МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная Европа

lab.recipe.by

2020, том 9, № 1–2

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь 02.12.2011
Регистрационное свидетельство № 1496

Учредитель:
УП «Профессиональные издания»
при участии Республиканского научного
общества специалистов клинической
лабораторной диагностики Беларуси

Адрес редакции:
220049, Минск, ул. Кнорина, 17
Тел.: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Директор Евтушенко Л.А.
Заместитель главного редактора Жабинский А.В.
Руководитель службы рекламы и маркетинга Коваль М.А.
Технический редактор Нужин Д.В.

Украина

Журнал зарегистрирован
Государственной регистрационной
службой Украины 02.12.2014
Регистрационное свидетельство № 21184-10984ПР

Учредители:
Национальная медицинская академия
последипломного образования имени П.Л. Шупика
УП «Профессиональные издания»

Офис в Украине:
ООО «Профессиональные издания. Украина»
04116, Киев, ул. Старокиевская, 10-г, сектор «В»,
офис 201

Контакты:
тел.: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pi_info@ukr.net

Подписка
в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь)
индивидуальный индекс **01389**
ведомственный индекс **013892**

в каталоге ОАО «Арзи» (Российская Федерация)
индекс **01389**

в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан)
индекс **01389**

В Украине подписка оформляется через офис
ООО «Профессиональные издания. Украина»

01389 – единый индекс в электронных каталогах
«Газеты и журналы» на сайтах агентств:
ООО «Информнаука» (Российская Федерация),
АО «МК-Периодика» (Российская Федерация),
ООО «Прессинформ» (Российская Федерация),
ООО «НПО «Информ-система» (Российская Федерация),
ГП «Пресса» (Украина),
ГП «Пошта Молдовей» (Молдова),
АО «Летувос паштас» (Литва),
Kubon&Sagner (Германия),
ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия),
Фирма «INDEX» (Болгария)

Электронная версия журнала доступна
на сайте lab.recipe.by, в Научной электронной
библиотеке elibrary.ru, в базе данных East View,
в электронной библиотечной системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь
в редакцию в Минске
и офис в Киеве

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.
Цена свободная

Подписано в печать 27.03.2020.
Тираж в Беларуси 1000 экз.
Тираж в Украине 2000 экз.
Заказ №

Формат 70x100 $^{1}/_{16}$. Печать офсетная

Отпечатано
Производственное дочернее унитарное предприятие
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№2/18 от 26.11.2013.
пл. Свободы, 23-103, г. Минск.
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика. Восточная Европа»
Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с письменного разрешения редакции с обязательной ссылкой на источник.
© УП «Профессиональные издания», 2020
© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2020

Беларусь **Украина**

Главный редактор
Камышников Владимир Семенович,
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
клинической лабораторной диагностики
Белорусской медицинской академии
последипломного образования

Редакционная коллегия:
Алехнович Л.И., к.м.н., доц. (Минск)
Бадыгина Н.А., к.б.н. (Минск)
Беляев С.А. (Минск)
Вергун О.М., к.б.н., доц. (Минск)
Владимирская Т.Э., к.б.н. (Минск)
Гусина Н.Б., к.м.н., доц. (Минск)
Доценко Э.А., д.м.н., проф. (Минск)
Дубровский А.Ч., к.м.н. (Минск)
Качеровская Е.Р. (Минск)
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф. (Витебск)
Костин Г.М., к.м.н., доц. (Минск)
Костюк С.А., д.м.н., доц. (Минск)
Кочетов А.Г., д.м.н. (Москва)
Кузнецов О.Е., к.м.н., доц. (Гродно)
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц. (Минск)
Лелевич В.В., д.м.н., проф. (Гродно)
Ляликов С.А., д.м.н., проф. (Гродно)
Новикова И.А., д.м.н., проф. (Гомель)
Потапнев М.П., д.м.н., проф. (Минск)
Прохорова В.И., д.м.н., проф. (Минск)
Смирнова Л.А., д.м.н., проф. (Минск)
Смолякова Р.М., д.б.н., доц. (Минск)
Таганович А.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Хуторян Л.М. (Челябинск)

Главный редактор
Лунёва Анна Геннадиевна,
д.м.н., профессор, заведующая кафедрой
клинической лабораторной диагностики
Национальной медицинской академии
последипломного образования имени П.Л. Шупика,
президент Всеукраинской ассоциации
клинической химии и лабораторной медицины

Редакционная коллегия:
Бодня Е.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Воронцова Л.Л., д.м.н., проф. (Запорожье)
Вьюницкая Л.В., к.б.н., доц. (Киев)
Гавриленко Т.И., д.б.н., проф. (Киев)
Ермоленко Т.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Завадецкая Е.П., к.м.н., доц. (Киев)
Зяблицев С.В., д.м.н., проф. (Донецк)
Игнатьев А.М., д.м.н., проф. (Одесса)
Клименко С.В., д.м.н., проф. (Киев)
Клищ И.Н., д.б.н., проф. (Тернополь)
Криницкая И.Я., д.м.н., проф. (Тернополь)
Лаповец Л.Е., д.м.н., проф. (Львов)
Леонтьева Ф.С., к.б.н. (Харьков)
Липкан Г.Н., д.м.н., проф. (Киев)
Магомедов А.М., д.б.н., проф. (Киев)
Мацегора Н.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Медведева И.М., к.м.н. (Сумы)
Олейник Е.А., к.м.н., доц. (Киев)
Проценко В.Н., к.м.н., доц. (Харьков)
Ткач Ю.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Хейломский А.Б. (Киев)
Шахнин Д.Б., к.х.н. (Киев)
Якимова Т.П., д.м.н., доц. (Харьков)
Ястремська О.О., к.м.н., доц. (Львов)

Рецензируемое издание
Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований. Решение коллегии ВАК от 24.10.2012 (протокол № 06-18/2).

Научные статьи, опубликованные в журнале, для украинских соискателей ученых степеней на основании приказа МОНмолодьспорта Украины от 17.10.2012 № 1112 приравниваются к зарубежным публикациям.

Журнал включен в базы данных Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, РИНЦ.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.
Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точки зрения автора.
Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by **2020 Volume 9 Number 1–2**

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered
in the Ministry of information
of the Republic of Belarus 02.12.2011
Registration certificate № 1496

Founder:
UE "Professional Editions" with the participation
of the Republican scientific society of experts of the clinical
laboratory diagnostics of Belarus

Address of the editorial office:
220049, Minsk, Knorin str., 17
Phone: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Director Evtushenko L.
Deputy editor-in-chief Zhabinski A.
Head of advertising and marketing Koval M.
Technical editor Nuzhin D.

Ukraine

The journal is registered
at the State registry of Ukraine 02.12.2014
Registration certificate № 21184-10984PR

Founders:
Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education
UE "Professional Editions"

Office in Ukraine:
LLC "Professional Editions. Ukraine"
04116, Kyiv, Starokievskaya str., 10-g, sector "B",
office 201

Contacts:
phone: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pi_info@ukr.net

Subscription
in the Republican unitary enterprise "Belposhta"
individual index **01389**
departmental index **013892**

in catalogue JSC "ARZI" (Russian Federation)
index **01389**

in JSC "Kazpochta" catalogue (Kazakhstan)
index **01389**

In Ukraine the subscription is made out through office
LLC "Professional Edition. Ukraine"

Index **01389** in the electronic catalogs "Newspapers
and Magazines" on web-sites of agencies:
LLC "Informnauka" (Russian Federation),
JSC "MK-Periodika" (Russian Federation),
LLC "Pressinform" (Russian Federation),
LLC "SPA "Inform-system" (Russian Federation),
SE "Press" (Ukraine),
SE "Poshta Moldovey" (Moldova),
JSC "Letuvos pashtas" (Lithuania),
Kubon&Sagner (Germany),
LLC "Subscription Agency PKS" (Latvia),
INDEX Firm agency (Bulgaria)

The electronic version of the journal
is available on lab.recipe.by,
on the Scientific electronic library elibrary.ru,
in the East View database, in the electronic
library system IPRbooks

Concerning acquisition of the journal address
to the editorial office in Minsk
and the office in Kyiv

The frequency of journal is 1 time in 3 months.
The price is not fixed

Sent for the press 27.03.2020.
Circulation in Belarus is 1000 copies
Circulation in Ukraine is 2000 copies
Order №

Format 70x100 $^{1}/_{16}$. Litho

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics. Eastern Europe"
Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition is possible only with written
permission of edition with an obligatory reference to the source.
© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2020
© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2020

Belarus **Ukraine**

Editor-in-Chief Vladimir S. Kamyshnikov,
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Clinical Laboratory Diagnostics Department
of Belarusian Medical Academy of Postgraduate
Education (Minsk)

Editorial Board:
Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Badygina N., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)
Beliaev S. (Minsk)
Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci. (Minsk)
Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Hutoryan L. (Chelyabinsk)
Kacherovskaya E. (Minsk)
Kochetov A., Dr. of Med. Sci. (Moscow, Russia)
Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Vitebsk)
Kostin G., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kostyuk S., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuznetsov O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Grodno)
Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Gomel)
Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smirnova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Minsk)
Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Vladimirskaya T., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)

Editor-in-Chief Ganna G. Lunova,
Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Clinical
Laboratory Diagnostics Department of Shupyk
National Medical Academy of Postgraduate Education,
President of Ukrainian Association of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine (Kyiv)

Editorial Board:
Bodnya E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Ermolenko T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Gavrilenko T., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Ignatyev A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Kheilomskyi A. (Kyiv)
Klimenko S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Klishch M., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Ternopil)
Krinitskaya I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Ternopil)
Lapovets L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Lviv)
Leont'eva F., Cand. of Biol. Sci. (Kharkiv)
Lipkan G., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Magomedov A., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Matsegora N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Medvedeva I., Cand. of Med. Sci. (Sumy)
Oliynyk E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Protsenko V., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kharkiv)
Tkach Yu., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Shakhnin D., Cand. of Chemic. Sci. (Kyiv)
Vorontsova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Zaporizhia)
Vyyunitskaya L., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Yakimova T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Yastremska O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Lviv)
Zavadetskaya E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Zyablitsev S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Donetsk)

Peer-Reviewed Edition
The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research. HCC board decision of 12.10.2012 (protocol № 06-18/2).

Scientific articles published in the journal for Ukrainian applicants of academic degrees on the basis of the order of Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from 17.10.2012 № 1112 are equated to foreign publications.

The journal is included in the databases Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, RSCI.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.
Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.
Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "On the Rights of Advertising" are advertisers.

Уважаемые читатели!

Настоящий номер журнала открывается серией публикаций, посвященных становлению лабораторной медицины и службы клинической лабораторной диагностики в Республике Беларусь, а также значимости для ее развития 50-летней образовательной, научной, лечебно-диагностической, консультационной, организационно-методической и редакционно-издательской деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО – в связи с ее знаменательным юбилеем.

Не может не привлечь внимание и статья ведущих специалистов клинической лабораторной диагностики России об унификации процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчин.

Не менее важной представляется и статья белорусских специалистов-медиков, посвященная ранней, дородовой лабораторной диагностике врожденных пороков развития жизненно важных органов плода.

Хотелось бы отметить, что в течение более чем 9-летнего периода существования журнала на его страницах были обсуждены помимо многих научных проблем наиболее важные вопросы деятельности клинической лабораторной службы, а также подготовки профессиональных и научных кадров в этой сфере деятельности.

Так, профессором А.Г. Лунёвой была представлена обстоятельная информация о мероприятиях по изменению штатно-кадровой структуры клинико-диагностических лабораторий Украины, о реформировании медицинских лабораторий лечебно-профилактических учреждений г. Киева, о разработке модели индикаторов качества и их внедрении в работу клинико-диагностических лабораторий, а также о валидации и верификации количественных методик клинических лабораторных исследований, о новых подходах к оцениванию специалистов, работающих в медицинских лабораториях, о лицензировании и непрерывном совершенствовании профессиональной деятельности врачей лабораторной медицины в Украине.

Все затронутые Анной Геннадиевной вопросы и сделанные ею предложения нашли отклик в виде публикаций белорусских авторов, что во многом способствовало выработке правильной тактики дальнейшего развития лабораторной службы в Республике Беларусь и Украине. В последнее время обсуждался проект совместного участия кафедр клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика и Белорусской медицинской академии последипломного

образования в программе Европейского союза Эразмус+ по усовершенствованию процесса сертификации специалистов клинической лабораторной диагностики в странах-участниках проекта с целью признания соответствия уровня их квалификации требованиям Европейского реестра специалистов лабораторной медицины. Хотелось бы надеяться на то, что это начинание профессора А.Г. Лунёвой, сердце которой, к великому сожалению, перестало биться в начале текущего года, сможет получить дальнейшее развитие.

Белорусские представители редакционной коллегии международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа», профессорско-преподавательский коллектив кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО и все специалисты клинической лабораторной службы Республики Беларусь выражают глубокие соболезнования по поводу невосполнимой потери – безвременного ухода из жизни замечательного Человека, обладавшего незаурядными духовными качествами, талантливого ученого, прекрасного педагога, крупного организатора здравоохранения Украины в области лабораторной медицины, внесшего исключительно большой вклад в совершенствование деятельности службы клинической лабораторной диагностики, высококвалифицированного специалиста в области лабораторной медицины, прошедшего путь от врача-лаборанта до заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика и Президента Всеукраинской ассоциации клинической химии и лабораторной медицины – Лунёвой Анны Геннадиевны.

Глубоко скорбим по поводу постигшей всех нас большой, невосполнимой утраты.

Главный редактор в Беларуси
Камышников Владимир Семенович

Организация деятельности клинико-лабораторной службы
Становление лабораторной медицины в Республике Беларусь и вклад в ее развитие кафедры клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования (к 50-летию кафедры)
Камышников В.С. 9

Роль кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО в совершенствовании лабораторной химико-токсикологической службы Республики Беларусь
Кузьменко А.Т., Камышников В.С., Чубуков А.М. 32

Современные технологии и методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний: вклад в их реализацию лабораторной службы городской клинической инфекционной больницы г. Минска
Анисько Л.А., Рогачева Т.А. 37

Лабораторная диагностика нарушений мужской фертильности
Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины
Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И., Долгов В.В. 41

Оригинальные исследования
Биохимические исследования околоплодных вод как необходимый этап осуществления дородовой диагностики врожденных пороков развития органов пищеварительной системы
Чуканов А.Н., Курлович И.В., Семенчук В.Л., Виктор С.А. 50

Естественные факторы, влияющие на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови человека
Жильцов И.В. 60

Особенности минерализации костной ткани при сочетанном употреблении аторвастатина и оксипроизводного витамина D (α-кальцидола) (экспериментальное исследование)
Осочук С.С., Яковлева О.С. 68

Особенности клеточных факторов иммунитета у мужчин с нарушением репродуктивной функции при наличии токсокарозной инвазии
Воронцова Л.Л., Кенийз С.А., Коваленко В.А. 76

Лабораторные исследования в спортивной медицине
Зависимость биохимических маркеров здоровья от уровня спортивного мастерства в пубертатном периоде
Чиркин А.А., Алтани М.С., Степанова Н.А., Чиркина А.А. 87

Новые технологии в лабораторной диагностике
Трансляционная лабораторная медицина: прогнозирование осложненного течения острого коронарного синдрома с использованием инновационных технологий оценки сопряжения процессов антиоксидантной защиты, протео- и фосфолиполиза
Камышников В.С., Яковлев-Малых Н.Н., Литвинко Н.М., Свиридов О.В., Дубовская Л.В., Юрага Т.М., Борисенко Т.Д. 98

Оценка защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса
Пехтерева Н.В., Камышников В.С., Хоровец А.И., Жуковец Т.А. 116

Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии
Дорошенко Е.М., Новогродская Я.И. 135

Приглашение к дискуссии
К обсуждению проблемы «нормальных» величин: сравнительный анализ клеточного состава крови и уровней содержания в ней белков у спорадических и регулярных доноров
Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Прохорова В.И., Готько О.В., Левандовская О.В. 144

Аллергическая реакция на β-лактамные антибиотики – карбапенемы (обзор литературы и клинический случай)
Лапцевич А.В., Кондаурова С.Л., Липницкий А.В. 155

Некролог
Памяти Лунёвой Анны Геннадиевны – главного редактора журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» в Украине 164

IN THE ISSUE

Laboratory Diagnostics of Male Infertility
Unification of Procedures of Cytochemical Staining of Human Ejaculate to Determine the True Fertility of Men
Sapozhkova Zh., Eremin K., Dolgov V. 41

Original Researches
Biochemical Studies of Amniotic Fluid as a Necessary Stage in the Implementation of Prenatal Diagnosis of Congenital Malformations of the Digestive System
Chukanov A., Kurlovich I., Semenchuk V., Victor S. 50

Natural Factors That Affect the Level of Beta-Lactamase Activity of Human Serum
Zhyltsou I. 60

Features of Bone Mineralization in Combined Use of Atorvastatin and α-Calcidol (Experimental Study)
Osochuk S., Yakovleva O. 68

Peculiarities of Cellular Factors of Immunity in Men with Disorder of Reproductive Function in the Presence of Toxocariasis Invasion
Vorontsova L., Keniyz S., Kovalenko V. 76

Laboratory Researches in Sports Medicine
Dependence of Biochemical Health Markers on the Level of Sports Skills in the Puberty
Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A. 87

New Technologies in Laboratory Diagnostics
Translational Laboratory Medicine: Prediction of the Complicated Course of Acute Coronary Syndrome Using Innovative Technologies of Assessment of the Coupling of Antioxidant Protection Processes, Proteo- and Phospholipolysis
Kamyshnikov V., Yakovlev-Malykh N., Litvinko N., Sviridov O., Dubovskaya L., Yuraga T., Borisenko T. 98

Evaluation of the Protective Reaction of the Lipid Structures of Blood Serum and Spermoplasm to the Effect of the Factor that Initiates the State of Oxidative Stress
Pekhtserava N., Kamyshnikov V., Kharavets A., Zhukovets T. 116

Laboratory Diagnostic Technology for Simultaneous Determination in a Sample of the Analyzed Material (Tissue, Biological Fluid) of Homocysteine and Other Physiologically Active Aminothiols Using Highly Efficient Liquid Chromatography
Doroshenko Ye., Novogrodskaya Ya. 135

Request for Discussion
Discussion of the Problem of "Normal" Values: Comparative Analysis of Cell Composition of Blood and the Level of Blood Serum Proteins in Sporadic and Regular Donors
Taganovich A., Kauhanka N., Prohorova V., Got'ko O., Levandovskaya O. 144

Allergic Reaction to β-lactam Antibiotics – Carbapenems (Literature Review and Clinical Case Report)
Laptcevich A., Kandaurava S., Lipnitski A. 155

Становление лабораторной медицины в Республике Беларусь и вклад в ее развитие кафедры клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования (к 50-летию кафедры)

Лабораторная медицина – область медицинской деятельности, связанная с выполнением и трактовкой результатов осуществления лабораторно-диагностических исследований, адекватных выявлению ожидаемой у пациента (на основании учета ряда клинических и других признаков заболевания) формы патологии.

Она являет собой пример междисциплинарной науки, возникшей на «стыке» клинической медицины с биологией, химией, физикой, генетикой и другими фундаментальными науками и объединяющей в себе достижения медицины и естествознания. В силу этого лабораторная медицина составляет основу всех видов клинической деятельности, поскольку без выполнения клинико-лабораторных исследований весьма затруднительна, если не невозможна, постановка окончательного диагноза подавляющего большинства заболеваний.

В связи со все более широким внедрением в практику исследования пациентов молекулярно-биологических и генетических исследований, ориентированных на определение предикторов (предвестников) заболеваний, лабораторная медицина в последние годы составляет основу не только доказательной, но также предиктивной (превентивной, предупредительной), персонализированной и трансляционной медицины, состоящей в переносе разработанных в ходе выполнения фундаментальных исследований инновационных методов лабораторного анализа в медицинскую практику.

Теоретическую и методологическую основу активно развивающихся в настоящее время новых направлений в области лабораторной медицины составляет «клиническая лабораторная диагностика», рассматриваемая не только как вид профессиональной деятельности врачей по оказанию специализированной лечебно-диагностической помощи населению, но и как научная специальность, вошедшая в перечень специальностей ВАК Республики Беларусь под шифром 14.03.10.

Характерной особенностью специальности «клиническая лабораторная диагностика» является то, что она базируется на трех относительно самостоятельных, но вместе с тем интегрально тесно связанных

между собой и дополняющих друг друга научных дисциплин, каковыми являются:

- клиническая патобиология – теоретический базис, позволяющий осмыслить обнаруживаемые метаболические изменения в организме в аспекте их роли в патогенезе заболеваний;
- клиническая аналитика – методология и методический арсенал лабораторного исследования, обеспечивающие «доступ» к изучению различных компонентов биологического материала;
- клинико-лабораторная информатика – концептуальный аппарат оценки диагностической и прогностической значимости выявленных в организме метаболических изменений.

Развитие отечественной лабораторной медицины в течение последнего столетнего периода времени (охватывающего советский и постсоветский этапы ее становления) было обусловлено как достижениями в области научно-технического прогресса, так и совершенствованием системы мероприятий по организации деятельности лабораторной службы.

В начале прошлого века в дореволюционной Беларуси частнопрактикующими врачами, сотрудниками отдельных больниц, аптек и Пастеровских станций выполнялся весьма небольшой объем клинико-лабораторных исследований – в основном бактериологических, бактериоскопических, патологоанатомических, судебно-медицинских и других, включающих также анализ исследования пищевых продуктов и воды.

Но уже спустя месяц после освобождения страны от интервентов – 12 августа 1920 г. первым приказом Минского губернского отдела здравоохранения было предписано решить вопрос об организации производства медицинских анализов для лечебных учреждений и амбулаторий. На состоявшихся в 1922 г. и 1923 г. 3-м и 4-м Всебелорусских съездах медиков обсуждались проблемы организации лабораторной службы. На основании вынесенных решений в 1923 г. были созданы санитарно-бактериологический институт в Витебске, а в 1924 г. – микробиологический институт в Минске, деятельность которых была направлена прежде всего на создание необходимых диагностикумов, препаратов для борьбы с широко распространенными в стране венерическими и другими инфекциями, подготовку профессиональных кадров.

Лабораторная деятельность в тот период времени во многом развивалась и совершенствовалась благодаря участию в ее становлении специалистов-микробиологов и ряда известных представителей клинических специальностей. Так, существенный вклад в развитие этой отрасли медицинской деятельности был привнесен открытием в 1923 г. медицинского факультета при БГУ, поскольку возглавившие кафедры клинического профиля известные ученые стали играть роль инициаторов внедрения методов клинической лабораторной диагностики в практику обследования пациентов (при этом сами методы исследования «налаживались» главным образом специалистами-химиками) [1, 2].

