десятилетия ознаменовались значительным прогрессом в изучении молекулярной биологии клетки. Новые возможности связаны с развитием так называемых омиксных технологий: геномики, протеомики, метаболомики, эпигеномики, фармакомики, предназначенных для оптимизации профилактики, диагностики и лечения пациентов. В проведенном исследовании мы использовали новую диагностическую технологию, реализованную на базе когерентной интерференционной микроскопии, для неинвазивного изучения субклеточных структур иммунокомпетентных клеток при эндометриозе.

Полученные нами результаты показали, что в условиях физиологической нормы популяция CD4<sup>+</sup> лимфоцитов была достаточно однородной по анализируемым морфоденситометрическим параметрам. Клеток, содержащих гранулы, не выявлено. В то же время практически 37% CD8<sup>+</sup> лимфоцитов были перфоринпозитивными. Эти данные полностью согласуются с результатами других исследователей [17–19].

Экзоцитоз перфорины и гранзимов, содержащихся в литических цитоплазматических гранулах, выступает одним из основных механизмов реализации лимфоцитами цитотоксической способности. В результате взаимодействия цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью свободный перфорин встраивается в мембрану клетки-мишени с последующей полимеризацией в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> и образованием многочисленных трансмембранных пор, приводящих к осмотическому взрыву и лизису клетки. Гранзимы, проникая через образовавшиеся поры внутрь клетки-мишени, активируют эффекторный фермент каспазу-3 и вызывают деградацию ДНК, тем самым завершая необратимое разрушение клетки [17–20].

У женщин с эндометриозом наблюдаются качественные и количественные изменения макрофагов, подавление функции NK-клеток, снижение цитотоксической активности, нарушение процессов пролиферации и апоптоза [6, 21].

## Литература

1. Адамьян ЛВ, ред. Сочетанные доброкачественные опухоли и гиперпластические процессы матки (миома, аденомиоз, гиперплазия эндометрия). Проект клинических рекомендаций по ведению больных. М.; 2015. 94 с.
2. Прилепская ВН, Иванова ЕВ, Тагиева АВ, Летуновская АБ. Эндометриоз: от трудностей

- диагностики к новым возможностям терапии. Гинекология. 2012;14(4):4–8.
3. Подзолкова НМ, Колода ЮА, Коренная ВВ. Наружный генитальный эндометриоз: взгляд репродуктолога. Фарматека. 2012;12(245):64–71.
4. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil

В ряде исследований выявлена прямая зависимость между уровнем цитотоксичности и тяжестью заболевания [21, 22].

Согласно нашим данным, количество CD8<sup>+</sup> лимфоцитов с наличием перфориновых гранул при эндометриозе оказалось сниженным, что свидетельствует о низком цитотоксическом (перфориновом) потенциале иммунной системы у обследованных пациенток и, по-видимому, служит объяснением прогрессирующего и рецидивирующего характера заболевания. Следовательно, оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов посредством количественного определения клеток, содержащих перфориновые гранулы, с использованием современной диагностической технологии QPI может служить важным диагностическим и прогностическим критерием течения заболевания.

## Заключение

Установлены и количественно оценены особенности цитотоксического потенциала лимфоцитов периферической крови больных эндометриозом: подавление функциональной активности CD8-позитивных клеток, снижение уровня лимфоцитов, содержащих в цитоплазме перфориновые гранулы.

Исследование внутриклеточных структур лимфоцитов с использованием неинвазивной и безреагентной технологии QPI может позволить не только детально изучать патогенетические механизмы трансформации иммунокомпетентных клеток в условиях развития патологического процесса, но и на основе полученных результатов в перспективе разрабатывать новые подходы к функциональной диагностике состояния иммунной системы, предлагать доступные, информативные и объективные биомаркеры для прогноза течения и исхода заболевания, заложить основы принципиально новой тактики лечения при той или иной форме эндометриоза, модулируя цитотоксический потенциал иммунной системы пациента. ©

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.



6. Алексанова ЕМ, Аксененко ВА, Пилавова ОМ. Изменения местного иммунитета у пациенток с эндометриодными кистами яичников на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани. *Фундаментальные исследования*. 2014;(10–2): 245–50.
7. Линде ВА, Ермолова НВ, Колесникова ЛВ, Слесарева КВ, Ширинг АВ, Скачков НН. Содержание клеточных биорегуляторов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у женщин при формировании эндометриодных кист яичников. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2012;(3): 58–64.
8. Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017;8(4):7138–47. doi: 10.18632/oncotarget.12577.
9. Mu F, Harris HR, Rich-Edwards JW, Hankinson SE, Rimm EB, Spiegelman D, Missmer SA. A prospective study of inflammatory markers and risk of endometriosis. *Am J Epidemiol*. 2018;187(3):515–22. doi: 10.1093/aje/kwx272.
10. Гаспарян СА, Чотчаева СМ, Василенко ИА, Кастрикина ИС. Структурно-морфологические особенности тромбоцитов периферической крови при неразвивающейся беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2009;LVIII(3):7–11.
11. Ордианц ИМ, Побединская ОС, Макаева ДА, Алиева ЭА. Цитоморфометрическое прогнозирование невынашивания ранней беременности. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2014;(2):108–11.
12. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тychинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. *Вестник последипломного медицинского образования*. 2009;(3–4):64–8.
13. Лысенко МА, Метелин ВБ, Баранова НВ. Опыт применения инновационных клеточных технологий в диагностике эндометриодных кист яичников. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012;2(26):33–6.
14. Chang CW, Cheong ML, Chang GD, Tsai MS, Chen H. Involvement of Epac1/Rap1/CaMKI/HDAC5 signaling cascade in the regulation of placental cell fusion. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(11):745–55. doi: 10.1093/molehr/gat050.
15. Цалман АЯ, Ватазин АВ, Василенко ИА, Метелин ВБ, Вышенская ТВ. Интерференционная фазометрия ядерных структур лимфоцитов при трансплантации почки. *Клиническая нефрология*. 2010;(6):43–7.
16. Вышенская ТВ, Болотова АА, Василенко ИА, Звержховский ВД, Болдырев ДВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Метод определения цитотоксического потенциала по фазовым изображениям CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. *Биофизика*. 2016;61(3):523–7.
17. Кадагидзе ЗГ, Заботина ТН, Короткова ОВ, Табаков ДВ, Черткова АИ, Борунова АА, Панчук ИО, Самойленко ИВ, Харкевич ГЮ, Демидов ЛВ. Влияние ипилимумаба на субпулционную структуру лимфоцитов больных диссеминированной меланомой. *Практическая онкология*. 2017;18(3):285–97.
18. Борунова АА, Чкадуа ГЗ, Заботина ТН. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов. *Иммунология*. 2006;27(1):4–6.
19. Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, House CM, Chia J, Darcy PK, Yagita H, Trapani JA. Blood Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. 2007;110(4):1184–90. doi: 10.1182/blood-2007-02-072850.
20. Moreno-Hagelsieb G, Vitug B, Medrano-Soto A, Saier MH Jr. The Membrane Attack Complex/Perforin Superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2017;27(4):252–67. doi: 10.1159/000481286.
21. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60(5):383–404.
22. Jeung I, Cheon K, Kim MR. Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2916070. doi: 10.1155/2016/2916070.
1. Adamyan LV, editor. Combined benign tumors and hyperplastic processes of the uterus (myoma, adenomyosis, endometrial hyperplasia). *Draft clinical guidelines for managing patients*. Moscow; 2015. 94 p. Russian.
2. Prilepskaya VN, Ivanova EV, Tagieva AV, Letunovskaya AB. Endometriosis: from the difficulties of diagnosis to new possibilities of therapy. *Gynecology*. 2012;14(4):4–8. Russian.
3. Podzolkova NM, Koloda YuA., Korennaya VV. External endometriosis: reproductologist's view on the problem. *Pharmateca*. 2012;12(245):64–71. Russian.
4. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(3):511–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
5. Facchin F, Barbara G, Saita E, Mosconi P, Roberto A, Fedele L, Vercellini P. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2015;36(4):135–41. doi: 10.3109/0167482X.2015.1074173.
6. Алексанова ЕМ, Аксененко ВА, Пилавова ОМ. Local immunity changes in patients with endometrioid ovarian cysts on the background of undifferentiated connective tissue dysplasia. *Fundamental Research*. 2014;(10–2):245–50. Russian.
7. Linde VA, Ermolova NV, Kolesnikova LV, Slesareva KV, Shiring AV, Skachkov NN. Content of cell bioregulators in blood serum and in peritoneal fluid of women in the formation of ovarian endometrioid cysts. *Journal of Fundamental Medicine and Biology*. 2012;(3):58–64. Russian.
8. Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017;8(4):7138–47. doi: 10.18632/oncotarget.12577.
9. Mu F, Harris HR, Rich-Edwards JW, Hankinson SE, Rimm EB, Spiegelman D, Missmer SA. A prospective study of inflammatory markers and risk of endometriosis. *Am J Epidemiol*. 2018;187(3):515–22. doi: 10.1093/aje/kwx272.
10. Gasparyan SA, Chotchaeva SM, Vasilenko IA, Kastrikina IS. Structural morphologic features of peripheral blood platelets in recurrent miscarriage. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2009;LVIII(3):7–11. Russian.
11. Ordyanets IM, Pobedinskaya OS, Makaeva DA, Alieva E.A. Cytomorphometry forecasting miscarriage early pregnancy. *Mother and Baby in Kuzbass*. 2014;(2):108–11. Russian.
12. Vasilenko IA, Kardashova DZ, Tychinsky VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanian BYa. Cell diagnostics: the potential of vital computed microscopy. *Journal of postgraduate medical education*. 2009;(3–4):64–8. Russian.
13. Lysenko MA, Metelyn VB, Baranova NV. New cellular technologies in diagnostics of endometrioid ovarian cysts. *Medical News of the North Caucasus*. 2012;2(26):33–6. Russian.
14. Chang CW, Cheong ML, Chang GD, Tsai MS, Chen H. Involvement of Epac1/Rap1/CaMKI/HDAC5 signaling cascade in the regulation of placental cell fusion. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(11):745–55. doi: 10.1093/molehr/gat050.
15. Tsalman AY, Vatazin AV, Vasilenko IA, Metelin VB, Vyshenskaya TV. Interference phaseometry of the lymphocyte nuclear structures after kidney transplantation. *Clinical Nephrology*. 2010;(6):43–7. Russian.
16. Vyshenskaya TV, Bolotova AA, Vasilenko IA, Zverzhovskiy VD, Boldyrev DV, Kretushev AV, Evdokimov AA. A technique for the assess-



ment of the cytotoxic capacity of CD8<sup>+</sup> lymphocytes based on phase images. *Biophysics*. 2016;61(3):523–7. Russian.

17. Kadagidze ZG, Zabolina TN, Korotkova OV, Tabakov DV, Chertkova AI, Borunova AA, Panchuk IO, Samoilenko IV, Kharkevich GYu, Demidov LV. The effect of ipilimumab on the subpopulation structure of lymphocytes of patients with metastatic melanoma. *Practical Oncology*. 2017;18(3):285–97. Russian.
18. Borunova AA, Chkadua GZ, Zabolina TN. Perforin-mediated cytotoxicity of CD16<sup>+</sup>-lym-

phocytes. *Immunology*. 2006;27(1):4–6. Russian.

19. Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, House CM, Chia J, Darcy PK, Yagita H, Trapani JA. Blood. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. 2007;110(4):1184–90. doi: 10.1182/blood-2007-02-072850.
20. Moreno-Hagelsieb G, Vitug B, Medrano-Soto A, Saier MH Jr. The Membrane Attack Complex/Perforin Superfamily. *J Mol Mi-*

*crobiol Biotechnol*. 2017;27(4):252–67. doi: 10.1159/000481286.

21. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60(5):383–404.
22. Jeung I, Cheon K, Kim MR. Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2916070. doi: 10.1155/2016/2916070.

## The potential and prospects of the quantitative phase imaging (QPI) diagnostic technology in obstetrics and gynecology

R.A. Lifenko<sup>1</sup> • O.S. Popova<sup>2</sup> • A.G. Topuzov<sup>3</sup> • V.D. Zverzhovskiy<sup>4</sup>

**Rationale:** An important role of immunological factors in the endometriosis pathophysiology allows for their consideration as diagnostic and prognostic disease markers. A promising approach to the diagnosis of immunological abnormalities is based on the non-invasive cell diagnostic technology of quantitative phase imaging (QPI), with underlying principles of laser interferometry and holography. **Aim:** To assess the QPI potential to identify diagnostic criteria for cell immunity abnormalities in female patients with external endometriosis. **Materials and methods:** We performed a quantitative assessment of the cytotoxic potential of peripheral blood lymphocytes from 22 patients with endometrioid ovarian cysts (mean age, 27.1 ± 3.4 years), 20 patients with uterine leiomyoma (mean age, 29.3 ± 4.1 years) and 20 healthy non-pregnant women of child-bearing age (mean age, 28.7 ± 3.6 years). We used the non-invasive QPI technique with the module for phase interference microscopy of the Russian hard- and software complex Bioni (Westtrade Ltd., Russia). **Results:** We studied phase interference pictures of native lymphocytes to identify morphological and densitometry characteristics for CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> cells. Two groups of cells were identified in the cytotoxic lymphocyte population, which differed in their values of the phase thickness ( $H_{\text{cyl}}$ ) and the area of cytoplasm adjacent to the membrane and containing the perforin granules ( $S_{\text{cyl}}$ ). It was found, that in the

healthy controls the proportion of perforin-positive cytotoxic CD8<sup>+</sup> lymphocytes was 37.1 ± 5.15%, in the patients with endometriosis 29.8 ± 6.34%, and in those with uterine leiomyoma 42.6 ± 5.89%. **Discussion:** Assessment of the lymphocyte cytotoxic potential by quantitative determination of cells containing perforin granules may be an important diagnostic and prognostic criterion of the disease course. **Conclusion:** Studies of the intracellular structures of lymphocytes by non-invasive and non-reagent technology QPI allows not only for a detailed evaluation of pathophysiological mechanisms of immune competent cell transformation in the course of a pathological process, but also gives future directions for development of new approaches to functional assessment of the immune system based on the results obtained.

**Key words:** phase interference microscopy, endometrioid ovarian cyst, lymphocyte, cytotoxic potential, perforin granules

**For citation:** Lifenko RA, Popova OS, Topuzov AG, Zverzhovskiy VD. The potential and prospects of the quantitative phase imaging (QPI) diagnostic technology in obstetrics and gynecology. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):758–64. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-758-764.

Received 02 May 2018; accepted 26 November 2018

**Roman A. Lifenko** – MD, PhD, Chief Physician<sup>1</sup>

✉ 59 Kislovodskaya ul., Mineralnye Vody, 357203, Russian Federation. Tel.: +7 (87922) 6 78 87. E-mail: hadik202@gmail.com

**Olga S. Popova** – Postgraduate Student, Chair of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Postgraduate Education<sup>2</sup>

**Aleksandr G. Topuzov** – Chief Physician<sup>3</sup>

**Vladislav D. Zverzhovskiy** – Engineer, Specialized Educational and Scientific Laboratory of Coherent Phase Microscopy<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mineralnye Vody District Hospital; 67A Gagarina ul., Mineralnye Vody, 357202, Russian Federation

<sup>2</sup>Stavropol State Medical University; 310 Mira ul., Stavropol, 355017, Russian Federation

<sup>3</sup>Mineralovodsk Interdistrict Maternity Hospital; 21 Fevral'skiy per., Mineralnye Vody, 357200, Russian Federation

<sup>4</sup>Moscow Technological University; 78 Vernadskogo prospekt, Moscow, 119454, Russian Federation

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.





Оригинальная статья

# Трансляционные исследования электрофоретической подвижности и фазового портрета эритроцитов с учетом развития стрессовой реакции в условиях патологического процесса

Дерюгина А.В.<sup>1</sup> • Иващенко М.Н.<sup>2</sup> • Игнатьев П.С.<sup>3</sup> • Самоделкин А.Г.<sup>2</sup>

**Актуальность.** Современные методы клеточной диагностики востребованы при разработке новых подходов персонализированной медицины. К таким методам, активно внедряемым в диагностический процесс лечебных учреждений, можно отнести когерентную фазовую интерферометрию и клеточный микроэлектрофорез. **Цель** – обоснование возможности использования биофизических и морфоденситометрических показателей эритроцитов в качестве критериев эффективности терапии и развития адаптационных процессов у пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями. **Материал и методы.** Под наблюдением находились 25 больных в возрасте от 40 до 54 лет (11 мужчин и 14 женщин), из них 9 (36%) – с язвенной болезнью желудка, 3 (12%) – с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 8 (32%) – с острым гастритом, 5 (20%) – с острым панкреатитом. Биофизические и морфологические особенности эритроцитов периферической крови пациентов исследовали до и после проведения терапии с использованием методов клеточной диагностики – микроэлектрофореза и лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. Параллельно оценивали динамику рутинных клинико-лабораторных показателей: количество эритроцитов и лейкоцитов, уровень гемоглобина, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), лейкоцитарную формулу. Контрольную группу составили 10 здоровых доноров в возрасте

от 36 до 52 лет. В экспериментах *in vitro* анализировали изменения электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) и морфологии эритроцитов при действии адреналина и кортизола. **Результаты.** После проведения терапии у больных наблюдалось уменьшение содержания лейкоцитов (на 27%), повышение моноцитов (в 2 раза) и снижение СОЭ (на 10%) относительно показателей до лечения ( $p < 0,05$  во всех случаях). ЭФПЭ увеличивалась на 12% (1,37 против 1,22 мкм $\times$ см/В $\times$ с,  $p < 0,05$ ). В эритроцитарной популяции обследованных пациентов до лечения по сравнению с контрольной группой отмечалось уменьшение доли дискоцитов (85,2 против 95,4%,  $p < 0,05$ ), увеличение эхиноцитов, стоматоцитов и дегенеративно измененных форм (11, 2,8 и 1% соответственно,  $p < 0,05$ ). После терапии содержание дискоцитов повышалось практически до физиологической нормы (91,3%). Однако при этом поверхность клеток дискоидной формы оставалась неоднородной с наличием многочисленных микроспикул, что нашло отражение в изменении электрокинетических и морфологических свойств эритроцитов в ответ на развивающуюся в организме стресс-реакцию. Влияние стресс-реализующих систем подтверждено экспериментами *in vitro* по оценке воздействия адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) на эритроциты. К 120-й минуте эксперимента под влиянием адреналина наблюдалось снижение ЭФПЭ (1,14 против исходных 1,24 мкм $\times$ см/В $\times$ с,

$p < 0,05$ ) и увеличение сферичности клеток. При действии кортизола, напротив, ЭФПЭ увеличивалась (1,72 против 1,36 мкм $\times$ см/В $\times$ с,  $p < 0,05$ ), но выраженность эхиноцитарной трансформации была незначительной. **Заключение.** Биофизические и морфоденситометрические показатели эритроцитов, полученные с использованием современных экспресс-методов клеточного микроэлектрофореза и когерентной интерференционной микроскопии, объективно отражают интенсивность стресс-реакции при развитии патологического процесса и включение адаптационных механизмов в ходе проводимой терапии.

**Ключевые слова:** эритроциты, микроэлектрофорез, когерентная фазово-интерференционная микроскопия, гастроэнтерологические заболевания

**Для цитирования:** Дерюгина АВ, Иващенко МН, Игнатьев ПС, Самоделкин АГ. Трансляционные исследования электрофоретической подвижности и фазового портрета эритроцитов с учетом развития стрессовой реакции в условиях патологического процесса. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):765–71. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-765-771.

Поступила 22.02.2018;  
принята к публикации 22.11.2018

**Т**рансляционная медицина признана одним из актуальных направлений современной науки. Внедрение результатов фундаментальных исследований в практическое здравоохранение способствует переходу к персонализированной медицине, то есть позволяет врачу использовать возможности новых способов диагностики и оценки эффективности

проводимого лечения [1, 2]. К таким методам, активно внедряемым в диагностический процесс лечебных учреждений, можно отнести когерентную фазовую интерферометрию и клеточный микроэлектрофорез [3, 4].

Ранее нами установлено, что изменение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) позволяет характеризовать развитие





стресс-реакции и включение адаптационных резервов организма [5, 6]. Как показали эксперименты с моделированием стресса на животных, снижение ЭФПЭ наблюдается при активации симпатно-адреналовой системы, тогда как рост ЭФПЭ связан с активацией гипофизарно-надпочечниковой системы и повышением резистентности организма [7]. Изучение ЭФПЭ при различных патологических состояниях выявило однонаправленную динамику данного показателя, проявляющуюся в его снижении относительно физиологической нормы, что может быть отражением разной степени выраженности стрессовой реакции [8–11]. Особенности ЭФПЭ определяются свойствами клеточных мембран, визуализация которых позволяет, на наш взгляд, получить дополнительную информацию о перестройке поверхностных структур клеток в условиях нормы и патологии. Однако для верификации использования ЭФПЭ и параметров фазового портрета эритроцитов в качестве показателей патологического процесса необходимо сопоставить их изменения с результатами стандартных клинико-лабораторных исследований.

Цель работы – обоснование возможности использования биофизических и морфоденситометрических показателей эритроцитов в качестве критериев эффективности терапии и развития адаптационных процессов у пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями.

## Материал и методы

Мы провели анализ показателей крови пациентов гастроэнтерологическими заболеваниями (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, острый гастрит, острый панкреатит). Группа пациентов набрана на основании результатов анкетирования, проводившегося перед госпитализацией на первичном приеме у врача-гастроэнтеролога на базе ГБУЗ НО Городская поликлиника № 50 Советского района г. Нижнего Новгорода. Критерием включения в исследование служило наличие у пациентов острого состояния, отсутствие ранее самостоятельно проводившегося лечения, а также добровольное согласие, полученное в соответствии с требованиями ст. 9 Федерального закона от 27.07.2006 «О персональных данных» № 152-ФЗ. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (протокол № 47 от 11.09.2017).

Под наблюдением находились 25 больных в возрасте от 40 до 54 лет (11 мужчин

**Дерюгина Анна Вячеславовна** – д-р биол. наук, доцент, заведующая кафедрой физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>

**Иващенко Марина Николаевна** – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии и биохимии животных<sup>2</sup>  
✉ 603107, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 97, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (831) 462 66 56.  
E-mail: mi11207@rambler.ru

**Игнатьев Павел Сергеевич** – канд. физ.-мат. наук, главный конструктор<sup>3</sup>

**Самоделькин Александр Геннадьевич** – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии животных<sup>2</sup>

и 14 женщин), из них 9 (36%) – с язвенной болезнью желудка, 3 (12%) – с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 8 (32%) – с острым гастритом, 5 (20%) – с острым панкреатитом. Диагноз формулировался врачом в соответствии с общепринятыми клиническими стандартами на основании анамнеза и подтверждался лабораторными и клиническими исследованиями. Лечение пациентов включало проведение стандартных терапевтических мероприятий: медикаментозную терапию (полусинтетические пенициллины, холинолитики, антациды, блокаторы H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов, цитопротекторы), физиотерапию, диету. Контрольную группу составили 10 здоровых доноров в возрасте от 36 до 52 лет.

Исследование ЭФПЭ, морфологии эритроцитов и клинический анализ крови проводили при поступлении пациентов в стационар до начала и после проведения терапевтических мероприятий перед выпиской. Для оценки ЭФПЭ готовили взвесь отмытых эритроцитов путем трехкратного центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут с 0,9% раствором хлористого натрия. Суспензию клеток разводили в 10 мМ трис-НСI-буфере (pH 7,4) и измеряли ЭФПЭ методом микроэлектрофореза с использованием цитоферометра в нашей модификации [4], регистрируя время прохождения эритроцитами расстояния 100 мкм в трис-НСI-буфере с pH 7,4 при силе тока 12 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:  $U = S / T \cdot H$ , где S – расстояние, на которое перемещались клетки, T – время перемещения клеток на расстояние S, H – градиент потенциала. Величину градиента потенциала определяли по формуле:  $H = I / g \cdot \chi$ , где I – сила тока, g – поперечное сечение камеры,  $\chi$  – удельная электропроводимость среды [12].

Исследование комплексной фазометрии эритроцитов проведено методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии на микроскопе МИМ-340 (Екатеринбург, Россия). В работе использовали лазер с длиной волны 532 нм и объектив с увеличением  $\times 20$ , разрешение по поверхности до 15 нм, разрешение по вертикали – 0,1 нм, возможность контроля изделий с глубиной рельефа – до 600 нм [13, 14]. Регистрировали морфологию нативных клеток без предварительной фиксации, что позволяло визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени, изучать их морфологию и динамику внутриклеточных процессов. Исследование лабораторно-клинических показателей крови проводили стандартными клиническими методами [15].

В экспериментах *in vitro* используемые в опытах эритроциты трижды отмывали 0,9% раствором

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»; 603107, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 97, Российская Федерация

<sup>3</sup> АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод» им. Э.С. Яламова»; 620100, г. Екатеринбург, ул. Восточная, 33 Б, Российская Федерация



хлористого натрия и инкубировали с адреналином ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), регистрируя динамику изменения ЭФПЭ через 15, 30, 60, 120 минут от начала инкубации. Каждая серия включала по 20 опытов.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Biostat. Количественные переменные представляли в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Статистическую значимость полученных различий разности средних значений при соблюдении условий нормальности распределения и равенства дисперсий оценивали с применением t-критерия Стьюдента. В остальных случаях применялся критерий Манна – Уитни. Бинарные показатели оценивались с помощью точного критерия Фишера. За величину уровня статистической значимости различий принимали  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Исследование клинико-лабораторных показателей крови и ЭФПЭ у обследованных больных выявило, что после проведенного лечения по сравнению с исходными данными отмечалось статистически значимое уменьшение количества лейкоцитов – на 17%, снижение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) на 10%, уменьшение количества лимфоцитов на 32% и увеличение моноцитов в 2 раза (табл. 1). Регистрация ЭФПЭ показала ее увеличение более чем на 12% относительно исходного уровня ( $p < 0,05$ ).

Восстановление клинико-лабораторных показателей до физиологической нормы является объективным свидетельством эффективности лечения патологического процесса. ЭФПЭ, сниженная при поступлении больных в стационар, после проведения терапии увеличивалась, превышая значения данного показателя в контрольной группе.

На величину электрофоретической подвижности клетки влияют многие факторы, в частности, физико-химические особенности мембраны и свойства окружающей клетку среды [4, 7]. При прогрессировании патологических состояний изменяется микроокружение, рН, состав и концентрация электролитов, что приводит к изменению величины поверхностного заряда циркулирующих эритроцитов. Снижение отрицательного заряда, а значит, и снижение ЭФПЭ отражает модификацию их мембранных свойств, ускорение агрегации, адгезии к эндотелию и изменение реологии крови пациента в условиях патологического процесса. Соответственно, при эффективной терапии происходит стабилизация структуры

**Таблица 1.** Изменение клинико-лабораторных показателей крови и электрофоретической подвижности эритроцитов у пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями

Показатель	Контроль	Пациенты с гастроэнтерологическими заболеваниями	
		до лечения	после лечения
Гемоглобин, г/л	128,6 ± 4,23	114,7 ± 4,77*	117,6 ± 2,79
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	4,5 ± 0,24	4,1 ± 0,09*	4,16 ± 0,13
СОЭ, мм/ч	8,21 ± 1,67	18,19 ± 1,45*	16,55 ± 2,28*†
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	6,06 ± 0,77	8,46 ± 0,92*	7,05 ± 0,64†
Палочкоядерные, %	2,04 ± 0,57	1,14 ± 0,47	1,21 ± 0,52
Сегментоядерные, %	58,01 ± 3,05	60,51 ± 3,74	57 ± 3,35
Моноциты, %	18,14 ± 2,55	6,14 ± 3,55†	12,36 ± 2,59†
Лимфоциты, %	15,75 ± 5,51	32,21 ± 5,56*	22,38 ± 4,91†
ЭФПЭ, мкм × см/В × с	1,3 ± 0,02	1,22 ± 0,02*	1,37 ± 0,03†

СОЭ – скорость оседания эритроцитов, ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов  
Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm m$ )

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями контрольной группы

†  $p < 0,05$  по сравнению с показателями до лечения

**Таблица 2.** Морфологические типы фазово-интерференционных портретов эритроцитов

Группа	Типы эритроцитов, %			
	дискоциты	эхиноциты	стоматоциты	дегенеративно измененные
Контроль	95,4 ± 0,4	3,8 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1
Пациенты с гастроэнтерологическими заболеваниями				
до лечения	85,2 ± 0,5*	11 ± 0,2*	2,8 ± 0,7*	1 ± 0,6
после лечения	91,3 ± 0,3	6 ± 0,5	2,1 ± 0,7	0,6 ± 0,3

Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm m$ )

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями контрольной группы

**Таблица 3.** Динамика изменения электрофоретической подвижности эритроцитов периферической крови после воздействия адреналином и кортизолом *in vitro*, мкм × см/В × с

Вид воздействия	Время после воздействия, минуты			
	15	30	60	120
Адреналин	1,24 ± 0,05	1,19 ± 0,08*	1,15 ± 0,07*	1,14 ± 0,05*
Кортизол	1,36 ± 0,03	1,52 ± 0,06*	1,96 ± 0,06*	1,72 ± 0,08*
Физиологический раствор	1,33 ± 0,02	1,36 ± 0,06	1,32 ± 0,06	1,35 ± 0,04

Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm m$ )

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями (физиологический раствор)

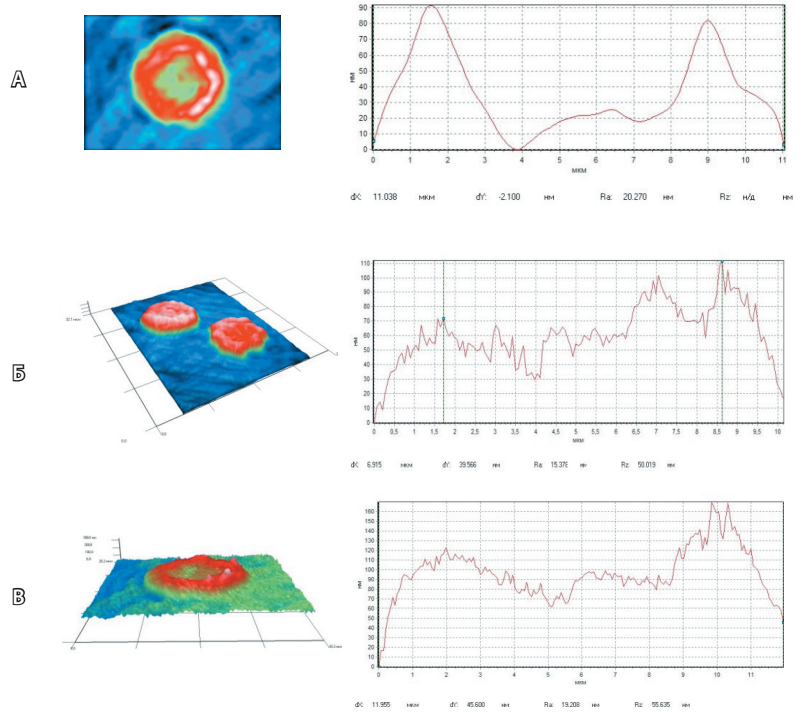
клеточной мембраны, восстановление активности ферментных и транспортных систем, повышение величины электрического заряда и восстановление ЭФПЭ до значений нормы.

Учитывая, что существенное влияние на ЭФПЭ оказывает поверхностная архитектура белок-липидной структуры мембран [16], был проведен анализ морфоденситометрических показателей эритроцитов методом интерференционной микроскопии. У пациентов с гастроэнтерологической патологией доля измененных форм эритроцитов возросла на 17% по сравнению с группой контроля. Изменение формы эритроцитов в большей степени было связано с появлением эхиноцитов (табл. 2, рис. 1).

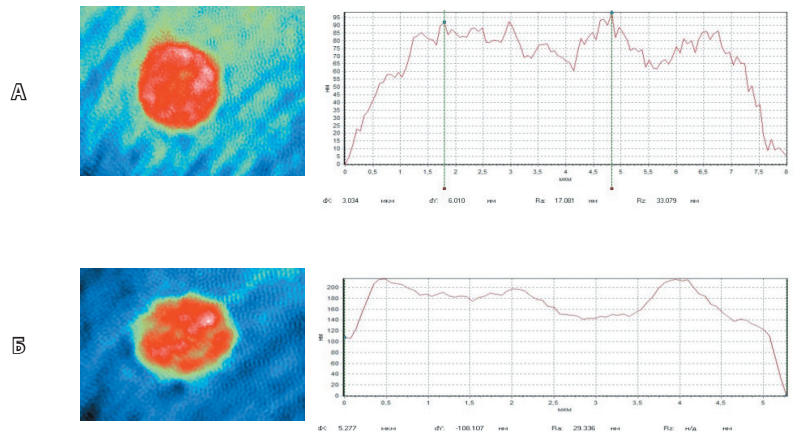
Не исключено, что увеличение количества эхиноцитов вызвано усилением окислительных процессов в клетках и появлением в них гемина [17]. При этом эритроциты с сохраненной формой дискоцита на различных участках клетки имели негладкую, неоднородную поверхность (см. рис. 1–2), что может быть обусловлено структурной перестройкой цитоскелета, конформационными изменениями и топографическим перераспределением молекул гемоглобина в сетчатой строме и подмембранных областях клетки [18] или начальной стадией перехода дискоцита в эхиноцит [19].

Проведение терапии способствовало снижению доли морфологически измененных форм эритроцитов и росту ЭФПЭ. Однако если фазовый профиль дискоцитов здоровых людей характеризовался близкой к равномерной ультраструктурой мембран и внутриклеточного содержимого (см. рис. 1А), то дискоциты больных, обследованных после курса терапии, имели негладкую поверхность с выростами (см. рис. 1Б). Появление неровностей на поверхности клеток может быть обусловлено начальной стадией перехода дискоцитов в эхиноциты, формирование которых сдерживается адаптационными процессами в клетке. Сходные изменения ультраструктуры мембран эритроцитов были зафиксированы при использовании опитов [20]. У пациентов после лечения, несмотря на количественное восстановление дискоидных форм эритроцитов до нормальных значений, ультраструктура мембран также отличалась от контрольных образцов (см. рис. 1В). В этой клинической группе было зарегистрировано увеличение ЭФПЭ.

Имея в виду, что изменение ЭФПЭ отражает развитие стресс-реакции [8], рост показателя у гастроэнтерологических больных может указывать на уменьшение стрессовой реакции и развитие адаптационных процессов.



**Рис. 1.** Фазово-интерференционные портреты (слева) и фазовые профили (справа) эритроцитов периферической крови здоровых доноров (А), пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями до (Б) и после (В) курса терапии



**Рис. 2.** Фазовый портрет (слева) и фазовый профиль (справа) эритроцитов *in vitro* при действии исследуемых веществ: адреналина (А) и кортизола (Б)

Для подтверждения данного положения нами были проведены эксперименты *in vitro*, связанные с анализом изменения ЭФПЭ и особенностей их фазово-интерференционных портретов при действии адреналина и кортизола, поскольку первая фаза стресс-реакции сопряжена с увеличением концентрации адреналина в периферической крови, тогда как вторая фаза стресса отражает развитие резистентности и сочетается с увеличением





концентрации кортизола, действие которого направлено на элиминацию стресса.

Исследование показало, что адреналин, начиная с 30 минут наблюдения, вызывал одностороннее снижение ЭФПЭ, в то время как под действием кортизола, напротив, отмечено прогрессирующее увеличение этого показателя (табл. 3). Зарегистрированы особенности изменения морфологии эритроцитов в условиях эксперимента: адреналин вызывал увеличение сферичности клеток, а при действии кортизола наблюдалось появление эхиноцитов, однако выраженность эхиноцитарной трансформации была незначительной (рис. 2).

Таким образом, можно предположить, что при развитии патологического процесса в зависимости от его интенсивности возникает стрессовая реакция, которая проявляется в изменении морфологии эритроцитов и их электрофоретической подвижности. Чем интенсивнее идет развитие стресса, тем больше патологически измененных эритроцитов с эхиноцитарной трансформацией и тем ниже ЭФПЭ. Данный процесс может быть связан с эффектом адреналина, который при взаимодействии с рецепторами эритроцитов вызывает активацию фосфолипаз, усиливает процесс липопероксидации, что модифицирует морфофункциональную организацию клеток и увеличивает проницаемость мембран [21]. Проведение терапевтических мероприятий ограничивает стресс-реакцию, которая может быть обусловлена включением

адаптационных процессов в организме, что отражается на структуре эритроцитов: уменьшение эхиноцитарной трансформации в сочетании с повышенным уровнем ЭФПЭ. Данные процессы, вероятно, могут быть обусловлены действием кортизола. Глюкокортикоиды играют важную роль в регуляции связанного со стрессом гомеостаза (центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, обмена веществ и иммунореактивной реакции). Кортизолу принадлежит ключевая роль в обеспечении гомеостаза всего гипоталамо-гипофизарно-кортикоидного комплекса, ответственного за развитие неспецифических механизмов реактивности организма [22].

## Заключение

Показатели ЭФПЭ и денситометрические параметры живых эритроцитов, полученные с использованием методов клеточного электрофореза и лазерной интерференционной микроскопии, объективно отражают особенности изменения морфофункционального состояния клеток при развитии патологического процесса. Данные методы могут быть использованы для количественной характеристики степени стрессовой реакции и развития адаптационных процессов, что особенно важно при переходе к персонализированной медицине, поскольку уровень адаптационных резервов организма индивидуален и должен учитываться при разработке конкретной терапевтической стратегии. ☺

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

## Литература

1. Пальцев МА, Белушкина НН. Трансляционная медицина – новый этап развития молекулярной медицины. Молекулярная медицина. 2012;(4):3–6.
2. Колбин АС, Гапешин РА, Малышев СМ. Современные подходы к организации трансляционных исследований. Педиатрическая фармакология. 2014;11(3):15–9. doi: 10.15690/pf.v11i3.1002.
3. Popescu G, Park Y. Quantitative phase imaging in biomedicine. J Biomed Opt. 2015;20(11): 111201. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111201.
4. Федин АИ, Василенко ИА, Бадалян КР. Влияние холестерина на электрокинетические свойства мембран эритроцитов при хронической ишемии головного мозга. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015;115(9–2):30–7.
5. Antipenko EA, Deryugina AV, Gustov AV. Effects of nonspecific cytoprotective treatment on stress resistance and compensatory potential in patients with chronic cerebral ischemia. Neurosci Behav Physiol. 2017;47(7):817–20. doi: 10.1007/s11055-017-0474-3.
6. Бояринов ГА, Дерюгина АВ, Яковлева ЕИ, Зайцев РР, Шумилова АВ, Бугрова МЛ, Бояринова ЛВ, Филиппенко ЕС, Соловьева ОД. Фармакологическая коррекция микроциркуляции у крыс, перенесших черепно-мозговую травму. Цитология. 2016;58(8):610–7.
7. Крылов ВН, Дерюгина АВ, Плесскова СН. Электрофоретическая подвижность и морфометрия эритроцитов крыс при стрессовых воздействиях. Современные технологии в медицине. 2010;(4):23–6.
8. Стародумов ВЛ, Калинина НГ, Горбунов ВА. Состояние мембран эритроцитов как индикатор воздействия свинца окружающей среды. Вестник Ивановской медицинской академии. 2013;18(4):16–9.
9. Сашенков СЛ, Алачева ЛВ. Оценка реактивности периферического отдела эритроцитной массы у детей с воспалительными заболеваниями органов дыхания. Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2014;(6):123–31.
10. Veshapidze N, Chigogidze T, Managadze L, Gabunia N, Kotrikadze N. Dynamics of the structural and electrical characteristics of erythrocytes in men with metastatic adenocarcinoma of the prostate before and after plastic orchietomy. Georgian Med News. 2007;(153):11–4.
11. Дерюгина АВ, Шумилова АВ, Филиппенко ЕС, Галкина ЯВ, Симутис ИС, Бояринов ГА. Функционально-биохимические показатели эритроцитов при использовании мексикора в посттравматический период экспериментальной кровопотери и сочетанной черепно-мозговой травмы у крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017;164(7):34–7.
12. Дерюгина АВ, Бояринов ГА, Симутис ИС, Никольский ВО, Кузнецов АБ, Ефимова ТС. Коррекция озонированной эритроцитной массой метаболических показателей эритроцитов и структуры миокарда после острой кровопотери. Цитология. 2018;60(2): 89–95. doi: 10.31116/tsitol.2018.02.03.
13. Атаходжаев И, Игнатьев П, Индукаев К, Осипов П. Лазерная интерференционная микроскопия для нанотехнологий. Фотоника. 2012;32(2):52–5.





14. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тychинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. Вестник последипломного медицинского образования. 2009;(3–4):64–8.
15. Меньшиков ВВ, Долгов ВВ, ред. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. В 2 томах. Том 1. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012. 928 с.
16. Cook GM. Glycobiology of the cell surface: Its debt to cell electrophoresis 1940–65. *Electrophoresis*. 2016;37(11):1399–406. doi: 10.1002/elps.201500476.
17. Сергунова ВА, Черняев АП, Козлов АП, Близняк УА, Борщеговская ПЮ, Козлова ЕК, Черныш АМ. Наноструктура мембран эритроцитов при интоксикации крови. Исследование с помощью атомной силовой микроскопии. Альманах клинической медицины. 2016;44(2):234–41. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241.
18. Rodnenkov OV, Luneva OG, Ulyanova NA, Maksimov GV, Rubin AB, Orlov SN, Chazov EI. Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure. *Pathophysiology*. 2005;11(4):209–13. doi: 10.1016/j.pathophys.2004.12.001.
19. Браже АР, Браже НА, Сосновцева ОВ, Павлов АН, Мозекильде Э, Максимов ГВ. Исследование клеточной динамики с помощью интерференционной микроскопии с применением вейвлет-анализа. Компьютерные исследования и моделирование. 2009;1(1):77–83.
20. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Borshegovskaya PY, Bliznjuk UA, Rysaeva RM, Gudkova OY. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J Crit Care*. 2010;25(3):539.e1–12. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007.
21. Макшанова ГП, Устьянцева ИМ, Петухова ОВ, Агаджанян ВВ. Изменение проницаемости эритроцитарных мембран и показателей липидного обмена у больных с политравмой при раннем и отсроченном оперативном лечении. Физиология человека. 2003;29(1):95–9.
22. Калый ВВ. Состояние синтеза и метаболизма глюкокортикоидных гормонов у больных раком гортани молодого возраста. Сибирский медицинский журнал (Томск). 2010;25(1):15–6.
1. Paltsev MA, Belushkina NN. Translational medicine – a new stage of molecular medicine development. *Molecular Medicine*. 2012;(4):3–6. Russian.
2. Kolbin AS, Gapeshin RA, Malyshev SM. Modern approaches to the organization of translational research. *Pediatric Pharmacology*. 2014;11(3):15–9. Russian. doi: 10.15690/pf.v11i3.1002.
3. Popescu G, Park Y. Quantitative phase imaging in biomedicine. *J Biomed Opt*. 2015;20(11):111201. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111201.
4. Fedin AI, Vasilenko IA, Badalyan KR. The effect of cholesterol on the electrokinetic properties of erythrocyte membranes in chronic cerebral ischemia. *Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2015;115(Special Issue 9):30–7. Russian.
5. Antipenko EA, Deryugina AV, Gustov AV. Effects of nonspecific cytoprotective treatment on stress resistance and compensatory potential in patients with chronic cerebral ischemia. *Neurosci Behav Physi*. 2017;47(7):817–20. doi: 10.1007/s11055-017-0474-3.
6. Bojarinov GA, Deryugina AV, Jakovleva EI, Zajcev RR, Shumilova AV, Bugrova ML, Bojarinova LV, Filippenko ES, Solov'eva OD. Pharmacological correction of microcirculation in rats suffered a traumatic brain injury. *Tsitologiya*. 2016;58(8):610–7. Russian.
7. Krylov VN, Deryugina AV, Pleskova SN. Electrophoretic mobility and morphometry of the rat erythrocytes at the stress effects. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. 2010;(4):23–6. Russian.
8. Starodumov VL, Kalinina NG, Gorbunov VA. Status of erythrocyte membranes as an indicator of environmental lead exposure abstract. *Bulletin of the Ivanovo Medical Academy*. 2013;18(4):16–9. Russian.
9. Sashenkov SL, Alacheva LV. Reactivity of peripheral erythron children with inflammatory respiratory system. *Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology*. 2014;(6):123–31. Russian.
10. Veshapidze N, Chigogidze T, Managadze L, Gabunia N, Kotrikadze N. Dynamics of the structural and electrical characteristics of erythrocytes in men with metastatic adenocarcinoma of the prostate before and after plastic orchiectomy. *Georgian Med News*. 2007;(153):11–4.
11. Deryugina AV, Shumilova AV, Filippenko ES, Galkina YV, Simutis IS, Boyarinov GA. Functional and biochemical parameters of erythrocytes during mexicor treatment in posttraumatic period after experimental blood loss and combined traumatic brain injury. *Bull Exp Biol Med*. 2017;164(1):26–9. doi: 10.1007/s10517-017-3918-4.
12. Deryugina AV, Boyarinov GA, Simutis IS, Nikol'skiy VO, Kuznetsov AB, Efimova TS. Correction of metabolic indicators of erythrocytes and the structure of myocardium after acute blood loss using an ozonized erythrocytal mass. *Tsitologiya*. 2018;60(2):89–95. Russian. doi: 10.31116/tsitol.2018.02.03.
13. Atokhodjaev A, Ignatyev I, Indukaev K, Osipov P. Laser interferometric microscopy for nanotechnologies. *Photonics*. 2012;32(2):52–5. Russian.
14. Vasilenko IA, Kardashova ZZ, Tychinskiy VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanian BYa. Cellular diagnostics: the possibilities of vital computer microscopy. *Journal of Postgraduate Medical Education*. 2009;(3–4):64–8. Russian.
15. Men'shikov VV, Dolgov VV, editors. Clinical laboratory diagnostics. National guidelines. In 2 vol. Vol. 1. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. 928 p. Russian.
16. Cook GM. Glycobiology of the cell surface: Its debt to cell electrophoresis 1940–65. *Electrophoresis*. 2016;37(11):1399–406. doi: 10.1002/elps.201500476.
17. Sergunova VA, Chernyaev AP, Kozlov AP, Bliznjuk UA, Borshchegovskaya PY, Kozlova EK, Chernysh AM. The nanostructure of erythrocyte membranes under blood intoxication: an atomic force microscopy study. *Almanac of Clinical Medicine*. 2016;44(2):234–41. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241.
18. Rodnenkov OV, Luneva OG, Ulyanova NA, Maksimov GV, Rubin AB, Orlov SN, Chazov EI. Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure. *Pathophysiology*. 2005;11(4):209–13. doi: 10.1016/j.pathophys.2004.12.001.
19. Brazhe AR, Brazhe NA, Sosnovtseva OV, Pavlov AN, Mosekilde E, Maksimov GV. Wavelet-based analysis of cell dynamics measured by interference microscopy. *Computer Research and Modeling*. 2009;1(1):77–83. Russian.
20. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Borshegovskaya PY, Bliznjuk UA, Rysaeva RM, Gudkova OY. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J Crit Care*. 2010;25(3):539.e1–12. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007.
21. Makshanova GP, Ust'yantseva IM, Petukhova OV, Agadzhanian VV. Changes in the permeability of erythrocyte membranes and lipid metabolism in patients with polytrauma in early and delayed surgical treatment. *Human Physiology*. 2003;29(1):95–9. Russian.
22. Kalyi VV. Synthesis and metabolism of glucocorticoid hormones in patients of young age groups having laryngeal cancer. *Siberian Medical Journal*. 2010;25(1):15–6. Russian.