Эти заслуженные деятели науки и другие «великие медики» большое внимание уделяли внедрению в практику новых методов лабораторного исследования пациентов, а также организации осуществления лабораторной деятельности в медицинских учреждениях.

	Профессор Эльберт Борис Яковлевич (1891–1963): микробиолог, первый заведующий кафедрой микробиологии (1923–1931) и первый директор Белорусского санитарно-бактериологического института (1923–1931)
	Профессор Мелких Сергей Михеевич (1877–1952): терапевт, первый заведующий кафедрой факультетской терапии медицинского факультета БГУ (1923–1930) и Белорусского (Минского) медицинского института (1930–1941)
	Профессор Гаусман Федор Оскарович (1868–1944): терапевт, первый заведующий кафедрой госпитальной терапии медицинского факультета БГУ (1924–1930), Белорусского медицинского института (1930–1941)
	Профессор Леонов Василий Антонович (1889–1972): педиатр, первый заведующий кафедрой детских болезней медицинского факультета БГУ (1924–1930), Белорусского (Минского) медицинского института (1930–1941)
	Профессор Прокопчук Андрей Яковлевич (1986–1970): дерматовенеролог, заведующий кафедрой кожных и венерических болезней Белорусского (Минского) медицинского института (1931–1941)

Для того периода времени характерным являлось то, что формирование направлений и спектра лабораторных исследований определялось прежде всего профессиональными и научными интересами авторитетных специалистов-клиницистов.

При ряде кафедр, расположенных на базе клиник (как и в самих клиниках), были созданы биохимические группы (лаборатории). В 30-х гг. прошлого столетия таковые имелись на кафедрах госпитальной терапии, общей терапии, госпитальной хирургии (зав. – проф. М.П. Соколовский), кожно-венерических болезней, детских болезней и др.

После окончания Великой Отечественной войны эта традиция была продолжена: клинико-биохимические группы были созданы и при ряде других кафедр Минского государственного медицинского института (МГМИ): пропедевтики внутренних болезней (зав. – проф. И.Д. Мишенин), факультетской терапии (зав. – проф. Б.И. Трусевич), психиатрии (зав. – проф. М.А. Чалисов) и др.

Особенно важную роль в «укреплении» клинико-лабораторной базы сыграло открытие в послевоенное время научно-исследовательских институтов МЗ БССР, оснащенных наиболее совершенным для того времени лабораторно-диагностическим оборудованием: НИИ онкологии, НИИ неврологии и физиотерапии, НИИ туберкулеза, НИИ кожно-венерических заболеваний, НИИ переливания крови, НИИ травматологии МЗ БССР и др.

Осуществление клинико-лабораторной деятельности было невозможным без использования специальных, адекватных решению поставленных задач биохимических и других методов исследования. В связи с этим широкую популярность приобрели вышедшие в свет в середине и в конце прошлого столетия труды (пособия, справочники) российских и зарубежных ученых, посвященные различным аспектам клинической лабораторной диагностики. В их числе:

- «Руководство по клиническим лабораторным исследованиям», В.Е. Предтеченского, МедГИЗ. – 1960. Москва. – 963 с.
- «Клинические лабораторные исследования в педиатрии». Йордан Тодоров. Третье русское издание. София, 1961. – 784 с.
- «Биохимические методы исследования в клинике». Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. Ленинград, «Медицина», 1976, 383 с.

Подготовке кадров в области медицинской биохимии (как важного раздела лабораторной медицины) во многом способствовали работы белорусских ученых-биохимиков. Так, в 1956 г. вышла книга профессора М.Ф. Мережинского «Клиническая биохимия», в 1957 г. – профессора Л.С. Черкасовой «Биохимия травмы», в 1960 г. – профессора М.А. Чалисова и доцента Л.И. Ландо «Биохимические исследования в психиатрической клинике», в 1961 г. – профессоров Л.С. Черкасовой и М.Ф. Мережинского «Обмен жиров и липидов», в 1965 г. – профессоров М.Ф. Мережинского и Л.С. Черкасовой «Основы клинической биохимии».

Заложенные научной школой профессора М.Ф. Мережинского традиции получили дальнейшее развитие в направлениях образовательной деятельности профессорско-преподавательского состава кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО).

В середине прошлого века многие актуальные вопросы клинической биохимии нашли освещение в материалах Первого Всесоюзного биохимического съезда [3, 4], активными участниками которого явились известные ученые, внесшие крупный вклад в развитие лабораторной медицины.

Среди них профессора: А.Н. Климов (лаборатория биохимии липидного обмена Отдела биохимии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград), Г.В. Дервиз (Центральный ордена Ленина институт гематологии и переливания крови, Москва), И.И. Иванов (Ленфилиал ВНИИМИО), Б.Ф. Коровкин (кафедра биохимии Военно-медицинской ордена Ленина Академии им. С.М. Кирова, Ленинград), Н.А. Юдаев, Ю.А. Панков (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва), В.В. Меньшиков, Т.Д. Большакова (Межклиническая гормональная лаборатория 1-го Московского ордена Ленина медицинского института им. И.М. Сеченова при Госпитальной терапевтической клинике им. А.А. Остроумова, Москва).

В подготовке кадров специалистов клинической лабораторной диагностики значительная роль была отведена доцентскому курсу «клиническая лабораторная диагностика», созданному Е.А. Кост в 1924–1925 гг. при кафедре терапии II Московского медицинского института (зав. кафедрой профессор М.П. Кончаловский), впоследствии (в 1936 г.) преобразованному Е.А. Кост в кафедру клинической лабораторной диагностики при Центральном институте усовершенствования врачей (ЦИУ). Подготовке специалистов в области лабораторной медицины во всех регионах СССР (в том числе и в БССР) во многом способствовал основанный в 1925 г. и выходивший вплоть до 1941 г. журнал «Лабораторная практика», в котором публиковались статьи с описанием перспективных к использованию методов лабораторной диагностики и трактовкой получаемых с их применением результатов. С 1955 г. преемником его стал журнал «Лабораторное дело» (с 1993 г. журнал для специалистов клинико-лабораторной службы стал выходить под названием «Клиническая лабораторная диагностика»: к настоящему времени выпуск этого журнала прекращен).

В становлении клинической биохимии и лабораторной диагностики в Республике Беларусь весьма большую роль сыграла кафедра общей химии Минского государственного медицинского института, которую возглавлял доцент В.А. Бандарин [5, 6].

Заведующий кафедрой общей химии МГМИ доцент В.А. Бандарин

С 1946 г. на базе созданного при кафедре научного студенческого кружка систематически готовились будущие специалисты в данной области медицины. Среди них: академик Национальной академии наук БССР, профессор Ю.М. Островский (Гродно); академик НАН Республики Беларусь профессор Е.Ф. Конопля; заслуженный деятель науки Республики Беларусь профессор В.Г. Колб; бывший заведующий кафедрой биохимии БГМУ заслуженный деятель науки Республики Беларусь профессор В.К. Кухта; заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелМАПО профессор В.С. Камышников; заведующий кафедрой биохимии БГМУ профессор А.Д. Таганович; бывший доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, а затем заведующий кафедрой гематологии БелГИУВ и директор НИИ гематологии МЗ Республики Беларусь профессор Е.П. Иванов; профессор кафедры биохимии БГМУ, лауреат Государственной премии Республики Беларусь Т.С. Морозкина; бывший заведующий кафедрой дерматовенерологии БелМАПО профессор Л.Г. Барабанов; заведующий кафедрой дерматовенерологии БГМУ профессор В.Л. Панкратов; заведующий кафедрой инфекционных болезней БелМАПО профессор А.А. Ключарева; профессор Н.Н. Войтенок (специалист в области молекулярной гематологии), профессор кафедры онкологии БГМУ Т.М. Литвинова и многие другие.

Оценивая в целом этап развития клинической лабораторной диагностики в период с 1920 по 1966 г. нельзя не отметить, что он характеризовался отсутствием стандартизации в использовании методов лабораторного анализа, их произвольным выбором для обследования пациентов.

Значимые организационные мероприятия, положившие начало новому этапу развития лабораторной медицины, стали систематически проводиться с 1967 г. Так, в январе 1967 г. при МЗ БССР была введена должность главного внештатного специалиста республики по клинической лабораторной службе, на которую был назначен руководитель биохимической лаборатории НИИ туберкулеза Министерства

здравоохранения БССР В.Г. Колб. 15 апреля 1967 г. при Управлении лечебно-профилактической помощи Министерства здравоохранения БССР был создан консультативный совет по лабораторному делу из 10 наиболее квалифицированных специалистов. Были произведены назначения главных внештатных врачей-лаборантов при областных отделах здравоохранения в г. Минске.

Важной вехой в становлении деятельности лабораторной службы на качественно новом уровне явился приказ МЗ СССР № 63 от 25.01.1968 «О мерах по дальнейшему развитию и совершенствованию лабораторной клинико-диагностической службы в СССР», которым предусмотрено создание клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) во всех лечебно-профилактических учреждениях стационарного и поликлинического типа, утверждение должности «врач-лаборант» и создание кафедр клинической лабораторной диагностики во всех 18 действующих в тот период времени институтах усовершенствования врачей, в том числе в Белорусском государственном институте усовершенствования врачей (БелГИУВ).

На основании соответствующих приказов МЗ СССР и БССР в 1968 г. были созданы Всесоюзный научно-методический и контрольный центр (ВНМиКЦ) по лабораторному делу в Москве, а также Республиканский организационно-методический и контрольный центр по лабораторному делу (РОМКЦЛД) в Минске, который весьма успешно функционировал на протяжении 25 лет (с 1968 до 1993 г.). Благодаря совместной деятельности кафедр клинической лабораторной диагностики и Всесоюзного научно-методического и контрольного центра (Москва) разработаны унифицированные методы исследования. Их внедрению в медицинских учреждениях Республики Беларусь способствовали обучение врачей-лаборантов на кафедре клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО) и деятельность РОМКЦЛД, впоследствии (в 1993 г.) преобразованного в Республиканский центр клинической лабораторной диагностики – РЦКЛД (ныне – Республиканский центр лабораторной диагностики – РЦЛД).

В 1968 г. в целях повышения эффективности профессиональной и научно-практической деятельности специалистов в области клинической лабораторной диагностики в Белоруссии было создано республиканское общество врачей-лаборантов, которое осуществляло свою деятельность в рамках Всесоюзного научного общества врачей-лаборантов, будучи его республиканским филиалом.

В результате проведенных мероприятий в последующем установилась отлаженная система организационно-методического руководства деятельности службы клинической лабораторной диагностики Министерства здравоохранения республики.

К тому же во второй половине прошлого века сформировался ряд научных школ в области медицинской биохимии и лабораторной медицины.

Одной из них явилась Гродненская научная биохимическая школа по изучению патохимии алкоголизма и наркомании, созданная академиком Ю.М. Островским на базе Института биохимии АН БССР и кафедры биохимии Гродненского медицинского института. Обучение студентов на курсе клинической биохимии в ГрГМУ было организовано

доцентом Ю.В. Киселевским, на базе которого в дальнейшем была создана кафедра клинической лабораторной диагностики ГрГМУ.

Академик Ю.М. Островский

Витебская научная биохимическая школа была сформирована благодаря деятельности профессоров А.А. Чиркина и Н.Ю. Коневаловой, а также заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики ВГМУ профессора Л.Н. Кирпиченок, открывших новые направления как в липидологии (по изучению липид-транспортной системы), так и в исследовании протеолитической системы крови.

Гомельская научная школа биохимиков и специалистов клинической лабораторной диагностики представлена деятельностью сотрудников кафедр биохимии (заведующий профессор А.И. Грицук), клинической лабораторной диагностики (заведующий профессор И.А. Новикова) и РНПЦ радиационной медицины и экологии человека МЗ Республики Беларусь.

Основополагающий вклад в развитие направления деятельности по подготовке профессиональных кадров в области лабораторной медицины внесла Минская (республиканская) школа клинической лабораторной диагностики, представленная кафедрой БелГИУВ (БелМАПО) (заведующие кафедрой: профессор В.Г. Колб – с 1970 по 1999 г.; профессор В.С. Камышников – с 1999 г. по настоящее время) и кафедрой биохимии БГМУ (заведующие в разные периоды времени профессор В.К. Кухта и профессор А.Д. Таганович).

Заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО) профессор В.Г. Колб

Со времени создания 20 апреля 1970 г. кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО) на ее базе стали систематически проводиться курсы специализации (переподготовки) и тематического усовершенствования (повышения квалификации), а также были открыты клиническая ординатура и специальная ординатура (спецординатура) по подготовке врачей-лаборантов для работы в странах Африки и Латинской Америки.

В период с начала деятельности кафедры до распада СССР актуальным являлось внедрение унифицированных методов исследования; их широкому использованию способствовали выпущенные в свет большим тиражом книги В.Г. Колб и В.С. Камышникова «Клиническая биохимия» (Минск, Беларусь. 1976), «Справочник по клинической химии» (Минск, Беларусь. 1982).

Их издание ознаменовало развитие направления информационной деятельности, ориентированное на подготовку профессиональных кадров [6–8].

За период деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО ее сотрудниками издано в общей сложности около 80 учебников, учебных пособий, справочников, монографий, которые охватывали как общие вопросы клинико-лабораторных исследований, так и лабораторную диагностику при отдельных нозологических формах заболеваний, относящихся к разным областям медицины, среди которых: гематология и гемостазиология, иммунология, кардиология, наркология, неврология, онкология, гепатология, нефрология.

Также вышли в свет пособия по лабораторной диагностике для практических врачей, популярные издания для населения (по толкованию результатов лабораторного исследования) и другие.

Сведения об издании кафедрой клинической лабораторной диагностики учебников, учебных пособий, допущенных Министерством образования Республики Беларусь, справочников и других руководств представлены в табл. 1.

Таблица 1
Информационное обеспечение отдельных видов клинико-лабораторной деятельности

Исследование в областях:	
Клиническая биохимия	
Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь. 1976 Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь. 1982	
Техника лабораторных работ	
«Техника лабораторных работ». Учебник (допущен МО Республики Беларусь). Москва. «МЕДпресс-информ», 2011, 336 с. Техника лабораторных работ в медицинской практике 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 344 с.: ил.	

Продолжение таблицы 1

Исследование в областях:	
Клинико-биохимическая лабораторная диагностика	
«Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике». В двух томах. – Мн.: Беларусь, 2002. – 495 с.: ил. «Клинико-биохимическая лабораторная диагностика». Справочник в 2 томах. Минск. Интерпресс-сервис. Оформление: «Книжный дом», 2003, 495 с.: ил. «Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике». 2-е издание, переработанное и дополненное. – Москва, «МЕДпресс-информ», 2004, 920 с., 2009. 889 с.	
Методы лабораторных исследований	
«Методы клинических лабораторных исследований». Учебное пособие для учащихся медицинских училищ по специальности «Лабораторная диагностика» (Допущено МО Республики Беларусь). Минск, Белорусская наука: 2001, 695 с., 2002. – 775 с. «Методы клинических лабораторных исследований». Учебник. Москва, МЕД-пресс-информ. Претерпело 10 переизданий (с дополнениями) в течение 10 лет!	
Гематология	
«Атлас по гематологии». Практическое пособие по морфологической и клинической диагностике. Перевод с английского. «Гемостазиология в клинической и лабораторной практике»: Учеб. пособие (допущено МО Республики Беларусь). – Минск : Адукацыя і выхаванне, 2011. – 320 с.: ил. «Руководство по гемостазиологии» (Е.П. Иванов). «Диагностика нарушений гемостаза» (Е.П. Иванов). «Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования». (Е.Т. Зубовская, С.Г. Светлицкая)	

Продолжение таблицы 1

Исследование в областях:	
Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда	
Лабораторная диагностика острого инфаркта миокарда / Учебно-методическое пособие. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2009, 72 с. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца / Учебное пособие с грифом Министерства образования Республики Беларусь. Беларусь, Минск, Издательство «Образование и воспитание», 2009, 152 стр. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца (предикторы осложнений и мониторинг метаболических нарушений) / Учебное пособие с грифом Министерства образования Республики Беларусь. Беларусь, Минск, Издательство «Образование и воспитание», 2015, 360 стр.	
Химико-токсикологический анализ наркотиков и психоактивных веществ	
Отравления наркотическими средствами, действующими на опиоидные рецепторы. Клиническая и лабораторная диагностика: учебно-методическое пособие / Адукацыя і выхаванне, 2010. – 72 с.: ил. Клинико-лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ: учеб. пособие / В.С. Камышников [и др.] под ред. В.С. Камышникова. – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2016. – 376 с.: ил.	
Неврология	
Монография. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта миокарда головного мозга / Под редакцией проф. д.м.н. В.С. Камышникова. – Минск: БелМАПО, 2013. – 512 с.	
Онкологические заболевания, диагностика и мониторинг	
Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов. Москва. МЕДпресс-информ, 2011, 128 с.: ил.	
Заболевания печени, диагностика	
Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени / В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 96 с.: ил. 2014. – 96 с.: ил.	

Продолжение таблицы 1

Исследование в областях:	
НОРМА	
Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь Справочное пособие для медицинских работников. Минск, 2009 г. Норма в лабораторной медицине: Справочник / В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 336 с.: ил.	
Справочники по диагностическим тестам	
Справочник по диагностическим тестам. Диана Николь, Стивен Дж. Макфи, Мишель Пиньон, Чуани Марк Лу. 2011. – 560 с.: ил.	
Карманный справочник врача	
Карманный справочник врача по лабораторной диагностике. В.С. Камышников. Минск, «Беларуская навука», 2002 г., 463 с. Карманный справочник по диагностическим тестам / Под ред. В.С. Камышникова. – Москва. МЕДпресс-информ: 2004. – 464 с., ил. 2007 г. – 400 с., 2008 г. – 400 с., 2012 г. – 400 с., 2013 г. – 400 с.	
Клинико-лабораторная диагностика для врачей	
Справочник участкового терапевта. Минск, 1986. Раздел «Клиническое толкование лабораторных исследований». С. 314–330. Практическое руководство по общей врачебной / семейной медицинской практике. Под редакцией проф. А.Г. Мрочека, доцента Е.А. Воронко. Минск, БелМАПО, 2003 г., 623 стр. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней : учеб. пособие / В.С. Камышников. – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. – 584 с.: ил. Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний / В.С. Камышников. – Мн. Издательство «Адукацыя і выхаванне», 2014. – 464 с.: ил. Учебное пособие допущено Министерств образования Республики Беларусь для студентов учреждений высшего образования по специальностям «Медико-диагностическое дело», «Лечебное дело»	
Лабораторная диагностика хирургических болезней	
Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней : учеб. пособие / В.С. Камышников. – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. – 584 с.: ил.	

Продолжение таблицы 1

Исследование в областях:	
Клинико-лабораторная диагностика от А до Я	
«Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справочное пособие. МЕДпресс-информ, 2005 – 320 с., 5-е изд. – 2014. 320 с.	
Клинико-лабораторная диагностика для населения	
«О чем говорят медицинские анализы» (справочное пособие), Беларуская навука: Минск, 1997, 1998. Москва: «Медпресс-информ», 2005 г., 176 стр. 3-е издание, переработанное и дополненное. Москва: «МЕДпресс-информ 2009, 224 с. М. : МЕДпресс-информ, 2013. – 304 с. Жизнь, здоровье, долголетие (советы профессоров). Мн.: Беларуская навука, 1998. – 622 с.	
Национальное руководство по клинической лабораторной диагностике	
Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний. – Мн.: Издательство «Адукацыя і выхаванне», 2014. – 464 с.: ил. Тираж 750 экз. Учебное пособие (допущено МО Республики Беларусь) для студентов учреждений высшего образования по специальностям «Медико-диагностическое дело», «Лечебное дело». Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований): учеб. пособие (допущено МО Республики Беларусь) для студентов учреждений высшего образования по специальности «Медико-диагностическое дело», «Лечебное дело» / МЕДпресс-информ, 2015. – 720 с. ил. (усл. печ. л. 45,00 + 3,00 цв. вкл.)	
Руководство по КЛД на английском языке	
Трактовка результатов клинико-лабораторного исследования – Interpretation of results of clinical laboratory research: учебное пособие / В.С. Камышников, Л.В. Батуревич, А.А. Сидо. – Минск: БелМАПО, 2010. – 328 с. (V.S. Kamyshnikou, L.V. Baturevich, A.A. Sido, Minsk: BelMAPE, 2010)	

Окончание таблицы 1

Исследование в областях:	
Руководство по КЛД на английском языке	
Организация клинической лабораторной службы, аттестация специалистов	

На основании приказа МЗ Республики Беларусь от 14.03.2011 № 233 издано национальное руководство по клинической лабораторной диагностике, представленное учебными пособиями для студентов медицинских университетов и системы последипломного образования, допущенных МО Республики Беларусь:

- «Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней»: учеб. пособие / В.С. Камышников. – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. – 584 с.;
- «Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний»: учеб. пособие (допущено МО Республики Беларусь): 2014;
- «Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований» : учеб. пособие / под ред. проф. В.С. Камышникова. – М. : МЕДпресс-информ, 2015. – 720 с.

Повышению информированности врачей во многом способствовало проведение в течение 40 лет (через каждые 5 лет) 8 съездов специалистов клинической лабораторной диагностики, каждый из которых сопровождался изданием материалов сообщений. Так, 1-й съезд состоялся 20–21 мая 1975 г., Минск, 2-й съезд – 22–23 октября 1981 г., Минск; 3-й съезд – 3–4 октября 1986 г., Минск; 4-й съезд – в 1992 г., Гродно; 5-й съезд – в 1997 г., Минск; 6-й съезд – 27–28 ноября 2002 г., Брест; 7-й съезд – 25–26 октября 2007 г., Минск; 8-й съезд – 11–12 ноября 2016 г., Минск.

С начала 2012 г. организовано издание профильного международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа», одобренного ВАК Беларуси. В каждом номере освещается тематика общего проблемного характера (в частности, организации лабораторной службы, подготовки профессиональных и научных кадров в области лабораторной медицины); содержится информация о

новых, инновационных технологиях лабораторного исследования, создаваемых в ходе выполнения диссертационных исследований, а также сведения, способствующие подготовке профессиональных кадров в области лабораторной медицины.

Созданная информационная база послужила фундаментальной и практико-ориентированной основой для выполнения научно-исследовательских работ в области клинической лабораторной диагностики.

В 2000 г. Президиумом ВАК Республики Беларусь были утверждены два разработанных в 1999 г. (В.С. Камышников, 1999 г.) постоянных паспорта специальности 14.03.10 (ранее 14.00.46) – клиническая лабораторная диагностика (по двум отраслям: «медицинские науки» и «биологические науки»), а с 2001 г. на базе БелМАПО был открыт совет по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности «клиническая лабораторная диагностика» и «эндокринология».