# Translational studies of electrophoretic mobility and phase picture of erythrocytes with consideration of development of stress response during a pathological process

A.V. Deryugina<sup>1</sup> • M.N. Ivashchenko<sup>2</sup> • P.S. Ignat'ev<sup>3</sup> • A.G. Samodelkin<sup>2</sup>

**Rationale:** Modern cell diagnostic methods are in high demand during the development of new approaches in personalized medicine. Coherent phase interferometry and cell microelectrophoresis are among such methods that are being actively introduced into the diagnostic process in medical institutions. **Aim:** To substantiate the potential use of biophysical and morphodensitometrical erythrocytes parameters as criteria of treatment efficacy and course of adaptation process in patients with gastrointestinal tract disorders. **Materials and methods:** The study included 25 patients aged from 40 to 54 years (11 males and 14 females), among them 9 (36%) with gastric peptic ulcer, 3 (12%) with duodenal ulcer, 8 (32%) with acute gastritis, and 5 (20%) with acute pancreatitis. Biophysical and morphological particulars of peripheral blood erythrocytes were assessed before and after treatment using cell diagnostic techniques, such as microelectrophoresis and laser modulation interference microscopy. Also, we evaluated changes over time in routine clinical laboratory tests, such as red and white blood cell counts, hemoglobin levels, and erythrocyte sedimentation rate (ESR), and differential leukocyte counts. The control group included 10 healthy donors aged from 36 to 52 years. *In vitro* experiments were performed to assess the erythrocyte electrophoretic mobility (EPM) and morphology of erythrocytes treated with epinephrine or cortisol. **Results:** After the treatment, the patients demonstrated a decrease in their leukocyte counts (by 27%), a 2-fold increase in monocyte counts and an ESR decrease (by 10%), compared to the corresponding baseline values before treatment ( $p < 0.05$  for all comparisons). EPM increased by 12% ( $1.37$  vs.  $1.22$   $\text{mcm} \times \text{cm}/V \times \text{s}$ ,  $p < 0.05$ ). The erythrocyte pool of the patients before treatment, had a decreased proportion of discocytes, compared to that in the

control group (85.2 vs. 95.4%,  $p < 0.05$ ), increased proportions of echinocytes, stomatocytes and degenerative forms (11, 2.8 and 1%, respectively,  $p < 0.05$ ). After the treatment, the discocytes counts increased virtually up to their physiological normal range (91.3%). However, the surface of the discoid cells remained heterogeneous with multiple microspicules; this resulted in changes of electrokinetic and morphological properties of erythrocyte response to stress reaction occurring in the body. The impact of the stress effectors was confirmed in *in vitro* experiments assessing the effects of epinephrine ( $1 \times 10^{-9}$  g/mL) and cortisol ( $5 \times 10^{-7}$  g/mL) on erythrocytes. At 120 minutes of the experiment, epinephrine decreased EPM ( $1.14$  vs.  $1.24$   $\text{mcm} \times \text{cm}/V \times \text{s}$  at baseline,  $p < 0.05$ ) and increased cell sphericity. On the contrary, cortisol increased EPM ( $1.72$  vs.  $1.36$   $\text{mcm} \times \text{cm}/V \times \text{s}$ ,  $p < 0.05$ ), with non-significant echinocytic transformation. **Conclusion:** Biophysical and morphodensitometric parameters of red blood cells obtained with the use of current express methods of cell microelectrophoresis and coherent interference microscopy help to objectivize the intensity of stress response during a pathological process and activation of adaptation mechanisms during the treatment.

**Key words:** erythrocytes, microelectrophoresis, coherent phase interference microscopy, gastrointestinal tract disorders

**For citation:** Deryugina AV, Ivashchenko MN, Ignat'ev PS, Samodelkin AG. Translational studies of electrophoretic mobility and phase picture of erythrocytes with consideration of development of stress response during a pathological process. Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(8):765–71. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-765-771.

Received 22 February 2018;  
accepted 22 November 2018

## Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Funding

The study was performed under financial support from the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) for the research project No 18-016-00195.

**Anna V. Deryugina** – ScD in Biology, Head of the Chair of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>

**Marina N. Ivashchenko** – PhD in Biology, Associate Professor, Chair of Physiology and Biochemistry of Animals<sup>2</sup>

✉ 97 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603107, Russian Federation. Tel.: +7 (831) 462 66 56. E-mail: mi11207@rambler.ru

**Pavel S. Ignat'ev** – PhD in Physics and Mathematics, Chief Designer<sup>3</sup>

**Aleksandr G. Samodelkin** – ScD in Biology, Professor, Head of the Chair of Physiology and Biochemistry of Animals<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Agricultural Academy; 97 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603107, Russian Federation

<sup>3</sup>JSC "Production Association "Ural Optical and Mechanical Plant named after Mr. E.S. Yalamov" (UOMZ); 33 B Vostochnaya ul., Ekaterinburg, 620100, Russian Federation



Оригинальная статья

# Изменения спектральных характеристик плазмы при контакте венозной крови человека с гранулированными сорбентами *in vitro*

Буркова Н.В.<sup>1</sup> • Киричук О.П.<sup>1,2</sup> • Романчук Е.В.<sup>2</sup> • Даванков В.А.<sup>3</sup> • Постнов В.Н.<sup>1,4</sup> • Кузнецов С.И.<sup>1</sup>

**Актуальность.** При проведении гемосорбции важно не только исследовать сорбционные и активационные характеристики гемоконтактных препаратов, но и оценить, какое влияние оказывают сорбенты на гомеостатические параметры крови. По степени изменения оптической плотности плазмы крови на длинах волн, соответствующих пикам поглощения гемоглобина (414, 544 и 577 нм), можно судить об интенсивности гемолиза. **Цель** – оценить влияние контакта трех гранулированных сорбентов (СКТ-6А ВЧ, СПС, Силохром С-120) с венозной кровью человека *in vitro* на изменения спектральных характеристик плазмы крови. **Материал и методы.** Гемоконтактное взаимодействие проводили в стендовых условиях с использованием донорской крови в ротационном режиме. Пробы крови брали до начала эксперимента и через 5, 20, 40 и 60 минут. Спектроскопические исследования проводили в видимой области света (300–700 нм) на спектрофотометре UNICO 2802(S).

**Результаты.** Взаимодействие сорбента СКТ-6А ВЧ с кровью вызывало уменьшение оптической плотности плазмы на длине волны 540 нм по сравнению с исходными данными уже через 5 минут эксперимента на 17,3% ( $p < 0,05$ ). Снижение показателей оптической плотности при контакте крови с СПС в течение срока наблюдения составило от 2,6 до 12,1% ( $p < 0,05$ ). Сорбционная активность СКТ-6А ВЧ и СПС преобладала над лизирующими свойствами. Показатели процентного изменения оптической плотности сорбента Силохром С-120 при контакте с кровью, напротив, возросли от 25,6 до 38,3% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало о гемолизе на данном препарате. Исследуемые сорбенты, вызывающие при контакте с кровью увеличение степени гемолиза, можно расположить в следующем порядке: СПС < СКТ-6А ВЧ < Силохром С-120. **Заключение.** Апробированные сорбенты СКТ-6А ВЧ и СПС могут быть использованы в качестве гемоконтактных препаратов при проведении малообъемной

гемоперфузии. Для практического использования в клинике наиболее перспективен препарат СПС. Сорбент Силохром С-120 требует проведения химической модификации для улучшения свойств гемосовместимости.

**Ключевые слова:** контактная активация крови, углеродный сорбент, сверхсшитый полистирол, гемосовместимость, гемолиз, клеточные популяции крови, спектральные характеристики плазмы крови

**Для цитирования:** Буркова НВ, Киричук ОП, Романчук ЕВ, Даванков ВА, Постнов ВН, Кузнецов СИ. Изменения спектральных характеристик плазмы при контакте венозной крови человека с гранулированными сорбентами *in vitro*. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):772–777. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-772-777.

Поступила 31.10.2018;  
принята к публикации 29.11.2018

Одно из необходимых условий использования изделий медицинского назначения для проведения эфферентной терапии (в частности, гемосорбции) в клинике – их гемосовместимость. Важным показателем совместимости сорбентов с кровью считается гемолиз эритроцитов, который обычно оценивают по максимуму поглощения на длинах волн, характерных для гемоглобина. Все гемосорбенты должны быть проанализированы по этому показателю. Наряду с сорбционным эффектом контактное взаимодействие крови с сорбентами включает механизмы твердофазной контактной гемомодуляции, то есть механизмы развития активационных процессов в гуморальных и клеточных системах крови, что приводит к изменению общего эффекторно-регуляторного потенциала активированной крови и повышению эффективности ее воздействия на патологический

**Буркова Наталья Владимировна** – д-р биол. наук, доцент, профессор лечебного факультета Института медицинского образования, вед. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментальной биомоделирования Института экспериментальной медицины<sup>1</sup>  
✉ 194156, г. Санкт-Петербург, пр-т Пархоменко, 15, Российская Федерация. Тел.: +7 (921) 384 05 07. E-mail: n.burk@list.ru

процесс [1]. Данный принцип лежит в основе новой медицинской технологии – малообъемной гемоперфузии, которая не имеет аналогов в мировой практике. Методы целевой и регионарной малообъемной гемоперфузии доказали свою эффективность при лечении некоторых заболеваний [2]. В настоящее время проводятся работы по поиску и конструированию гемоконтактных препаратов (сорбентов), которые должны проявлять максимальное активационное (и желательное разнонаправленное) воздействие на клеточные и гуморальные системы крови и не должны оказывать негативного влияния на кровь человека. Предварительные исследования показали, что длительный контакт сорбентов с кровью приводит к гемолизу эритроцитов различной степени интенсивности [3]. Гемолиз эритроцитов сопровождается выделением в плазму крови молекул гемоглобина. По степени изменения оптической



плотности плазмы на длинах волн, соответствующих пику поглощения гемоглобина, можно судить об интенсивности гемолиза [4]. В данной работе были исследованы изменения оптической плотности плазмы крови при длительном (60 минут) контакте крови человека с гранулированными сорбентами *in vitro*.

Цель исследования – оценить влияние контакта трех гранулированных сорбентов (СКТ-6А ВЧ, СПС, Силохром С-120) с венозной кровью человека *in vitro* на изменения спектральных характеристик плазмы крови.

## Материал и методы

В стендовых условиях исследовали влияние контакта крови с различными по физико-химической структуре гранулированными сорбентами на гемолиз эритроцитов. В эксперименте использовали венозную кровь здоровых доноров, которую получали на станции переливания крови ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Кровь забирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с гепарином лития в объеме 9 мл.

В работе были исследованы три сорбента:

1. СКТ-6А ВЧ – медицинский углеродный адсорбент высокой чистоты, разрешенный к применению в клинической практике в качестве гемосорбента и гемоактиватора при процедуре малообъемной гемоферфузии [5].

2. СПС (сверхсшитый полистирол марки MN) – гранулы темно-коричневого цвета размером 0,3–1,2 мм. Удельная поверхность 800–1000 м<sup>2</sup>/г, суммарный объем пор – 1–1,1 мл/г. Поры двух типов: транспортные диаметром 80 нм и нанопоры диаметром 1–3 нм. Полимер нейтрален, не содержит функциональных групп, имеет гидрофобную поверхность, не меняет объема в средах в интервале рН 1–14 независимо от ионной силы раствора.

3. Силохром С-120 – гранулы белого цвета неправильной формы размером 0,3–0,5 мм. Удельная поверхность гранул – 130 м<sup>2</sup>/г, размер пор – 28 нм.

*Этическая экспертиза.* Получено заключение этического комитета ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России: «Одобрить проведение исследований по протоколу проекта «Апробация сверхсшитого полистирола (марки MN) и силикагелей (Силохрома С-120 и КСК-2)

### Киричук Оксана

**Петровна** – лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины<sup>1</sup>; студентка кафедры медицинской физики<sup>2</sup>

### Романчук Елизавета

**Вячеславовна** – студентка кафедры медицинской физики<sup>2</sup>

### Даванков Вадим

**Александрович** – д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией стереохимии сорбционных процессов<sup>3</sup>

### Постнов Виктор

**Николаевич** – канд. хим. наук, доцент, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории нанотехнологий Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины<sup>1</sup>; доцент кафедры химии твердого тела<sup>4</sup>

### Кузнецов Сергей

**Иванович** – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины<sup>1</sup>

в качестве гемоконтактных препаратов в стендовых условиях на базе Центра» (протокол № 154 от 10.10.2016).

На углеродном сорбенте СКТ-6А ВЧ было выполнено 20 экспериментов, на СПС и Силохроме С-120 – по 10 экспериментов. Стендовые эксперименты проводили в гемоконтактных одноразовых шприц-колонках объемом 20 мл. В шприц помещали фильтр из нетканого материала и капроновую сетку, которые плотно фиксировали у торцевой поверхности прижимным кольцом. В колонки загружали гемоконтактные препараты, хранящиеся в 20% растворе этанола, в объеме 1,8–2 мл. Перед началом работы из колонок удаляли раствор этанола, гемоконтактные препараты промывали 3 раза стерильным физиологическим раствором (1:10), а затем еще 3 раза физиологическим раствором с гепарином (20 ед/мл). После этого в шприц-колонку забирали гепаринизированную донорскую кровь из вакуумной пробирки из расчета «сорбент – кровь» 1:4. Предварительно из этой же пробирки отбирали пробу крови «до контакта». Загруженные кровью шприцы-колонки помещали в горизонтальном положении на роторную мешалку и включали вращение. Эксперименты проводили в течение 60 минут при комнатной температуре в постоянном ротационном режиме. Для проведения исследований пробы крови забирали из колонки через 5, 20, 40 и 60 минут от начала контакта с сорбентом в объеме 1,8–2 мл в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Далее цельную кровь центрифугировали в течение 10 минут при скорости 3500 об/мин на лабораторной центрифуге Thermo Scientific SL 16 и отделяли плазму крови от форменных элементов. Плазму крови разводили в пропорции «кровь – физиологический раствор» 1:29. Спектроскопические исследования проводились в видимой области света (300–700 нм) на спектрофотометре UNICO 2802(S).

Гемолитическую активность (ГА) сорбентов оценивали в процентах по изменению оптической плотности в постконтактных пробах относительно оптической плотности на соответствующих длинах волн в пробах до контакта. Числовые значения рассчитывали по формуле:

$GA = (A - B) / B \times 100\%$ , где А – оптическая плотность в исследуемых (постконтактных) пробах на соответствующих длинах волн, В – оптическая

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России; 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»; 195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН; 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 28, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (институт химии); 198504, г. Санкт-Петербург, г. Петергоф, Университетский пр-т, 26, Российская Федерация



плотность нативной плазмы без контакта с сорбентами (проба «до») на тех же длинах волн [6].

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием прикладных пакетов Statistica 7.0 для Windows и Excel 2013. Статистически значимые изменения показателей внутри групп оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для попарно связанных выборок и критерия Вилкоксона для парных сравнений, статистически значимые различия показателей между группами – с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок и U-критерия Манна – Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля): Me (25%; 75%). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах для всех трех гемоконтактных препаратов были исследованы спектры плазмы крови в диапазоне длин волн 300–700 нм. Для этого были выбраны пробы, в которых плазма визуально имела наиболее выраженный гемолиз. Это позволило выявить длины волн, на которых идет максимум поглощения. Дальнейшие исследования всех образцов плазмы проводили только на этих длинах волн, а не по всему спектру волн видимого диапазона. На рис. 1 представлены спектры плазмы крови в пробах «до» контакта с сорбентом СКТ-6А ВЧ и в пробах «5 минут» и «60 минут» после контакта (точки «20 минут» и «40 минут» на рисунках не отражены, поскольку они малоинформативны). На каждом из трех спектров наблюдали резкий максимум поглощения на длине волны около

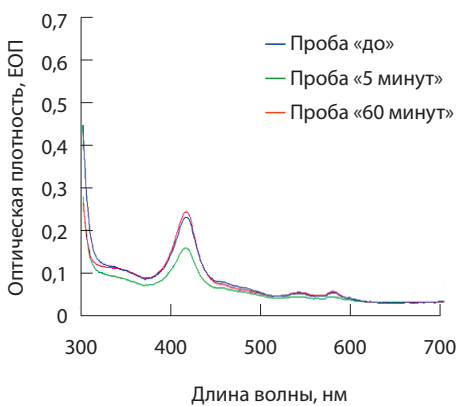
414 нм. Этот максимум – отличительный признак порфиринового ядра, характерный для молекулы гемоглобина [7]. Сравнивая с пробой «до», можно отметить, что спектр пробы «5 минут» практически не отличался от нее, а в пробе «60 минут» наблюдалось значительное увеличение оптической плотности в максимуме на 414 нм ( $p < 0,05$ ).

Спектры плазмы крови, контактировавшей с сорбентом СПС, имели максимумы на длине волны 414 нм (рис. 2).

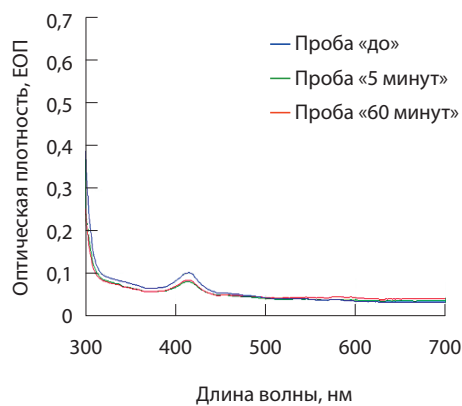
При этом значения оптической плотности в пробах «до», «5 минут» и «60 минут» практически не различались. Пики поглощения в диапазоне 540–580 нм отсутствовали. Согласно данным литературы, спектр поглощения молекулы гемоглобина в оксиформе состоит из трех главных полос: 414 нм (полоса Core), 542–544 нм ( $\beta$ -полоса) и 576–578 нм ( $\alpha$ -полоса) [7]. Следовательно, можно полагать, что при пробе «60 минут» в плазме крови появляются молекулы оксигемоглобина. Нарастание концентрации оксигемоглобина в венозной крови связано с присутствием в колонке атмосферного воздуха, из которого кровь насыщается кислородом и постепенно артерируется, то есть увеличивается парциальное давление кислорода в крови. Других пиков поглощения в растворе плазмы обнаружено не было, что позволяет говорить об отсутствии в этих пробах дезокси- (полосы поглощения на 429 и 556 нм) и карбокси-форм гемоглобина (пики поглощения на 540 и 570 нм) [8].

Более выраженный эффект наблюдался в спектрах плазмы крови после контакта с Силохромом С-120 (рис. 3).

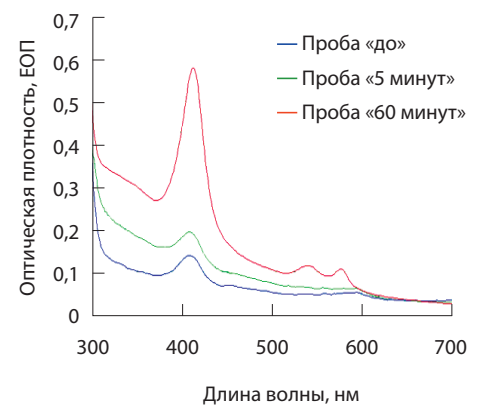
В спектре, соответствующем пробе «до», присутствовал только пик поглощения,



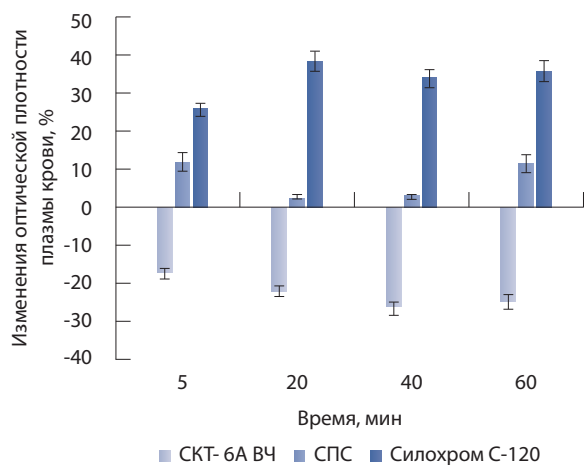
**Рис. 1.** Изменения оптической плотности плазмы крови человека в диапазоне длин волн 300–700 нм при контакте с сорбентом СКТ-6А-ВЧ в пробах «до», через «5 минут» и «60 минут» после начала эксперимента



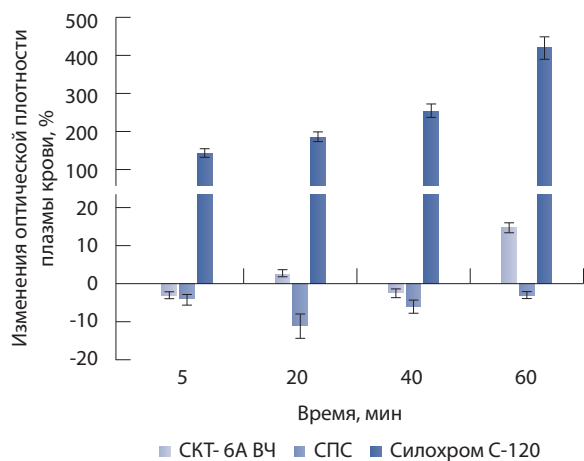
**Рис. 2.** Изменения оптической плотности плазмы крови человека в диапазоне длин волн 300–700 нм при контакте с сорбентом СПС в пробах «до», через «5 минут» и «60 минут» после начала эксперимента



**Рис. 3.** Изменения оптической плотности плазмы крови человека в диапазоне длин волн 300–700 нм при контакте с сорбентом Силохром С-120 в пробах «до», через «5 минут» и «60 минут» после начала эксперимента



**Рис. 4.** Изменения оптической плотности плазмы крови (%) на длине волны 540 нм при контакте с сорбентами СКТ-6А ВЧ, СПС и Силохром С-120 в течение 60 минут



**Рис. 5.** Изменения оптической плотности плазмы крови (%) на длине волны 414 нм при контакте с сорбентами СКТ-6А ВЧ, СПС и Силохром С-120 в течение 60 минут

соответствующий полосе Сорс, а  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосы отсутствовали. С увеличением времени проведения экспериментов увеличивалась абсорбция на длине волны 414 нм, а также появлялись пики поглощения, соответствующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосам. Следовательно, для оценки гемолитической активности сорбентов важно учитывать максимумы поглощения на длинах волн, характерных для поглощения оксигемоглобина: 414, 544 и 577 нм.

Дальнейшие эксперименты позволили оценить степень гемолиза эритроцитов при контактном взаимодействии крови с сорбентами. Измерения оптической плотности проводили на длинах волн, наиболее часто используемых специалистами для оценки гемолиза и соответствующих пикам поглощения гемоглобина (414 и 540 нм). Анализ полученных спектров на длине волны 540 нм (рис. 4) показал, что контакт сорбента СКТ-6А ВЧ с кровью вызывал уменьшение оптической плотности плазмы в пробах «5 минут» по сравнению с пробой «до» на 17,3% ( $p < 0,05$ ).

В отрицательном диапазоне также находились аналогичные показатели в других точках исследования, причем различия между ними не были существенными. Необходимо отметить, что все исследованные гемоконтактные препараты обладают выраженными сорбционными свойствами, а СПС и СКТ-6А ВЧ представляют собой гемосорбенты, которые способны сорбировать многие макромолекулы, в том числе и гемоглобин. В этой связи результирующий показатель будет складываться из способности гранул лизировать эритроциты и сорбировать их содержимое (гемоглобин). При исследовании СКТ-6А ВЧ очевидно, что сорбционная активность несколько преобладает над лизирующими свойствами угля и остается сбалансированной на протяжении всего эксперимента. Исследуемые показатели на двух других сорбентах находились в диапазоне выше нуля (см. рис. 4).

Диапазон изменения величины оптической плотности при контакте крови с СПС варьировал от 2,6 до 12,1%. В пробе «5 минут» процент оптической плотности был равен 12,1%, а в пробах «20 минут» и «40 минут» начинали превалировать сорбционные процессы, и только к концу эксперимента показатели составляли 11,6%. Следовательно, для сорбента СПС характерно преобладание сорбционной активности, а лизирующий эффект минимален. Силохром С-120 при контакте с кровью был более «агрессивен» по отношению к эритроцитам: показатели процентного изменения оптической плотности возрастали от 25,6 до 38,3% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало о гемолизе на данном сорбенте.

Еще более значительные изменения регистрировали в плазме при контакте Силохрома С-120 с кровью на длине волны 414 нм (рис. 5). Уже в пробе «5 минут» прирост показателей оптической плотности составил 144,4% ( $p < 0,05$ ), а в пробе «60 минут» – 418,5% ( $p < 0,05$ ). На других сорбентах данные показатели практически не изменялись. Для СПС характерно преобладание сорбционных свойств сорбента, регистрируемых на этой длине волны. Во всех реперных точках показано снижение процента изменений оптической плотности, которые регистрировались в отрицательной зоне.

На углеродном сорбенте СКТ-6А ВЧ в начале эксперимента фиксировали отрицательные показатели, а к пробе «60 минут» показатели оптической плотности достигали 14,9%, что свидетельствовало о преобладании сорбционной активности над лизирующим эффектом.

Таким образом, предварительные эксперименты показали, что при оценке гемолитической активности сорбентов важно обращать



внимание на максимумы поглощения на длинах волн, характерных для оксигемоглобина: 414, 544 и 577 нм. Исследуемые нами сорбенты, вызывающие увеличение степени гемолиза, можно расположить в следующем порядке: СПС < СКТ-6А ВЧ < Силохром С-120.

Наиболее перспективным для использования в клинической практике можно считать СПС, так как его контакт с кровью практически не вызывает гемолиза эритроцитов. Кроме того, он обладает активационными свойствами по отношению к гуморально-клеточным компонентам системы крови [3]. СКТ-6А ВЧ – сорбент, который уже прошел клиническую апробацию и зарекомендовал себя как активационный препарат при использовании метода малообъемной гемоперфузии [5]. В ряде клиник Санкт-Петербурга при его применении для целевой и регионарной малообъемной гемоперфузии получен выраженный лечебный эффект у пациентов с критической ишемией и термическими поражениями нижних конечностей, диабетической стопой, воспалительными и гнойно-некротическими заболеваниями пальцев и кисти [2]. Однако были выявлены и недостатки СКТ-6А ВЧ: углеродные гранулы хрупкие и «пылят», а также имеют низкие модификационные свойства поверхности, что делает невозможным получение на его основе новых селективных гемоконтактных препаратов. Силохром С-120 также можно рассматривать как потенциальный гемоконтактный препарат для малообъемной гемоперфузии. Необходимым условием его дальнейшего эффективного использования считаем определенную химическую модификацию для баланса лизирующих и сорбционных свойств.

Известно, что взаимодействие крови с твердофазными (гранулированными) препаратами

вне организма в гемоконтактном устройстве изменяет ее физико-химические параметры, вызывает образование ряда биоактивных регуляторных и эффекторных структур [3]. Можно утверждать, что проведение целевой химической модификации поверхности матриц различных сорбентов для придания им специфических свойств позволит создать линейку гемоконтактных препаратов, не только обладающих высокими сорбционными качествами, но и способных индуцировать заданный спектр биологической активности в крови.

## Заключение

Предварительные эксперименты показали, что по динамике оптической плотности плазмы крови человека в исследуемых участках спектра можно косвенно судить об изменении концентрации гемоглобина в плазме и, следовательно, о степени гемолиза эритроцитов крови при контакте с сорбентом. СКТ-6А ВЧ и СПС продемонстрировали высокую сорбционную активность, преобладающую над их литическими свойствами, и могут быть рекомендованы в качестве гемоконтактных препаратов для клинического применения с целью качественного и количественного изменения биоактивных субстанций крови. Сорбент Силохром С-120 требует проведения дополнительной химической модификации его поверхности для улучшения показателей совместимости. Эффективность использования указанных препаратов в клинической практике при проведении малообъемной гемоперфузии можно будет констатировать после дальнейших исследований их активационных свойств, которые позволят оценить спектр индуцируемых ими в крови биоактивных соединений. ☺

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

## Литература

1. Кузнецов СИ. Практические аспекты принципа твердофазной контактной активации крови. Успехи современного естествознания. 2006;(2):31–2.
2. Кузнецов СИ, Буркова НВ, Тюкавин АИ. Контактная твердофазная гемомодуляция. Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. 2013;(6): 28–33.
3. Кузнецов СИ, Киричук ОП, Буркова НВ, Даванков ВА, Постнов ВН, Литвиненко ЕВ. Реакция клеточных элементов крови на контакт с гранулированными сверхшитым полистиролом и кремнеземами. Трансляционная медицина. 2017;4(4):43–55. doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-4-43-55.
4. Pan T, Huang W, Liu Z, Yao L. Near-infrared spectroscopic analysis of hemoglobin with stability based on human hemolysates samples. American Journal of Analytical Chemistry. 2012;3(1): 19–23. doi: 10.4236/ajac.2012.31004.
5. Багненко СФ, Курыгин АА, Киселев ВА, Нохрин СП, Кузнецов СИ, Джурко БИ, Крещер ИВ, Буркова НВ. Лечение критической ишемии нижних конечностей методом целевой малообъемной гемоперфузии. Методические рекомендации. СПб.: Изд-во НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе; 2003. 7 с.
6. Анисимова НЮ, Должикова ЮИ, Даванков ВА, Пастухов АВ, Миляева СИ, Сенатов ФС, Киселевский МВ. Гемосо-
- вместимость наносорбентов на основе сверхшитых полимеров стирола серии Стиросорб. Российский биотерапевтический журнал. 2012;11(1):23–7.
7. Кривенцев ЮА, Никулина ДМ. Биохимия: строение и роль белков гемоглобинового профиля М.: Юрайт; 2018. 73 с.
8. Кузнецов СИ, Киричук ОП, Буркова НВ, Топко АА, Даванков ВА, Постнов ВН, Литвиненко ЕВ. Влияние контакта венозной крови человека с сорбентами in vitro на ее некоторые физико-химические параметры. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018;17(1):50–60. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-1-50-60.



## References

1. Kuznetsov SI. Practical aspects of the principle of solid-phase contact activation of blood. *Advances in Current Natural Sciences*. 2006;(2): 31–2. Russian.
2. Kuznetsov SI, Burkova NV, Tyukavin AI. Solid-phase contact hemomodulation. *Bulletin of Almazov National Medical Research Centre*. 2013;(6):28–33. Russian.
3. Kuznetsov SI, Kirichuk OP, Burkova NV, Davankov VA, Postnov VN, Litvinenko EV. Reaction of the cellular elements of the blood to the contact with the granulated hypercross-linked polystyrene and silica. *Translational Medicine*. 2017;4(4):43–55. Russian. doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-4-43-55.
4. Pan T, Huang W, Liu Z, Yao L. Near-infrared spectroscopic analysis of hemoglobin with stability based on human hemolysates samples. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2012;3(1):19–23. doi: 10.4236/ajac.2012.31004.
5. Bagnenko SF, Kurygin AA, Kiselev VA, Nokhrin SP, Kuznetsov SI, Dzhurko BI, Kretser IV, Burkova NV. Treatment of critical ischemia of lower extremities by targeted low volume hemoperfusion. A guideline. Saint Petersburg: Janelidze St. Petersburg Research Institute; 2003. 7 p.
6. Anisimova NYu, Dolzhikova YuI, Davankov VA, Pastukhov AV, Miljaeva SI, Senatov FS, Kiselevsky MV. Hemocompatibility of nanostructured sorbents based on hypercrosslinked styrene polymers of the Styrosorb series. *Russian Journal of Biotherapy*. 2012;11(1):23–7. Russian.
7. Kriventsev YuA, Nikulina DM. *Biochemistry: the structure and role of hemoglobin profile proteins*. Moscow: Yurayt; 2018. Russian.
8. Kuznetsov SI, Kirichuk OP, Burkova NV, Topko AA, Davankov VA, Postnov VN, Litvinenko EV. The impact of the contact of venous human blood with sorbents on some of blood physicochemical parameters in vitro. *Regional Blood Circulation and Microcirculation*. 2018;17(1):50–60. Russian. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-1-50-60.

## Changes in plasma spectral characteristics during the *in vitro* contact of human venous blood with granulated sorbents

N.V. Burkova<sup>1</sup> • O.P. Kirichuk<sup>1,2</sup> • E.V. Romanchuk<sup>2</sup> • V.A. Davankov<sup>3</sup> • V.N. Postnov<sup>1,4</sup> • S.I. Kuznetsov<sup>1</sup>

**Rationale:** During hemosorption procedures, it is important to investigate not only the sorption and activation characteristics of hemocontact agents, but also to assess the effect of sorbents on the parameters of blood homeostasis. The intensity of hemolysis can be judged by the degree of changes in optical density of blood plasma at wavelengths corresponding to the peak absorption of hemoglobin (414, 544 and 577 nm). **Aim:** To assess the effect of three granular sorbents (SKT-6A, HPS, Silochrome C-120) contacting human venous blood *in vitro* on changes in plasma spectral characteristics. **Materials and methods:** The blood contact was modeled at bench conditions with the use of donated blood at rotating mode. Blood samples were drawn before the experiment and after 5, 20, 40, and 60 minutes. Spectroscopic assessment was performed in the visible light range (300–700 nm) with UNICO 2802(S) spectrophotometer. **Results:** The interaction of the SKT-6A sorbent with blood resulted in a 17.3% decrease in the plasma optical density at a wavelength of 540 nm, compared to baseline, as soon as at 5 minute of the experiment ( $p < 0.05$ ). The decline in optical density imposed by the blood contact with HPS ranged from 2.6 to 12.1% ( $p < 0.05$ ) during the observation period. The sorption activity of SKT-6A and HPS prevailed over their lytic properties. On the contrary, the

percentage change in the optical density of the Silochrome C-120 sorbent during its blood contact increased from 25.6 to 38.3% ( $p < 0.05$ ), indicating that this sorbent was inducing hemolysis. The sorbents tested can be arranged as follows according to their ability to induce hemolysis during their contact with blood: HPS < SKT-6A < Silochrome C-120. **Conclusion:** The tested SKT-6A and HPS sorbents can be used as blood-contact agents for the low volume hemoperfusion. The HPS agent seems to be the most promising for routine clinical use. The Silochrome C-120 sorbent requires some chemical modification to improve its properties of hemocompatibility.

**Key words:** contact blood activation, carbon sorbent, hypercross-linked polystyrene, hemocompatibility, hemolysis, blood cell populations, plasma spectral characteristics

**For citation:** Burkova NV, Kirichuk OP, Romanchuk EV, Davankov VA, Postnov VN, Kuznetsov SI. Changes in plasma spectral characteristics during the *in vitro* contact of human venous blood with granulated sorbents. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):772–7. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-772-777.

Received 31 October 2018; accepted 29 November 2018

**Natal'ya V. Burkova** – PhD, ScD in Biology, Associate Professor, Professor of Medical Faculty, Institute of Medical Education; Leading Research Fellow, Research Laboratory for Bioprosthesis and Cardioprotection, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine<sup>1</sup>  
 ✉ 15 Parkhomenko prospekt, Saint Petersburg, 194156, Russian Federation. Tel.: +7 (921) 384 05 07. E-mail: n.burk@list.ru

**Oksana P. Kirichuk** – Assistant Researcher, Laboratory of Bioprosthesis and Cardioprotection, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine<sup>1</sup>; Student, Chair of Medical Physics<sup>2</sup>

**Elizaveta V. Romanchuk** – Student, Chair of Medical Physics<sup>2</sup>

**Vadim A. Davankov** – PhD, ScD in Chemistry. Sci., Professor, Head of the Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes<sup>3</sup>

**Victor N. Postnov** – PhD in Chemistry. Sci., Associate Professor, Senior Research Fellow, Research Laboratory of Nanotechnologies, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine<sup>1</sup>; Associate Professor, Chair of Solid State Chemistry<sup>4</sup>

**Sergey I. Kuznetsov** – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Research Laboratory for Bioprosthesis and Cardioprotection, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre; 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, 197341, Russian Federation

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University; 29 Politekhnicheskaya ul., Saint Petersburg, 195251, Russian Federation

<sup>3</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences; 28 Vavilova ul., Moscow, 119334, Russian Federation

<sup>4</sup> St. Petersburg State University (Institute of Chemistry); 26 Universitetskii prospekt, Peterhof, Saint Petersburg, 198504, Russian Federation

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.





Оригинальная статья

# Применение метода интерференционной микроскопии для изучения структурных характеристик дермальных фибробластов в культуре

Нефедова И.Ф.<sup>1</sup> • Россинская В.В.<sup>1</sup>

**Нефедова Ирина Феликсовна** – науч. сотр. Института экспериментальной медицины и биотехнологий<sup>1</sup>  
✉ 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 20, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (927) 264 61 21.  
E-mail: bobrovka2012@yandex.ru

**Россинская Виктория Викторовна** – канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. Института экспериментальной медицины и биотехнологий<sup>1</sup>

**Актуальность.** Применение методов электронной, атомно-силовой и конфокальной микроскопии для скрининга биологически активных соединений, изделий медицинского назначения и экспресс-диагностики ряда заболеваний на клеточном уровне связано с трудоемкой и длительной пробоподготовкой, которая не исключает возможность погрешностей измерений и возникновения артефактов. Этим недостатком лишен метод модуляционной интерференционной микроскопии, позволяющий осуществлять неинвазивные исследования клеточной структуры, получать изображение с нанометровым разрешением и проводить анализ оптических свойств объекта. **Цель** – оценить возможность использования метода интерференционной микроскопии при изучении морфофункциональных характеристик ядер клеток в культуре на примере дермальных фибробластов при воздействии митомицином *in vitro*. **Материал и методы.** Нативную культуру дермальных фибробластов человека 6-го пассажа, выращенную на стекле с зеркальным напылением в лаборатории культуры клеток Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, исследовали при помощи модуляционного интерференционного микроскопа МИМ-340 (АО «ПО «УОМЗ», Россия). Оценивали динамику структурных характеристик ядер дермальных фибробластов при воздействии митомицином в условиях *in vitro*. Контрольную группу составила культура фибробластов, культивируемая в аналогичных условиях на стеклах с зеркальным покрытием без добавления митомицина. Исследования на МИМ-340 проводили через 3 часа, 1 сутки и 4 суток после воздействия цитостатиком. Контрольную

группу исследовали в те же сроки. **Результаты.** Показано, что культура клеток, выращенная на диэлектрических стеклах, по морфофункциональным характеристикам не отличается от культуры, выращенной на культуральном пластике. Тем самым доказана возможность изучения адгезивной культуры в нативном состоянии с использованием интерференционной микроскопии. Установлено, что на однократное воздействие митомицином 0,04% клетки отвечают изменением формы на шаровидную и резким увеличением фазовой толщины ядер (217,8 против 142,18 нм в контрольной группе,  $p \leq 0,05$ ). В последующие сроки происходит восстановление морфофункциональных характеристик клеток, что подтверждается динамикой изменений плотности культуры, формы и размеров клеток, а также фазовой толщины ядра. **Заключение.** Полученные результаты позволяют рекомендовать метод модуляционной интерференционной микроскопии для изучения токсичности и биосовместимости лекарственных средств, а также изделий медицинского назначения и физических факторов, используемых для диагностики и лечения.

**Ключевые слова:** адгезивная культура, модуляционный интерференционный микроскоп, фазовая толщина, пролиферация

**Для цитирования:** Нефедова ИФ, Россинская ВВ. Применение метода интерференционной микроскопии для изучения структурных характеристик дермальных фибробластов в культуре. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):778–83. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-778-783.

Поступила 17.04.2018;  
принята к публикации 04.12.2018

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России; 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, Российская Федерация



**В** последние годы широкое распространение в медико-биологических исследованиях получили методы электронной, атомно-силовой и конфокальной микроскопии. Среди важных приложений таких методов следует отметить скрининг биологически активных соединений, изделий медицинского назначения и экспресс-диагностику ряда заболеваний на клеточном уровне. Однако их применение связано с трудоемкой и длительной пробоподготовкой, которая, тем не менее, не исключает возможность погрешностей измерений и возникновения артефактов.

Весьма перспективным в этом контексте оказывается метод интерференционной лазерной микроскопии, разработанный на основе быстродействующих оптических профилометров нового поколения [1, 2]. Его уникальная особенность – принципиально новый алгоритм вычисления фазы отраженного от объекта волнового фронта, сочетающий в себе быстродействие методов фазовых шагов [3] и сверхразрешение фазометрических методов (метод временных интервалов) [4, 5]. Такой подход позволяет осуществлять неинвазивные исследования клеточной структуры, получать изображение с нанометровым разрешением и проводить анализ оптических свойств объекта [3, 6], максимально исключая погрешности и присутствие артефактов. Модуляционная интерференционная микроскопия уже используется в изучении таких объектов, как клетки крови, опухольевые клетки, нейрон-глиальная сеть, а также бактерии и споры микроорганизмов [7–11].

Скрининг лекарственных препаратов, материалов, физических факторов диагностики и лечения часто проводится на адгезивных клетках. Для проведения таких тестирований разработано и используется большое количество разнообразных протоколов. Расширение комплекса методов, применяемых в этих протоколах, позволяет полнее оценить результаты тестирования. При этом предпочтение следует отдавать тем методам, которые не требуют трудоемкого подготовительного этапа. В этой связи модуляционная интерференционная микроскопия представляет большой интерес с точки зрения возможности изучать нативную культуру без использования дополнительных окрашиваний.

Цель – оценить возможность использования метода интерференционной микроскопии при изучении морфофункциональных характеристик ядер клеток в культуре на примере

дермальных фибробластов при воздействии митомицином *in vitro*.

## Материал и методы

Разработанный АО «ПО «УОМЗ» (Россия) модуляционный интерференционный микроскоп МИМ-340 был передан Институту экспериментальной медицины и биотехнологий (ИЭМБ) ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России в рамках договора о временном безвозмездном пользовании в целях адаптации данного прибора для проведения медико-биологических исследований (Договор № А0104 от 04.05.2015).

Предметом исследования была культура дермальных фибробластов человека 6-го пассажа, выращенная в лаборатории культуры клеток Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Лаборатория соответствует требованиям GMP и GLP, оснащена комплексом «чистых помещений» класса Б, в которых размещено необходимое оборудование, позволяющее создавать зоны чистоты класса А согласно ГОСТ Р ИСО 14644.

Первичный материал получали у доноров с соблюдением всех требований биоэтики после подписания информированного согласия и одобрения исследования Комитетом по биоэтике ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (протокол № 184 от 03.05.2017). Фибробласты высевали в дозе  $5 \times 10^4$  кл/стекло на стерильные диэлектрические стекла ( $25 \times 76$  мм) с зеркальным покрытием, которые помещали в стерильные чашки Петри и заливали полной ростовой средой (среда 199 – 90%, эмбриональная телячья сыворотка – 10% (среда и сыворотка – ООО «БиолоТ», Россия), гентамицин – 40 мкг/мл). Культивирование проводили в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора (Sanyo – Incubator, MCO-18AC, Япония) при температуре  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  и постоянной влажности. Через 1 сутки после посева, когда клетки сформировали на стеклах диффузный монослой небольшой плотности, из чашек Петри удаляли ростовую среду и заменяли ее ростовой средой с содержанием митомицина 0,04%. Через 2 минуты среду с митомицином удаляли, стекла однократно промывали раствором Хенкса и заливали полной ростовой средой. Контрольную группу составила культура фибробластов, культивированная в аналогичных условиях на стеклах с зеркальным покрытием без добавления митомицина. Далее препараты обеих групп инкубировали в указанных выше условиях.

Исследования на МИМ-340 проводили через 3 часа, 1 сутки и 4 суток после воздействия цитостатиком. Контрольную группу исследовали в те же сроки. При помощи камеры белого света оценивали строение и характер роста фибробластов. С помощью лазера измеряли поперечные размеры ядер фибробластов и их фазовую толщину.

В эксперименте было задействовано по 12 стекол в опытной и контрольной группах (по 4 стекла на каждый срок). В каждом препарате (стекле) измеряли не менее 20 ядер фибробластов.

Результаты были представлены в виде среднего арифметического значения ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ). Для определения равнозначности сравниваемых групп использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки первого рода менее 0,05 ( $p < 0,05$ ). Статистический анализ проводили с использованием программы Excel 2010 (Microsoft corp., США).

## Результаты и обсуждение

Для проведения исследований на МИМ-340 образцы должны быть размещены на диэлектрическом стекле с зеркальным напылением. Нативные клетки крови можно наблюдать в препарате, приготовленном методом «раздавленной капли». При этом их морфологические характеристики не изменяются, чего нельзя сказать об адгезивной культуре. Наш опыт показал, что если приготовить такой препарат из суспензии фибробластов, при микроскопии визуализируются «ошаренные» клетки (рис. 1А). В препарате мы наблюдаем выпуклые клетки округлой формы с трудноразличимым ядром и оптически однородной цитоплазмой. Такая картина не характерна для нормальной адгезивной культуры. Фибробласты в культуре растут прикрепленными к субстрату, по которому распластываются и образуют монослой. При снятии с субстрата в суспензии адгезивные клетки, в том числе фибробласты, принимают компактную функциональную форму для временного приспособления к неблагоприятным условиям.

Для того чтобы получить возможность изучать нативную культуру в естественном состоянии с помощью МИМ-340, было принято решение вырастить клетки непосредственно на стекле с зеркальным напылением. Поскольку клетки *in vitro* культивируются только в стерильных условиях, а стекла поставляются

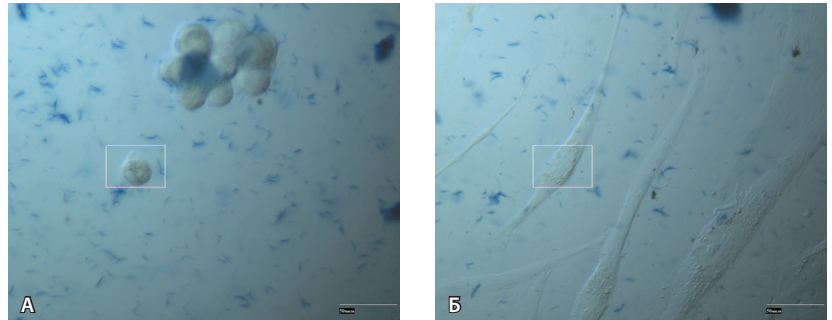


Рис. 1. Адгезивная культура фибробластов: А – в суспензии (без посева); Б – на диэлектрическом стекле, 24 часа после посадки. Камера белого света. Окраска трипановым синим

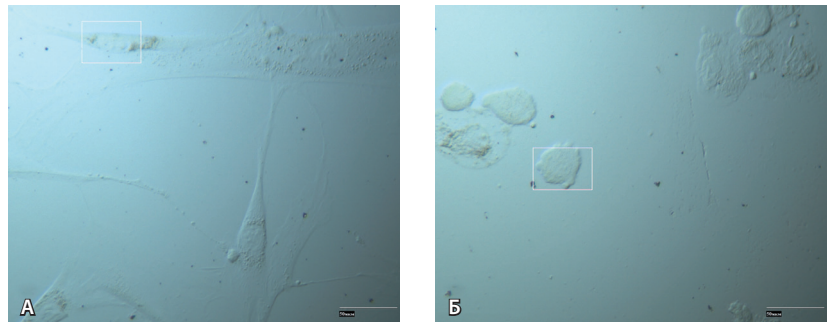


Рис. 2. Нативные фибробласты (время наблюдения – 3 часа): А – контрольная группа; Б – опытная группа (после однократного воздействия митомцином)

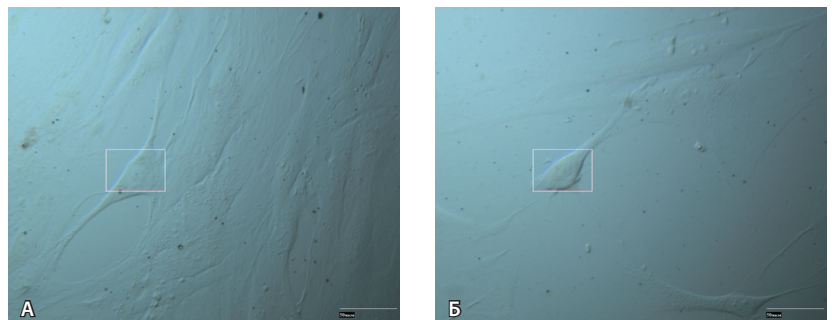


Рис. 3. Нативные фибробласты (время наблюдения – 1 сутки): А – контрольная группа; Б – опытная группа (после однократного воздействия митомцином)

нестерильными, нами был разработан метод их стерилизации [12].

После посадки непосредственно на диэлектрическое стекло клетки вели себя в принципе так же, как при посеве на культуральный пластик. В положенный срок они прикреплялись к диэлектрическим стеклам, распластывались по поверхности, устанавливали контакты между отростками, тем самым формируя монослой (рис. 1Б). Ввиду более слабого сцепления клеток



с зеркальной поверхностью такие показатели, как индекс адгезии и время удвоения (отражает пролиферативную активность культуры), были несколько ниже, чем при росте клеток на культуральном пластике. Индекс адгезии составил 85 и 96% соответственно, время удвоения через 2 суток после посева –  $35,39 \pm 1,17$  и  $31,35 \pm 0,61$  ч. Время удвоения было стабильным на всем протяжении эксперимента, что обеспечило прогрессивное увеличение плотности монослоя. При этом до конца эксперимента соотношение живых и мертвых клеток в монослое на разных поверхностях практически не различалось и составило  $95,53 \pm 1,57\%$  на зеркале и  $97,61 \pm 2,14\%$  на пластике [1]. Следовательно, требования к условиям работы на МИМ-340 не являются препятствием для изучения адгезивных культур клеток в нативном состоянии.

Клетки контрольной группы практически не отличались от выращенных на культуральном пластике: они имели веретенообразную форму (рис. 2А), четко визуализирующееся ядро, от 1 до 3 отростков, характер роста тоже соответствовал нормальной культуре.