В течение 19-летнего периода после открытия защищены 3 докторские и 36 кандидатских диссертаций по научной специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика, притом не только профессиональными работниками службы клинической лабораторной диагностики, но и представителями других клинических специальностей: терапии, хирургии, эндокринологии, кардиологии, пульмонологии (в том числе и специалистами из Ближнего Востока).

В продолжение этого периода четырежды (в 2000 г., 2007 г., 2010 г. и 2016 г.) производилось обновление паспорта научной специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика: два раза – в соответствии с ранее принятым шифром специальности – 14.00.46 и два раза – ныне действующим – 14.03.10.

Паспортом специальности предопределены, в частности, разработка и усовершенствование новых лабораторно-диагностических методов исследования и установление лабораторных критериев с оценкой диагностической надежности их использования.

Направление научной деятельности по созданию импортозамещающих и инновационных методов исследования в области лабораторной медицины во многом было инициировано объективными условиями, сложившимися после распада СССР [10, 11].

Вызванное этим прекращение поставки в нашу страну из Российской Федерации необходимых для выполнения лабораторных исследований реагентов, контрольного биологического материала привело к простаиванию лабораторного оборудования и почти полному прекращению выполнения лабораторных исследований в лечебно-профилактических учреждениях нашей страны.

В сложившейся ситуации Министерство здравоохранения и Государственный комитет по науке и технологиям (ГКНТ) Республики Беларусь поддержали представленные кафедрой клинической лабораторной диагностики научно-технические проекты, направленные на разработку

отечественных наборов реагентов для имевшихся тогда в лабораториях измерительных фотометрических приборов – типа ФЭКов.

В результате в течение 1993–1996 гг. были созданы и выпущены в достаточно большом количестве наборы реагентов 14 видов для выполнения основного спектра жизненно важных лабораторных исследований, а также налажено их массовое производство на базе НТК «Анализ Х» (БГУ, Минск). Тем самым было обеспечено выполнение необходимых в подавляющем большинстве случаев лабораторно-диагностических исследований населению страны.

Начавшаяся же в этот период времени аккредитация в городах Беларуси представительств иностранных фирм – поставщиков нового современного лабораторного оборудования вызвала потребность в разработке новых адекватных приборов европейского и мирового уровня лабораторно-диагностических тест-систем, что и было осуществлено начиная с 1995 г. в ходе реализации ряда финансируемых целевым назначением заданий Государственных научно-технических программ и инновационных проектов.

В дальнейшем при совместном участии в выполнении 24 тем НИР (в том числе 16 заданий ГНТП и 5 инновационных проектов) сотрудников кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО, БГУ, ИБОХ и Института физики и Института тепломассообмена НАН Беларуси было создано около 80 видов отечественных приборов и лабораторно-диагностических тест-систем для использования в клинической практике (табл. 2).

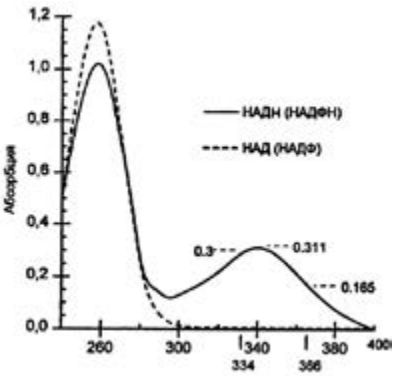
Таблица 2
Выполненные с участием кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО научно-технические и инновационные проекты создания отечественных импортозамещающих и экспортоориентированных лабораторно-диагностических систем

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
1. Инновационный проект по разработке и созданию отечественного ротационного вискозиметра. Срок выполнения: 1992–1993 гг. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников. Организации-соисполнители – Институт тепломассообмена им. А.В. Лыкова НАНБ (научный руководитель д.т.н. профессор З.П. Шульман), Научно-производственная фирма «Неотех», ЦКБ «Пеленг» БелОМО. Срок выполнения 1992–1993 гг.	
2. Задание Государственной научно-технической программы (ГНТП) «Здоровье»: «Разработка технологии производства и клинико-лабораторного применения реактивов, наборов реагентов для биохимических исследований в клинической лабораторной практике». Срок выполнения: 1993–1995 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»), Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Итоги выполнения проекта – создание 14 видов наборов реагентов для выполнения исследований на обычной фотометрической измерительной аппаратуре (типа ФЭКов): наборы реагентов для определения содержания глюкозы; общего белка; мочевины; креатинина; мочевой кислоты; хлорид-ионов; холестерина; триацилглицеринов; наборы реагентов для определения активности ланинаминотрансферазы; аспартатаминотрансферазы; щелочной фосфатазы; кислой фосфатазы; холинэстеразы; наборы реагентов для постановки тимоловой пробы

Продолжение таблицы 2

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
3. Задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать лабораторно-диагностические тест-системы для экспресс-определения компонентов крови и мочи с использованием ферментной технологии и освоить их производство». Срок выполнения: 1996–1997 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»). Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Созданы наборы реагентов для выполнения исследований методами кинетического анализа на биохимических полуавто- и автоанализаторах с целью определения содержания: глюкозы; мочевины, активности аланинаминотрансферазы, активности аспартатаминотрансферазы
4. Задания ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать лабораторно-диагностические тест-системы для экспресс-определения компонентов крови и мочи с использованием ферментной технологии и освоить их производство». Срок выполнения: 1996–1997 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»). Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Созданы тест-полоски для экспресс-анализа содержания в моче: белка; билирубина; глюкозы; кетоновых тел.
5. Инновационный проект (ОНТП): «Разработать прямо показывающий анализатор ионного состава крови и других биологических жидкостей». Срок выполнения: 1996–1997 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ, завод «Горизонт». Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Разработан отечественный полуавтоанализатор для определения содержания в крови, моче и других биологических жидкостях: калия; натрия; хлорид-ионов.
6. Задание ГНТП «Медицинская техника»: «Разработка универсального высокочувствительного флуориметра для клинической лабораторной диагностики». Срок выполнения: 1997–1999 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ, Институт физики им. Степанова НАН Беларуси. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Задание ГНТП «Медицинская техника» завершено созданием опытных образцов флуориметра с термостатированным кюветным отделением, адаптированным к решению задач клинической лабораторной диагностики (по определению витаминов, гормонов, других биологически важных веществ)

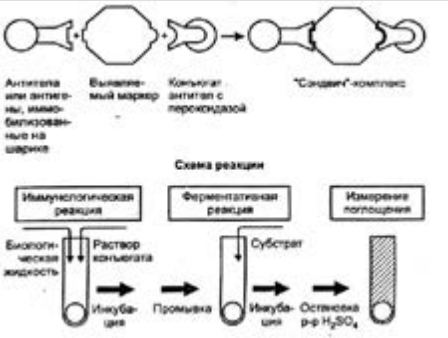
Продолжение таблицы 2

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
7. Задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать ферментативные лабораторно-диагностические тест-системы для определения активности глутаматдегидрогеназы, оксибутиратдегидрогеназы (ЛДГ-1), креатинкиназы, мочевины, мочевой кислоты методами кинетического анализа и освоить их производство». Срок выполнения: 1998–1999 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»). Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	На базе НТПК «Анализ Х» (БГУ) освоен массовый выпуск приведенных в названии проекта наборов реагентов 
8. Задания ГНТП: «Разработать и внедрить технологию производства импортозамещающих растворов для гематологических полуавтоматических и автоматических анализаторов зарубежного производства». Срок выполнения: 1998–2000 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»). Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Созданы отечественные растворы для импортных анализаторов: – лизирующий, – детергентный, – депротеинизирующий, – изотонический
9. Инновационный проект (ОНТП): «Разработать технологии и организовать производство наборов реактивов для иммуноферментного анализа (ИФА) гормонов, регулирующих репродуктивную функцию женщины (эстриол, хорионический гонадотропин)». Срок выполнения: 1998–2000 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – ИБОХ НАНБ. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Созданы наборы реагентов для иммуноферментного определения гормонов, регулирующих репродуктивную функцию женщины
10. Инновационный проект (ОНТП): «Разработать технологии и организовать производство наборов реактивов для иммуноферментного анализа (ИФА) комплекса стероидных гормонов (кортизол, тестостерон, эстрадиол, прогестерон)». Срок выполнения: 1999–2001 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – ИБОХ НАНБ. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Созданы наборы реагентов для определения гормонов коры надпочечников методами иммуноферментного анализа

Продолжение таблицы 2

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
11. Инновационный проект (ИП): «Разработать тест-систему для иммуноферментного анализа сывороточного ферритина и организовать производство. Оптимизировать на основе созданной тест-системы программы скрининга и мониторинга железодефицитных состояний у населения Республики Беларусь». Срок выполнения: 2000–2001 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – ИБОХ НАНБ. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	На базе ХОП ИБОХ освоено производство наборов реагентов для определения содержания ферритина (уровень которого позволяет судить о скрытом недостатке железа в организме) в сыворотке крови
12. Задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: "Разработать лабораторно-диагностические тест-системы и освоить производство наборов реагентов для определения активности гамма-глютамилтранспептидазы, билирубина, холестерина, фосфора, магния, железа, общей и латентной железосвязывающей способности сыворотки крови". Срок выполнения: 2001 – 2002 гг. Головная организация – БелМАПО, Организации-соисполнители – БГУ (кафедра аналитической химии, НТПК «Анализ Х»). Научный руководитель – профессор В.С.Камышников	Внедрение в медицинскую практику – производство в Республике Беларусь и приобретение медицинскими учреждениями тест-систем для выполнения исследований: – содержания холестерина липопротеинов высокой плотности; – содержания фосфора; – содержания магния; – содержания билирубина; – содержания холестерина ферментативным методом; – содержания железа в сыворотке крови; – общей железосвязывающей способности сыворотки крови; – ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки крови; – активности гамма-глутамилтранспептидазы
13. Задание Фонда фундаментальных исследований – «Разработать тест-систему для экспрессного определения общего антиоксидантного статуса организма и использовать ее для оценки эффективности антиоксидантной терапии при различных патологиях». Сроки исполнения – 2002–2003 гг. Головная организация – БелМАПО. Организации-соисполнители – ИБОХ НАНБ. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников	Разработана тест-система для скриниговой оценки общего антиоксидантного статуса организма
14. Задание Государственной программы научных исследований (ГПНИ) «Биологическая инженерия и биобезопасность 47» «Молекулярные и клеточные механизмы жизнедеятельности растительных и животных систем как основа для разработки новых сельскохозяйственных и медицинских технологий»: «Изучение и оптимизация химических и биохимических реакций, лежащих в основе количественного определения активности ферментов, субстратов и электролитов крови и других биологических жидкостей и разработка диагностических наборов нового поколения для клинических биохимических исследований» – сокращенно: «ЖИДКИЕ РЕАГЕНТЫ» Срок выполнения 2006–2010 гг. Научные руководители: профессор, д.м.н. В.С. Камышников (БелМАПО). Профессор д.х.н. Е.М. Рахманько (БГУ, НТПК Анализ Х). Профессор, д.х.н. В.В. Егоров (Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» (НИИ ФХП БГУ))	Созданы 19 видов жидких моно- и биреагентных диагностических наборов для биохимического анализа крови и других биологических жидкостей на активность ферментов: аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, альфа-амилазы и лактатдегидрогеназы, а также для определения содержания холестерина, триглицеридов, билирубина, креатинина, мочевой кислоты, алкоголя, аммиака, калия, кальция, хлоридов и общего белка, и разработаны инструкции по использованию настоящих наборов в анализе

Продолжение таблицы 2

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
15. Инновационный проект: «Разработать технологию и организовать производство экспресс-тестов на основе моноклональных антител для идентификации наркотических средств и психотропных веществ в биологических пробах». Сроки выполнения – 2005–2008 гг. Организация-производитель: «УНИТЕХПРОМ» БГУ. Учреждения разработчики: 1. БГУ. 2. РУП «САНД» БГУ. 3. Наркологический диспансер г. Минска. 4. БелМАПО: кафедра КЛД.	Создано 6 видов иммунохроматографических тест-систем для экспресс-определения: – опийных алкалоидов; – героина; – амфетамина; – производных амфетамина; – каннабиноидов; – марихуаны. Выпущено 10 000 тест-полосок пяти наименований. Итоги выполнения инновационного проекта: Три утвержденные МЗ Республики Беларусь Инструкции по применению: – «Экспресс-тесты на основе моноклональных антител для идентификации наркотических средств и психотропных веществ в биологических пробах» – «Методика обнаружения и количественного определения опиатов в биологических жидкостях» – «Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях»
16. Задание подпрограммы «Диагностикумы» Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных форм и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010–2014 гг. и на период до 2020 г. НИР – «Разработка и освоение технологии производства набора реагентов для характеристики антирадикальной активности фармсубстанций и биологических жидкостей на базе стабильных радикалов». Сроки выполнения – 2011–2014 гг. Научные руководители: профессор, доктор хим. наук А.П. Киселев (ИБОХ НАН Б) и профессор, доктор мед. наук В.С. Камышников (БелМАПО)	Инновационная разработка, выполняемая совместно с НАН Беларуси. Создан: набор реагентов на базе стабильных радикалов для характеристики антирадикальной активности биологических жидкостей «ОксСтат»
17. Задание подпрограммы «Фармацевтическая промышленность» Государственной программы «Инновационные биотехнологии» на 2010–2012 годы и на период до 2015 г. – Разработать и освоить производство на СП ООО «Фармлэнд» иммуноферментного набора реагентов для определения тропонина I в клинико-лабораторной диагностике болезней сердечно-сосудистой системы. Организации-исполнители: НИИ ФХП БГУ, предприятие «ФАРМЛЭНД» (организация-исполнитель). Сроки выполнения – 2010–2012 гг.	

Окончание таблицы 2

Название проекта, его руководители, сроки выполнения	**Краткое содержание проекта**
18. Задание Д.21 «Разработка и апробация новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы А2 в крови (ГП «Импортозамещающая фармпродукция»). Подпрограмма «Диагностикумы» на 2011 г. Научные руководители: профессор, доктор хим. наук Н.М. Литвинко (ИБОХ НАН Беларуси) и профессор, доктор мед. наук В.С. Камышников (БелМАПО). Сроки выполнения: 2010–2015 и на период до 2020 гг.	Инновационная разработка, выполненная совместно с НАН Беларуси Набор реагентов «ФЛА2-ФОА» для определения активности панкреатической фосфолипазы А2 в крови человека методом фотометрического анализа
19. Инициативная тема НИР: «Лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных употреблением психоактивных веществ». Срок выполнения: 2012–2014 гг. Научный руководитель – профессор В.С. Камышников. Разработчики: В.С. Камышников (БелМАПО), А.М. Чубуков, Л.Н. Боровикова, А.Т. Федорова, Т.М. Якименко	«Наборы реагентов для определения показателей метаболизма этанола в биологических жидкостях организма человека». Зарегистрированы в Республике Беларусь.

Координированное, совместное сотрудничество медиков, химиков, биологов и инженерно-технических работников привело к созданию нового научного направления, которое включало в себя семь основных аспектов, охвативших разработку не только тест-систем на основе жидкой и сухой химии, но и нового лабораторного оборудования, а именно:

- тест-систем для конечно-точечного анализа, осуществляемого на обычной фотометрической аппаратуре;
- тест-систем кинетического анализа для автоматизированных биохимических устройств;
- тест-систем «сухой химии» на основе простых химических, ферментных реакций и иммунохроматографического анализа;
- тест-систем для иммуноферментного анализа;
- растворов для выполнения исследований на импортных гематологических анализаторах;
- нового лабораторного диагностического оборудования;
- диагностических наборов нового поколения – «жидких» реагентов.

В результате выполнения указанных и ряда других проектов, ориентированных на решение задач, вызванных запросами практического здравоохранения, были не только сэкономлены большие валютные средства и обеспечено бесперебойное выполнение населению лабораторно-диагностических исследований, но и возникло новое направление научно-практической деятельности, объединившее на долгие годы ученых-химиков (аналитиков) и медиков (лабораторных диагностов) во имя достижения благородной цели – улучшения состояния здоровья и повышения эффективности медицинского обслуживания населения.

Выполненный анализ хода становления лабораторной медицины в советский и постсоветский периоды времени позволил выделить три основных этапа развития лабораторной медицины и охарактеризовать каждый из выделенных его этапов.

Так, 1-й этап – развитие лабораторной медицины в Советской Белоруссии в период времени с 1920 по 1966 гг. выразился:

- в значительном расширении спектра биохимических и других видов лабораторного исследования, определяемого профильными, профессиональными и научными интересами сотрудников кафедр медицинских институтов и отдельных НИИ;
- разноплановости, отсутствии стандартизации в использовании методов лабораторного исследования;
- отсутствии надлежащей организации деятельности клинической лабораторной службы.

2-й этап – становление службы клинической лабораторной диагностики, предопределенное концептуальными положениями приказа МЗ СССР от 23.01.1967 г. (касающегося всех основных сфер деятельности службы в период с 1967 по 1991 гг.), ознаменовался:

- введением должности «врач-лаборант» и «лаборант с высшим образованием»;
- организацией клинико-диагностических лабораторий при всех лечебно-профилактических учреждениях (стационарного и поликлинического типа);
- созданием общества врачей-лаборантов;
- формированием четкой организационной структуры, представленной институтом штатных и внештатных главных специалистов по лабораторному делу;
- созданием Республиканского организационно-методического и контрольного центра по лабораторному делу;
- унификацией методов лабораторного исследования, обеспечивающих преемственность в исследовании пациента;
- открытием кафедры клинической лабораторной диагностики в БелМАПО;
- открытием ординатуры и спецординатуры по клинической лабораторной диагностике.

3-й этап – формирование национальной службы клинической лабораторной диагностики в постсоветский период времени (с 1991 г. по настоящее время) характеризуется:

- значительным расширением спектра лабораторных исследований, достижением их соответствия европейскому и мировому уровню;
- аккредитацией в суверенной Беларуси представительств множества лабораторно-диагностических иностранных фирм;
- развитием отечественного производства наборов реагентов и лабораторной аппаратуры;
- реорганизацией системы организационно-методического руководства службой;
- становлением системы подготовки специалистов на додипломном уровне;
- расширением сферы деятельности по созданию отечественной информационной базы в области лабораторной медицины;

- подготовкой научно-педагогических кадров высшей научной квалификации (через институты аспирантуры и соискательства);
- созданием паспорта научной специальности «клиническая лабораторная диагностика» по отрасли «медицинские науки» и по отрасли «биологические науки»;
- созданием Совета по защите кандидатских и докторских диссертаций по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Перспективное, магистральное направление развития лабораторной медицины определяется девизом: «Наука – экономике знаний!» В настоящий период времени его реализации способствует участие в Государственной программе «Импортозамещение» (2016–2020 гг.) и Государственной программе «Наукоемкие технологии и техника» (2016–2020 гг.), утвержденной Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 21.04.2016 № 327, и других.

Камышников В.С.

Роль кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО в совершенствовании лабораторной химико-токсикологической службы Республики Беларусь

Развитие токсикологической химии на современном этапе предъявляет особые требования к специалистам, работающим в области химико-токсикологического анализа (ХТА). Для грамотной интерпретации результатов химико-токсикологического исследования специалисту с медицинским и медико-биологическим образованием требуется определенный уровень знаний органической, аналитической и токсикологической химии, фармакологии и фармакокинетики. Для правильного выбора аналитического метода и получения достоверных результатов необходимо знать физико-химические свойства исследуемых токсикантов, принципы используемых лабораторных методов, а также все этапы ХТА.

Мировой тенденцией последнего десятилетия является высокий темп роста уровня распространенности потребления новых психоактивных веществ, созданных на основе известных наркотических средств путем изменения структуры, дизайна их молекулы – «дизайнерских» наркотиков, что требует постоянного обучения специалистов, работающих в сфере ХТА, а также разработки новых методов обнаружения психоактивных веществ в биологических жидкостях.

С целью подготовки и повышения квалификации специалистов, работающих в области ХТА, на кафедре клинической лабораторной диагностики БелМАПО в 2001 году на основании приказа ректора впервые была разработана и внедрена в учебный процесс «Программа последипломного обучения врачей по химико-токсикологическому анализу веществ, вызывающих одурманивание». В последующие годы были разработаны, утверждены и внедрены в учебный процесс программы по токсикологии опийных алкалоидов, полусинтетических производных и синтетических средств, действующих на опиоидные рецепторы; химико-токсикологическому анализу веществ, оказывающих стимулирующее действие на центральную нервную систему» и ряд других, охватывающих, в частности, такие разделы исследований, как «Этиловый спирт и его суррогаты; лекарственные средства, оказывающие одурманивающее действие», «Современные дизайнерские наркотики – синтетические каннабиноиды и дизайн-амфетамины». Учебные программы каждые два года пересматриваются и дополняются новыми данными в области ХТА.

В настоящее время на кафедре клинической лабораторной диагностики БелМАПО 2 раза в год проводятся курсы повышения квалификации специалистов в сфере ХТА на основе утвержденной в ноябре 2016 года учебной программы «Химико-токсикологический анализ»

для заведующих клинико-диагностических, токсикологических лабораторий, врачей лабораторной диагностики, научных сотрудников организаций здравоохранения, биологов. Настоящая учебная программа разработана доцентом кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО, кандидатом медицинских наук А.Т. Кузьменко, заведующим централизованной химико-токсикологической лабораторией УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска А.М. Чубуковым и заведующим кафедрой клинической лабораторной диагностики БелМАПО, доктором медицинских наук, профессором В.С. Камышниковым.

Программа данного курса рассчитана на 80 учебных часов с рациональным распределением учебных часов теоретической подготовки и практических занятий: лекции – 18 часов, практические занятия – 56 часов, тематические дискуссии – 6 часов.

Содержание учебной программы представлено общим разделом «Основы идеологии белорусского государства» и профильным разделом «Клиническая лабораторная диагностика». В свою очередь, профильный раздел включает «Клиническую и токсикологическую лабораторную диагностику», «Общие принципы химико-токсикологических исследований» и «Частные вопросы химико-токсикологического анализа и клинической токсикологии».

В разделе «Клиническая и токсикологическая лабораторная диагностика» представлены основные принципы организации и деятельности клинической лабораторной службы, а также химико-токсикологических лабораторий, техника безопасности и вопросы контроля качества в лабораториях.

В разделе «Общие принципы химико-токсикологических исследований» отражены основы клинической фармакологии, характеристика основных групп наркотических, психоактивных и психотропных веществ, клинико-лабораторная диагностика отравлений, методология ХТА, основные методы ХТА и их сравнительная характеристика.