Уже через 3 часа после однократного воздействия митомицином большая часть фибробластов теряла отростки и приобретала округлую форму. Целостность монослоя нарушалась, клетки на стеклах располагались поодиночке или небольшими группами, во многих фибробластах не удавалось визуализировать ядро и цитоплазму. У ряда фибробластов наблюдалось выпячивание клеточной мембраны (рис. 2Б) с последующим образованием экзосом ( $37,4 \pm 1,8\%$ ), в контрольной группе такие явления определялись значительно реже ( $1,7 \pm 0,2\%$ ).

В контрольной группе в последующие наблюдаемые сроки морфофункциональные характеристики культуры фибробластов соответствовали таковым, выращенным на культуральном пластике (рис. 3А).

В опытной группе через сутки после воздействия митомицином уменьшалось количество ошаренных клеток (рис. 3Б). Клетки начинали расплываться и приобретать характерную для фибробластов форму.

Через 4 суток в опытной группе клетки имели характерную веретенообразную форму с 2–3 анастомозирующими между собой отростками, но в отличие от контрольной культуры характер роста был хаотичный. Зарост был менее плотный, чем в контроле. Встречалось большое количество фрагментов погибших клеток. Количество ошаренных клеток в 3 раза

Фазовая толщина ядер дермальных фибробластов при воздействии митомицином,  $M \pm \sigma$ , нм

Время эксперимента	Контроль	Опытная группа
3 часа	$142,18 \pm 41,86$	$217,8 \pm 78,28^*$
1 сутки	$173,56 \pm 67,99$	$186,56 \pm 61,72$
4 суток	$167,78 \pm 63,45$	$235,45 \pm 73,90^*$

\* $p \leq 0,05$

превышало аналогичный показатель в контрольной группе.

Фазовая толщина ядер фибробластов через 3 часа после воздействия митомицином в опытной группе значимо увеличивалась (на 53%) по отношению к контрольной (таблица). Это вызвано изменением формы клеток и значительным уменьшением площади прикрепления их к поверхности стекла. Здесь следует обратить внимание на несоответствие терминов «геометрическая толщина» и «фазовая толщина» объекта. Если первый описывает реальную толщину объекта и выражается величинами порядка мкм, то второй зависит от оптических свойств объекта и иммерсионной среды и имеет порядок десятков нм [13]. Через сутки этот показатель уменьшался на 17% и практически выравнивался с контрольным, что связано с расплыванием клеток и, следовательно, увеличением их площади. Через 4 суток фазовая толщина ядер фибробластов в опытной группе возросла по сравнению с предыдущим сроком на 26% и превышала показатель контрольной группы на 40%.

Таким образом, увеличение фазовой толщины ядер через 3 часа после воздействия митомицином является ответной реакцией фибробластов на данный препарат. Через 1 сутки уменьшение средней фазовой толщины ядер связано с преобладанием в препарате распластанных клеток, находящихся предположительно в премитотической фазе. Изучение препаратов при помощи камеры белого света в последующие сроки показало активную пролиферацию фибробластов в опытной группе, что подтверждалось высоким показателем фазовой толщины через 4 суток.

Определенную зависимость фазовой толщины от этапа жизненного цикла выявила группа ученых при исследовании стадий прорастания спор. Споры, прорастая, растворяют наружную оболочку и принимают «распластанную форму» [10]. Фибробласты, напротив, готовясь к митозу, подбиают отростки и приобретают округлую форму.





## Заключение

Наши исследования убедительно продемонстрировали возможность использования метода интерференционной микроскопии для изучения нативных клеток в монослое. Преимущество такого методического подхода – в отсутствии длительной и трудоемкой пробоподготовки.

Выявленная зависимость фазовой толщины ядер дермальных фибробластов от морфофункционального состояния клеток обосновывает информативность данного показателя при изучении адгезивной культуры *in vitro*.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Полученные результаты дают основание предполагать перспективность практического применения метода модуляционной интерференционной микроскопии при изучении токсичности и биосовместимости лекарственных средств, изделий медицинского назначения, а также физических факторов, используемых для диагностики и лечения. При этом дополнительное оснащение МИМ-340 стерильным термостатом позволит проводить тестирование на одних и тех же культурах в динамике, что еще больше повысит информативность метода. ☺

## Литература

1. Нефедова ИФ, Россинская ВВ, Волова ЛТ, Болтовская ВВ, Кулагина ЛН. Использование возможностей интерференционной микроскопии для изучения культуры адгезивных клеток. Современные проблемы науки и образования. 2017;(5) [Электронный ресурс]. Доступно на: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26800> (дата обращения: 29.09.2017).
2. Popescu G, Park Y. Quantitative phase imaging in biomedicine. *J Biomed Opt.* 2015;20(11):111201. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111201.
3. Лопарев АВ, Игнатъев ПС, Индукаев КВ, Осипов ПА, Мазалов ИН, Козырев АВ. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. Измерительная техника. 2009;(11):60–4.
4. Бункин НФ, Суязов НВ, Шкирин АВ, Игнатъев ПС, Индукаев КВ. Определение микроструктуры газовых пузырьков в глубоко очищенной воде по измерениям элементов матрицы рассеяния лазерного излучения. *Квантовая электроника.* 2009;39(4):367–81. doi: 10.1070/QE2009v039n04ABEH013892.
5. Yang SA, Yoon J, Kim K, Park Y. Measurements of morphological and biophysical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson's disease. *Cytometry A.* 2017;91(5):510–8. doi: 10.1002/cyto.a.23110.
6. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тychинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. *Вестник последиplomного медицинского образования.* 2009;(3–4):64–8.
7. Иванова ЕВ, Щербакoва ЭГ, Рабинович ОФ, Барсуков АА, Ежова ЕГ, Василенко ИА. Современные подходы к патогенетической терапии плоского лишая слизистой оболочки рта. *Стоматология.* 2005;84(5):28–31.
8. Evans AA, Bhaduri B, Popescu G, Levine AJ. Geometric localization of thermal fluctuations in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(11):2865–70. doi: 10.1073/pnas.1613204114.
9. Арсениук АЮ, Павлова ИБ, Игнатъев ПС. Исследование процесса L-трансформации в популяции сальмонелл методами электронной лазерной интерференционной микроскопии. *Сельскохозяйственная биология.* 2013;48(6):55–60. doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.55rus.
10. Тychинский ВП, Николаев ЮА, Лисовский ВВ, Кретушев АВ, Вышенская ТВ, Мулюкин АЛ, Сузина НА, Дуда ВИ, Эль-Регистан ГИ. Исследования ранних стадий прорастания спор *Bacillus licheniformis* методом динамической фазовой микроскопии. *Микробиология.* 2007;76(2):191–9.
11. Власова ЕА, Василенко ИА, Суслов ВП, Пашкин ИН. Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран. *Урология.* 2011;(2):36–41.
12. Кулагина ЛН, Болтовская ВВ, Долгушкин ДА, Нефедова ИФ, Россинская ВВ, авторы; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, патентообладатель. Способ обработки предметных стекол с зеркальным покрытием. Пат. 2639768 Рос. Федерация. Оpubл. 22.12.2017.
13. 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.

## References

1. Nefedova IF, Rossinskaya VV, Volova LT, Boltovskaya VV, Kulagina LN. Use of phase microscopy possibilities for studying the culture of adhesive cells. *Modern Problems of Science and Education.* 2017;(5) [Internet]. Available from: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26800> (accessed 29 September 2017). Russian.
2. Popescu G, Park Y. Quantitative phase imaging in biomedicine. *J Biomed Opt.* 2015;20(11):111201. doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111201.
3. Loparev AV, Ignat'ev PS, Indukaev KV, Osipov PA, Mazalov IN, Kozыrev AV. A high-speed modulation interference microscope for biomedical studies. *Meas Tech.* 2009;52(11):1229–35. doi: 10.1007/s11018-010-9426-9.
4. Bunkin NF, Suyazov NV, Shkirin AV, Ignatiev PS, Indukaev KV. Determination of the microstructure of gas bubbles in highly purified water by measuring the elements of the laser radiation scattering matrix. *Quantum Electronics.* 2009;39(4):367–81. Russian. doi: 10.1070/QE2009v039n04ABEH013892.
5. Yang SA, Yoon J, Kim K, Park Y. Measurements of morphological and biophysical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson's disease. *Cytometry A.* 2017;91(5):510–8. doi: 10.1002/cyto.a.23110.
6. Vasilenko IA, Kardashova ZZ, Tychinskiy VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanian BYa. Cellular diagnostics: the possibilities of vital computer microscopy. *Journal of Postgraduate Medical Education.* 2009;(3–4):64–8. Russian.
7. Ivanova EV, Shcherbakova EG, Rabinovich OF, Barsukov AA, Ezhova EG, Vasilenko IA. Modern approaches to pathogenetic therapy of flat lichen mucosa of the mouth. *Stomatologiya.* 2005;84(5):28–31. Russian.



8. Evans AA, Bhaduri B, Popescu G, Levine AJ. Geometric localization of thermal fluctuations in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):2865–70. doi: 10.1073/pnas.1613204114.
9. Arsenyuk AYu, Pavlova IB, Ignat'ev PS. Examination of L-transformation in Salmonella by electron and laser interference microscopy. *Agricultural Biology*. 2013;48(6):55–60. doi: 10.15389/agrobiol.2013.6.55rus. Russian.
10. Tychinskii VP, Nikolaev YuA, Lisovskii VV, Kretushev AV, Vyshenskaya TV, Mulyukin AL, Suzina NE, Duda VI, El'-Registan GI. Research on the early stages of spore germination in *Bacillus licheniformis* using dynamic phase microscopy. *Microbiology*. 2007;76(2):164–71. doi: 10.1134/S0026261707020063.
11. Vlasova EA, Vasilenko IA, Suslov VP, Pashkin IN. Dynamics of morphometric parameters of peripheral blood platelets as a criterion in assessing thrombogenicity of dialysis membranes. *Urologiia*. 2011;(2):36–41. Russian.
12. Kulagina LN, Boltovskaya VV, Dolgushkin DA, Nefedova IF, Rossinskaya VV, inventors; Samara State Medical University, assignee. The method of processing of slide glasses with a mirror coating. Russian Federation patent 2639768. 2017 Dec 22.
13. 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.

## The use of the interference microscopy to study structural characteristics of cultured dermal fibroblasts

I.F. Nefedova<sup>1</sup> • V.V. Rossinskaya<sup>1</sup>

**Rationale:** The use of electron, nuclear power and confocal microscopy for the screening of biologically active compounds, medical products and express diagnostics of some diseases at the cell level is associated with labor- and time-consuming sample preparation, which cannot exclude potential measurement errors and artifacts. The modulation interference microscopy does not have these disadvantages; it allows for non-invasive studies of cell structures, imaging with nanometer resolution and analysis of the optical properties of an object.

**Aim:** To assess the potential of the interference microscopy in the evaluation of morphofunctional characteristics of *in vitro* mitomycin conditioned cultured cell nuclei (dermal fibroblasts taken as a model). **Materials and methods:** Native culture of human dermal fibroblasts of the 6<sup>th</sup> passage, grown on glass with mirror coating in the cell culture laboratory of the Institute of Experimental Medicine and Biotechnology of Samara State Medical University (Russia), was examined with a modulation interference microscope MIM-340 (JSC PA UOMZ, Russia). Changes over time in the structural characteristics of dermal fibroblast nuclei conditioned with mitomycin were evaluated. The control group included fibroblasts cultured in the same conditions on glass with mirror coating without mitomycin. Imaging with MIM-340 was done at three hours, one and four days after adding the cytostatic. The control group was assessed at the same time points. **Results:** We have

shown that the cell culture grown on dielectric glasses does not differ in its morphofunctional characteristics from the culture grown on culture plastics. This proves the possibility to study the adhesive native culture using interference microscopy. We have found that the cells respond to a single mitomycin 0.04% exposure with a change to a globular shape and a sharp increase in the nuclear phase thickness (217.8 vs. 142.18 nm in the control group,  $p \leq 0.05$ ). Thereafter, the morphofunctional characteristics of the cells are restored, which is confirmed by the changes over time in the culture density, cell shape and size, and the phase thickness of the nucleus. **Conclusion:** The results obtained make it possible to recommend the method of modulation interference microscopy for evaluation of toxicity and biocompatibility of drugs, medical products and physical factors for diagnosis and treatment.

**Key words:** adhesive culture, modulation interference microscope, phase thickness, proliferation

**For citation:** Nefedova IF, Rossinskaya VV. The use of the interference microscopy to study structural characteristics of cultured dermal fibroblasts. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):778–83. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-778-783.

Received 17 April 2018;  
accepted 04 December 2018

**Irina F. Nefedova** – Research Fellow, Institute of Experimental Medicine and Biotechnology<sup>1</sup>  
✉ 20 Gagarina ul., Samara, 443079, Russian Federation. Tel.: +7 (927) 264 61 21.  
E-mail: bobrovka2012@yandex.ru

**Viktoriya V. Rossinskaya** – MD, PhD, Associate Professor, Leading Research Fellow, Institute of Experimental Medicine and Biotechnology<sup>1</sup>

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

<sup>1</sup>Samara State Medical University; 89 Chapayevskaya ul., Samara, 443099, Russian Federation



Оригинальная статья

# Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой ротоглотки у пациентов, не имеющих заболеваний респираторного тракта и ротовой полости

Затевалов А.М.<sup>1</sup> • Селькова Е.П.<sup>1</sup> • Гудова Н.В.<sup>1</sup> • Оганесян А.С.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Функциональная активность микробиоты верхних дыхательных путей и ротовой полости имеет высокий информативный потенциал для диагностики инфекционных заболеваний и разработки профилактических мероприятий, что обусловлено быстрой изменчивостью и высокой активностью бактерий локуса. **Цель** – определение статистических характеристик концентраций и соотношений короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) ротоглотки (функциональной активности микробиоты ротоглотки) в зависимости от возраста у пациентов, не имеющих инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей и ротовой полости. **Материал и методы.** Методом газожидкостной хроматографии исследованы концентрации КЖК в слюне 683 пациентов в возрасте от 1 месяца до 85 лет, не имеющих инфекционных заболеваний респираторного тракта и ротовой полости. Возрастные интервалы с однородными значениями показателей КЖК в слюне были определены путем выявления постоянных тенденций средних (медианных) значений с точностью до месяца. Полученные выборки

показателей для определенных временных интервалов сравнивали по критерию Манна – Уитни для порога значимости 95% ( $p < 0,05$ ). **Результаты.** Не было выявлено статистически значимых различий медианы суммарной концентрации КЖК (8,04 (интерквартильный размах 4,85–14,22) ммоль/г) и уксусной кислоты (6,27 (3,79–11,21) ммоль/г) в слюне для всех возрастов от 1 месяца до 85 лет. Для других показателей регистрировались 2–3 этапа изменений, происходивших в возрасте 4 месяцев и 14 лет. По достижению 14 лет концентрации пропионовой и масляной кислот статистически значимо увеличивались, а валериановой, капроновой, а также КЖК с разветвленной цепью – снижались. Соответственно, после 14 лет среднее значение структурного индекса увеличивалось с 0,25 до 0,27 ед. ( $p < 0,05$ ). Значение индекса изокилот с возрастом снижалось, изменяясь в 2 этапа: в 4 месяца с 1,89 до 1,04 ед. ( $p < 0,05$ ) и далее в 14 лет до 0,74 ед. ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Стабилизация концентраций КЖК в слюне происходит по достижении 14 лет. Структурный индекс и индекс изокилот являются наиболее чувствительными

к интегральному изменению структуры микробиоты. При анализе данных исследования метаболической функции микрофлоры следует использовать аппарат математического моделирования и многомерной статистики в трех возрастных интервалах: с рождения до 4 месяцев, от 4 месяцев до 14 лет, от 14 лет и старше.

**Ключевые слова:** короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), микробиота ротоглотки, возрастные концентрации КЖК, функциональная активность, дети, взрослые

**Для цитирования:** Затевалов АМ, Селькова ЕП, Гудова НВ, Оганесян АС. Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой ротоглотки у пациентов, не имеющих заболеваний респираторного тракта и ротовой полости. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):784–91. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-784-791.

Поступила 17.12.2018;  
принята к публикации 18.12.2018

**М**икробиота верхних дыхательных путей выполняет барьерную функцию, защищая хозяина от вирусных и бактериальных возбудителей, поступающих в организм водным, пищевым, контактно-бытовым, воздушно-капельным или воздушно-пылевым путем [1, 2]. Это объясняет необходимость присутствия устойчивых к факторам внешней среды и биологически активных видов микроорганизмов, способных к протеолитическому метаболизму.

Вследствие анатомически обусловленной разнородности ротовая полость представляет

собой сложный микробиологический локус [1]. Микрофлора, колонизирующая слизистые оболочки и миндаины, поверхности зубов и десневые карманы, значительно различается [3]. В настоящее время получена информация о более 300 родов бактерий, выделенных из слюны и зубных бляшек [3, 4].

Преобладающие таксоны принадлежат к *Firmicutes* (род *Streptococcus*, семейство *Veillonellaceae*, род *Granulicatella*), *Proteobacteria* (род *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (род *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), *Bacteroidetes*. В мазках со щек обнаруживается меньшее, а на



поверхности зубов – наибольшее видовое разнообразие [3–5]. Слизистая оболочка щек, миндалин и нёба колонизирована аэробными видами, в основном *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp. Десневая бороздка обособлена от полости рта, здесь преобладают анаэробы, нитевидные и извитые формы бактерий. Ротовая жидкость (слюна и жидкость десневой борозды) является своеобразным буфером, который осуществляет взаимосвязь между всеми биотопами ротовой полости и внутреннюю регуляцию. В большом количестве из нее выделяют *Veillonella* spp., *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. [5]. Значительное скопление (до  $10^8$  КОЕ/г) микроорганизмов локализуется в зубной бляшке, в основном актиномицеты [6, 7]. Количественное соотношение представителей нормальной микрофлоры ротовой полости зависит от диеты, гигиены полости рта, заболеваний зубов и верхних дыхательных путей.

Подтверждена взаимосвязь между микробиологическим состоянием ротовой полости и заболеваниями пародонта [8]. Колонизация полости рта бактериями с патогенным потенциалом и развитие в ней инфекционного процесса может стать источником инфекций нижних дыхательных путей, септицемии, эндокардита. Имеются убедительные данные, указывающие на корреляцию между состоянием микробиоты ротовой полости и системными заболеваниями, ревматоидным артритом, патологией желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, онкологическими заболеваниями, диабетом [9–13].

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), продуцируемые микробиотой ротовой полости, играют важную роль, обеспечивая нормальную экологию локуса, препятствуя образованию биопленок потенциально патогенных бактерий [14]. Вместе с тем избыточная их продукция может способствовать развитию пародонтоза [8].

В этой связи дальнейшее изучение биологической роли оральной микрофлоры может быть полезным для определения оптимальных терапевтических вмешательств и профилактики многих заболеваний человека.

Использование определения концентраций КЖК для интегральной оценки состояния микробиоты представляется актуальным, поскольку включает информацию о функциональной активности микроорганизмов из всех экологических ниш как аэробной, так и анаэробной ее части, а применение проекционных методов многомерной статистики позволяет определить прогноз развития заболеваний на ранних стадиях.

**Затевалов Александр Михайлович** – д-р биол. наук, гл. науч. сотр. лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний<sup>1</sup>  
✉ 143985, Московская область, г. Балашиха, мкр. Саввино, ул. Детская, 11–5, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (905) 714 91 14.  
E-mail: 89057149114@mail.ru

**Селькова Евгения Петровна** – д-р мед. наук, руководитель лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний, гл. науч. сотр.<sup>1</sup>

**Гудова Наталия Владимировна** – науч. сотр. лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний<sup>1</sup>

**Оганесян Арпине Степановна** – науч. сотр. лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний<sup>1</sup>

Целью данной работы было определение статистических характеристик концентраций и соотношений КЖК ротоглотки (функциональной активности микробиоты ротоглотки) в зависимости от возраста у пациентов, не имеющих инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей и ротовой полости.

## Материал и методы

Проведено обсервационное исследование образцов слюны (из биологического банка данных ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) 683 пациентов в возрасте от 1 месяца до 85 лет. В исследование включены образцы слюны, собранные у пациентов, обратившихся в консультативно-диагностический центр вышеназванного учреждения в течение 2011–2018 гг. Исследование одобрено независимым этическим комитетом (протокол № 15 от 2010 г.). Перед обследованием пациенты или законные представители несовершеннолетних пациентов подписали добровольное согласие на обработку персональных данных и были информированы о правилах сбора слюны. Слюна собиралась в одноразовые лабораторные пробирки натошак или не раньше двух часов после еды. Для исключения вероятного воспалительного процесса из исследования исключались пациенты с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, острыми респираторными заболеваниями и кариесом. Гендерные различия не учитывались.

Концентрации КЖК в слюне определены методом газожидкостной хроматографии подкисленного супернатанта фильтрата слюны. Хроматография проводилась на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 методом прямого ввода подкисленного супернатанта слюны в испаритель. Использовалась капиллярная кварцевая металлизированная колонка с неподвижной фазой FFPA. Диаметр колонки 0,3 мм, длина 30 м. Газ-носитель – азот. Детектор – пламенно-ионизационный. Режим изотерма 150 °С. Расчет концентраций проводился по методу внутреннего стандарта (α-диметилмасляная кислота). Идентификация КЖК выполнялась по временам удержания пиков [15].

Определение концентраций КЖК проводилось методом прямого ввода пробы в испаритель хроматографа. Определяли концентрации в слюне уксусной, пропионовой, изомаляной, масляной, изовалериановой, валериановой, изокапроновой и капроновой кислот. Доля концентраций уксусной, пропионовой, масляной кислот в их сумме характеризует целостность микробного

<sup>1</sup> ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, Российская Федерация





Показатели абсолютного содержания и соотношения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов разных возрастных групп

Показатель / возраст	Количество исследований	Медиана (интерквартильный размах)	Дисперсия	Стандартная ошибка среднего	Стандартное отклонение
Общий уровень, ммоль/г					
0–85 лет	643	8,038 (4,85–14,22)	242,51	0,615	15,57
Структурный индекс, ед.					
0–13 лет	372	0,25 (0,18–0,35)	0,05	0,01	0,22
14–85 лет	269	0,27 (0,19–0,38)	0,11	0,02	0,33
Индекс изокилот, ед.					
0–3 мес.	74	1,89 (1,25–2,42)	2,35	0,18	1,53
4 мес. – 13 лет	298	1,04 (0,64–1,85)	1,62	1,27	0,07
14–85 лет	269	0,74 (0,4–1,03)	1,14	0,07	1,07
Уксусная кислота, ммоль/г					
0–85 лет	643	6,27 (3,79–11,21)	137,91	0,46	11,74
Пропионовая кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,91 (0,42–1,77)	11,42	0,18	3,38
14–85 лет	269	1,19 (0,7–2,2)	5,68	0,15	2,38
Изомасляная кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,13 (0,08–0,25)	0,42	0,03	0,65
14–85 лет	269	0,07 (0,03–0,17)	0,07	0,02	0,27
Масляная кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,1 (0,06–0,24)	0,49	0,04	0,7
14–85 лет	269	0,22 (0,1–0,5)	0,96	0,06	0,98
Изовалериановая кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,09 (0,05–0,16)	0,12	0,02	0,35
14–85 лет	269	0,07 (0,03–0,17)	0,03	0,01	0,18
Валериановая кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,07 (0,03–0,17)	0,2	0,02	0,45
14–85 лет	269	0,01 (0–0,04)	0,02	0,01	0,12
Изокапроновая кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,03 (0,01–0,1)	0,22	0,02	0,47
14–85 лет	269	0 (0–0,01)	0,002	0,002	0,04
Капроновая кислота, ммоль/г					
0–13 лет	372	0,02 (0,01–0,04)	0,02	0,01	0,15
14–85 лет	269	0 (0–0,01)	0,001	0,002	0,03



Доля уксусной кислоты в сумме «уксусная, пропионовая, масляная кислота», %					
0–13 лет	372	86,59 (80,92–89,58)	61,13	0,41	7,82
14–85 лет	269	80,3 (75,37–85,73)	74,95	0,53	8,66
Доля пропионовой кислоты в сумме «уксусная, пропионовая, масляная кислота», %					
0–3 мес.	74	12,46 (9,66–17,6)	58,4	0,89	7,64
4 мес. – 13 лет	298	11,25 (7,93–16,16)	38,23	0,36	6,18
14–85 лет	269	16,09 (11,81–19,81)	40,89	0,39	6,39
Доля масляной кислоты в сумме «уксусная, пропионовая, масляная кислота», %					
0–3 мес.	74	1,4 (0,62–2,24)	4,15	0,24	2,04
4 мес. – 13 лет	298	1,72 (1,1–2,83)	18,84	0,25	4,34
14–85 лет	269	2,73 (1,54–4,9)	30,28	0,34	5,5
Уксусная кислота, %					
0–13 лет	372	79,99 (73,97–85,05)	83,7	0,47	9,15
14–85 лет	269	78,55 (72,23–83,71)	95,75	0,6	9,79
Пропионовая кислота, %					
0–13 лет	372	10,78 (7,62–15,65)	38,18	0,32	6,18
14–85 лет	269	15,63 (11,45–19,27)	34,21	0,36	5,85
Изомаляная кислота, %					
0–13 лет	372	1,61 (1,04–3,14)	3,82	0,1	1,95
14–85 лет	269	0,94 (0,52–1,65)	2,15	0,09	1,47
Масляная кислота, %					
0–13 лет	372	1,56 (0,99–2,54)	14,07	0,19	3,75
14–85 лет	269	2,71 (1,51–4,75)	26,71	0,32	5,17
Изовалериановая кислота, %					
0–13 лет	372	1,09 (0,7–1,75)	1,89	0,07	1,38
14–85 лет	269	0,92 (0,45–1,43)	1,12	0,06	1,06
Валериановая кислота, %					
0–13 лет	372	0,93 (0,35–2,04)	6,89	0,14	2,63
14–85 лет	269	0,11 (0,05–0,44)	2,35	0,09	1,53
Изокапроновая кислота, %					
0–13 лет	372	0,35 (0,14–1,27)	2,99	0,09	1,73
14–85 лет	269	0,05 (0,03–0,09)	0,48	0,04	0,69
Капроновая кислота, %					
0–13 лет	372	0,29 (0,13–0,62)	0,24	0,03	0,49
14–85 лет	269	0,05 (0,03–0,08)	0,45	0,04	0,67

Выборки соседних повозрастных подгрупп для каждого показателя статистически значимо отличались друг от друга ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна – Уитни)



сообщества [16]. Характеристикой функциональной активности симбионтной микробиоты служит структурный индекс, который рассчитывается как отношение суммы концентраций всех компонентов гомологического ряда карбоновых кислот от пропионовой до капроновой к концентрации уксусной кислоты [16]. Протеолитическая активность микробиоты ротоглотки оценивается по индексу изокилот, который рассчитывается как отношение суммы концентраций изомаляной, изовалериановой, изокапроновой кислот к сумме концентраций масляной, валериановой, капроновой кислот в слюне [16].