В разделе «Частные вопросы химико-токсикологического анализа и клинической токсикологии» отражены особенности методологии идентификации и количественного определения отдельных психоактивных веществ.

Учебное время, предусмотренное для изучения отдельных разделов и тем, позволяет достаточно глубоко усвоить как теоретический, так и практический материал, а объем и структура программы соответствуют рекомендациям по составлению учебных программ Министерства образования Республики Беларусь.

Обучение специалистов в сфере ХТА на кафедре клинической лабораторной диагностики БелМАПО предполагает получение слушателями современных знаний в области ХТА, изучение новых технологий выявления токсикантов в биологических жидкостях. Практические лабораторные занятия по ХТА проводятся на базе централизованной химико-токсикологической лаборатории УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска и клинической химико-токсикологической лаборатории УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи». С целью получения слушателями глубоких знаний к занятиям привлекаются известные специалисты в области ХТА –

врачи высшей квалификационной категории, заведующие соответствующими лабораториями – Чубуков Александр Михайлович и Боровикова Лидия Николаевна.

Кроме педагогической работы сотрудники кафедры принимают активное участие в научно-методической работе в области ХТА.

В соответствии с решением лечебно-контрольного совета Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 17.07.2009 № 9 и постановлением коллегии Совета Министров от 11.01.2011 № 27 о необходимости «Разработать методики определения наркотических психотропных, токсических и других одурманивающих веществ в биосредах организма» и «Расширить перечень тем диссертационных исследований по проблемам, связанным с профилактикой наркомании», а также приказом ректора ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» «О внесении изменений в Приказ БелМАПО» от 27.12.2012 г. № 153-ах, которым регламентируется «Расширить направления научных исследований по проблемам, связанным с профилактикой наркомании, лечением и реабилитацией наркозависимых лиц, а также выработку приоритетных тематик диссертационных исследований по данным проблемам», на кафедре активно проводится научная работа в данном направлении.

По результатам выполнения диссертационных исследований в области анализа наркотических психотропных и одурманивающих веществ на кафедре защищены три кандидатские диссертации по специальности 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика»:

1. О.М. Вергун – «Экспресс-метод определения опийных алкалоидов и особенности изменения лабораторных показателей метаболизма при отравлении наркотическими средствами»;
2. И.Д. Шилейко – «Лабораторная диагностика употребления метадона и значимость его мониторинга при осуществлении заместительной метадоновой терапии»;
3. Л.Н. Боровикова – «Лабораторно-диагностическая значимость комплексной оценки показателей метаболизма этанола и биогенных моноаминов при хронической алкогольной интоксикации».

Получено три патента на изобретения:

- патент на изобретение – способ определения степени наркотического отравления опийными алкалоидами (пат. 14142 G01N 33/48 / В.С. Камышников, О.М. Вергун);
- патент на изобретение – способ выявления наличия метадона в организме человека (пат. 15590 G01N 33/48 / В.С. Камышников, И.Д. Шилейко, А.М. Чубуков);
- патент на изобретение № 18517 – «Способ диагностики хронической алкогольной интоксикации» от 27.05.2014 (В.С. Камышников, В.М. Шейбак, Е.М. Дорошенко, Л.Н. Боровикова).

Произведено и поставлено в аптечную сеть 10 000 тест-полосок для иммунохроматографического определения (методом сухой химии) наркотиков шести видов: опийные алкалоиды, героин, амфетамин, производные амфетамина, каннабиноиды, марихуана.

Разработаны и освоены в производстве зарегистрированные в Республике Беларусь «Набор реагентов для определения показателей метаболизма этанола в биологических жидкостях организма человека

«Этиловый спирт», ТУ ВУ 100117887.104-2013» / Камышников В.С. (БелМАПО), Рахманько Е.М. (БГУ), Чубуков А.М. (Городской клинический наркологический диспансер г. Минска), Федорова А.Т. (директор ООО «Мультилаб»). Сведения о наборе приведены в каталоге Ярмарки инновационных разработок «Химические технологии и наноиндустрия» (ГКНТ, Минск; БелИСА – ГУ «Белорусский институт системного анализа и информационного обеспечения научно-технической сферы»), Минск, 2016 г., стр. 44–45.

В настоящее время совместными усилиями сотрудников кафедры, специалистов в области клинической лабораторной диагностики и химико-токсикологического анализа разработана концепция выполнения химико-аналитических исследований наркотиков и психоактивных веществ в специализированных учреждениях Республики Беларусь. Химико-токсикологические лаборатории, функционирующие в системе Министерства здравоохранения Республики Беларусь, в своей работе руководствуются утвержденными унифицированными методиками исследований:

1. Методика газохроматографического определения этилового спирта в жидких биологических средах организма: МВИ.МН 1329-2001.
2. Экспресс-тесты на основе моноклональных антител для идентификации наркотических средств и психотропных веществ в биологических пробах (опийных акалоидов, героина; амфетамина, метамфетамина и их дериватов; каннабиноидов (марихуаны)): инструкция по применению № 048-0509.
3. Методика обнаружения и количественного определения опиатов в биологических жидкостях: инструкция по применению № 061-0610.
4. Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях: инструкция по применению № 104-0910.
5. Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных немедицинским употреблением трамадола: инструкция по применению № 049-0511.
6. Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных каннабиноидами: инструкция по применению № 065-0512.
7. Метод лабораторной диагностики состояний интоксикации, вызванных потреблением фенобарбитала: инструкция по применению № 077-0713.
8. Комплексный метод выделения из биологического материала, идентификации и количественного определения психоактивных веществ и лекарственных средств, потенцирующих их действие: инструкция по применению № 066-06.18

Сотрудники кафедры активно участвуют в редакционно-издательской деятельности в области химико-токсикологического анализа. Так, кроме многочисленных материалов к конференциям и тезисов, статей в рецензируемых журналах, вышли в свет учебно-методические и учебное пособия, в которых изложены характеристики основных наркотических средств и психотропных веществ, распространенных на нелегальном рынке в Республике Беларусь: приведены классификация наркотических средств, особенности их фармакокинетики, воздействия на организм человека, клинические признаки их употребления, отражены принципы и методы химико-токсикологического анализа:

1. Отравления наркотическими средствами, действующими на опиоидные рецепторы. Клиническая и лабораторная диагностика: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников, С.А. Игумнов, А.М. Чубуков, В.П. Максимчук, О.М. Вергун, И.Д. Шилейко, И.М. Григорьев, А.А. Шмигельский [под ред. В.С. Камышникова] – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2010. – 72 с.: ил.
2. Технологии химико-токсикологического анализа и их использование в практике диагностики состояний, вызванных употреблением наркотических средств: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников, И.Д. Шилейко, А.Т. Кузьменко, Д.А. Статкевич, А.М. Чубуков. – Минск: БелМАПО, 2015 – 139 с.
3. Клинико-лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ: учеб. пособие / В.С. Камышников, И.Д. Шилейко, А.Т. Кузьменко, А.М. Чубуков, Д.А. Статкевич. – Минск: Адукацыя і выхаванне. – 2016 – 376 с. (Допущено Министерством образования Республики Беларусь в качестве учебного пособия для слушателей системы дополнительного образования взрослых по медицинским специальностям).

Таким образом, кафедра клинической лабораторной диагностики БелМАПО вносит существенный вклад в совершенствование лабораторной химико-токсикологической службы Республики Беларусь путем подготовки специалистов, обладающих достаточными знаниями в области токсикологии и фармакокинетики, владеющих современными методами идентификации и количественного определения психоактивных веществ, а также активно участвующих в научно-методической работе.

Кузьменко А.Т., Камышников В.С., Чубуков А.М.

Современные технологии и методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний: вклад в их реализацию лабораторной службы городской клинической инфекционной больницы г. Минска

Инфекционные болезни до сих пор продолжают наносить существенный ущерб здоровью населения страны, и осуществление мер по предотвращению их распространения остается весьма актуальным. Опасность инфекционных заболеваний связана как с возможностью их тяжелого течения и развитием летального исхода, так и со способностью вовлечения в процесс большого числа людей в течение короткого периода времени. Лабораторная диагностика играет первостепенную роль в установлении этиологии инфекционных заболеваний, необходимой для адекватного назначения терапии, а также в проведении контроля эффективности проводимого лечения.

Для диагностики инфекционных заболеваний применяются как неспецифические, так и специфические методы лабораторного анализа. Среди неспецифических методов диагностики наиболее востребованы общий анализ крови (диагностика инфекционного мононуклеоза), общий анализ мочи, клинические исследования цереброспинальной жидкости (ЦСЖ): диагностика менингитов и энцефалитов; биохимический анализ крови (прежде всего на предмет диагностики вирусных гепатитов, геморрагической лихорадки), гемостазиограмма (характерно изменяющаяся при вирусных гепатитах, геморрагической лихорадке).

Специфическая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний в настоящее время располагает большими возможностями установления этиологии инфекционного процесса, используя различные методологические подходы: выявление маркеров непосредственного присутствия возбудителя в организме человека (антигенов, нуклеиновых кислот), иммунологически опосредованных продуктов реакций, направленных на борьбу с инфекционным агентом (различных классов специфических к ним антител, интерферона, аутоантител и других), характеризующих течение инфекционного процесса в организме человека.

Опыт внедрения в инфекционную лабораторную практику новых маркеров, методов исследования показал их практическую значимость и обоснованность применения.

Наиболее важными методами специфической лабораторной диагностики инфекционных заболеваний безусловно являются бактериологический метод, молекулярно-биологические методы исследования на основе применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА), результаты использования которых отвечают

на почти все вопросы инфекционистов: присутствует ли возбудитель в организме человека в настоящее время, была ли встреча с ним в прошлом, предоставляют информацию о характере инфекции (острая или хроническая), о репликации в клетках-мишенях или персистировании возбудителя в организме, об эффективности применяемой терапии или необходимости смены лекарственных препаратов, о вероятном прогнозе развития инфекционного процесса и другие.

В настоящее время наиболее широко применяемым методом лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является ИФА. Клинико-диагностическая лаборатория городской клинической инфекционной больницы г. Минска с помощью ИФА (вариант иммунохимического анализа) определяет более 50 инфекционных маркеров, применяя для этого около 80 качественных и количественных методов исследования. Кроме того, с целью повышения достоверности получаемых результатов в процессе определения некоторых маркеров используются диагностические тест-системы нескольких производителей (например, для определения суммарных антител к вирусу гепатита С (ВГС) – анти-ВГС, HBsAg вируса гепатита В (ВГВ), антител класса М вируса гепатита А (ВГА) (анти-ВГА IgM) и другие).

Ежемесячно клинико-диагностическая лаборатория выполняет с использованием ИФА около 13 000 исследований. Следует отметить, что ежегодный прирост данных исследований составляет около 15%, что обусловлено как увеличением потребности клиницистов в определении инфекционных маркеров у растущего числа пациентов, так и расширением спектра определяемых маркеров.

За последние три года были внедрены: определение маркеров инфекционных заболеваний с помощью непрямого и конкурентного ИФА с учетом результатов реакции флуоресценции (на иммунохимическом анализаторе закрытого типа Vidas как референсной лабораторно-диагностической системы) по подтверждению или исключению выявления следующих маркеров: анти-ВГС суммарные, HBsAg, анти-ВГА IgM, диагностики болезни Лайма (антител классов М, G к боррелиям в сыворотке крови, интратекальных антител (АТ) в ЦСЖ с расчетом индекса интратекального синтеза), диагностики некоторых маркеров, относящихся к группе TORCH-инфекций (АТ классов М, G к цитомегаловирусу (ЦМВ), токсоплазме гондии (в том числе определения авидности IgG)); определение АТ классов М, G к иерсиниям.

Накопленный нами опыт применения ИФА позволяет заключить, что иммуноферментные исследования требуют от сотрудников лаборатории следующих качеств: внимательности, сосредоточенности, умения анализировать свою работу. Следует также помнить о возможности получения ложно позитивного результата ИФА и в ряде случаев проводить дополнительные исследования, используя тест-системы более высокого класса.

В 2019 году освоен и внедрен в клинико-лабораторную практику квантифероновый тест (QFT-Plus), направленный на выявление латентной туберкулезной инфекции методом ИФА. Принцип метода основан на определении в гепаринизированной крови концентрации гамма-интерферона, опосредованного клеточным иммунным ответом лимфоцитов СД4 и СД4+СД8 на пептидные антигены ESAT-6 и CFP-10,

ассоциированные с инфекцией микобактериями туберкулеза. Обследовано 1654 пациента, выполнено 6616 исследований (от 1 человека кровь забирается в 4 специальных вакутайнера). Серопозитивными оказались 113 пациентов, что составило 6,83%.

Молекулярно-биологический метод выявления нуклеиновых кислот (НК) возбудителей с помощью ПЦР используется в инфекционной практике г. Минска с 1999 года. (на протяжении 20 лет), учет результатов амплификации в режиме реального времени применяется в течение 13 лет. В настоящее время методами ПЦР-анализа в клинико-диагностической лаборатории городской клинической инфекционной больницы (ГКИБ) выявляется 35 патогенов. В работе клинико-диагностической лаборатории городской больницы используются также мультиплексные тест-системы для выявления возбудителей гнойных менингитов (менингококки, пневмококки, гемофильная палочка), клещевых инфекций (ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека, МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека), респираторных вирусных инфекций (парагрипп I–IV типов, грипп А, В, аденовирус, респираторно-сентициальный вирус, бокавирус, метапневмовирус). Наибольшее количество исследований выполняется с целью определения вирусной нагрузки вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), обнаружения в биологическом материале генома вирусов гепатитов (В, С, Д, Е), герпес-вирусов (ВПГ1-2т., ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, ВГЧ 6т.), возбудителей клещевых инфекций (БЛ, КЭ, ГАЧ, МЭЧ, боррелия Миямото) и других. Использование методов определения вирусной нагрузки имеет большое значение для пациентов, получающих противовирусную терапию (ВИЧ-инфекция, ВГС, ВГВ и др.). Проводится также определение генотипа РНК ВГС. В 2014 году был отработан и внедрен метод определения вирусной нагрузки с «обогащением», что позволило увеличить чувствительность определения РНК ВГС в плазме крови в 10 раз.

За последние 4 года внедрены методы ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ): выявление ДНК криптококков (в плазме и ЦСЖ), листерий, РНК рикетсий, парвовирусов, генома возбудителей ОРВИ в назофаренгиальных мазках.

Помимо вышеописанных методов для расшифровки этиологии инфекционных заболеваний достаточно давно используется простой, быстрый экспресс-метод иммунохроматографического анализа (ИХА), с помощью которого в ГКИБ определяют 16 показателей, в том числе 13 маркеров возбудителей инфекционных болезней. Данным методом исследуются: фекалии – по диагностике гастроэнтеритов вирусной этиологии (рота-, адено-, астро- и норовирусы (1, 2-го типов)); носоглоточные смывы на предмет выявления респираторных вирусов, возбудителей ОРВИ (грипп А и В, аденовирус, респираторно-сентициальный вирус). В образцах кала с использованием данного метода выявляются антигены криптоспоридий, лямблий, кампилобактерий, дизентерийной амебы, токсины клостридий дифицилле. Всего за 11 месяцев 2019 года с помощью ИХА на инфекционные маркеры исследовано 4 774 образца биоматериала, выполнено 6 923 анализа.

Следует отметить высокую результативность использования ИХА на скрытую кровь. Так, за 10 месяцев 2019 года при исследовании 366 образцов кала положительный результат был получен в 133 случаях, что составило 36,3%.

Несколько лет назад был внедрен полуколичественный метод определения криоглобулинов (холодовых антител, парапротеинов, состоящих из циркулирующих иммунных комплексов) как маркеров аутоиммунного компонента развития вирусных гепатитов. Наличие криоглобулинемии у пациентов с ХВГС значительно усугубляет течение заболевания. За десять месяцев 2019 года на криоглобулины было исследовано 533 образца сыворотки крови, в 32 получен положительный, в 24 случаях выдан сомнительный результат.

С целью повышения качества лабораторной диагностики инфекционных заболеваний совместно с кафедрами инфекционных болезней БГМУ и БелМАПО ведется активная работа по внедрению новых технологий и методов диагностики инфекционной патологии. Ежегодно клинико-диагностическая лаборатория городской клинической инфекционной больницы г. Минска участвует в различных проектах, связанных с диагностикой и лечением ряда инфекций, что способствует развитию лабораторно-диагностических исследований в области инфекционных заболеваний. Так, в течение последних 3 лет ряд сотрудников лаборатории участвуют в выполнении научно-исследовательской темы «Гепатит Е». Проект осуществляется в рамках «Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств – участников СНГ» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации. В ходе осуществления данного совместного проекта в деятельность клинико-диагностической лаборатории УЗ ГКИБ была внедрена серологическая и молекулярно-биологическая диагностика вирусного гепатита Е: обследовано более 1500 пациентов (при этом выявлено 53 пациента с острым гепатитом, 120 реконвалесцентов).

Таким образом, деятельность клинико-диагностической лаборатории инфекционной больницы г. Минска осуществляется в тесном взаимодействии с врачами-клиницистами и сотрудниками кафедры инфекционных болезней БГМУ и БелМАПО. Убеждены, что только совместная слаженная работа позволяет идти в ногу со временем и соответствовать современным требованиям, предъявляемым к лабораторной диагностике.

Анисько Л.А., Рогачева Т.А.

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.026
УДК 616.697

Сапожкова Ж.Ю.[1, 2], Еремин К.И.[1], Долгов В.В.[3]
[1] Международная школа цитологии, Москва, Санкт-Петербург, Россия
[2] Подольский диагностический центр, Подольск, Россия
[3] Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Sapozhkova Zh.[1, 2], Eremin K.[1], Dolgov V.[3]
[1] International Cytology School, Moscow, Saint Petersburg, Russia
[2] Centre of Laboratory Diagnostics, Podolsk, Russia
[3] Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины

Unification of Procedures of Cytochemical Staining of Human Ejaculate to Determine the True Fertility of Men

Резюме

Руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует цитохимическое окрашивание форменных элементов эякулята для последующего определения статуса фертильности мужчины. Несмотря на то что во всех странах этот документ является основополагающим в анализе спермы, существуют определенные сложности и ограничения его использования в России. В целях установления истинной репродуктивной возможности и мониторинга сперматогенеза предлагается стандартизация протокола цитохимического окрашивания эякулята, который заложен в наборе реагентов отечественного производства «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия). Набор полностью соответствует прописям руководства ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) и российским рекомендациям, т. е. полностью подтверждена идентичность полученных результатов окраски. Набор является безопасным для использования, не содержит веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием или влияющим на репродуктивную функцию человека. Технологические возможности набора определяют стандартизированные подходы в протоколе цитохимического окрашивания элементов эякулята, тем самым исключая ошибки аналитического этапа спермограммы. Унификация диагностических процедур анализа спермы человека представляется необходимым шагом на пути сохранения репродуктивного здоровья семьи.

Ключевые слова: анализ спермы человека, спермограмма, пероксидазоположительные клетки, жизнеспособность сперматозоидов, нормальная и аномальная морфология сперматозоидов.

Abstract

Currently, WHO guidelines (5th edition, 2010) regulate the cytochemical staining protocol for human semen examination to determine the fertility status in men. Even though this document

is fundamental for semen analysis worldwide, it is not so often used in Russia due to peculiarities of Russian laboratory market. In order to avoid the non-suitable peculiarities of the WHO staining protocol, as well as to reveal the true fertility in men, there was developed a home-produced set of reagents (GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES, LLC "GEMSTANDART", Saint Petersburg, Russia), which lets to obtain completeness of the cytochemical staining protocol. The identity of the set of reagents and the WHO staining protocol in the way to obtain the coloration results is fully confirmed. The GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES (LLC "GEMSTANDART", Saint Petersburg, Russia) is safe to use, because it does not contain the substances that have a carcinogenic, mutagenic or other effect on human reproductive system. The technological capabilities of the set determine the standardized approaches in the protocol of cytochemical staining of the elements of ejaculate, thereby eliminating the errors of the analytical stage of the semen analyses. Such approach seems to be a necessary step for unification of the semen analysis protocol in Russia for preserving the reproductive health of family.
Keywords: human semen analysis, semen analysis, peroxidase-positive cells, sperm vitality, normal and abnormal sperm morphology.

■ ВВЕДЕНИЕ

Руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует цитохимическое окрашивание форменных элементов эякулята для последующего определения статуса фертильности мужчины [3, 14]. Несмотря на то, что в других странах этот документ является фундаментальным в анализе спермы [13, 14], существуют определенные сложности и ограничения его использования в России. Руководство ВОЗ рекомендует применение ряда реагентов для окрашивания, не зарегистрированных в России и содержащих канцерогенные прекурсоры. Отсутствие обработки спермы реагентами для надлежащего цитохимического окрашивания, рекомендованными в прописях ВОЗ, является главным источником ошибочного определения уровня истинных лейкоцитов / пероксидазоположительных клеток (ППК), а также живых и мертвых сперматозоидов в российских лабораториях. Оценка ППК, жизнеспособности эякулята, а также морфологии сперматозоидов остается одним из проблемных параметров анализа спермы, неверная оценка которых приводит к разночтению результатов, недостоверной диагностике и неправильному лечению. В целях установления истинной репродуктивной возможности и мониторинга сперматогенеза мужчины предлагается унификация процедур цитохимического анализа спермы человека, который заложен в наборе реагентов отечественного производства «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с мая по ноябрь 2019 г. на учебной базе Международной школы цитологии (Москва) проведен корреляционный анализ результатов клинического анализа спермы от 200 мужчин 29–65 лет. Исследования выполнены в клинико-диагностической лаборатории сети медицинских клиник г. Подольска двумя способами.

Способ 1. Используются растворы, приготовленные согласно прописям рекомендаций и протоколов по анализу спермы человека, представленных в широком доступе в интернете [1–4, 7, 10–14]. Прописи

содержат вещества, обладающие канцерогенным, мутагенным действием (насыщенный раствор формальдегида, орто-толуидин).

Способ 2. Используется набор реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (далее – набор) для комплексной оценки показателей спермограммы, в том числе для цитохимической окраски ППК и сперматозоидов, применяемой для определения их жизнеспособности и морфологии, что является одной из инновационных составляющих набора. В состав набора входят следующие компоненты для окрашивания: Реагент № 1 – проявитель: смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного, калия фосфорнокислого однозамещенного, аммония хлористого, динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина; Реагент № 2 – перекись водорода 30%; Реагент № 3 – раствор эозина, 5% водный; Реагент № 4 – раствор нигрозина, 10% водный; Реагент № 5 – краситель азур-эозин по Романовскому; Реагент № 6 – фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду. Реагент № 7, содержащий фосфатно-солевой раствор бромелайна, для окрашивания не предназначен, а используется лишь в целях разжижения вязкого эякулята. Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием или влияющим на репродуктивную функцию человека.

Принцип действия реагентов для цитохимического окрашивания в способе 2

Реагенты № 1 и Реагенты № 2, входящие в состав набора, при обработке образца спермы окрашивают в коричневый цвет клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты). Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий), остаются бесцветными. В качестве положительного контроля при определении окраски ППК образцов эякулята используется цельная кровь, результаты окраски оценивают микроскопией.

Реагент № 3 и Реагент № 4 предназначены для цитохимического окрашивания живых и мертвых сперматозоидов. В результате взаимодействия двух реагентов, смешанных в строго определенных соотношениях с эякулятом на предметном стекле, отчетливо визуализируются под микроскопом окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Нигрозин обеспечивает темное окрашивание фона, что упрощает идентификацию бледно-окрашенных сперматозоидов.

Реагент № 5 и Реагент № 6 идентифицируют внутриклеточные субстанции эякулята. Принцип действия основан на том, что они имеют разную pH и связываются с компонентами клеток, имеющих противоположную реакцию. Ацидофильные структуры окрашиваются в разные тона красного цвета, базофильные структуры – в тона от пурпурового до синего. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются азур-эозином в сине-фиолетовый цвет. При использовании окраски по Романовскому и Май-Грюнвальду головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет.

Приготовление рабочего раствора из реагентов 1, 2

К флакону с Реагентом № 1 осторожно добавить 10 мкл Реагента № 2 и перемешать. Рабочий раствор использовать в течение 24 часов при хранении при 0–5 °С. Остатки неизрасходованного рабочего раствора аликвотировать по 500 мкл в сухие микропробирки типа Эппендорф и заморозить. Допускается 1 месяц хранения в морозильной камере с последующим однократным размораживанием перед проведением исследования.

Реагенты № 3–6 готовы к использованию.

Окрашивание ППК в эякуляте

1. Тщательно перемешать образец спермы, не допуская образования пузырьков и пены.
2. В пробирку поместить аликвоту из 20 мкл спермы и 180 мкл рабочего раствора (разведение 1:10) – готовая смесь исследуемого препарата.
3. Аккуратно перемешать суспензию в течение 10 с. стеклянной палочкой и инкубировать при 37 °С 30 минут.
4. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить две стороны камеры Горяева.
5. Для осаждения клеток удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.
6. Оценить ППК в заполненной камере в световом микроскопе.

Окрашивание живых и мертвых сперматозоидов в эякуляте

1. На предметное стекло разместить 10 мкл спермы.
2. Добавить 20 мкл Реагента № 3.
3. Аликвоту эякулята и Реагент № 3 размешать на предметном стекле и оставить для окрашивания на 5 с.
4. К полученной смеси добавить 30 мкл Реагента № 4.
5. Все размешать и оставить для последующего окрашивания на 5 с.
6. Оценить живые и мертвые сперматозоиды в световом микроскопе.

Окрашивание сперматозоидов для определения их морфологии

1. Приготовление и фиксация препаратов. Сделать мазки из эякулята на предметных стеклах, высушить на воздухе либо в термостате при температуре не выше 37 °С до исчезновения влажного блеска. Зафиксировать высушенные препараты неразведенным раствором фиксатора-красителя по Май-Грюнвальду (Реагент № 6 Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду) – налить неразбавленный раствор фиксатора-красителя так, чтобы он покрыл весь мазок в течение 1–2 мин. Смывать фиксатор перед окраской не требуется.
2. Проведение окраски. Непосредственно перед окраской мазков приготовить рабочий раствор красителя: смешать раствор красителя (Реагент № 5 Краситель азур-эозин по Романовскому) с деионизированной/дистиллированной водой в соотношении 1+4 (1:5) (на 10 мл красителя 40 мл воды). Полученный рабочий раствор красителя можно хранить до 5–7 суток в закрытом контейнере. На фиксированные мазки эякулята налить рабочий раствор красителя,

по истечении 15–20 мин. препараты промыть деионизированной/дистиллированной водой, высушить и микроскопировать.

Процедура проведения цитохимического окрашивания эякулята двумя способами

В способе 1 процедура цитохимического окрашивания эякулята состояла из двух этапов: 1) окрашивание живых/мертвых сперматозоидов различными методами, предложенными руководством ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) [3, 14] и российскими рекомендациями [1, 2, 4]; 2) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов. Этап окрашивания ППК был заменен на оценку присутствия нейтрофильных гранулоцитов субъективно (на глаз) по косвенным идентификационным признакам.

В способе 2 процедура цитохимического окрашивания эякулята состояла из трех этапов: 1) окрашивание живых/мертвых сперматозоидов методом, заложенным в наборе; 2) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов методом, заложенным в наборе; 3) окрашивание ППК методом, заложенным в наборе.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способом 1 и способом 2 параллельно было исследовано 200 образцов эякулята по четырем диагностическим параметрам: концентрация лейкоцитов, концентрация сперматозоидов, жизнеспособность эякулята и морфология сперматозоидов. Оценивалось количество образцов, в которых показатели не соответствовали референсным значениям, указанным в 5-м руководстве ВОЗ, 2010 г. (см. таблицу).

Результаты таблицы свидетельствуют о том, что при оценке свойств эякулята способом 1 из 200 исследованных образцов в 136 (68 %) выявлены отклонения, выходящие за референтные значения; в способе 2 патологические отклонения выявлены в 37% тех же образцов эякулята. Как видно из таблицы, высокий процент выявленных отклонений способом 1 – это преимущественно пиоспермия и некрозооспермия; расхождение в сорок одном (41) и одиннадцати (11) результатах соответственно.

Согласно данным литературы [5–10], умеренные уровни ППК в эякуляте (<1 млн/мл) являются физиологической нормой; при более высоких концентрациях (1–2,5 млн/мл) сперма может оставаться фертильной.

Сравнительные результаты выявления показателей эякулята использованными способами, выходящие за референсные значения, указанные в 5-м руководстве ВОЗ

Выявленная патология (анализировано 200 образцов эякулята)	Способ 1, результат	Способ 2, результат
Пиоспермия (концентрация ППК (лейкоцитов) >1 млн/мл)	96	55
Некрозооспермия (количество живых сперматозоидов <58%)	21	10
Олигозооспермия (концентрация сперматозоидов <15 млн/мл)	11	5
Тератозооспермия (количество патологических форм >4%)	8	4
Всего категорий патологии, n	136	74

Необходимо обращать внимание на критично высокий уровень ППК (>2,5 млн/мл), частота наступления беременности при котором может снижаться. В этой связи крайне важно не допускать ложную пиоспермию, так как необоснованно назначенное антибактериальное лечение может необратимо спровоцировать патологию остальных главных показателей эякулята.

Главным источником расхождений между способами было отсутствие в способе 1 обработки спермы реагентами для цитохимического окрашивания нейтрофильных гранулоцитов, которые окрашивают круглые клетки (КК), содержащие пероксидазу, в коричневый цвет. За основу подсчета лейкоцитов способом 1 была принята известная методика количественной оценки содержания КК без цитохимического окрашивания ППК (нейтрофильных лейкоцитов) в эякуляте [1]. Недостатки методики следующие: 1) проводится оценка и определение концентрации всех КК, а не только нейтрофильных гранулоцитов/ППК в эякуляте; 2) применяются косвенные идентификационные признаки ППК: округлая форма, сегментированные ядра, микроворсинчатая поверхность, средний размер, что не соответствует рекомендациям ВОЗ. Очевидно, что методика не приемлема для мониторинга содержания лейкоцитов в сперме, так как не дает представления об их истинном содержании. Как результат происходили ошибочная интерпретация и излишний подсчет концентрации бесцветных (неокрашенных) лейкоцитов: за ППК были приняты все КК, не содержащие пероксидазу. Необходим подсчет истинных лейкоцитов, содержащих пероксидазу. Все КК были отнесены к лейкоцитам по их субъективным признакам, что привело к ложной пиоспермии. На рис. 1 представлены истинные коричневые ППК и бесцветные КК.

Согласно руководству ВОЗ (5-е издание, 2010 г.), присутствие ППК в эякуляте определяют с помощью метода цитохимического окрашивания токсичным, канцерогенным и мутагенным раствором на основе орто-толуидина [3, 14]. Использование этого протокола в России затруднено, так как: 1) отсутствует коммерчески доступный набор для окраски; составить набор из 6 реагентов затруднительно, так как орто-толуидин является прекурсором и в свободном доступе отсутствует; 2) в медицинских лабораториях запрещено использование самостоятельно приготовленных реагентов, к тому же современные лаборатории не имеют необходимого поверенного оборудования: весов, оборудования для титрования; в КДЛ России используют готовые наборы реагентов.

В соответствии с различными вариациями протоколов спермограммы [1–4, 7, 10–14] широкое применение в практике КДЛ нашла методика оценки присутствия лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического метода, основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы [2]. Недостатки методики заключаются в следующем: 1) позволяет приблизительно определить присутствие лейкоцитов, но не ППК в эякуляте; 2) может приводить к ложной пиоспермии, так как лейкоцитарная эстераза появляется в биологической жидкости и при разрушении лейкоцитов; 3) не дает истинного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.

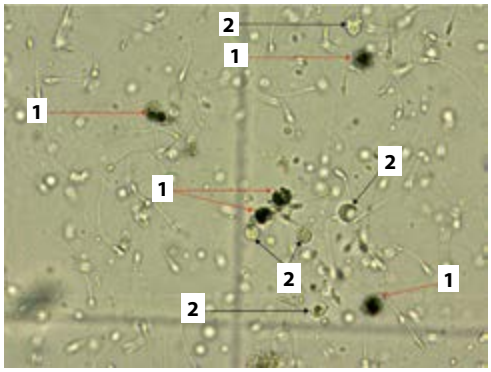


Рис. 1. ППК / нейтрофильные лейкоциты (1), окрашенные в коричневый цвет; КК (2) – неокрашенные (бесцветные). Нативный препарат, приготовленный способом 2. ×400

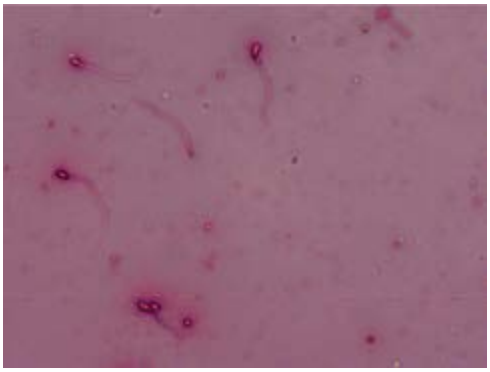


Рис. 2. Головки и хвосты сперматозоидов, а также лецитиновые зерна окрашены в интенсивно-красный цвет. Суправитальная окраска по Блюму (5% водный эозин) для дифференцировки жизнеспособности эякулята. Окрашенный препарат, приготовленный способом 1. ×400

Рис. 3. Головки сперматозоидов окрашены в интенсивно-красный цвет, хвост плохо просматривается (1); некоторые головки сперматозоидов окрашены в бело-розовый цвет (неполное окрашивание), хвост плохо просматривается (2). Представленная методика позволяет дифференцировать все сперматозоиды в поле зрения как мертвые (контактные к красителю), даже если головка сперматозоидов имеет бело-розовое окрашивание. Суправитальная окраска по модификации Блюма для дифференцировки жизнеспособности. Окрашенный препарат, приготовленный способом 1. ×400

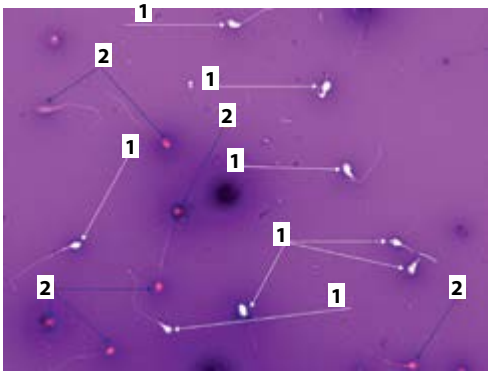


Рис. 4. Головки и хвосты сперматозоидов окрашены в интенсивно-красный цвет (2); головки и хвосты живых сперматозоидов не окрашены или бесцветные (1). Сперматозоиды, окрашенные в бело-розовый цвет (неполное окрашивание), отсутствуют. Суправитальная окраска по протоколу набора для дифференцировки жизнеспособности эякулята. Окрашенный препарат, приготовленный способом 2. ×400.

Основная причина расхождения одиннадцати (11) результатов в определении некрозооспермии способами 1 и 2 (см. таблицу) – отсутствие стандартизации при аликвотировании компонентов при суправитальной окраске по Блюму [2, 3, 14] для дальнейшего цитохимического окрашивания сперматозоидов способом 1. Метод окраски способа 1 регламентирует окрашивание в течение 30 с. на предметном стекле 1 капли эякулята и равного количества 5% водного эозина. В результате живые сперматозоиды должны оставаться бесцветными, а мертвые – окрашиваться в красный цвет [2]. Неточное дозирование компонентов и несоблюдение времени окрашивания может приводить к перекрашиванию сперматозоидов и мимикрировать живые сперматозоиды (рис. 2).

Существует методика оценки живых и мертвых сперматозоидов, описанная Е.Е. Брагиной [1], где рекомендовано окрашивание смеси 1 капли неразведенного перемешанного эякулята с 1 каплей красящего раствора из 5% водного эозина и 10% нигрозина в течение 30 с. Основной недостаток такого подхода – также отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов. Как результат – перекрашивание сперматозоидов и ложная некрозооспермия (рис. 3).

В отличие от вышеупомянутых методик дифференцировки жизнеспособности эякулята, протокол окрашивания набора (способ 2) определяет строгое соблюдение дозирования аликвот и время экспозиции окрашивания, в результате достигается надлежащее качество окраски – четко видны окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Такой подход обеспечивает безошибочную интерпретацию жизнеспособности (рис. 4).

Возможная причина четырех (4) расхождений в способах 1 и 2 при оценке нормальных и патологических форм сперматозоидов (см. таблицу) – применение методики быстрого окрашивания эякулята Diff-Quik [3, 14]. С одной стороны, применение экспресс-окрашивания снижает время оборота теста (TAT / turn around time), что оптимизирует производственный процесс. С другой стороны, получаются препараты более низкого качества по сравнению с мазками, окрашенными традиционным методом по Романовскому – Гимзе, что предлагает набор. Отмечается, что анализ морфологии сперматозоидов достаточно субъективен и трудно поддается стандартизации [3, 14] даже при окраске конвенциональным методом. Констатируем, что использование окрашивания по протоколу набора Реагентами № 5 и № 6 повышает качество окрашивания, что дает возможность улучшить оценку эякулята.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе клинико-лабораторных испытаний результаты окрашивания клеток эякулята реагентами набора «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия) полностью соответствуют данным литературы [1–4, 14], т. е. полностью подтверждена идентичность полученных результатов окрашивания. Набор является безопасным для использования, так как не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием

или влияющим на репродуктивную деятельность человека. Технологические возможности набора определяют стандартизированные подходы в протоколе цитохимического окрашивания элементов эякулята, тем самым исключая ошибки аналитического этапа спермограммы. Внедрение в практику медицинской лаборатории набора, наряду с профильным повышением квалификации специалистов, представляется очевидным и непременным атрибутом диагностических процедур анализа спермы в целях сохранения мужского репродуктивного здоровья.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bragina E. (2014) Semen analyses protocol [Protocol provedeniya spermiologicheskogo issledovaniya]. *Andrologya I genitalnaya chyrurgya,* 1: 24.
2. Dolgov V., Lugovskaya S. (2006) *Laboratory diagnostics of male infertility* [Laboratornaya diagnostica muzhskogo besplodya]. M. Tver: «Tryada», 1: 146. (in Russian)
3. (2012) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. WHO* [Rukovodstvo po issledovanyu i obrabotke eyakulyata cheloveka]. Moscow, izdatelstvo «Capital Print», 305. (in Russian).
4. Schatochina I., Kuztetcova V. (2014) *Uchebnoe posobie po issledovanyu eyakulyata* [Study guide on ejaculate analysis]. Moscow, 20 (in Russian).
5. Aitken R.J., Baker H.W. (1995) Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod.*, 10, pp. 1736–9.
6. Cao X-W., Lin K., Li C-Y., Yuan C-W. (2011) A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Zhonghua nan ke xue - National journal of andrology,* 17 (12), pp. 1059–63.
7. Esfandiari N., Sharma R.K., Saleh R.A., Thomas A.J., Jr, Agarwal A. (2003) Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl.,* 24, pp. 862–70.
8. Virginie Barraud-Lange, Jean-Christophe Pont, Ahmed Ziyyat, Khaled Pocate, Christophe Sifer, Isabelle Cedrin-Durnerin, Bouchra Fechtali, Beatrice Ducot, and Jean Philippe Wolf (2011) Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *J. Androl. Fertil Steril,* 96, pp. 1315–9. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.
9. Kvist U., Björndahl L. (2002) *Manual on Basic Semen Analysis.* Oxford: Oxford University Press.
10. Masha Ahadi, Fereshte Aliakbari (2019) *Evaluation of the Standardization in Semen Analysis Performance According to the WHO Protocols Among Laboratories in Tehran, Iran,* 14 (2), pp. 142–147. Published online 2019 Jun 10. doi: 10.30699/IJP.14.2.142 PMCID: PMC6679670
11. Menkveld R. (2007) The basic semen analysis. *Male Infertility. Ch. 9.* Oxford: Informa Healthcare, UK, pp. 141–70.
12. Suresh C Sikka, Wayne JG Hellstrom (2016) Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl.*, 18 (3), pp. 392–401. Published online 2016 Apr 8. doi: 10.4103/1008-682X.179161 PMCID: PMC4854088 PMID: 27056346
13. WHO (2010) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed.* Geneva.
14. WHO (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th ed.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Поступила/Received: 15.01.2020
Контакты/Contacts: jannet72@mail.ru

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.027
УДК 616.34-007.43-03:611.26-073.4-8-053.1

Чуканов А.Н.[1], Курлович И.В.[2], Семенчук В.Л.[2], Виктор С.А.[2]
[1] Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь
[2] Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Chukanov A.[1], Kurlovich I.[2], Semenchuk V.[2], Victor S.[2]
[1] Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus
[2] Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

Биохимические исследования околоплодных вод как необходимый этап осуществления дородовой диагностики врожденных пороков развития органов пищеварительной системы

Biochemical Studies of Amniotic Fluid as a Necessary Stage in the Implementation of Prenatal Diagnosis of Congenital Malformations of the Digestive System

Резюме

Введение. «Изолированное» использование визуализирующих методов исследования для диагностики врожденных пороков развития у плода в ряде случаев оказывается несостоятельным. Применение современных технологий ультразвуковой визуализации не позволяет осуществлять надлежащую диагностику и дифференцирование у плода таких врожденных аномалий, как атретическое поражение участков пищеварительной трубки, билиарная атрезия, муковисцидоз. Современная пренатальная диагностика врожденных аномалий развития плода требует разработки новых эффективных методов комплексного исследования плода, включающих в себя выполнение биохимических исследований околоплодных вод с последующей оценкой полученных результатов: с применением региональных процентильных нормативов Республики Беларусь.

Цель. Разработка эффективного метода диагностики и дифференциации врожденных пороков развития у плода, связанных с атретическим поражением билиарных ходов и кишечной трубки.

Материалы и методы. Работа выполнена на базе лаборатории репродуктивного здоровья ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», кафедры ультразвуковой диагностики ГУО «БелМАПО», межрайонного ресурсного центра пренатальной диагностики УЗ «1-я городская клиническая больница» г. Минска с использованием клинического (анализ анамнестических данных, результатов осмотра), инструментальных (ультразвуковое исследование (УЗИ) плода, магнитно-резонансная томография (МРТ) плода, амниоцентез) и лабораторного (биохимическое исследование околоплодных вод) методов.

Проведен проспективный структурный анализ исходов беременности у 80 женщин с врожденными аномалиями развития плода (основная группа) и 80 женщин группы сравнения.

Результаты и обсуждение. Рассчитанные нормативные процентильные значения общей активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) в

амниотической жидкости для срока беременности 16–18 недель составили: ЩФ – 0 (0–0,6) U/l, ГГПТ – 13,8 (9,0–34,0) U/l. У пациенток с атрезиями различных участков пищеварительного тракта (атрезия тонкого/толстого кишечника) выявлено повышение уровня активности ЩФ и ГГТП в амниотической жидкости. Значимых отличий показателей ферментативной активности у беременных с кистами брюшной полости и диафрагмальными грыжами по сравнению с аналогичными у пациентов группы контроля не установлено.

Заключение. Представленный новый комплексный подход к пренатальной диагностике аномалий развития пищеварительной системы плода, сочетающий использование метода лабораторной диагностики (в качестве ведущего) с УЗИ и МРТ, должен способствовать снижению «удельного веса» инвалидизации детей, перинатальных потерь, экстренных досрочных родоразрешений.

Разработанный клинико-лабораторный метод диагностики врожденных пороков развития пищеварительной системы плода, основанный на определении активности фетальных пищеварительных ферментов в амниотической жидкости, а также установленные нормативные процентильные значения активности пищеварительных ферментов в околоплодных водах у беременных женщин Республики Беларуси являются новыми, официально утвержденными и могут использоваться врачами-специалистами в своей практической деятельности.

Ключевые слова: пренатальная диагностика, врожденные пороки развития, пищеварительные ферменты, амниотическая жидкость.

Abstract

Introduction. The "isolated" use of imaging research methods for diagnostics of congenital malformations in the fetus is unconvincing in some cases. The use of modern ultrasound imaging technologies does not let to conduct a proper diagnosis and differentiation of such congenital anomalies in the fetus as atretic lesions of the digestive tube, biliary atresia, and cystic fibrosis. Modern prenatal diagnosis of congenital malformations of the fetus requires the development of new effective methods for the comprehensive study of the fetus, which includes performing biochemical studies of amniotic fluid with subsequent evaluation of the results: using regional percentile standards of the Republic of Belarus.

Purpose. To develop an effective method for diagnostics and differentiation of congenital malformations in the fetus associated with atretic lesion of the biliary ducts and intestinal tube.

Materials and methods. The work was performed on the base of the Reproductive Health Laboratory of the State Institution "Scientific and Practical Center "Mother and Child", Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, the Inter-District Resource Center of Prenatal Diagnostics of the 1st City Clinical Hospital of Minsk, using the clinical method (analysis of anamnestic data, examination results), instrumental methods (ultrasound of the fetus, magnetic resonance imaging of the fetus, amniocentesis), laboratory method (biochemical examination of the amniotic fluid). A prospective structural analysis of pregnancy outcomes was performed in 80 women with congenital malformations of the fetus (main group) and 80 women in the comparison group.