**Статистический анализ.** Полученные результаты определения концентраций и соотношений КЖК (функциональной активности микробиоты ротоглотки) были ранжированы по возрасту. Для пациентов в возрасте до 5 лет временные промежутки с однородными значениями показателей были определены путем выявления постоянных тенденций средних (медианных) значений, усредненных для пациентов одного возраста с точностью до месяца, для пациентов старше 5 лет – с точностью до 1 года. Для каждой группы по каждому показателю рассчитали медианное значение и нанесли на графики по возрастам. В результате анализа графиков были выделены области, в которых по медианным значениям определялись тенденции и отличающийся уровень исследуемого показателя. Далее каждую последующую выборку сравнивали с предыдущей по U-критерию Манна – Уитни для порога значимости 95% ( $p < 0,05$ ). Если показатель не отличался от предыдущего ( $p > 0,05$ ), временные интервалы объединяли и рассматривали как один временной интервал. Описательная статистика по показателям абсолютной концентрации КЖК, расчетных индексов представлена в виде среднего (медианы), нижнего и верхнего квартилей, стандартного отклонения, стандартной ошибки и дисперсии. Для расчетов использовали программу Microsoft Excel из пакета программ Microsoft Office 2007.

## Результаты

Показатели функциональной активности микробиоты ротоглотки для разных возрастных групп отражены в таблице. Оказалось, что концентрации КЖК в слюне имеют высокую дисперсию и большой разброс значений. Суммарная концентрация КЖК и концентрация уксусной кислоты, составляющая 80% в пуле КЖК, не имели статистически значимых различий во всех возрастных интервалах всей исследованной выборки.

Дисперсии концентраций пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров существенно ниже, что позволило выявить статистически значимые различия в двух возрастных интервалах: до 13 лет включительно и 14–85 лет. Установлено увеличение концентраций пропионовой и масляной кислот и уменьшение продукции кислот с разветвленной цепью (валериановой, капроновой и изокилот) после достижения 14 лет. Наиболее значительно снизилась концентрация изокапроновой (в 5 раз), валериановой (в 12,7 раза) и капроновой (в 4,4 раза) кислот.

Соотношение уксусная/пропионовая/масляная кислота в возрастном аспекте имело 3 временных интервала, для которых значения медиан были относительно постоянными: до 4 месяцев, с 4 месяцев до 14 лет, 14 лет и старше. Доля уксусной кислоты по достижении 14 лет снижалась с 87 до 80%, а доли пропионовой и масляной кислот соответственно повышались. Снижались также доли кислот с разветвленной цепью и их изомеров, что приводило к синхронным изменениям соответствующих индексов (повышению структурного и снижению индекса изокилот).

## Обсуждение

Микрофлора ротовой полости начинает формироваться внутриутробно и развивается параллельно желудочно-кишечному тракту [3]. Младенцы колонизируются бактериями вскоре после рождения – вертикально (от матери) и горизонтально (из непосредственного окружения). Отсутствие зубных рядов у детей (необходимо условие для существования строгих анаэробов) определяет микробиоценоз с повышенной продукцией уксусной кислоты. В возрасте до 4 месяцев в полости рта преобладают аэробные микроорганизмы и факультативные анаэробы *S. salivarius*, *Lactobacillus* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Candida albicans*, обнаруживается незначительное количество анаэробов, преимущественно *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp. [17, 18]. Резкое изменение качественного состава микроорганизмов в момент прорезывания зубов и введения прикорма приводит к появлению строгих анаэробов и быстрому нарастанию их количества, что отражается на увеличении доли продуктов их ферментации. С появлением зубов микроорганизмы перераспределяются по новым нишам соответственно анатомическому строению, снижается интегральная протеолитическая активность микрофлоры ротоглотки, как следствие – уменьшается индекс изокилот.



Образованию многочисленных микробных ниш с относительно стабильными микробными популяциями на слизистой оболочке щек, десен, языка, в десневых карманах и на зубах способствует прежде всего доступность пищевого субстрата. Эти факторы создают благоприятные условия для адгезии, колонизации и размножения аэробных и анаэробных микроорганизмов, преимущественно стрептококков (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*), лактобацилл (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*), грамотрицательных анаэробных и микроаэрофильных бактерий семейства *Bacteroidaceae* (*B. melaninogenicus* и *B. gingivalis*), *Fusobacterium* и *Propionibacteriaceae*. Количество бактерий родов *Spirochaetales* и *Bacteroides* увеличивается в полости рта примерно к 14 годам, что может быть связано с окончанием смены зубов, возрастными сдвигами гормонального фона и/или увеличением контактов в подростковом возрасте.

Как показали результаты настоящего исследования, в слюне доля уксусной кислоты в общем пуле КЖК составляет 80%, что выше, чем в кишечнике, так как в данном локусе больше аэробных бактерий, продуцирующих уксусную кислоту. По достижении 14 лет доля уксусной кислоты снижалась с 87 до 80%. Это указывает на увеличение анаэробных бактерий и отражает микробиологические данные, полученные другими методами [3, 4]. К этому же возрасту происходило статистически значимое снижение как абсолютной концентрации валериановой, капроновой и изоокислот, так и их доли в общем пуле КЖК. Продуцентами изоформ КЖК являются анаэробные протеолитические бактерии, активность которых подавляется в условиях более разнообразной и устойчивой микробиоты.

Изменения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки происходят в соответствии с периодами становления иммунной системы, продукции IgA и секреции слюнных желез [3, 4]. Концентрация КЖК в слюне значительно ниже, чем в желудочно-кишечном тракте [19], что связано с меньшим количеством

бактерий, небольшим количеством и сроком пребывания пищевых субстратов в ротовой полости. Эволюционно сложившаяся необходимость микробиоты ротовой полости быстро приспосабливаться к резким изменениям температурного режима, pH среды, большому количеству чужеродных бактерий, грибов и вирусов, служит причиной высокой дисперсии концентраций КЖК в слюне [7, 20]. Устойчивость средних значений концентраций КЖК в слюне для разных возрастных групп может быть обусловлена значительным влиянием внешних факторов (постоянным попаданием новых микроорганизмов).

При проведении клинических исследований эффективности терапевтических вмешательств и при оценке показателей у конкретного пациента для выбора терапии необходимо опираться на относительные показатели (профили и соотношения концентраций КЖК), индексы изоокислот и структурный индекс, а также использовать аппарат математического моделирования и многомерной статистики в 3 возрастных интервалах: 0–4 месяца, 14 месяцев – 14 лет, 14 лет и старше.

## Заключение

Концентрации КЖК, их относительное содержание и структурные индексы, отражающие функциональную активность микробиоценоза ротоглотки, характеризуются различными критическими этапами динамических возрастных изменений. Для конкретных показателей регистрируется 2–3 этапа изменений, происходящих до 4 месяцев, от 4 месяцев до 14 лет и от 14 лет и старше. Достаточно стабильная структура функциональной активности микробиоты ротоглотки устанавливается в 14 лет. Суммарная концентрация КЖК и концентрация уксусной кислоты в слюне имеют высокую дисперсию значений, что не позволяет разделить их концентрации на возрастные интервалы. Структурный индекс и индекс изоокислот наиболее чувствительны к интегральному изменению структуры микробиоты. ©

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

## Литература

1. Алешкин ВА, Афанасьев СС, Караулова АВ, ред. Микробиоценозы и здоровье человека: руководство для врачей. М.: Династия; 2015. 548 с.
2. Медведева ЕА, Мескина ЕР. Метаболическая активность микрофлоры ротоглотки у детей с бронхитом и внебольничной пневмонией. Альманах клинической медицины. 2015;42:72–8. doi: 10.18786/2072-0505-2015-42-72-78.
3. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009;9:259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259.
4. Xian P, Xuedong Z, Xin X, Yuqing L, Yan L, Ji-yao L, Xiaoquan S, Shi H, Jian X, Ga L. The oral microbiome bank of China. *Int J Oral Sci.* 2018;10(2):16. doi: 10.1038/s41368-018-0018-x.
5. Li K, Bihan M, Methé BA. Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. *PLoS One.* 2013;8(5):e63139. doi: 10.1371/journal.pone.0063139.





- Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Laio-la M, Paparo L, Calignano A, De Caro C, Coretti L, Chiariotti L, Gilbert JA, Ercolini D. Specific signatures of the gut microbiota and increased levels of butyrate in children treated with fermented cow's milk containing heat-killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(19). pii: e01206–17. doi: 10.1128/AEM.01206-17.
- Bozzetto S, Pirillo P, Carraro S, Berardi M, Cesca L, Stocchero M, Giordano G, Zanconato S, Baraldi E. Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections. *Pharmacol Res.* 2017;115:162–7. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.007.
- Shirasugi M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N. Normal human gingival fibroblasts undergo cytostasis and apoptosis after long-term exposure to butyric acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(4):1122–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.168.
- Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol.* 2011;13(12):3077–87. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02573.x.
- Fan X, Alekseyenko AV, Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, Purdue MP, Abnet CC, Stolzenberg-Solomon R, Miller G, Ravel J, Hayes RB, Ahn J. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut.* 2018;67(1):120–7. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312580.
- Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014;5(2):e01012–14. doi: 10.1128/mBio.01012-14.
- Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, Buas MF, Raftery D, Chen C. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204249. doi: 10.1371/journal.pone.0204249.
- Ohshima M, Sugahara K, Kasahara K, Katakura A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2017;37(5):2727–34. doi: 10.3892/or.2017.5561.
- Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):650–4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.011.
- Алешкин ВА, Ардатская МД, Бабин ВН, Дубинин АВ, Иконников НС, Кондракова ОА, Минушкин ОН, авторы; НИФ «Ультрасан», заявитель и патентообладатель. Способ разделения смеси жирных кислот фракции C<sub>2</sub>–C<sub>7</sub> методом газожидкостной хроматографии. Пат. 2145511 Рос. Федерация. Оpubл. 20.02.2000.
- Алешкин ВА, Селькова ЕП, Затевалов АМ, Миронов АЮ, Волчецкий АЛ, Гудова НВ. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Федеральные клинические рекомендации. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье; 2016. 40 с.
- Алешкин ВА, Галимзянов ХМ, Афанасьев СС, Караулов АВ, Рубальский ОВ, Несвижский ЮВ, Воропаева ЕА, Афанасьев МС. Нарушения микробиоценозов у детей: Многоцентровое исследование. Сообщение I. Микробиоценоз и дисбактериоз ротоглотки у детей. *Астраханский медицинский журнал.* 2010;5(3):9–13.
- Анурова АЕ, Величко ЭВ, Косырева ТФ, Стуров НВ. Влияние микрофлоры полости рта матерей на формирование микробиоценоза полости рта у детей с врожденными расщелинами верхней губы и нёба. *Трудный пациент.* 2017;15(1–2):59–63.
- Затевалов АМ, Селькова ЕП, Гудова НВ, Оганесян АС. Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот кишечной микробиотой у пациентов, не имеющих гастроэнтерологических заболеваний. *Альманах клинической медицины.* 2018;46(2): 109–17. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-2-109-117.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9:123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.

## References

- Aleshkin VA, Afanas'ev SS, Karaulova AV, editors. *Microbiocenosis and human health: a guide for doctors.* Moscow: Dinastiya; 2015. 548 p. Russian.
- Medvedeva EA, Meskina ER. The metabolic activity of the microflora of the oropharynx in children with bronchitis and community-acquired pneumonia. *Almanac of Clinical Medicine.* 2015;42:72–8. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2015-42-72-78.
- Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009;9:259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259.
- Xian P, Xuedong Z, Xin Y, Yuqing L, Yan L, Ji-yao L, Xiaoquan S, Shi H, Jian X, Ga L. The oral microbiome bank of China. *Int J Oral Sci.* 2018;10(2):16. doi: 10.1038/s41368-018-0018-x.
- Li K, Bihan M, Methé BA. Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. *PLoS One.* 2013;8(5):e63139. doi: 10.1371/journal.pone.0063139.
- Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Laio-la M, Paparo L, Calignano A, De Caro C, Coretti L, Chiariotti L, Gilbert JA, Ercolini D. Specific signatures of the gut microbiota and increased levels of butyrate in children treated with fermented cow's milk containing heat-killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(19). pii: e01206-17. doi: 10.1128/AEM.01206-17.
- Bozzetto S, Pirillo P, Carraro S, Berardi M, Cesca L, Stocchero M, Giordano G, Zanconato S, Baraldi E. Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections. *Pharmacol Res.* 2017;115:162–7. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.007.
- Shirasugi M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N. Normal human gingival fibroblasts undergo cytostasis and apoptosis after long-term exposure to butyric acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(4):1122–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.168.
- Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol.* 2011;13(12):3077–87. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02573.x.
- Fan X, Alekseyenko AV, Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, Purdue MP, Abnet CC, Stolzenberg-Solomon R, Miller G, Ravel J, Hayes RB, Ahn J. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut.* 2018;67(1):120–7. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312580.
- Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014;5(2):e01012–14. doi: 10.1128/mBio.01012-14.
- Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, Buas MF, Raftery D, Chen C. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204249. doi: 10.1371/journal.pone.0204249.
- Ohshima M, Sugahara K, Kasahara K, Katakura A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2017;37(5):2727–34. doi: 10.3892/or.2017.5561.
- Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):650–4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.011.
- Aleshkin VA, Ardatskaya MD, Babin VN, Dubinin AV, Ikonnikov NS, Kondrakova OA, Minushkin ON, inventors; NIF "Ultrasan", assignee. The method to separate the mixture of fatty acids C<sub>2</sub>–C<sub>7</sub> by gas liquid chromatography. Russian Federation patent 2145511. 2000 Feb 20.



16. Aleshkin VA, Selkova EP, Zatevalov AM, Mironov AYU, Volchetsky AL, Gudova NV. Definition of dysbiotic changes of gastrointestinal tract on bowel contents markers. *Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'e*; 2016. 40 p. Russian.
17. Aleshkin VA, Galimzyanov HM, Afanasyev SS, Karaulov AV, Rubalskiy OV, Nesvijskiy YuV, Voropaeva EA, Afanasyev MS. The deviation of microbiocynosis in children: multicentral investigation. Report I. Microbiocynosis and dysbacteriosis of stomatopharynx in children. *Astrakhan Medical Journal*. 2010;5(3):9–13. Russian.
18. Anurova AE, Velichko EV, Kosyreva TF, Sturov NV. Influences of maternal oral microflora on specific characteristics of oral microbiocenosis in children with congenital cleft lip and palate. *Difficult Patient*. 2017;15(1–2): 59–63. Russian.
19. Zatevalov AM, Selkova EP, Gudova NV, Oganessian AS. Age-related changes in production of short-chain fatty acids by gut microbiome in patients without gastroenterological diseases. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(2): 109–117. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-2-109-117.
20. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009;9:123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.

## Age-related changes in production of short chain fatty acids by oropharyngeal microbiota in patients without respiratory tract and oral disorders

A.M. Zatevalov<sup>1</sup> • E.P. Selkova<sup>1</sup> • N.V. Gudova<sup>1</sup> • A.S. Oganessian<sup>1</sup>

**Rationale:** Functional activity of upper respiratory tract and oral microbiota has a high informational potential for diagnostics of infectious disease and for development of preventive measure, which is to be explained by rapid variability and high activity of bacteria in this location. **Aim:** To determine statistical characteristics of concentrations and ratios of the oropharyngeal short chain fatty acids (SCFA) (i.e., functional activity of oropharyngeal microbiota) depending on age of patients without infectious disorder of upper respiratory tract and oral cavity. **Materials and methods:** Gas liquid chromatography was used to measure SCFA concentrations in saliva from 683 patients aged from 1 month to 85 years who did not have any infections of respiratory tract and oral cavity. Age intervals with homogenous salivary SCFA levels were determined with constant trends in their means (medians) with one-month accuracy. The resulting parameters for the identified age intervals were compared with Mann-Whitney test at 95% significance level ( $p < 0.05$ ). **Results:** There were no significant differences between median total SCFA levels (8.04 [4.85; 14.22] mmol/G) and median acetic acid levels (6.27 [3.79; 11.21] mmol/G) in saliva from patients of all ages from 1 month to 85 years. For all other parameters, from 2 to 3 steps of changes were found that occurred at the age of 4 months and 14 years. After the age of 14, the concentrations of propionic

and butyric acid significantly increased, whereas those of valeric and caproic acids, as well as of the branched chain SCFA decreased. Correspondingly, after the age of 14, the mean structural index increased from 0.25 to 0.27 U ( $p < 0.05$ ). The isoacid index decreased with age in two steps: at the age of 4 months from 1.89 to 1.04 U ( $p < 0.05$ ) and later at the age of 14 years to 0.74 U ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Salivary SCFA levels become stable at the age of 14. The structural index and the isoacid index are most sensitive to the integral changes in the microbiota composition. Analysis of the results of studies on metabolic functioning of microflora should be based on mathematic modeling and multifactorial statistics in three age intervals: from birth to 4 months of age, from 4 months to 14 years and over 14 years.

**Key words:** short chain fatty acids (SCFA), oropharyngeal microbiota, age-related SCFA levels, functional activity, children, adults

**For citation:** Zatevalov AM, Selkova EP, Gudova NV, Oganessian AS. Age-related changes in production of short chain fatty acids by oropharyngeal microbiota in patients without respiratory tract and oral disorders. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):784–91. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-784-791.

Received 17 December 2018;  
accepted 18 December 2018

**Alexander M. Zatevalov** – PhD, ScD in Biology, Chief Research Fellow, Laboratory of Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases<sup>1</sup>  
✉ 11–5 Detskaya ul., Zheleznodorozhny town, Moscow Region, 143985, Russian Federation.  
Tel.: +7 (905) 714 91 14.  
E-mail: 89057149114@mail.ru

**Eugenia P. Selkova** – MD, PhD, Head of the Laboratory of Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases, Chief Research Fellow<sup>1</sup>

**Natalia V. Gudova** – Research Fellow, Laboratory of Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases<sup>1</sup>

**Arpine S. Oganessian** – Research Fellow, Laboratory of Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases<sup>1</sup>

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

<sup>1</sup>G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 10 Admirala Makarova ul., Moscow, 125212, Russian Federation



Оригинальная статья

# Катехоламины плазмы крови у пациентов с ранними нелечеными стадиями болезни Паркинсона

Залялова З.А.<sup>1,2</sup> • Хасанова Д.М.<sup>2</sup> • Угрюмов М.В.<sup>3</sup>

**Актуальность.** Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание с преимущественным вовлечением катехоламин-продуцирующих нейронов центральной и периферической нервных систем. Учитывая относительную доступность и низкую стоимость определения концентраций катехоламинов в плазме крови, целесообразно изучение этих показателей для их использования в качестве биомаркеров начальных стадий БП. **Цель** – определение и сопоставление плазменных концентраций дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у здоровых добровольцев и пациентов с начальными стадиями БП при клинически дифференцированных акинетико-ригидной (АРФ) и дрожательной форм (ДФ). **Материал и методы.** Проведено наблюдательное одномоментное когортное исследование в период с 2012 по 2015 г. В основную группу посредством сплошного отбора включались пациенты, находившиеся на амбулаторном наблюдении в Республиканском консультативно-диагностическом центре экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии (Казань, Россия), с впервые клинически выявленной ранней (I и II стадии по Хен – Яру, 1967) БП разного возраста и пола, ранее не получавшие специфическую

противопаркинсоническую терапию. Группу контроля составили относительно здоровые добровольцы без клинических признаков БП с возможными иными хроническими заболеваниями неэкстрапирамидного генеза. Уровни катехоламинов в плазме крови определяли методом жидкостной хроматографии. **Результаты.** В основную группу исследования были включены 130 пациентов с впервые установленным диагнозом БП (средний возраст  $59,34 \pm 8,42$  года, 45,38% мужчин), не леченные ранее. Группу контроля составили 56 человек, сопоставимых по возрасту и полу. Распределение пациентов по формам и стадиям БП: ДФ БП – 56,9%, АРФ БП – 43,1%; I стадия – 76,9%, II стадия – 23,1%. В плазме крови пациентов с БП по сравнению с контролем отмечено снижение концентрации НА вне зависимости от формы и стадии (95% доверительный интервал = 124–216 и 248–428 пкг/мл соответственно,  $p < 0,026$ ). Уровень ДОФА был снижен только у пациентов с АРФ БП ( $p = 0,017$ ), уровень ДОФУК – у пациентов со II стадией БП ( $p = 0,008$ ). Соотношение показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК составило в среднем 1:32:105:64 в группе контроля против 1:62:238:88 у пациентов с ДФ БП (различия статистически значимо для НА, ДОФА,  $p < 0,05$ ) и 1:29:96:32 при АРФ БП ( $p > 0,05$ ). У здоровых добровольцев изменения концентрации ДОФА

определяют 84% изменчивости концентраций ДА и НА; взаимосвязи уровня ДОФУК с другими катехоламинами крови не обнаружено. Пациенты с БП, наоборот, вне зависимости от формы и стадии болезни имеют прямую взаимосвязь уровня ДОФУК с уровнем ДА ( $p < 0,04$ ). У пациентов с ДФ БП сохраняется прямая зависимость плазменных концентраций НА и ДОФА ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Полученные результаты по абсолютным и относительным показателям основного обмена катехоламинов у пациентов с БП начальных стадий поддерживают гипотезу о различном патогенезе дрожательной и акинетико-ригидной форм заболевания.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона идиопатическая, дрожательная форма болезни Паркинсона, акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, катехоламины, биомаркеры

**Для цитирования:** Залялова ЗА, Хасанова ДМ, Угрюмов МВ. Катехоламины плазмы крови у пациентов с ранними нелечеными стадиями болезни Паркинсона. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):792–801. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-792-801.

Поступила 27.06.2018;  
принята к публикации 17.12.2018

**Б**лезнь Паркинсона (БП) – полисимптомное нейродегенеративное заболевание, развивающееся в результате мультисистемной дегенерации преимущественно моноаминергических нейронов [1] и характеризующееся целым спектром как двигательных, так и недвигательных клинических проявлений [2]. Установлено, что патологический нейродегенеративный процесс

при БП является системным и нарушает обмен всех катехоламинов в разных структурах головного мозга с преимущественным вовлечением дофаминергических и норадренергических нейронов [3, 4]. Поскольку патологический процесс при БП не ограничивается мозгом, важным представляется изучение функционального состояния периферических органов, синтезирующих катехоламины



[5]. Предпринимаются попытки использовать в качестве биологических маркеров БП уровень концентрации катехоламинов и их производных [6]. Определение их в спинномозговой жидкости, которое ранее рассматривалось как наиболее специфичный лабораторный критерий диагностики БП, сопряжено с манипуляционными рисками и высокой стоимостью процедуры [7]. В качестве биомаркеров начальных стадий БП остаются привлекательными плазменные концентрации катехоламинов в связи с относительной доступностью и дешевизной метода [5].