Results and discussion. The calculated normative percentile values of the total activity of alkaline phosphatase (ALP) and the activity of gamma-glutamyltranspeptidase (GGTP) in amniotic fluid in the gestational age of 16–18 weeks were the following: ALP – 0 (0–0.6) U/l, GGPT – 13.8 (9.0–34.0) U/l. In patients with atresia of various sections of the digestive tract (atresia of the small / large intestine), the increase of the level of activity of alkaline phosphatase and GGT in the amniotic fluid was revealed. Significant differences in the indicators of enzymatic activity in pregnant women with cysts of the abdominal cavity and diaphragmatic hernias (if compared with similar patients in the control group) were not detected.

Conclusion. The presented new comprehensive approach to prenatal diagnostics of abnormalities of the digestive system of the fetus, which combines the use of laboratory diagnostic method

(as the leading one) with ultrasound and MRI, should help to reduce the "specific gravity" of children's disability, perinatal losses, emergency early delivery. The developed clinical and laboratory method for diagnostics of fetal digestive system VLD is based on determination of the activity of fetal digestive enzymes in amniotic fluid, as well as the established standard percentile values of the activity of digestive enzymes in the amniotic fluid in pregnant women of the Republic of Belarus, are new, officially approved and can be used by specialists in their practical activities.
Keywords: prenatal diagnosis, congenital malformations, digestive enzymes, amniotic fluid.

■ ВВЕДЕНИЕ

Одной из особенностей современного этапа развития здравоохранения является заметное повышение у врачей внутренней требовательности к себе. У врачей ультразвуковой диагностики она часто проявляется в стремлении поставить верный диагноз абсолютно всем обследованным пациентам, хотя зачастую это представляет собой невыполнимую задачу. Наибольшие сложности такого плана возникают при постановке диагноза врожденного порока развития (ВПР) у плода в случаях, когда применение многих из необходимых традиционных клинических методов обследования, кроме ультразвуковой диагностики, крайне ограничено или невозможно.

Несмотря на активнейшее в последние годы развитие визуализирующего диагностического оборудования, его изолированное применение для дифференциации врожденных пороков у плода в некоторых случаях не позволяет получить желаемый результат. Применение технологий трехмерной визуализации, технологии Fusion, эластографии, предельное повышение разрешающей способности ультразвукового сканера практически никак не помогают в диагностировании и дифференцировании у плода таких врожденных аномалий, как атретическое поражение участков пищеварительной трубки, билиарная атрезия, муковисцидоз.

Так, невозможность визуализации желчного пузыря у плода в ходе ультразвукового скринингового обследования беременной составляет ситуацию, при которой постановка правильного пренатального диагноза структурно-функциональных нарушений в билиарной системе превращается для врача в очень сложную задачу.

Отрицательный результат визуализации желчного пузыря плода в ходе выполнения ряда последовательных инструментальных исследований является сонографическим признаком как относительно легкого порока развития, каковым является изолированная агенезия желчного пузыря, так и тяжелых поражений, характеризующихся плохим прогнозом, среди которых муковисцидоз, анеуплоидии (трисомия 18, трисомия 21, триплоидия и пр.), билиарная атрезия, вирусные инфекции (цитомегаловирус), множественные врожденные пороки развития (синдром Поттера и пр.) [1, 2].

Еще одной весьма важной проблемой является диагностика атрезии участков кишечной трубки плода, в особенности толстой кишки. При данном врожденном пороке развития у плода в ходе пренатального ультразвукового исследования (УЗИ) могут не выявляться никакие

патогномоничные сонографические признаки в виде патологического растяжения участка ободочной или прямой кишки. Отсутствие этого признака объясняется физиологическими механизмами реабсорбции жидкости из кишечника, которая максимально выражена у плода именно в дистальных отделах кишечной трубки – ободочной, сигмовидной и прямой кишке.

Таким образом, диагностика и дифференциация описанных патологических состояний является сложной задачей и требует обязательного применения комплексной диагностики, включающей не только УЗИ, но и другие методы исследования. Однако при этом как в отечественных, так и в зарубежных источниках информации содержатся противоречивые данные, касающиеся потенциальных возможностей различных методов лучевой и лабораторной диагностики в выявлении таких врожденных аномалий развития пищеварительной системы плода, как билиарная атрезия, атретические поражения пищеварительной трубки, включая пищевод, тонкий и толстый кишечник, а также раннего выявления аномалий, приводящих при несвоевременном их обнаружении к глубокой инвалидизации либо скорой гибели новорожденных.

Из изложенного следует, что современная пренатальная диагностика врожденных аномалий развития плода требует разработки новых эффективных методов комплексного исследования плода, в том числе включающих методы биохимического исследования околоплодных вод с последующей оценкой результатов с применением региональных процентильных нормативов Республики Беларусь.

Согласно результатам выполненных к настоящему времени все еще немногочисленных исследований, при таких пороках развития плода, как муковисцидоз, билиарная атрезия, атрезия тонкого кишечника, а также при хромосомных аномалиях плода в амниотической жидкости отмечается изменение общей активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) [3–7], однако эти сведения разноречивы.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода диагностики атретического поражения кишечной трубки плода и дифференциальной диагностики агенезии желчного пузыря, муковисцидоза и билиарной атрезии на основе результатов биохимического исследования околоплодных вод.

Наряду с этим была поставлена задача определения оптимальной тактики пренатальной дифференциальной диагностики в случаях невозможности получения сонографического изображения желчного пузыря плода и подтверждения потенциальной пользы оценки уровня пищеварительных ферментов в амниотической жидкости, что открыло бы «окно» для выполнения дальнейших исследований.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе лаборатории репродуктивного здоровья ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», кафедры ультразвуковой диагностики ГУО «БелМАПО», межрайонного ресурсного центра пренатальной диагностики УЗ «1-я городская клиническая больница» г. Минска.

Осуществлено комплексное клинико-лабораторное исследование, включающее в себя использование клинического (анализ анамнестических данных, результатов осмотра), инструментальных (УЗИ плода, магнитно-резонансная томография (МРТ) плода, амниоцентез) и лабораторных методов исследования патогенетически значимых тестов: определение общей активности щелочной фосфатазы и активности гамма-глутамилтранспептидазы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Нормальность распределения проверяли по результатам тестов Шапиро – Уилка и Колмогорова – Смирнова. Определяли долю (%), медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25–Q75). Для сравнения независимых выборок с количественными показателями использовали непараметрический критерий Манна – Уитни (U). Для сравнения качественных показателей (долей) в группах использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. В случае если ожидаемая частота признака составляла менее 5, применяли двусторонний критерий Фишера (F). Статистически значимыми принимали различия при $p<0,05$.

Проведен проспективный структурный анализ исходов беременности у 80 женщин с врожденными аномалиями развития плода (основная группа) и 80 женщин с физиологически протекающей беременностью (группа контроля). Возраст пациенток основной группы и группы сравнения составил 30 (27–33) лет и 29 (26–33) лет соответственно и не имел статистически значимых различий между группами и подгруппами. При анализе антропометрических показателей (роста, массы до беременности, ИМТ) статистически значимых отличий между подгруппами основной группы и группы сравнения выявлено не было ($p>0,05$).

Пациентки основной группы в зависимости от выявленного порока пищеварительной системы плода были разделены на 4 подгруппы:

1) беременные с атрезиями различных отделов пищеварительного тракта плода (подгруппа 1, n=42);
2) беременные с кистами брюшной полости плода (подгруппа 2, n=12);
3) беременные с диафрагмальной грыжей у плода (подгруппа 3, n=12);
4) беременные с другими пороками пищеварительного тракта плода (подгруппа 4, n=14).

Всем беременным было выполнено УЗИ плода.

У пациенток основной группы также выполнялся забор околоплодных вод посредством амниоцентеза на исследование активности ферментов, отражающих функциональное состояние органов гепато-билиарной системы и кишечного тракта, – ЩФ и ГГТФ; у остальных пациентов воды забирались во время родоразрешения.

Амниоцентез выполнялся по общепринятой методике: одноразовой иглой 20G трансабдоминально под контролем ультразвукового исследования в месте, свободном от плаценты.

Для предотвращения контаминации материала материнскими клетками первую порцию амниотической жидкости объемом 0,5 мл не использовали для выполнения клинико-лабораторного исследования.

Для биохимического анализа из общего количества забранной амниотической жидкости (в среднем 5 мл) шприцем аспирировали 1 мл околоплодных вод, которые исследовали либо сразу, либо в течение

ближайших 24 ч. Во втором случае образец хранился при температуре +2…+8 °С не более 24 ч.

Исследование околоплодных вод с целью оценки общей активности щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы проводилось с использованием биохимического анализатора «KoneLab 30i» и сертифицированных наборов реагентов.

Полученные в процессе исследования беременных основной и контрольной групп результаты были использованы для установления нормативных значений активности указанных ферментов в околоплодных водах и последующей клинико-лабораторной диагностики/дифференциации атретических поражений кишечной трубки плода и билиарной атрезии (по результатам исследования пациенток основной группы).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень активности ферментов (общей щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы) в амниотической жидкости представлен в табл. 1.

В амниотической жидкости пациенток подгруппы 1 (с установленными визуализирующими методами (УЗИ, МРТ) атрезиями различных участков пищеварительного тракта или подозрениями на данную аномалию, подтвержденную постнатально) повышение общей активности щелочной фосфатазы и ГГТП констатировано при атрезии тонкого и толстого кишечника. Вероятно, именно изменениями активности пищеварительных ферментов, в том числе исследованных нами наряду с изменением концентрации желчных солей в содержимом кишечной трубки, можно объяснить отличия от нормы в случае атретических поражений Т1- и Т2-сигналов от кишечника, которые были зафиксированы при проведении МРТ брюшной полости плода.

Для исключения влияния на ферментативную активность амниотической жидкости ферментов крови беременной проводилась сравнительная оценка общей щелочной активности фосфатазы и активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови женщин с ВПР плода

Таблица 1
Показатели Me (Q_{25}–Q_{75}) общей активности щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы в амниотической жидкости беременных основной и контрольной групп в сроке гестации 16–18 недель

Table 1
Me (Q25–Q75) indicators of the total activity of alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase in the amniotic fluid of pregnant women of the main and control groups, at the gestational age of 16–18 weeks

Показатель / Indicator	Основная группа / Main group				Контрольная группа / Control group
	Все / all	Подгруппа / subgroup			
		1	2	3	
ЩФ, U/l / Total alkaline phosphatase, U/l	22,0 (18,0–30,0)	24,0 (21,0–32,0)	21,0 (12,0–25,0)	19,0 (14,0–26,0)	0 (0–0,6)
ГГТП,U/l / Gamma glutamyl transpeptidase, U/l	29,7 (18,3–56,8)	10,1 (6,1–50,0)	40,5 (30,1–53,4)	41,9 (30,7–58,7)	13,8 (9,0–34,0)

у пациенток основной группы и группы сравнения. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как следует из данных табл. 2, показатели общей активности щелочной фосфатазы и активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови женщин с ВПР плода и женщин группы контроля не выходили за пределы нормы и не имели статистически значимых различий (p>0,05).

Установлены нормативные процентильные значения активности ферментов (общей щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы) в амниотической жидкости у беременных женщин в Республике Беларусь.

Пищеварительные ферменты плода начинают определяться в амниотической жидкости беременных с 12–13 недель гестации, когда исчезает анальная мембрана [8]. Однако диагностическое значение эти тесты приобретают с 16 недель беременности, когда становится возможным проведение амниоцентеза для верификации диагноза ВПР пищеварительной системы плода.

В группе сравнения забор околоплодных вод осуществлялся в сроках беременности 16–18 недель при проведении амниоцентеза, и рассчитывались относящиеся к этому сроку нормативные процентильные значения общей активности щелочной фосфатазы и активности гамма-глутамилтранспептидазы в амниотической жидкости.

С учетом того, что, как следует из данных, представленных в табл. 1, уровень общей активности щелочной фосфатазы в околоплодных водах в 16–18 недель беременности близок к 0, а при наличии билиарной атрезии предполагается уменьшение активности ферментов в околоплодной жидкости, для диагностики данной патологии предпочтительнее использовать тест определения активности гамма-глутамилтранспептидазы.

Таблица 2
Уровень общей активности щелочной фосфатазы и активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови у женщин с ВПР плода и пациентов группы сравнения, Me (Q_{25}–Q_{75})

Table 2
The level of total alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase in blood serum in women with fetal malformations and comparison groups, Me (Q25 – Q75)

Показатель / Indicator	Основная группа / Main group					Группа контроля / Comparison group
	Все / All	Подгруппа / subgroup				
		1	2	3	4	
ЩФ, U/l / Total alkaline phosphatase, U/l	56 (41–98)	69 (43–87)	57 (36–103)	65 (40–93)	52 (39,0–95,0)	67 (37–101)
ГГТП,U/l / Gamma glutamyl transpeptidase, U/l	21 (11–31)	19 (10–28)	20 (13–32)	22 (11–32)	19 (9–29)	17,0 (9–29)

Примечание: статистически значимых различий не выявлено (p>0,05).
Note: no statistically significant differences were found (p>0.05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешность коррекции атрезии желчевыводящих путей, или билиарной атрезии, у новорожденных зависит от своевременности установления диагноза и, как следствие, своевременности последующего направления новорожденного в хирургический стационар. Естественно, что лучший результат хирургической коррекции можно получить в случае наиболее раннего выявления данного порока развития, то есть выявления еще до момента родов. Более вероятно, что к этому времени изменения в структуре печени будут наименее выраженными [7, 9, 10], а своевременное, как можно более раннее обеспечение дренажа желчи позволит более эффективно затормозить процесс цирротической трансформации печени у ребенка. Соответственно, значимость именно пренатального установления правильного диагноза атрезии желчных ходов является неоспоримой.

При билиарной атрезии, сонографические критерии которой очень схожи с таковыми при агенезии желчного пузыря, дифференциальная диагностика патологических состояний играет решающую роль, так как прогнозы при указанных ВПР кардинально отличаются.

Ведущую роль в их дифференциации, судя по полученным нами данным, сегодня может играть только оценка изменения активности исследованных пищеварительных ферментов в околоплодных водах, основанная на сравнении полученных данных с установленными в ходе исследования нормативными значениями.

Активность пищеварительных ферментов, обнаруживаемых в амниотической жидкости и синтезирующихся билиарным эпителием (гамма-глутамилтранспептидаза) и энтероцитами (кишечная щелочная фосфатаза), не может не изменяться при нарушении их поступления в кишечную трубку и далее – в амниотическую полость.

Рассчитанные нормативные процентильные значения общей активности ЩФ и ГГТП в амниотической жидкости для срока беременности 16–18 недель составили: для ЩФ – 0 (0–0,6) U/l, ГГПТ – 13,8 (9,0–34,0) U/l. Так как общая активность щелочной фосфатазы в околоплодных водах в 16–18 недель беременности близка к нулю, а при наличии билиарной атрезии предполагается уменьшение количества ферментов в околоплодной жидкости, предпочтительнее использовать для диагностики данной патологии оценку уровня активности ГГТП.

У пациенток с атрезиями различных участков пищеварительного тракта (атрезия тонкого/толстого кишечника) в амниотической жидкости выявлено повышение уровня активности ЩФ и ГГТП.

Значимых отличий в уровне активности ЩФ и ГГТП у беременных с кистами брюшной полости и диафрагмальными грыжами по сравнению с группой контроля выявлено не было.

Таким образом, констатированное нами изменение активности пищеварительных ферментов в амниотической жидкости в настоящее время является единственным дополнительным тестом, который с большой вероятностью может указывать на диагноз атрезии желчных протоков при невизуализируемом желчном пузыре.

Результаты МРТ брюшной полости плода, фиксирующие отличия Т1- и Т2-сигналов при норме и при атретическом поражении кишечника

плода, вероятнее всего, обусловленные изменениями активности пищеварительных ферментов и концентрации желчных солей в содержимом кишечной трубки, также могут использоваться в качестве дополнительного, пока «неспецифического» диагностического критерия билиарной атрезии и кишечной атрезии.

Уровень активности таких пищеварительных ферментов, как гамма-глутамилтранспептидаза и кишечная щелочная фосфатаза, в амниотической жидкости при билиарной атрезии у плода снижается по сравнению с нормативными процентильными значениями для обследуемой популяции беременных женщин, что соответствует представлениям некоторых других исследований [10–14].

Подтверждение диагностической значимости оценки уровня активности пищеварительных ферментов в амниотической жидкости выявленными нами изменениями МРТ-сигналов у плодов с атретическими поражениями кишечника и билиарной атрезией представляется весьма важным, так как это, в том числе, открывает перспективу для дальнейших исследований в данном направлении.

Представленный новый комплексный подход к пренатальной диагностике аномалий развития пищеварительной системы плода, сочетающий использование метода лабораторной диагностики (в качестве ведущего) с УЗИ и МРТ, должен способствовать снижению «удельного веса» инвалидизации детей, перинатальных потерь, экстренных досрочных родоразрешений.

Разработанный клинико-лабораторный метод диагностики ВПР пищеварительной системы плода, основанный на определении активности фетальных пищеварительных ферментов в амниотической жидкости, а также установленные нормативные процентильные значения активности пищеварительных ферментов в околоплодных водах у беременных женщин Республики Беларуси являются новыми, официально утвержденными (инструкция по применению № 115-1118, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь 30.11.2018 г.) и могут использоваться врачами-специалистами в своей практической деятельности.

Социальная и экономическая значимость результатов настоящего исследования состоит в охране здоровья матери и ребенка как важного фактора повышения благополучия семьи в Республике Беларусь.

Экономическая значимость заключается в значительном снижении затрат (до 25%) на выхаживание глубоко декомпенсированных новорожденных, критическая тяжесть состояния которых обусловлена несвоевременным выявлением врожденного порока развития и, соответственно, не вполне адекватной тактикой ведения беременности и родов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blazer S., Zimmer E.Z., Bronshtein M. (2002) Nonvisualization of the fetal gallbladder in early pregnancy: comparison with clinical outcome. *Radiology*, vol. 224, pp. 379–382.
2. Bronshtein M., Weiner Z., Abramovici H., Filmar S., Erlik Y., Blumenfeld Z. (1993) Prenatal diagnosis of gall bladder anomalies – report of 17 cases. *Prenat Diagn*, vol. 13, pp. 851–861.
3. Shen O., Rabinowitz R., Yagel S., Gal M. (2011) Absent gallbladder on fetal ultrasound: prenatal findings and postnatal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol*., vol. 37, pp. 673–677.
4. Muller F., Bernard P., Salomon L.J., Dreux S., Allaf B., Czerkiewicz I. (2015) Role of fetal blood sampling in cases of non-visualization of fetal gallbladder. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, vol. 46, pp. 743–744.
5. Bennion R.S., Thompson J.E., Tompkin R.K. (1988) Agenesis of the gallbladder without extrahepatic biliary atresia. *Arch Surg*., vol. 123, pp. 1257–1260.
6. Malde S. (2010) Gallbladder agenesis diagnosed intra-operatively: a case report. *J*. Med Case Rep., vol. 4, pp. 285.
7. McKiernan P.J., Baker A.J., Kelly D.A. (2000) The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet*, 355, 25.
8. Bardin R., Danon D., Harel D. (2007) Reference values for gamma-glutamyl- transferase (GGT) in amniotic fluid between 16-22 weeks gestation: an addition in assessing non-visualization of fetal gallbladder? *Ultrasound Obstet. Gynecol*., vol. 30, Is. 4, pp. 549–550.
9. Hopkins P.C., Yazigi N., Nylund C.M. (2017) Incidence of Biliary Atresia and Timing of Hepatoportoenterostomy in the United States. *J. Pediatr*., vol. 187, pp. 253.
10. Boughanim M., Benachi A., Dreux S., Delahaye S., Muller F. (2008) Nonvisualization of the fetal gallbladder by second-trimester ultrasound scan: strategy of clinical management based on four examples. *Prenat Diagn*., vol. 28, pp. 46–48.
11. Ochshorn Y., Rosner G., Barel D., Bronshtein M., Muller F., Yaron Y. (2007) Clinical evaluation of isolated nonvisualized fetal gallbladder. *Prenat Diagn*., vol. 27, pp. 699–703.
12. Dreux S., Boughanim M., Lepinard C., Guichet A., Rival J-M., de Becdelievre A. (2012) Relationship of non-visualization of the fetal gallbladder and amniotic fluid digestive enzymes analysis to outcome. *Prenat Diagn*., vol. 32, pp. 423–426.
13. Muller F., Gauthier F., Laurent J., Schmitt M., Boué J. (1991) Amniotic fluid GGT and congenital extrahepatic biliary damage. *Lancet Lond Engl*., vol. 337, pp. 232–233.
14. Bardin R., Danon D., Tor R., Mashiach R., Vardimon D., Meizner I. (2009) Reference values for gamma-glutamyl-transferase in amniotic fluid in normal pregnancies. *Prenat Diagn*., vol. 29, pp. 703–706.

Поступила/Received: 11.12.2019
Контакты/Contacts: a.chukanov@tut.by

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.028
УДК 616.153.96:577.112.824

Жильцов И.В.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Zhyltsou I.
Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Естественные факторы, влияющие на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови человека

Natural Factors That Affect the Level of Beta-Lactamase Activity of Human Serum

Резюме

Введение. Как было установлено нами ранее, человеческий сывороточный альбумин обладает собственной бета-лактамазной активностью и способен гидролизовать бета-лактамную связь в молекулах многих антибиотиков из одноименной группы.
Цель. Установить, насколько естественные факторы, такие как pH крови, температура, время суток и др., влияют на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови человека.
Материалы и методы. Для количественного определения бета-лактамазной активности сыворотки крови использовали спектрофотометрический метод, основанный на регистрации распада бета-лактамной связи нитроцефина (в том числе при изменении pH раствора хромогена, внесении в реакционную среду раствора ЭДТА, изменении температуры инкубируемой среды). Использованы сыворотки крови практически здоровых людей (доноров), а также пациентов реанимационного отделения Витебской областной инфекционной больницы.
Результаты и обсуждение. Установлено, что бета-лактамазная активность сыворотки крови характеризуется оптимумом pH в районе 9,0, а при изменении pH с 7,0 до 8,0 меняется с минимальных до субмаксимальных значений. При повышении температуры инкубации с 36 °C до 42 °C бета-лактамазная активность сыворотки крови возрастает на ≈45%. Присутствие двухвалентных катионов металлов практически не оказывает влияния на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови. Уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови постепенно снижается с возрастом. По крайней мере у некоторых пациентов возможны значительные (до ≥20%) суточные колебания бета-лактамазной активности сыворотки крови.
Выводы. Бета-лактамазная активность сыворотки крови является сложным интегральным параметром, зависящим от многих эндогенных факторов, что затрудняет клиническую интерпретацию получаемых результатов.
Ключевые слова: бета-лактамазная активность сыворотки крови человека, «эндогенная» резистентность к бета-лактамным антибиотикам, модифицирующие факторы: pH крови, температура тела, лихорадка, кофакторы, изменение бета-лактамазной активности за короткие и длительные промежутки времени.

Abstract

Introduction. As we previously discovered, human serum albumin has its own beta-lactamase activity and can hydrolyze the beta-lactam bond in the molecules of many antibiotics from this group.
Purpose. To determine how natural factors, such as blood pH, temperature, time of the day, etc., affect the level of beta-lactamase activity of human blood serum.
Materials and methods. To quantitatively determine the serum beta-lactamase activity, a spectrophotometric method was used on the base of detection of hydrolysis of the nitrocephin beta-lactam bond (the pH of the chromogen solution was variated, the EDTA solution was added to the reaction medium, and the incubation temperature was changed if necessary). For our experiments, we used the blood serum of healthy donors, as well as patients of the intensive care unit of the Vitebsk regional infectious diseases hospital.
Results and discussion. It was found that the serum beta-lactamase activity is characterized by pH optimum near 9.0; when the pH changes from 7.0 to 8.0, the beta-lactamase activity level changes from minimum to submaximal values. If the temperature of incubation increases from 36 °C to 42 °C, the beta-lactamase activity of blood serum increases by ≈45%. The presence of bivalent metal cations produces practically no effect on the level of beta-lactamase activity of blood serum. The level of beta-lactamase activity of blood serum gradually decreases with aging. In at least some patients, significant (up to ≥20%) diurnal fluctuations of the serum beta-lactamase activity are possible.
Conclusions. Serum beta-lactamase activity is a complex integral parameter, which depends on many endogenous factors that complicate the clinical interpretation of its levels.
Keywords: beta-lactamase activity of human blood serum, "endogenous" resistance to beta-lactam antibiotics, modifying factors: blood pH, body temperature, fever, cofactors, changes of beta-lactamase activity for short and long periods of time.

■ ВВЕДЕНИЕ

Как было установлено нами ранее, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) обладает собственной бета-лактамазной активностью и способен гидролизовать бета-лактамную связь в молекулах многих антибиотиков из одноименной группы [1]. За годы изучения эндогенной бета-лактамазной активности человеческой крови, опосредуемой ЧСА, у нас сформировалось мнение, что данная активность является индивидуальным маркером, очень медленно изменяющимся с течением времени, ввиду чего превентивное определение данного показателя может быть использовано для прогнозирования эффективности ряда бета-лактамных антибиотиков у отдельных индивидуумов в случае развития у них бактериальных инфекций. Помимо этого, складывается впечатление, что уровень бета-лактамазной активности человеческой крови, измеряемый in vitro, адекватно отражает выраженность «эндогенной» резистентности к антибиотикам бета-лактамного ряда. Тем не менее следует отметить, что нами уже неоднократно продемонстрировано, что бета-лактамазная активность ЧСА является по сути ферментоподобной, т. е. должна подчиняться тем же закономерностям, что и активность «настоящих» энзимов [2, 3]. Так, ферментативная активность должна: 1) зависеть от pH биологических сред; 2) повышаться

при повышении температуры тела, вплоть до момента начала денатурации третичной структуры соответствующего белка; 3) модифицироваться различными кофакторами (включая молекулы лекарственных средств) как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения [4]. Помимо этого, ферментативная активность может (иногда существенно) изменяться с течением времени, следуя внутренним циклам человеческого организма, в том числе в ходе старения.

Показано, например, что присутствие в крови людей микроскопических количеств таких распространенных отходов нефтехимического производства, как 1-нафтол, 2-нафтол, 8-хинолинол, может приводить к повышению бета-лактамазной активности соответствующих проб сыворотки крови на 100–200% [5].

При этом, в отличие от ферментов, уровень которых является маркером патологических состояний (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, α-амилаза и др.), бета-лактамазная активность увязывается с собственно степенью распада антибиотиков бета-лактамного ряда в крови пациента, вследствие чего колебания данной активности, связанные с депривацией воздействия ряда факторов, характерных для соответствующего пациента (например, высокой лихорадки), могут привести к существенному искажению результатов обследования и, следовательно, к ошибкам в трактовке полученных результатов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить, насколько естественные факторы, такие как pH крови, температура, время суток и др., влияют на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови человека.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эксперимента были использованы пробы сыворотки крови практически здоровых доноров с различными исходными уровнями бета-лактамазной активности. Для определения динамики изменения бета-лактамазной активности крови в течение дня были использованы сыворотки крови пациентов, госпитализированных в реанимационное отделение УЗ «Витебская областная инфекционная клиническая больница», ввиду доступности указанных лиц для круглосуточного отбора проб их крови, который осуществлялся в течение суток каждые 3 часа.

Для количественного определения бета-лактамазной активности сыворотки крови мы использовали известный спектрофотометрический метод, основанный на регистрации распада бета-лактамной связи нитроцефина [6, 7].

С целью оценки зависимости уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови от наличия кофакторов (ионов Cu^{2+} и Zn^{2+}) исследуемые образцы сыворотки крови обрабатывались 0,3 моль/л раствором ЭДТА, который обладает очень высоким сродством к двухвалентным катионам металлов, ввиду чего способен извлекать их из активных центров энзимов и других белков.

Для выявления зависимости бета-лактамазной активности сыворотки крови от pH микроокружения также была использована реакция

распада нитроцефина, причем рабочий раствор хромогена был приготовлен с использованием различных буферных растворов в интервале pH от 2,5 до 13,0 с шагом 0,5. Интервал pH от 2,5 до 3,5 был перекрыт глицин-HCl буфером, 4,0–5,5 – ацетатным буфером, 6,0–7,5 – цитратно-фосфатным буфером, 8,0–8,5 – трис-HCl буфером, 9,0–10,5 – глицин-NaOH буфером, 11,0–11,5 – фосфат натрия (2-зам.)-NaOH буфером и 12,0–13,0 – KCl-NaOH буфером.

Для оценки зависимости бета-лактамазной активности сыворотки крови от температуры инкубации идентичные пробы сыворотки крови раздельно инкубировались при 33 °C, 36 °C, 39 °C и 42 °C. Данный интервал температур отражает реальные температуры, которые могут быть зарегистрированы в жизнеспособном человеческом организме в норме и при различных патологических состояниях (инфекционно-токсический шок с гипотермией, гиперпиретическая лихорадка, фебрильная лихорадка при инфекционных заболеваниях).

Статистический анализ результатов исследования производился при помощи аналитического пакета Statistica 10.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как оказалось, оптимум pH для реакции распада нитроцефина под воздействием сыворотки человеческой крови составляет ≈9,0. При этом имеет место резкое увеличение уровня бета-лактамазной активности ЧСА при повышении pH с 7,0 до 8,0 (рис. 1). Так, при pH 7,0 указанная активность составляет около 6,4% распада внесенного в пробу количества нитроцефина, при pH 7,4 (т. е. при его физиологическом значении) – приблизительно 22,2%, а при pH 8,0 – уже 57,3%. Таким образом, при различных патологических состояниях бета-лактамазная активность человеческой крови может скачкообразно изменяться – снижаться

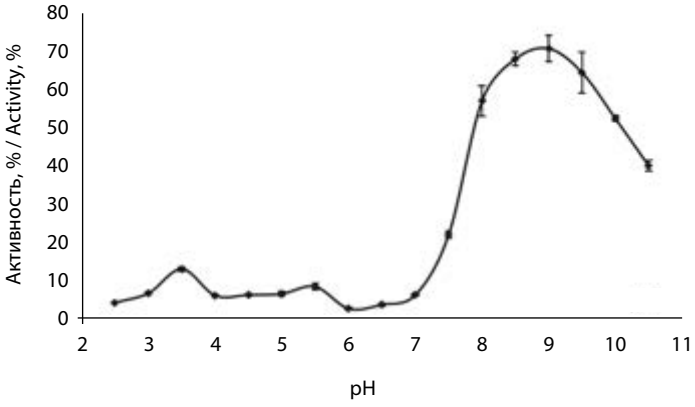


Рис. 1. Зависимость уровня бета-лактамазной активности сыворотки человеческой крови от pH. Здесь и далее точки данных снабжены метками, характеризующими разброс данных в вариационном ряду (±SD, или ±σ)

Fig. 1. The dependence of the level of beta-lactamase activity of human serum on pH. Hereinafter, the data points are labeled to characterize the data variation (±SD, or ±σ)

до минимальных цифр при ацидозе любого генеза (типичном для большинства тяжелых заболеваний и неотложных состояний) и резко нарастать при алкалозе (также встречающемся при некоторых тяжелых заболеваниях и неотложных состояниях).

С повышением температуры инкубации каталитическая активность образцов сыворотки крови существенно возрастает: разница между уровнями бета-лактамазной активности при 36 °С и 39 °С составляет до 11,5%, а при 37 ° и 42 °С – до 44,6% (рис. 2). Указанная разница является статистически значимой (sign rank test, $p<0,01$).

Данная картина может быть объяснена исходя из правила Вант-Гоффа: в небольшом температурном интервале (от 0 °С до 100 °С) при повышении температуры на каждые 10 градусов константа скорости гомогенной элементарной реакции увеличивается в 2–4 раза. В случае реакций, катализируемых ферментами, зависимость скорости реакции от температуры обычно имеет колоколообразный вид: с повышением температуры скорость реакции быстро возрастает, достигает максимума при температуре, соответствующей оптимальной для данного фермента (обычно в интервале 37…38 °С), после чего также быстро снижается при дальнейшем повышении температуры [4]. В нашем случае температурный оптимум реакции распада нитроцефина под воздействием человеческой сыворотки крови, очевидно, лежит выше 42 °С; соответственно, можно утверждать, что бета-лактамазная активность человеческой крови быстро возрастает с повышением температуры тела, и у пациентов с высокой лихорадкой in vivo она может оказаться существенно выше, чем in vitro.

Обработка проб сыворотки человеческой крови 0,3 М раствором ЭДТА приводила к очень незначительному снижению ее бета-лактамазной активности (средняя активность проб нативной сыворотки

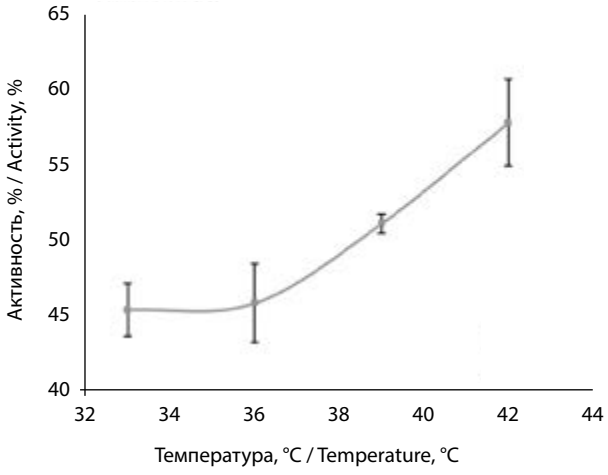


Рис. 2. Зависимость бета-лактамазной активности проб человеческой сыворотки крови от температуры инкубации

Fig. 2. Dependence of beta-lactamase activity of human blood serum samples on incubation temperature

составила 35,6% при 95% доверительном интервале (ДИ) 33,8–37,4; средняя активность тех же проб после добавления раствора ЭДТА оказалось равной 32,7% при ДИ 31,7–33,7). Таким образом, разница в уровнях бета-лактамазной активности образцов нативной сыворотки и их же после обработки ЭДТА составила всего 2,9 процентных пункта, хотя и была статистически значима (U-тест Манна – Уитни, p=0,014).

Соответственно, примесь ионов Zn^{2+} и Cu^{2+} в качестве кофакторов, равно как и прочих двухвалентных катионов металлов, связываемых ЭДТА в прочные комплексы, не может опосредовать более 8,1% от уровня собственной бета-лактамазной активности сыворотки человеческой крови.

Статистический анализ показал, что уровень бета-лактамазной активности проб сыворотки крови обратно пропорционален возрасту лиц, включенных в исследование (коэффициент ранговой корреляции Спирмена R=–0,367, n=498, p<0,0001). Выявленная взаимосвязь является слабой, но статистически высокозначимой, что указывает на тенденцию к планомерному снижению бета-лактамазной активности сыворотки крови с возрастом. Причиной данного явления может быть постепенное снижение концентрации альбумина в крови, нередко наблюдаемое у пожилых людей, а также особенности диеты и медикаментозной терапии, приводящие к блокировке активных центров в молекулах альбумина, ответственных за проявление бета-лактамазной активности.

Анализ уровня бета-лактамазной активности у одних и тех же пациентов с инфекционной патологией с интервалом 3 часа неожиданно показал, что в течение суток бета-лактамазная активность сыворотки крови может изменяться в достаточно широких пределах – от 55% до >70%, причем наиболее высокий уровень активности наблюдался в ранние утренние часы, а наиболее низкий – после полудня (рис. 3).

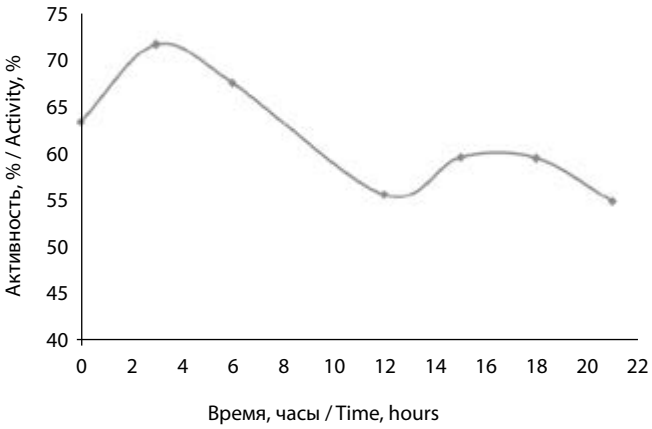


Рис. 3. Пример изменения бета-лактамазной активности сыворотки крови в течение суток у пациента с тяжелой инфекционной патологией

Fig. 3. An example of variation of serum beta-lactamase activity during the day in a patient with severe infectious pathology

Таким образом, суточный размах колебаний бета-лактамазной активности сыворотки крови составлял до 23,4%, что неожиданно много. Особенности использованной выборки не позволяют распространить полученные результаты на генеральную совокупность людей, но приходится признать, что по крайней мере у пациентов реанимационных отделений с тяжелой инфекционной патологией могут иметь место существенные колебания бета-лактамазной активности сыворотки крови в течение суток, что может быть связано, например, с режимом питания, либо назначением лекарственных средств, блокирующих активные центры молекул альбумина, ответственные за проявление бета-лактамазной активности, либо с циклическими изменениями pH крови.

■ ВЫВОДЫ

1. Бета-лактамазная активность сыворотки крови характеризуется оптимумом pH в районе 9,0, а при изменении pH с 7,0 до 8,0 бета-лактамазная активность сыворотки крови меняется с минимальных до субмаксимальных значений, что может иметь клиническое значение при ацидозах и алкалозах.
2. При повышении температуры инкубации с 36 °C до 42 °C бета-лактамазная активность сыворотки крови возрастает на 45%, что может иметь значение у лихорадящих пациентов с высокими показателями температуры тела.
3. Присутствие двухвалентных катионов металлов практически не оказывает влияния на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови.
4. Уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови постепенно снижается с возрастом.
5. У некоторых пациентов возможны значительные (до ≥20%) суточные колебания бета-лактамазной активности сыворотки крови.

Все изложенное указывает на то, что бета-лактамазная активность сыворотки крови является сложным интегральным параметром, зависящим от многих эндогенных факторов, действие которых может менять уровень указанной активности во много крат, что затрудняет клиническую интерпретацию результатов количественной оценки бета-лактамазной активности сыворотки крови пациентов in vitro. Наиболее разумной мерой по преодолению указанных затруднений видится введение шкалы поправочных коэффициентов, учитывающей, по крайней мере, температуру тела пациента и текущее значение pH его крови; тем не менее для точного определения величин поправочных коэффициентов необходимы дальнейшие углубленные исследования феномена.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhyltsou I. (2011) *Ustojchivost' k beta-laktamnym antibiotikam: priroda i klinicheskoe znachenie (monografija)* [Resistance to beta-lactam antibiotics: nature and clinical significance (monograph)]. Vitebsk: VSMU Publishing Department. (in Russian)
2. Zhyltsou I., Moiseev D., Semenov V., Egorov S. (2011) Kinetika raspada nekotoryh beta-laktamnyh antibiotikov pod vozdejstviem chelovecheskogo syvorotochnogo al'bumina [The degradation kinetics of some beta-lactam antibiotics under the influence of human serum albumin]. *Vestnik farmacii*, vol. 53, no 3, pp. 73–80.
3. Zhyltsou I., Veremej I., Semenov V., Generalov I., Egorov S. (2011) Mehanizm gidroliza beta-laktamnoj svjazi pod vozdejstviem al'bumina [The mechanism of hydrolysis of beta-lactam bond under the influence of albumin]. *Immunopathology, Allergology, Infectology*, no 3, pp. 24–31.
4. Kornish-Bouden E. (1979) *Osnovy fermentativnoj kinetiki* [Fundamentals of Enzymatic Kinetics]. Moscow: Mir. (in Russian)
5. Ahmad E., Rabbani G., Zaidi N., Ahmad B., Khan R.H. (2012) Pollutant-induced modulation in conformation and β-lactamase activity of human serum albumin. *PLoS One*, vol. 7, no 6: e38372, pp. 1–13.
6. O'Callaghan C.H., Morris A., Kirby S.M., Shingler A.H. (1972) Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 1, no 4, pp. 283–288.
7. Gosudarstvennyj komitet po standartizacii RB (2011) *Test-sistema Biolaktam dlja opredelenija beta-laktamaznoj aktivnosti biologicheskih substratov: TU BY 391353648.001-2011* [Biolactam test system for determination of beta-lactamase activity of biological substrates: TS BY 391353648.001-2011], Minsk, Gosudarstvennyj komitet po standartizacii RB.

Поступила/Received: 16.01.2020
Контакты/Contacts: zhyltsou@tut.by

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.029
УДК 616.314:599.323.4:577.118

Осочук С.С., Яковлева О.С.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Osochuk S., Yakovleva O.
Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Особенности минерализации костной ткани при сочетанном употреблении аторвастатина и оксипроизводного витамина D (α-кальцидола) (экспериментальное исследование)

Features of Bone Mineralization in Combined Use of Atorvastatin and α-Calcidol (Experimental Study)

Резюме

Введение. Известна способность статинов подавлять активность остеокластов и способствовать увеличению рентгенологической плотности костной ткани. При этом функциональная эффективность кальцификации оказывается неоднозначной, а характер взаимодействия витамина D и статинов применительно к их участию в минерализации костной ткани остается до конца не изученным. Результаты исследования позволяют прийти к предположению о том, что совместное введение статинов и 1(OH)D3 (α-кальцидола) способно не только замедлить вымывание Ca^{++} из костной ткани, но и увеличить ее кальцификацию, а также модифицировать остеогенез.

Цель. Изучение влияния длительного приема аторвастатина (ATV) в сочетании с 1-гидроксихолекальциферолом (α-кальцидолом – 1(OH)D3) на минеральный состав костной ткани челюсти лабораторных животных – крыс-самцов.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 120 лабораторных крысах-самцах, разделенных на 4 группы: интактные животные; животные, получавшие плацебо; группу крыс с внутрижелудочно вводимым аторвастатином в дозе 10 мг/кг массы тела и группу крыс-самцов с совместно вводимыми аторвастатином в дозе 10 мг/кг и α-кальцидолом в дозе 0,1 мг/кг. Испытуемые лекарственные средства (ЛС) вводились в течение 90 суток. Через сутки после последнего введения ЛС крысы декапитировались. Костная ткань очищалась от мышц и связочного аппарата и подвергалась рентгенологическому исследованию на аппарате X-Genus (Италия), сканирование снимков производилось с использованием Vista-Scan (Германия). Минеральный состав костной ткани определяли с использованием масс-спектрометра MARS 5 Digestion Microwave System компании CEM (США).

Результаты и обсуждение. Установлено, что совместное введение препаратов на 25,3% статистически значимо увеличило рентгенологическую плотность костной ткани челюсти по сравнению с монотерапией ATV, статистически значимо изменило соотношение ионов кальция, магния и меди, снизило на 23,1% содержание Mn^{++} и на 15,3% увеличило содержание Cu^{++}.

Выводы. В результате проведенной работы сделано заключение о потенцирующем действии α-кальцидола на минерализирующую активность аторвастатина, вероятно, за счет модификации процесса остеогенеза.

Ключевые слова: аторвастатин, α-кальцидол, рентгенологическая плотность, минеральный состав, челюсть крысы.

Abstract

Introduction. Statins are known to inhibit the activity of osteoclasts and to increase the radiological density of bone tissue. However, the functional efficiency of this calcification is not unique, and the nature of the interaction of vitamin D and statins in the mineralization of bone tissue remains unexplored. The results of the study suggest that the combined administration of statins and 1 (OH) D3 (α-calcidol) can not only slow down the removal of Ca++ from bone tissue, but also increase calcification and modify osteogenesis.
Purpose. To examine the effect of long-term administration of statins in combination with 1-hydroxycholecalciferol (α-calcidol-1 (OH) D3) on the mineral composition of bone tissue of the jaw of laboratory rats.
Materials and methods. The experiment was carried on 120 non-harmful laboratory male rats divided into 4 groups: 1 group – intact animals; 2 group – placebo animals (intragastric injection of 1% starch); 3 group – intragastric administration of atorvastatin (ATV) in a dose of 10 mg/kg of body weight; 4 group – administration of ATV in the dose of 10 mg/kg of body weight in conjunction with α-calcidol in the dose of 0.1 mcg/kg. Test drugs (PMs) were administered over 90 days. The removal of animals from the experiment was carried out by decapitation under anesthesia in the morning, the day after the last drug injection. Bone tissue was cleaned of muscles and ligamentous apparatus and subjected to X-ray examination on X-Genus apparatus (Italy), the images were scanned using Vista-Scan (Germany). The mineralized sample was studied on the mass spectrometer MARS 5 Digestion Microwave System of CEM company (USA). The content of the elements was calculated according to the calibration schedule of internal standards in organic ventures-ICPMS-71A (USA).
Results and discussion. It was found that co-administration of drugs statistically significantly increased the X-ray density of the jaw bone by 25.3%, if compared to ATV monotherapy, statistically significantly changed the ratio of calcium, magnesium and copper ions, decreased the Mn++ content by 23.1% and increased the content of Cu++ by 15.3%.
Conclusion. There was made the conclusion about the potentiating effect of α-calcidol on the mineralizing activity of ATV, probably due to modification of the osteogenesis process.
Keywords: atorvastatin, α-calcidol, X-ray density, mineral composition, rat jaw.