Основной целью настоящего исследования было определение уровня основных катехоламинов – дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) – в крови нелеченых пациентов с начальными стадиями БП (I и II стадии по Хен – Яру), а также сопоставление с уровнями катехоламинов здоровых людей того же возраста и пола.

## Материал и методы

Исследование представляет собой часть работы «Способ диагностики преклинической стадии болезни Паркинсона» – проекта, победившего на конкурсе «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по приоритетным направлениям развития науки и техники» в рамках реализации программы «СТАРТ-2011». Дизайн исследования предусматривал сопоставление клинических и лабораторных данных пациентов с БП в зависимости от пола, формы и стадии заболевания как внутри основной группы, так и с группой контроля.

В основную группу посредством сплошного отбора включались пациенты, находившиеся на амбулаторном наблюдении в Республиканском консультативно-диагностическом центре экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии (РКДЦЭПиБТ, Казань, Россия), с впервые клинически выявленной ранней (I и II стадии по Хен – Яру) БП разного возраста и пола, которые ранее не получали специфическую противопаркинсоническую терапию. Группу контроля составили относительно здоровые добровольцы без клинических признаков БП с возможными иными хроническими заболеваниями неэкстрапирамидного генеза, отбравшиеся на базах Госпиталя ветеранов войн (отделения кардиологии) и РКДЦЭПиБТ в период с 2012 по 2015 г. Пациенты обеих групп не имели тяжелых соматических заболеваний. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, подписывали информированное согласие.

**Залялова Зулейха Абдуллаязовна** – д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и реабилитации<sup>1</sup>, руководитель<sup>2</sup>  
✉ 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (917) 267 22 01.  
E-mail: z.zalyalova@gmail.com

**Хасанова Диана Магомедовна** – канд. мед. наук, врач-невролог<sup>2</sup>

**Угрюмов Михаил Вениаминович** – академик РАН, д-р биол. наук, заведующий лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций<sup>3</sup>

Для клинической оценки участников исследования использовали индивидуальные регистрационные карты, включающие паспортные и анамнестические данные. Клинико-неврологическое исследование проводили по стандартной методике. Болезнь Паркинсона оценивали по общепринятой стандартной шкале UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale), шкале Хен – Яра (1967). При клинической оценке состояния больных уточнялась и клиническая форма заболевания: преимущественно акинетико-ригидная (АРФ БП) или преимущественно дрожательная (ДФ БП). Кроме того, пациенты с БП были разделены на группы в зависимости от стадии по классификации Хен – Яра: I и II стадии. Пациенты с более тяжелыми стадиями БП по шкале Хен – Яра в исследование не включались.

Основной конечной точкой исследования было определение концентраций основных катехоламинов плазмы крови участников исследования. Методика забора крови на определение уровня катехоламинов состояла в следующем: кровь из локтевой вены (около 5 мл) собиралась в вакутейнеры с калиевой солью ЭДТА в 8:00 и сразу центрифугировалась при охлаждении до -40 °С и 2500 об/мин в течение 20 минут. Полученная сыворотка переносилась пипеткой в другую пластиковую пробирку и хранилась в течение 1 суток при температуре от +2 до +80 °С. Затем во ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва, Россия) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией определялись уровни концентрации ДА, НА, ДОФА, ДОФУК и индекс утилизации дофамина (ДОФУК/ДА).

*Этическая экспертиза.* Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания № 8 от 23.10.2012).

*Статистический анализ.* Расчет мощности выборки проводили исходя из уровня заболеваемости БП в республике Татарстан и г. Казани – 17 вновь выявленных случаев БП на 100 тыс. населения (по данным РКДЦЭПиБТ [8]), а также из условия ошибки выборки не более 5%. Оценку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft, США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США). Для оценки связи между признаками непараметрических данных применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ), критерии вероятности корреляции Кендалла ( $\tau$ ) и  $\gamma$ -коэффициент; для параметрических данных – критерий Пирсона.

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49, Российская Федерация

<sup>2</sup> Республиканский консультативно-диагностический центр экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии; 420029, г. Казань, ул. Исаева, 5, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, Российская Федерация





Статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялась по критерию Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (p) при проверке нормальности распределения и равенства генеральных дисперсий. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности  $p < 0,05$ . Проверку статистической значимости непараметрических данных (в том числе номинальных и категориальных величин) проводили с помощью критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни с установлением уровня достоверности  $p < 0,05$ . С помощью программного обеспечения Statistica также был проведен многомерный дисперсионный анализ (ANOVA) с построением генерализованных нелинейных моделей, линейный регрессионный анализ и анализ методом логистической регрессии.

## Результаты

В исследование были включены 186 человек: 130 пациентов основной группы с впервые установленным диагнозом БП, не леченных ранее, и 56 добровольцев группы контроля. В основной группе было 59 (45,38%) мужчин и 71 (54,62%) женщина, средний возраст составил  $59,34 \pm 8,42$  года (от 37 до 82 лет). В группе контроля было 23 (41,1%) мужчины и 33 (58,9%) женщины, средний возраст –  $58,8 \pm 9,8$  года (от 36 до 85 лет). Группы исследования были сопоставимы по полу и возрасту.

**Таблица 1.** Уровень катехоламинов в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых добровольцев

Группа	Показатель, пкг/мл (референсные значения*)			
	ДА (10–100)	НА (95–450)	ДОФА (300–2800)	ДОФУК (320–9600)
Контроль (n=31)	$18,5 \pm 24,4$	$317,1 \pm 244,8$	$1110,1 \pm 1051,5$	$748,6 \pm 683,6$
БП (n=45)	$11,8 \pm 15,9$	$161,8 \pm 131,9^{\dagger}$	$699,0 \pm 973,1$	$433,4 \pm 547,7^{\dagger}$
I стадия** (n=33)	$140 \pm 17,6$	$169,3 \pm 137,8^{\dagger}$	$781,8 \pm 1109,1$	$529,0 \pm 589,3$
II стадия (n=12)	$6,4 \pm 7,5$	$144,7 \pm 113,9^{\dagger}$	$496,1 \pm 337,6$	$171,3 \pm 294,9^{\dagger}$
ДФ БП (n=28)	$13,6 \pm 19,1$	$184,8 \pm 129,8^{\dagger}$	$866,3 \pm 1158,5$	$541,6 \pm 607,8$
I стадия (n=19)	$16,2 \pm 21,6$	$181,2 \pm 140,5$	$969,9 \pm 1348,4$	$661 \pm 654,8$
II стадия (n=9)	$7,1 \pm 9,1$	$193,7 \pm 106,4^{\dagger}$	$607,1 \pm 365,9$	$243,2 \pm 344,5$
АРФ БП (n=17)	$9,3 \pm 7,7$	$125,9 \pm 128,4^{\dagger}$	$441,0 \pm 446^{\dagger}$	$255,5 \pm 383,5^{\dagger}$
I стадия (n=13)	$10,7 \pm 8,3$	$150,3 \pm 137$	$492,3 \pm 501,3$	$325,7 \pm 416,3$
II стадия (n=4)	$4,9 \pm 2,8$	$46,8 \pm 44,2^{\dagger}$	$274,3 \pm 83,1$	$27,6 \pm 26$

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота

\* Нормы лаборатории определения (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

\*\* Стадия БП по Хен – Яру (1967)

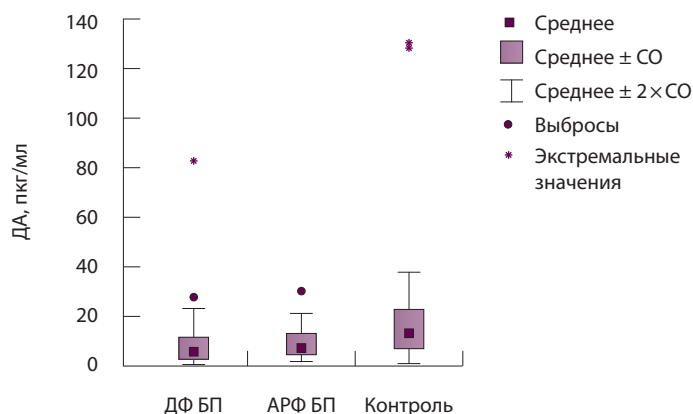
$^{\dagger} p < 0,05$  при сравнении с группой контроля

Среди пациентов с БП 74 (56,9%) имели ДФ БП и 56 (43,1%) – АРФ БП; с I стадией БП по Хен – Яру было 100 (76,9%) человек, со II стадией – 30 (23,1%).

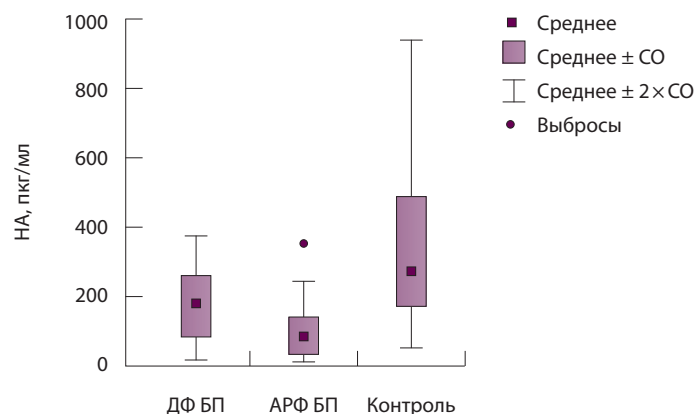
Анализ концентрации каждого катехоламина при БП выявил ряд существенных особенностей по сравнению с контролем (табл. 1).

Несмотря на более низкий уровень ДА и меньший размах возможных значений ДА в плазме крови пациентов с БП ( $11,8 \pm 15,9$  против  $18,5 \pm 24,4$  пкг/мл), статистически значимых различий в двух группах получено не было ( $p > 0,05$ ). Форма и стадия заболевания также не влияли на уровень статистической значимости результатов сравнения ( $p > 0,05$ ). Доверительные интервалы (95% ДИ) у пациентов с БП и группы контроля перекрываются, что не позволяет определить пороговое для диагностики значение ДА (рис. 1). Анализ зависимости уровня ДА от возраста обследуемых показал, что только здоровые добровольцы имели обратную среднюю корреляцию между этими параметрами ( $r = -0,415$ ). Для пациентов с БП вне зависимости от пола, формы и стадии заболевания такой корреляции не обнаружено ( $r = 0,056$ ). Множественный регрессионный анализ также показал значимую обратную взаимосвязь возраста здоровых добровольцев с концентрацией ДА в плазме крови ( $p = 0,0256$ ,  $F = 5,668$ , Mult.  $R = 0,44$ ). Следовательно, уровень ДА в плазме крови у пациентов с БП не связан с возрастом и не может быть объяснен функциональным угасанием дофаминергической системы в отличие от здоровых добровольцев, у которых отмечено возрастное снижение этого показателя.

Что касается уровня НА, он у пациентов с БП был статистически значимо ниже, чем в контроле ( $p = 0,0008$ ). При этом относительно контроля уровни концентрации НА оставались низкими у больных и с I стадией БП ( $p = 0,0045$ ), и со II ( $p = 0,026$ ), а также для ДФ БП ( $p = 0,014$ ) и для АРФ БП ( $p = 0,0049$ ). При сравнении форм БП между собой выявлено выраженное снижение уровня НА у пациентов с АРФ БП ( $p = 0,049$ ), при этом наблюдалась тенденция к увеличению данного различия по мере прогрессирования заболевания (статистическая значимость не установлена из-за небольшой степени свободы расчетов). Таким образом, нами обнаружено резкое снижение уровня концентрации НА в крови пациентов с БП вне зависимости от формы и стадии заболевания (рис. 2). В связи с этим был проведен анализ плазменной концентрации НА у добровольцев группы контроля и пациентов с БП с расчетом ДИ. Выяснилось, что 95% пациентов с БП имели значения уровня концентрации НА



**Рис. 1.** Уровень дофамина (ДА) в плазме крови пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и группы контроля; CO – стандартное отклонение

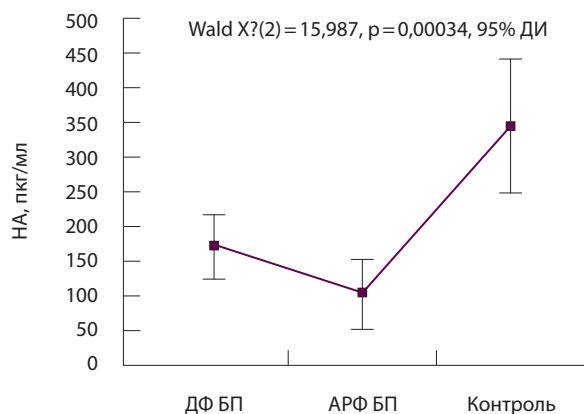


**Рис. 2.** Уровень норадреналина (НА) в плазме крови пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и группы контроля; CO – стандартное отклонение

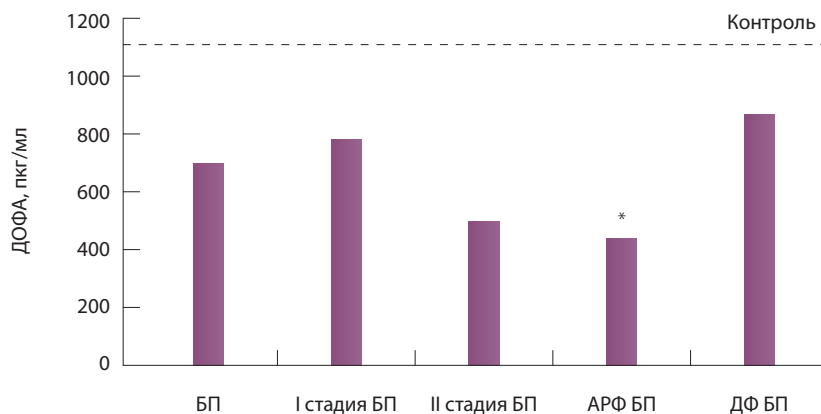
в пределах 124–216 пкг/мл (для пациентов с ДФ БП – 125–216 пкг/мл и с АРФ БП – 53–158 пкг/мл,  $p > 0,05$ ); 95% исследуемых из группы контроля – 248–428 пкг/мл (рис. 3). Полученные данные можно использовать для определения референсных значений уровня НА при сомнительном клиническом диагнозе БП. Соответственно, выявленные закономерности могут служить основанием для выделения НА в качестве биомаркера БП.

Статистически значимое снижение уровня ДОФА по сравнению с контролем отмечено только в группе АРФ БП ( $p = 0,017$ ; рис. 4). Плазменная концентрация ДОФУК была статистически значимо снижена в общей группе пациентов с БП по сравнению с контролем ( $p = 0,035$ ). При этом относительно контроля уровень ДОФУК в плазме крови пациентов с БП оставался статистически

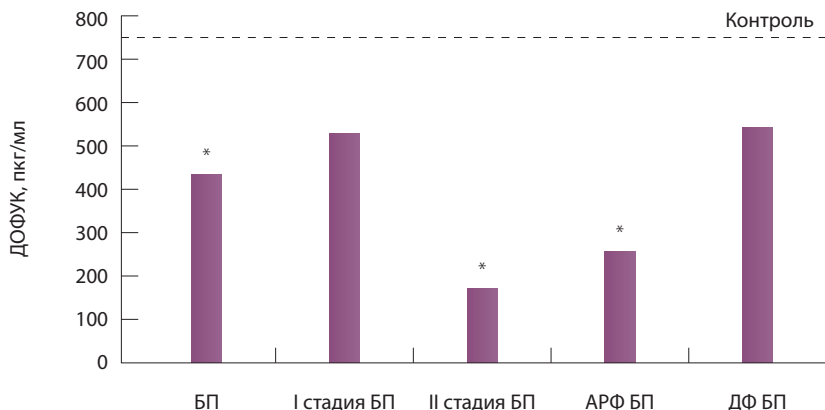
значимо ниже лишь у пациентов со II стадией БП ( $p = 0,008$ ), но не с I стадией ( $p = 0,18$ ), тогда как при АРФ БП этот показатель был снижен ( $p = 0,012$ ) вне зависимости от стадии заболевания (рис. 5). Таким образом, у пациентов с БП средний уровень ДОФУК достоверно ниже. Анализ в группах с расчетом ДИ показал, что 95% пациентов с БП имели значения уровня концентрации ДОФУК в пределах 232–507 пкг/мл (с ограничениями, так как ДИ концентрации ДОФА у пациентов с ДФ БП 222–653 пкг/мл может перекрывать нормальные значения; ДИ для пациентов с АРФ БП составил 25–404 пкг/мл); 95% исследуемых из группы контроля имели значения уровня концентрации ДОФУК в пределах 561–954 пкг/мл. Этими данными можно руководствоваться для определения референсных значений уровня ДОФУК



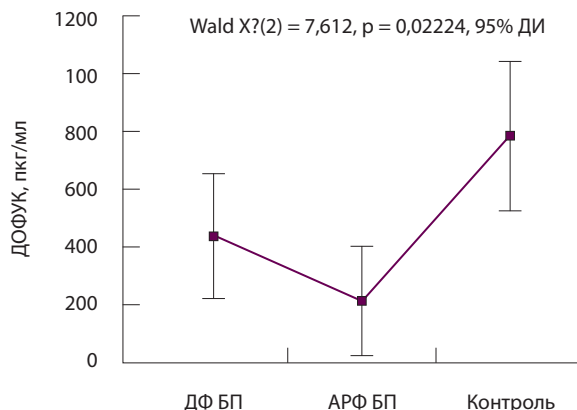
**Рис. 3.** Доверительные интервалы (ДИ) плазменной концентрации норадреналина (НА) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев



**Рис. 4.** Сравнение уровня концентрации L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и здоровых добровольцев; АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем



**Рис. 5.** Сравнение уровня концентрации дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и здоровых добровольцев; АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем



**Рис. 6.** Доверительные интервалы (ДИ) плазменной концентрации дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев

в случае сомнительного клинического диагноза БП (рис. 6). Кроме того, ДОФУК может выступать поддерживающим фактором при использовании НА в качестве биомаркера БП.

Для оценки взаимосвязи показателей концентрации катехоламинов в плазме крови был проведен анализ их соотношения с расчетом относительных величин: уровень ДА был принят за единицу, остальные показатели вычислены по отношению к нему (табл. 2). У обследованных из группы контроля соотношение показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК в среднем составило 1:32:105:64. Статистически значимых различий между основной группой (все пациенты с БП) и контрольной по этому параметру не получено. Анализ по гендерному признаку также различий с контролем не выявил. Что касается форм БП, увеличение соотношения показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК обнаружено только для пациентов с ДФ БП – 1:62:238:88, при этом различие было статистически значимым для НА и ДОФА ( $p < 0,05$ ). Такое изменение соотношения показателей у пациентов с ДФ БП может говорить о компенсаторных механизмах у этих больных (рис. 7).

Анализ соотношения показателей катехоламинов, проведенный в подгруппах исследования, показал отсутствие различий в зависимости от пола, но не от стадии и формы заболевания. У пациентов с ДФ БП отмечено статистически значимое увеличение соотношения концентрации НА/ДА в 4,5 раза ( $p = 0,035$ ) и концентрации ДОФА/ДА в 5 раз ( $p = 0,022$ ) во II стадии по Хен – Яру по сравнению с группой контроля. Одновременно наблюдалось резкое снижение

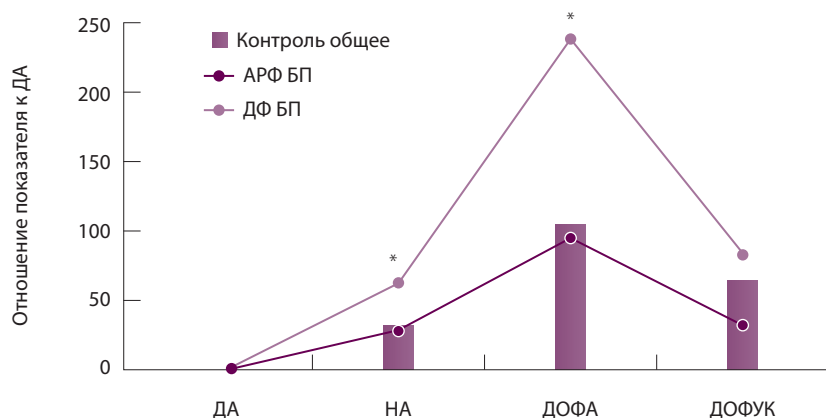
показателей соотношения других определяемых в крови катехоламинов к ДА у пациентов со II стадией АРФ БП, однако различие не было статистически значимым ( $p = 0,07$ ), что можно объяснить недостаточным количеством степеней свободы (рис. 8). Анализ соотношения ДОФУК/ДА (отражает скорость утилизации ДА) выявил некоторые противоречия. Так, если у пациентов с АРФ БП показатель утилизации ДА последовательно снижался (в среднем составил 40 для больных с I стадией и 8,8 – со II) по сравнению с контролем (64 в среднем), то у пациентов с ДФ БП он,

**Таблица 2.** Соотношение концентраций катехоламинов в крови и дофамина у пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых добровольцев

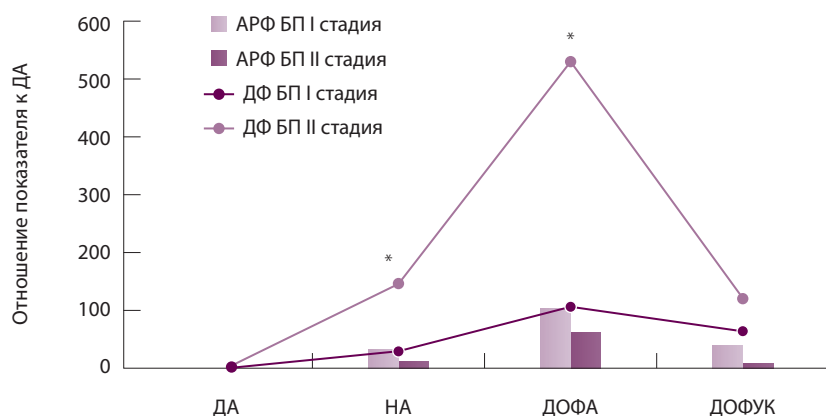
Группа	ДА	НА	ДОФА	ДОФУК
Контроль	1	32	105	64
женщины	1	33	116	70
мужчины	1	32	106	64
БП	1	50	182	63
женщины	1	73	262	82
мужчины	1	23	86	39
I стадия*	1	31	107	54
II стадия	1	100	374	85
ДФ БП	1	62	238	83
I стадия	1	29	108	65
II стадия	1	145	530	123
АРФ БП	1	29	96	32
I стадия	1	34	105	40
II стадия	1	12	64	9

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота

\* Стадия БП по Хен – Яру



**Рис. 7.** Показатели соотношения дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем



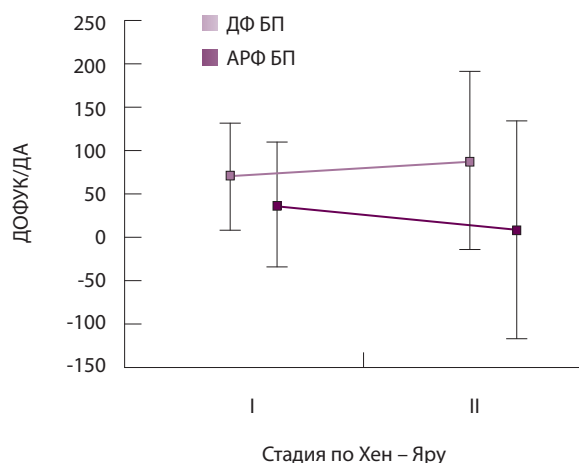
**Рис. 8.** Показатели соотношения дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона в зависимости от стадии по Хен – Яру; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем

наоборот, увеличивался (в среднем 65 для больных с I стадией и 123 – со II). Установлено, что 95% пациентов с ДФ БП имели значения скорости утилизации ДА в пределах 35,69–148,78, а с АРФ БП – 9,37–50,91, тогда как 95% исследуемых из группы контроля имели значения ДОФУК/ДА в пределах 35,12–102. Соответственно, можно говорить о разнонаправленном изменении скорости утилизации ДА в зависимости от формы БП (рис. 9). Одно из объяснений этого феномена – различия в патофизиологии подтипов БП. У пациентов с ДФ БП концентрация ДА в крови снижается, при этом другие звенья дофаминергического метаболизма не страдают, а возможно, даже пытаются компенсировать дофаминовый дефицит. Данные изменения могут быть

обусловлены как генетической предрасположенностью, так и средовыми факторами, что требует дальнейшего изучения. У пациентов с АРФ БП происходит одновременное снижение всех показателей дофаминергического обмена. Предположительно, это свидетельствует об истощении систем синтеза и утилизации. Таким образом, показатель скорости утилизации ДА может помочь в формировании прогноза заболевания.

Мы провели множественный регрессионный анализ, позволивший определить профиль зависимости концентраций катехоламинов в крови у пациентов разных групп. У здоровых добровольцев была выявлена прямая статистически значимая взаимосвязь концентраций ДА и ДОФА в плазме крови ( $p = 0,013$ ), уровня НА и ДОФА ( $p = 0,014$ ). Согласно полученным результатам, более 84% изменчивости концентраций ДА и НА объясняется изменениями концентрации предшественника данных катехоламинов. При этом уровни ДА и НА связаны между собой статистически значимой обратной взаимосвязью ( $p = 0,004$ ). Так, увеличение концентрации НА ведет к снижению концентрации ДА, что, вероятно, указывает на буферную роль ДА в плазме крови. Уровень ДОФУК не имел корреляции с уровнями других катехоламинов. В литературе описано отсутствие связи концентрации ДОФУК с другими катехоламинами в плазме крови здоровых людей [5, 8, 9].

У пациентов с БП происходит выраженное изменение нормальных взаимосвязей концентраций катехоламинов в крови. Все пациенты



**Рис. 9.** Сравнение скорости утилизации дофамина (ДА) у пациентов с болезнью Паркинсона в зависимости от формы и стадии; ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона



**Таблица 3.** Клинико-лабораторная дифференциальная диагностика дрожательной и акинетико-ригидной форм болезни Паркинсона

Признак	ДФ БП		АРФ БП	
	I стадия*	II стадия	I стадия	II стадия
Возраст начала БП, годы	63,73 ± 7,19		57,5 ± 8,83	
НА	↓		↓↓	
	↓	–	↓	↓↓
ДОФА	–		↓↓	
	–	↓	↓	↓↓
ДОФУК	–		↓↓	
	–	↓	↓	↓↓
ДА:НА:ДОФА:ДОФУК	1:62:238:82		1:29:96:32	
	1:29:108:65	1:145:530:123	1:34:105:40	1:12:64:9

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота; ↓ – показатель снижен, ↓↓ – показатель снижен выраженно

\* Стадия БП по Хен – Яру

с БП вне зависимости от формы и стадии болезни имели прямую значимую взаимосвязь уровня ДОФУК с уровнем ДА ( $p < 0,04$ ): 62% изменчивости концентрации ДОФУК у пациентов с ДФ и 78% изменчивости концентрации ДОФУК у пациентов с АРФ БП связано с изменением концентрации ДА в плазме крови. Данный факт говорит о повышенном уровне деградации ДА, который может влиять на уровень концентрации ДОФУК в крови, в норме не подверженный такому влиянию. У пациентов с АРФ БП других взаимосвязей уровня концентрации катехоламинов обнаружено не было. В группе ДФ БП была выявлена значимая обратная взаимосвязь уровней ДА и ДОФА в крови пациентов ( $r = -0,4399$ ,  $p = 0,047$ ), что, вероятно, свидетельствует об усилении синтеза ДА из неизменных запасов ДОФА в организме. Следовательно, при ДФ БП происходит усиление обмена катехоламинов с целью компенсации нехватки основного нейромедиатора. При этом у пациентов с ДФ БП, как у здоровых добровольцев, сохраняется прямая статистически значимая зависимость уровней НА и ДОФА в плазме крови ( $p < 0,05$ ). Таким образом, результаты многомерного регрессионного анализа также позволяют сделать вывод о различиях в изменении обмена катехоламинов у пациентов в зависимости от формы БП.

## Обсуждение

Полученные нами основные результаты, а именно: отсутствие снижения концентрации предшественника дофамина – ДОФА – и его метаболита – ДОФУК – на I стадии у всех пациентов с БП и снижение концентрации ДОФА и ДОФУК в плазме у пациентов со II стадией АРФ БП, резкое снижение уровня концентрации НА в плазме крови пациентов с БП, более значительное у пациентов с АРФ БП, а также разнонаправленное изменение относительных показателей катехоламинов в плазме крови при разных формах БП требуют их отдельного рассмотрения при АРФ БП и ДФ БП.

Выявленные особенности уровней катехоламинов в плазме крови пациентов с БП по сравнению с контролем позволяют сделать предположения о возможном патогенезе данных различий. Во всех группах пациентов, разделенных по признаку пола, формы или стадии БП, отмечено снижение концентрации ДА в крови, но ни в одном из случаев оно не было статистически значимым. В ряде подгрупп это может быть связано с недостаточным объемом выборки пациентов и нуждается в дополнительной проверке на большем объеме пациентов. Вероятно, стабилизация уровня ДА в плазме крови происходит за счет компенсаторных механизмов. Одним из них может быть наличие дополнительных источников ДА на периферии: APUD-клетки, локализованные в разных органах человека и нейроэндокринные хромоафинные клетки мозгового слоя надпочечников содержат ферменты, необходимые для синтеза ДА из тирозина [10–12]. Они могут служить своеобразной нейроэндокринной буферной системой. Аналогично, отсутствие статистически значимого снижения концентрации ДОФА и ДОФУК на I стадии БП у пациентов как с АРФ БП, так и с ДФ БП обусловлено компенсаторными возможностями дополнительных дофаминергических клеток на периферии. Ко II стадии у пациентов с АРФ БП эти возможности истощаются – тогда наблюдается статистически значимое снижение концентрации ДОФУК и ДОФА в плазме крови. У пациентов со II стадией ДФ БП такого снижения не происходит, что свидетельствует о сохранных компенсаторных возможностях организма.

Обнаруженное нами резкое снижение уровня концентрации НА в плазме крови пациентов с БП вне зависимости от формы и стадии заболевания согласуется с теорией Н. Вракк и соавт. о последовательном каудо-ростральном поражении головного мозга при БП с более ранней дегенерацией



голубого пятна по сравнению с черной субстанцией [13]. Теория «двойного удара» предполагает поражение симпатических нервов периферической нервной системы [14], которые являются одним из ключевых источников НА плазмы крови, что также соотносится с результатами нашего исследования. Следует отметить, что дополнительных источников НА на периферии, за исключением хромоаффинных клеток надпочечников, нет. При этом у пациентов с АРФ БП снижение уровня НА было более значительным, чем у пациентов с ДФ БП, и увеличивалось по мере прогрессирования заболевания вне зависимости от формы.

Накапливается все больше доказательств различного патогенеза АРФ БП и ДФ БП, которые отличаются как по клиническим проявлениям [15–18], так и по нейровизуализационным признакам поражения катехоламиновых систем [19–21]. По данным нашего исследования, уровень НА у пациентов с ДФ БП по отношению к ДА не снижался по мере прогрессирования заболевания, а рос. Это может говорить о возможной компенсаторной роли НА, поскольку известно, что НА оказывает нейропротекторное действие на нейроны, в том числе дофаминергическое, защищая их от нейродегенеративного процесса [4]. Клинически это может проявляться в более медленном прогрессировании БП. При АРФ БП, напротив, уровни всех катехоламинов снижались, что отражает одновременное равномерное вовлечение всех катехоламиновых систем в патологический процесс. Возможно, именно поэтому пациенты с АРФ БП имеют широкий спектр клинических проявлений, в первую очередь, за счет разнообразных немоторных симптомов. То же можно сказать о ДОФА и ДОФУК, которые аналогично НА уменьшались по отношению к ДА у пациентов с АРФ БП и увеличивались при ДФ БП. Объяснением данного феномена могут быть различия в патогенезе нарушений разных форм БП. При ДФ БП наблюдается преимущественное

поражение черной субстанции, что избирательно ухудшает синтез ДА без нарушения его утилизации и продукции предшественников. У пациентов с АРФ БП, как указано выше, происходит параллельная дегенерация биологического субстрата всех катехоламиновых функциональных систем. Выявленные закономерности изменения концентрации катехоламинов плазмы в крови пациентов с различными формами и стадиями БП представлены в табл. 3.

**Ограничения исследования.** При правильном выполнении методики забора крови из вены для анализа концентрации катехоламинов в плазме крови ограничений к исследованию нет. Однако нужно учитывать методику взятия НА из кубитальной вены: пациент должен находиться в расслабленном лежачем положении, кровь забирается не сразу после пункции, а через 10–30 минут. Эта предосторожность направлена на уменьшение влияния внешних факторов (в том числе вкола иглы в вену руки), которые быстро и значительно могут поднять уровень НА в крови (в 5–10 раз). Кроме того, пациент должен быть предупрежден о необходимости взятия крови натощак, так как некоторые препараты и пища могут вызвать повышение концентрации НА и ДОФУК в крови.

## Заключение

Результаты нашего исследования поддерживают гипотезу о различном патогенезе ДФ БП и АРФ БП, чем и определяется разница в абсолютных и относительных показателях концентрации катехоламинов в плазме крови. Мы выявили некоторые значительные различия в относительных показателях основного обмена катехоламинов: резкое снижение уровня обмена (синтеза и утилизации ДА) у пациентов с АРФ БП и относительно сохранные показатели и взаимосвязи показателей катехоламинов у пациентов с ДФ БП. Полученные данные нуждаются в дальнейшем углубленном изучении. ☺

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Данная исследовательская инициатива финансировалась Инвестиционно-венчурным фондом Республики Татарстан (ИВФ РТ) и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (ФСРМФП) (Договор о научном сотрудничестве, п. 1, от 21.03.2011).

## Литература

- Goldman JG, Postuma R. Premotor and non-motor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2014;27(4):434–41. doi: 10.1097/WCO.0000000000000112.
- Залялова ЗА, Хасанова ДМ. Депрессия у пациентов с ранними стадиями болезни Паркинсона. *Трудный пациент.* 2016;(4–5): 22–8.
- Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1900–13. doi: 10.1093/brain/aws055.
- Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:31. doi: 10.3389/fn-sys.2011.00031.
- Угрюмов МВ, ред. *Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма.* Т. 1. М.: Научный мир; 2014; 580 с.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- Eldrup E, Mogensen P, Jacobsen J, Pakkenberg H, Christensen NJ. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epi-



- nephrine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995;92(2):116–21. doi: 10.1111/j.1600-0404.1995.tb01023.x.
8. Lewitt PA. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1(1):4. doi: 10.1186/2047-9158-1-4.
9. Веселова ИА, Сергеева ЕА, Македонская МИ, Еремина ОЕ, Калмыков СН, Шеховцова ТН. Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики. *Журнал аналитической химии.* 2016;71(12):1235–49. doi: 10.7868/S0044450216120124.
10. Goldstein DS, Holmes C. Neuronal source of plasma dopamine. *Clin Chem.* 2008;54(11):1864–71. doi: 10.1373/clinchem.2008.107193.
11. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(5):303–13. doi: 10.1177/17.5.303.
12. Wahbe F, Hagege J, Loreau N, Ardaillou R. Endogenous dopamine synthesis and dopa-decarboxylase activity in rat renal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 1982;27(1):45–54. doi: 10.1016/0303-7207(82)90061-2.
13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2):197–211. doi: 10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
14. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(20):1916–25. doi: 10.1212/01.wnl.0000312279.49272.9f.
15. Селихова МВ, Коган БВ, Серкин ГВ, Гусев ЕИ. Обмен катехоламинов при разных формах болезни Паркинсона. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2002;102(9):37–40.
16. Marras C, Chaudhuri KR. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. *Mov Disord.* 2016;31(8):1095–102. doi: 10.1002/mds.26510.
17. Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain.* 2009;132(Pt 11):2947–57. doi: 10.1093/brain/awp234.
18. Thenganatt MA, Jankovic J. Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):499–504. doi: 10.1001/jamaneuro.2013.6233.
19. Siderowf A, Newberg A, Chou KL, Lloyd M, Colcher A, Hurtig HI, Stern MB, Doty RL, Mozley PD, Winterson N, Duda JE, Weintraub D, Moberg PJ. [99mTc]TRODAT-1 SPECT imaging correlates with odor identification in early Parkinson disease. *Neurology.* 2005;64(10):1716–20. doi: 10.1212/01.WNL.0000161874.52302.5D.
20. Niethammer M, Feigin A, Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a009274. doi: 10.1101/cshperspect.a009274.
21. Залялова ЗА. Дрожательные фенотипы болезни Паркинсона. В: Иллариошкин СН, Левин ОС, ред. *Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием).* М.: Серебряные нити; 2011. с. 55–9.

## References

1. Goldman JG, Postuma R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2014;27(4):434–41. doi: 10.1097/WCO.0000000000000112.
2. Zalyalova ZA, Khasanova DM. Depression in patients with early stage Parkinson disease. *Difficult Patient.* 2016;(4–5):22–8. Russian.
3. Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1900–13. doi: 10.1093/brain/awo055.
4. Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:31. doi: 10.3389/fn-sys.2011.00031.
5. Ugrumov MV, editor. *Neurodegenerative diseases: from genome to the whole organism.* Vol. 1. Moscow: Nauchnyy mir; 2014. 580 p. Russian.
6. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
7. Eldrup E, Mogensen P, Jacobsen J, Pakkenberg H, Christensen NJ. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995;92(2):116–21. doi: 10.1111/j.1600-0404.1995.tb01023.x.
8. Lewitt PA. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1(1):4. doi: 10.1186/2047-9158-1-4.
9. Veselova IA, Sergeeva EA, Makedonskaya MI, Eremina OE, Kalmykov SN, Shekhovtsova TN. Methods for determining neurotransmitter metabolism markers for clinical diagnostics. *J Anal Chem.* 2016;71(12):1155–68. doi: 10.1134/S1061934816120108.
10. Goldstein DS, Holmes C. Neuronal source of plasma dopamine. *Clin Chem.* 2008;54(11):1864–71. doi: 10.1373/clinchem.2008.107193.
11. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(5):303–13. doi: 10.1177/17.5.303.
12. Wahbe F, Hagege J, Loreau N, Ardaillou R. Endogenous dopamine synthesis and dopa-decarboxylase activity in rat renal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 1982;27(1):45–54. doi: 10.1016/0303-7207(82)90061-2.
13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2):197–211. doi: 10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
14. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(20):1916–25. doi: 10.1212/01.wnl.0000312279.49272.9f.
15. Selikhova MV, Kogan BV, Serkin GV, Gusev EI. Catecholamines' metabolism in different forms of Parkinson disease. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2002;102(9):37–40. Russian.
16. Marras C, Chaudhuri KR. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. *Mov Disord.* 2016;31(8):1095–102. doi: 10.1002/mds.26510.
17. Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain.* 2009;132(Pt 11):2947–57. doi: 10.1093/brain/awp234.
18. Thenganatt MA, Jankovic J. Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):499–504. doi: 10.1001/jamaneuro.2013.6233.
19. Siderowf A, Newberg A, Chou KL, Lloyd M, Colcher A, Hurtig HI, Stern MB, Doty RL, Mozley PD, Winterson N, Duda JE, Weintraub D, Moberg PJ. [99mTc]TRODAT-1 SPECT imaging correlates with odor identification in early Parkinson disease. *Neurology.* 2005;64(10):1716–20. doi: 10.1212/01.WNL.0000161874.52302.5D.
20. Niethammer M, Feigin A, Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a009274. doi: 10.1101/cshperspect.a009274.
21. Zalyalova ZA. Shaking phenotypes of Parkinson's disease. In: Illarioshkin SN, Levin OS, editors. *Parkinson's disease and movement disorders: Guide for Physicians based on the proceedings of the II National Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders.* Moscow: Serebryanye niti; 2011. p. 55–9. Russian.



# Plasma catecholamine levels in the early stages of treatment-naïve Parkinson's disease

Z.A. Zalyalova<sup>1,2</sup> • D.M. Khasanova<sup>2</sup> • M.V. Ugrumov<sup>3</sup>

**Rationale:** Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with predominant involvement of catecholamine-producing neurons of the central and peripheral nervous system. Taking into account the relative availability and low costs of plasma catecholamine measurements, it is worthwhile to study these parameters as biomarkers of the early stages of PD. **Aim:** To determine whether plasma levels of dopamine (DA), norepinephrine (NE), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in patients with early stages of PD are related with akinetic-rigid and tremor-dominant variants and to compare the results to healthy volunteers. **Materials and methods:** This was an observational cross-sectional cohort study performed from 2012 to 2015. The main study group included unselected outpatients who attended the Republican Consultative and Diagnostic Center of Movement Disorders and Botulinotherapy (Kazan, Russia) with newly diagnosed early PD (Hoehn and Yahr stages I and II, 1967), of various ages and both genders, who had not been given any specific antiparkinsonian treatment. The control group included healthy volunteers with no clinical signs of PD (they could have other chronic diseases of the non-extrapyramidal origin). Plasma catecholamine levels were measured by gas liquid chromatography. **Results:** One hundred and thirty (130) treatment-naïve patients with newly diagnosed PD (mean age 59.34±8.42 years, male gender 45.38%) were enrolled into the main study group. The control group included 56 healthy volunteers matched for age and gender. The distribution of various PD forms and stages was as follows: PD tremor-dominant variant 56.9%, PD akinetic-rigid variant 43.1%; PD stage I 76.9%, PD stage II 23.1%. Irrespective of the variant and stage, the PD patients demonstrated decreased NE levels, compared to the

controls (95% confidence intervals 124–216 and 248–428 pg/mL, respectively,  $p < 0.026$ ). DOPA plasma level was reduced only in the patients with akinetic-rigid PD variant ( $p = 0.017$ ), while DOPAC level in the patients with PD stage II ( $p = 0.008$ ). The average DA:NE:DOPA:DOPAC ratio was 1:32:105:64 in the control group, 1:62:238:88 in the patients with PD tremor-dominant variant (the difference is significant for NE and DOPA,  $p < 0.05$ ), and 1:29:96:32 in those with PD akinetic-rigid variant ( $p > 0.05$ ). In the healthy controls the changes in DOPA levels account for 84% of the DA and NE variability; no correlation between DOPAC and other catecholamines was found. On the contrary, in the PD patients regardless of the stage and the disease variant, DOPAC levels directly correlated with DA ( $p < 0.04$ ). The PD tremor-dominant variant patients demonstrated a direct correlation between plasma NE and DOPA levels ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The results obtained on absolute and relative parameters catecholamine turnover in the patients with early PD stages support the hypothesis on different pathophysiology of the tremor-dominant and akinetic-rigid variants of PD.

**Key words:** idiopathic Parkinson's disease, Parkinson's disease tremor-dominant variant, Parkinson's disease akinetic-rigid variant, catecholamine, biomarker

**For citation:** Zalyalova ZA, Khasanova DM, Ugrumov MV. Plasma catecholamine levels in the early stages of treatment-naïve Parkinson's disease. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):792–801. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-792-801.

Received 27 June 2018;  
accepted 17 December 2018

**Zuleykha A. Zalyalova** – MD, PhD, Professor, Neurology and Rehabilitation Department<sup>1</sup>, Head<sup>2</sup>  
✉ 49 Butlerova ul., Kazan, 420012, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 267 22 01.  
E-mail: z.zalyalova@gmail.com

**Diana M. Khasanova** – MD, PhD, Neurologist<sup>2</sup>

**Michael V. Ugrumov** – Member of Russian Academy of Sciences, ScD in Biology, Head of Laboratory of Neural and Neuroendocrine Regulations<sup>3</sup>

## Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Funding

This research initiative was financially supported by the Investment and venture fund of the Republic of Tatarstan (IVF RT) and the Foundation for promotion of the development of small enterprises in the research and technical area (FPDSE) (Research Collaboration Agreement, art. 1, from 21.03.2011).

<sup>1</sup> Kazan State Medical University; 49 Butlerova ul., Kazan, 420012, Russian Federation

<sup>2</sup> Republican Consultative and Diagnostic Center of Movement Disorders and Botulinotherapy; 5 Isaeva ul., Kazan, 420029, Russian Federation

<sup>3</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences; 26 Vavilova ul., Moscow, 119334, Russian Federation



# Информация для авторов

Журнал «Альманах клинической медицины» публикует рецензируемые статьи по всем аспектам клинической медицины, в том числе результаты оригинальных, специальных, фундаментальных исследований с клинической значимостью, обзорные статьи по современным проблемам медицины, а также описания случаев из практики.

Место в рейтинге SCIENCE INDEX за 2017 г. по тематике «Медицина и здравоохранение» – 24, пятилетний импакт-фактор РИНЦ – 0,452

Статьи следует направлять в электронном виде через систему электронной редакции (OJS) на сайте [almclinmed.ru](http://almclinmed.ru)

## Отбор рукописей и рецензирование

### Прием и предварительное рассмотрение рукописи

- **соответствие тематике и профилю журнала**

«Альманах клинической медицины» входит в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (перечень ВАК). Шифр группы научных специальностей: 14.01.00 – клиническая медицина.

Периодичность: 8 выпусков в год. Принцип формирования номеров – тематический. См. план выпусков на сайте [almclinmed.ru](http://almclinmed.ru)

- **соответствие формальным требованиям**

См. правила для авторов: <https://www.almclinmed.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>

- **наличие заимствований (система «Антиплагиат»)**

Рукописи принимаются на рассмотрение при условии, что они не подавались в другие издания, не размещались в Интернете и не были опубликованы ранее.

В случае отклонения рукописи по причине наличия неправомерных заимствований автору дополнительно направляется отчет системы «Антиплагиат».

### Рецензирование

- Рецензирование выполняют члены редакционной коллегии и редакционного совета журнала, а также внешние рецензенты из числа ведущих специалистов в своей области, работающих в научных направлениях, соответствующих теме статьи. Число рецензентов может варьировать от одного до пяти.
- Статья направляется рецензенту без указания имен и координат авторов, в так называемом слепом варианте.
- Срок рецензирования составляет 15 рабочих дней. Он может быть продлен по просьбе рецензента, а также при необходимости привлечения дополнительных экспертов.
- Рецензент работает со статьей как с конфиденциальным материалом, строго соблюдая право автора на неразглашение до публикации содержащихся в статье сведений. Дополнительные эксперты могут привлекаться рецензентом к работе только с разрешения редакции и также на условиях конфиденциальности.

- В отдельных случаях по рекомендации рецензента редакция может направить статью на дополнительное рецензирование, в том числе статистическое и методологическое.
- Автору рецензируемой статьи предоставляется возможность ознакомиться с текстом рецензии, при этом не указывается имя рецензента и его контактная информация (за исключением случаев, когда рецензент дает разрешение на раскрытие информации о себе).
- Статья, не рекомендованная рецензентом к публикации, к повторному рассмотрению не принимается. Сообщение об отрицательной рецензии направляется автору по электронной почте, в письме приводятся текст рецензии и основания для отказа в публикации.
- Если в рецензии содержатся рекомендации по исправлению и доработке статьи, ответственный редактор направляет автору текст рецензии с предложением учесть рекомендации при подготовке нового варианта статьи или аргументированно их опровергнуть (частично или полностью). Доработанная автором статья повторно направляется на рецензирование.
- В случае отказа авторов от доработки рукописи они должны в письменной форме уведомить редакцию об отзыве статьи из журнала. Если авторы в двухмесячный срок с даты направления текста рецензии не высылают в редакцию доработанный вариант, редакция это трактует как отзыв статьи из журнала и направляет авторам уведомление об отклонении статьи в связи с истечением срока, отведенного на доработку.
- Если у автора и рецензента возникли неразрешимые противоречия относительно статьи, редколлегия вправе послать статью другому рецензенту. В конфликтных ситуациях статья может быть передана на рассмотрение одному из членов редакционной коллегии, окончательное решение в таких случаях принимает главный редактор.
- Наличие положительной рецензии не является достаточным основанием для публикации статьи. Окончательное решение о целесообразности публикации принимает редакционная коллегия, а в спорных ситуациях – главный редактор. После принятия редколлегией журнала решения о допуске статьи к публикации редакция информирует об этом автора и указывает выпуск журнала.

С полной информацией о порядке подачи рукописи, правилах для авторов, порядке рецензирования, публикационной этике можно ознакомиться на сайте журнала: [almclinmed.ru](http://almclinmed.ru)