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительное количество публикаций, свидетельствующих о высокой эффективности медицинского применения статинов в качестве гиполипидемических средств, они не лишены ряда побочных метаболических проявлений, способных привести к серьезным осложнениям. Вероятность возникновения осложнений увеличивается при использовании высоких доз статинов [1]. Исследования последних лет показывают, что до 50% пациентов, принимающих статины, не достигают целевых значений содержания холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) из-за активации биосинтеза белка – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин 9 (PCSK9) [2]. В связи с этим нередко дозы статинов приходится увеличивать, что приводит к наиболее выраженным осложнениям. Особенно велики проявления побочных эффектов у пациентов с дефицитом витамина D [3]. К сожалению, механизмы

взаимодействия статинов и витамина D весьма мало изучены. В научной литературе опубликованы данные о способности статинов увеличивать рентгенологическую плотность костной ткани за счет ингибирования остеокластов, которое осуществляется посредством снижения активности пренелирования белков – регуляторов активности этих клеток [4], а также экспрессии гена, активирующего остеобласты [5]. Ряд авторов указывают на способность статинов увеличивать содержание $25(OH)D_3$ в крови [6, 7]. Учитывая способность статинов снижать продукцию тестостерона [8], активирующего почечную 1α-гидроксилазу, участвующего в преобразовании неактивного $25(OH)D_3$ в активный $1,25(OH)_2D_3$, можно заключить, что увеличение рентгенологической плотности костной ткани статинами не связано с витамином D. Поскольку избыточная минерализация костной ткани способна увеличивать ее хрупкость [9], можно предположить, что описанное в литературе увеличение кальцификации костной ткани статинами может носить неоднозначный характер, что подтверждается работами Wilkie и соавт. [10].

В связи с изложенным представляется важным оценить эффект совместного применения статинов и продукта 1α-гидроксилазы – 1α-гидроксихолекальциферола (α-кальцидола).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния длительного приема аторвастатина в сочетании с 1α-кальцидолом на рентгенологическую плотность и минеральный состав костной ткани челюсти лабораторных крыс.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен в течение 3 месяцев на 120 неимбредных крысах-самцах, разделенных на 4 группы: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные «placebo» (с внутрижелудочно вводимым 1% раствором крахмала); 3-я группа – животные с внутрижелудочно вводимым аторвастатином (ATV) в дозе 10 мг/кг массы тела – «аторвастатин» на 1% крахмале; 4-я группа – животные с внутрижелудочно вводимым ATV в дозе 10 мг/кг массы тела совместно с α-кальцидолом в дозе 0,1 мкг/кг – «ATV + D» на 1% крахмале. Группа «placebo» была введена в структуру эксперимента с целью исключения влияния стресса от внутрижелудочного введения зонда экспериментальным животным, на существование которого указывают отечественные и зарубежные исследователи [11–13].

Животные содержались в условиях вивария Витебского государственного медицинского университета на сбалансированном зерновом корме. Выведение животных из эксперимента осуществлялось декапитацией под эфирным наркозом в утренние часы, через сутки после последнего введения лекарственных средств.

Рентгенологическую плотность костной ткани (R) определяли на аппарате X-Genus (Италия), сканирование снимков выполняли на Vista-Scan (Германия). R рассчитывали с использованием программы SIDEXIS Sirona.

Минерализацию костной ткани осуществляли с использованием азотной кислоты (HNO_3) на приборе MARS 5 Digestion Microwave System компании CEM (США).

Минерализованный образец исследовали на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Varian 810-MS компании Bruker (США). Содержание элементов рассчитывали по калибровочному графику внутренних стандартов Inorganic ventures-ICPMS-71A (США).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета статистических программ STATISTICA 10RUS (лицензия № sta999K34156W), принадлежащего УО «ВГМУ». Полученные данные проверялись на нормальность распределения с помощью критериев Колмогорова – Смирнова и Хи-квадрат Пирсона. В связи с неправильным распределением и неравенством дисперсий исследуемых показателей был применен непараметрический критерий Манна – Уитни для независимых выборок [14].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка рентгенологической плотности костной ткани (R) в группе «placebo» (см. таблицу) не выявила ее статистически значимых отличий от таковой в группе интактных животных (p=0,326), что позволило объединить обе группы для дальнейшей статистической обработки полученных данных. Анализ действия ATV показал, что он увеличивал R костной ткани по сравнению с таковой животных контрольной группы (p=0,015). Совместное применение ATV и α-кальцидола статистически значимо увеличивало R костной ткани как по сравнению с животными контрольной группы, так и по сравнению с R у животных, получавших только ATV (p=0,000001 и 0,026 соответственно).

Влияние аторвастатина и α-кальцидола на рентгенологическую плотность и минеральный состав костной ткани челюсти крыс-самцов

Группы		**Контроль Me (Q^{25}; Q^{75})**	**Плацебо Me (Q^{25}; Q^{75})**	**Аторвастатин Me (Q^{25}; Q^{75})**	**ATV + D Me (Q^{25}; Q^{75})**
R		38,72 (33,87; 46,29)		47,84 (38,75; 56,95) (**)	59,97 (47,39; 70,88) (**) (***)
Mg, г/кг		4,15 (3,66; 4,4)	3,23 (3,14; 3,27)*	3,52 (3,29; 3,67)*(**)	3,8 (3,49; 4,04)
P, кг/кг		0,1 (0,1; 0,1)	0,1 (0,09; 0,1)	0,1 (0,1; 0,11) (**)	0,09 (0,08; 0,1)
Ca, кг/кг		173,59 (168,62; 180,59)	166,08 (155,28; 170,5)	184,54 (173,12; 200,35) (**)	181,72 (175,36; 189,47) (**)
Mn, мг/кг		0,13 (0,12; 0,17)	0,13 (0,12; 0,14)	0,13 (0,1; 0,14)	0,1 (0,09; 0,11) (**) (***)
Cu, мг/кг		0,16 (0,15; 0,18)	0,13 (0,12; 0,16)	0,13 (0,12; 0,15)*	0,15 (0,14; 0,19) (***)
Ca/P		17,61 (17,24; 18,04)	17,13 (16,75; 17,38)	17,44 (16,89; 18,4)	19,17 (17,45; 19,74) * (**)
Σ		177,36 (172,53; 184,56)	169,35 (158,44; 173,94)*	188,23 (174,05; 204,05) (**)	185,57 (178,82; 193,61) (**)
%	Mg	2,33 (2,09; 2,49)	1,89 (1,87; 2,01)*	1,82 (1,78; 1,9)* (**)	2,08 (1,95; 2,12)* (***)
	P	0,06 (0,05; 0,06)	0,06 (0,06; 0,06)*	0,06 (0,05; 0,06)	0,05 (0,05; 0,06) (**)
	Ca	97,61 (97,45; 97,86)	98,05 (97,93; 98,07)*	97,98 (97,9; 98,07)*	97,84 (97,81; 97,97) (***)
	Mn, 10^{-5}	0,66 (0,65; 0,88)	0,83 (0,76; 0,9)	0,63 (0,58; 0,75) (**)	0,55 (0,51; 0,63)* (**)
	Cu	9,2 (9,1; 9,44)	9,47 (9,22; 9,92)	8,76 (8,44; 9,24) (**)	9,34 (8,79; 10,15) (***)

Примечания: статистически значимо по сравнению с * – контролем, ** – плацебо, *** – ATV. R – рентгенологическая плотность кости, Σ – сумма минералов.

Сравнение суммы содержания минералов в костной ткани животных групп «placebo» и интактных животных показало, что процедура внутрижелудочного введения 1% раствора крахмала статистически значимо снижает общее содержание минералов (p=0,0411) за счет ионов Mg^{++} (p=0,011). Поскольку стресс способен стимулировать резорбцию костной ткани [15], можно сделать заключение о том, что выявленный эффект обусловлен стрессом внутрижелудочного введения зонда. Выявленные изменения влекут за собой изменение и процентного содержания минералов. Отмечено статистически значимое снижение процентного содержания Mg^{++} (p=0,011) и увеличение процентного содержания Ca^{++} и P (p=0,011 и 0,049 соответственно).

Известно, что ионы Mg^{++} являются облигатными кофакторами прежде всего ферментов синтеза и распада АТФ [16], а их содержание в клетке отражает ее метаболическую активность. Исходя из этого, можно заключить, что снижение содержания ионов Mg^{++} в костной ткани животных группы «placebo» свидетельствует об изменении ее энергетического баланса. Вместе с тем известно, что костная ткань является депо ионов Mg^{++}, которое обеспечивает сохранение его нормальной концентрации в крови даже при его 80% дефиците в организме [17]. Учитывая данную особенность, можно предположить, что снижение содержания ионов Mg^{++} в костной ткани отражает состояние его обмена не только в костной ткани, но и во всем организме. Учитывая, что стресс сопровождается высокими энергозатратами, а также повышенным выделением ионов магния из организма [18], можно заключить, что выявленные изменения являются следствием стресса внутрижелудочного введения зонда. Как указывалось выше, изменения процентного отношения Mg^{++}, Ca^{++} и P могут быть следствием снижения абсолютного содержания Mg^{++} и отражать изменения метаболического профиля, связанного с влиянием стресса внутрижелудочного введения зонда.

Таким образом, исходя из изложенного, можно заключить, что стресс внутрижелудочного введения зонда оказал негативное действие на минеральный состав костной ткани, уменьшив сумму минералов за счет снижения содержания ионов магния, что привело к дисбалансу процентного содержание ионов Mg^{++}, Ca^{++} и P.

Сравнение исследованных показателей у крыс группы «ATV» с таковыми у интактных животных показало сохранение статистически значимого снижения содержания ионов Mg^{++} (p=0,011), а также снижение содержания ионов Cu^{++} (p=0,036) в группе ATV. При этом процентное содержание ионов Mg^{++} было статистически значимо снижено (p=0,0005), а Ca^{++} – увеличено (p=0,0025). Таким образом, в группе животных, принимавших ATV, помимо имеющихся в группе «placebo» изменений содержания ионов Mg^{++} и процентного содержания ионов Ca^{++} определяются дополнительные изменения содержания ионов Cu^{++}. Учитывая совпадение изменений содержания Mg^{++} с таковыми в группе «placebo», можно заключить, что они обусловлены стрессорным фактором, изменение содержания ионов и Ca^{++} – введением ATV, а изменение содержания ионов Cu^{++} – совместным действием ATV и стресса.

Сравнение данных, полученных у животных группы «ATV» и «placebo», показало, что в группе «ATV» увеличение R обусловлено

ростом суммарного содержания минералов (p=0,006). При этом количество Mg^{++} статистически значимо увеличивалось (p=0,016), не достигая, однако, значений, характерных для интактных животных. Достоверно увеличивалось содержание Ca^{++} и P (p=0,006 и 0,04 соответственно), что послужило причиной статистически значимого снижения процентного содержания Mg^{++}, Mn^{++} и Cu^{++} (p=0,041, 0,01 и 0,04 соответственно). Отсутствие изменений содержания Cu^{++} по сравнению с группой «placebo» подтверждает сделанное ранее предположение о том, что рост содержания этого элемента по сравнению с интактными животными обусловлен совместным действием стресса и ATV. Поскольку ионы Cu^{++} необходимы для цитохромоксидаз митохондрий и лизилоксидаз соединительной ткани, формирующих водородные связи в коллагене [19], можно заключить, что совместное действие ATV и стресса на этот показатель было негативным. Изменения же содержания Ca^{++} и P свидетельствуют о минерализующей активности ATV, что в целом совпадает с литературными данными. Вместе с тем следует обратить внимание на то, что избыточная минерализация костной ткани способна привести к снижению ее прочности [9], в связи с чем рост активности минерализации костной ткани под влиянием ATV требует дальнейшего изучения для заключения о позитивном или негативном характере его влияния на данный параметр.

Таким образом, можно заключить, что ATV оказал позитивное действие на содержание ионов Mg^{++}, увеличивая его содержание по сравнению с группой «placebo». Совместное действие стресса внутрижелудочного введения и ATV на ионы Cu^{++} расценивается как негативное. Выявленное увеличение рентгенологической плотности костной ткани обусловлено способностью ATV увеличивать содержание Ca^{++} и P и носит неоднозначный характер.

Совместное применение ATV и α-кальцидола статистически значимо увеличивало R как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой «ATV», что позволяет сделать заключение о способности α-кальцидола потенцировать рост R, вызванный введением ATV. Вместе с тем значительных изменений в содержании макроэлементов (Ca^{++} и P) не выявлено, что говорит о непричастности изменения концентрации этих элементов к росту R. Вероятно, рост R связан с метаболическими изменениями и формированием костных структур, отличающихся от таковых при введении ATV. Такая точка зрения подтверждается анализом изменений микроэлементов. Так, процентное содержание Mg^{++} по сравнению с его изменениями у животных, получавших ATV, увеличивалось (p=0,0007), оставаясь, однако, сниженным по отношению к его уровню у интактных животных (p=0,045). Отмечен статистически значимый рост соотношения Ca/P как по сравнению с интактными животными, так животными группы «placebo» (p=0,045 и 0,0001 соответственно), не выявлявшийся при применении ATV (что было обусловлено ростом содержания ионов Ca^{++} по сравнению с группой «placebo» (p=0,0048)). Учитывая, что содержание Ca^{++} не отличалось от такового в группе ATV, можно заключить, что его увеличение обусловлено в большей степени действием ATV. А изменение соотношения является следствием влияния α-кальцидола на метаболизм Ca^{++} и P. Изменение соотношения

Ca/P сопровождалось снижением % содержания P по сравнению с его уровнем в группе «placebo» (p=0,0019). Поскольку отношение Ca/P приближалось к его оптимальным для гидроксиапатита значениям (2,15) [20] по сравнению с таковым в контрольной группе животных и в группе «placebo», можно заключить, что выявленные совместные эффекты были позитивными.

Сравнение показателей минерального состава кости в группе животных, получавших ATV и ATV совместно с α-кальцидолом, выявило статистически значимое снижение содержания ионов Mn^{++} и увеличение до уровня интактных животных содержания ионов Cu^{++} (p=0,011 и 0,019 соответственно). Выявленные изменения содержания ионов повлекли за собой и изменение процентного соотношения Mg^{++}, Ca^{++} и Cu^{++}, снижая процентное содержание Ca^{++} и увеличивая – Mg^{++} и Cu^{++} (p=0,016, 0,0017 и 0,048 соответственно). Учитывая, что ионы Cu^{++} необходимы для цитохромоксидаз митохондрий и лизилоксидаз соединительной ткани, формирующих водородные связи в коллагене [19], можно заключить, что совместное действие ATV и α-кальцидола на данный показатель было позитивным. Поскольку ионы Mn^{++} используются для формирования металлопротеинов – таких как аргиназа, пируваткарбоксилаза, супероксиддисмутаза [9], снижение их содержания может носить негативный характер для работы вышеуказанных ферментов. Изменения процентного содержания указанных ионов, вероятнее всего, были обусловлены изменениями абсолютного содержания ионов и не могут быть интерпретированы как негативные или позитивные без дополнительных исследований.

■ ВЫВОДЫ

1. Стрессирование животных внутрижелудочным введением 1% раствора крахмала (10 г/л) через металлический зонд животным группы «placebo» снижает сумму минералов костной ткани с 177,36 до 169,35 единиц за счет снижения содержания Mg^{++} с 4,15 до 3,23 г/кг, что может свидетельствовать о негативном влиянии на энергетический обмен костной ткани.
2. Введение аторвастатина увеличивает рентгенологическую плотность костной ткани с 38,72 до 47,84 единиц за счет роста суммы всех минералов с 37,72 до 47,84 единиц, содержания Ca^{++} со 166,08 до 184,54 кг/кг и снижения негативного действия стресса внутрижелудочного введения зонда на содержание Mg^{++} посредством увеличения его содержания с 3,23 (placebo) до 3,52 г/кг (ATV). Совместное действие стресса внутрижелудочного введения зонда и ATV снижает содержание Cu^{++} в костной ткани с 0,16 до 0,13 мг/кг.
3. Совместное применение ATV и α-кальцидола увеличивает рентгенологическую плотность костной ткани челюсти по сравнению с таковой у животных группы контроля (с 38,72 до 59,97 единиц) и животных, получавших только ATV (с 47,84 до 59,97 единиц), что, вероятнее всего, не связано с увеличением содержания Ca^{++} индуцированным ATV, а обусловлено изменением метаболизма Ca^{++} и P под влиянием α-кальцидола, приближающего соотношение Ca^{++} и P к оптимальным для гидроксиапатита. Совместное применение ATV и α-кальцидола оказало позитивное влияние на содержание

ионов Cu^{++}, увеличив его содержание с 0,13 (ATV) до 0,15 мг/кг (ATV и α-кальцидол). Отмечается негативное действие на содержание ионов Mn^{++}, заключающееся в снижении его содержания с 0,13 до 0,1 мг/кг.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Van Staa T.P., Carr D.F., O'Meara H. (2014) Predictors and outcomes of increases in creatine phosphokinase concentrations or rhabdomyolysis risk during statin treatment. *Br J Clin Pharmacol.*, 78, pp. 649–59.
2. Benimeckaya K., Atyukov P., Astrakov S., Ragino YU. (2017) Novye vozmozhnosti gipolipidemicheskoj terapii [New possibilities of hypolipidemic therapy]. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie,* 4, pp. 65–81.
3. Michalska-Kasiczak M., Sahebkar A., Mikhailidis D.P. (2015) Analysis of vitamin D levels in patients with and without statin-associated myalgia a systematic review and meta-analysis of 7 studies with 2420 patients. *Int J Cardiol.*, 178, pp. 111–16.
4. SHvarc G. (2003) Molekulyarno-biologicheskie osnovy sozdaniya novyh lekarstvennyh sredstv dlya lecheniya osteporoza: II Statiny i formirovanie kosti [Molecular-biological base of creation of new medicines for treatment of osteoporosis: II statins and formation of bone]. *Osteoporoz i osteopatii,* 3, pp. 17–20.
5. Garrett I.R. (2001) Statins and bone formation. *Cur. Pharm. Design.,* 7, pp. 715–36.
6. Holick M.F. (2012) The statin D-lemma. *Dermatoendocrinol.,* 4 (1), pp. 10–11.
7. Sathyapalan, T., Shepherd J., Arnett C., Coady A.M., Kilpatrick E.S., Atkin S.L. (2010) Atorvastatin increases 25-hydroxy vitamin D concentrations in patients with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem.*, 56 (11), pp. 1696–700.
8. Buyanova S., Osochuk S. (2014) Vliyanie statinov na gormonal'nyj spektr krovi i soderzhanie holesterola v nadpochechnikah belyh laboratornyh krys [Influence of statins on hormonal spectrum of blood and cholesterol content in adrenal glands of white laboratory rats]. *Vestnik VGMU,* 1 (11), pp. 36–41.
9. Walker B., Colledge N.R., Ralston S., Penman I. (2014) *Davidson's Principles and Practice of Medicine.* E-Book Churchill Livengstone, Elsiver.
10. Wilkie D., Bowman D., Liga A., Bagi C. M., Miller S.C., Ranges G.E., Carley W. (2000) Cerivastatinin creases cortical bone formation in OVX rats. *J. Bone Miner. Res.*, 1 (15), pp. 549–54.
11. Karkishchenko N., Grachev S. (eds.) (2010) *Al'ternativy biomediciny Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih tekhnologiyah* [Alternatives of biomedicine. Guide on laboratory animals and alternative models in biomedical technologies]. Moscow.
12. Mary K. Walker, Jason R. Boberg, Mary T. Walsh. (2012) A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology,* 260, pp. 65–69.
13. Jonatan P. Balcombe, Neal D. Barnard, Chad Sadusky (2004) Laboratory routines cause animal stress. *Contemporary Topics,* 43 (6), pp. 42–51.
14. Borovikov V. (2003) *Iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere. Dlya professionalov* [The art of computer data analysis. For professionals]. Spb.: Piter, 688 p.
15. Ivanov D., Aleksandrovskaya N. (2018) Vliyanie social'noj izolyacii na stressoustojchivost' i rezorbciyu kostnoj tkani krys pri termicheskom stresse [Influence of social isolation on stress resistance and bone resorption in rats in thermal stress]. *Biomedicina,* 1, pp. 71–83.
16. Kol'tovep V., Labynceva P., Kapandashev V., Koctepin C. (2016) Magnitnyj izotop magniya uskoryaet reakciyu gidroliza ATF miozinom [Magnetic isotope of magnesium accelerates hydrolysis of ATF with myosin]. *BIOFIZIKA,* 61 (2), pp. 239–246.
17. Dzhunusbekova G., Kuanova L. (2017) Rasprostranennost' deficita magniya u pacientov s kardiologicheskimi i nevrologicheskimi zabolevaniyami v Respublike Kazahstan [Prevalence of magnesium deficiency in patients with cardiological and neurological diseases in the Republic of Kazakhstan]. *Medicine (Almaty),* 8 (182), pp. 22–32.
18. Tarasov E., Blinov D., Zimovina U., Sandakova E. (2015) Deficit magniya i stress: voprosy vzaimosvyazi, testy dlya diagnostiki i podhody k terapii [Magnesium deficiency and stress: issues of interconnection, tests for diagnostics, and approaches to therapy]. *Terapevticheskij Arhiv,* 9, pp. 114–122.
19. Rodionova L. (2005) Fiziologicheskaya rol' makro i mikroelementov [Physiological role of macroelements and microelements]. *Byulleten' VSNC SO RAMN,* 6 (44), pp. 195–9.
20. Talashova I., Silant'eva T. (2007) Laboratornoe vydelenie kal'cijfosfatnyh soedinenij iz kostnoj tkani krupnogo rogatogo skota i opredelenie ih sostava metodom elektronno-zondovogo mikroanaliza [Laboratory isolation of calcium phosphate compounds from bone tissue of cattle and determination of their composition with the method of electron probe microanalysis]. *Genij Ortopedii,* 4, pp. 71–5.

Поступила/Received: 18.10.2019
Контакты/Contacts: olga.lobkova88@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.030
УДК 616.995.1:611-013.11:616.697]-078.73

Воронцова Л.Л., Кенийз С.А., Коваленко В.А.
Запорожская медицинская академия последипломного образования, Запорожье, Украина

Vorontsova L., Keniyz S., Kovalenko V.
Zaporizhzhya Medical Academy of Postgraduate Education, Zaporizhzhya, Ukraine

Особенности клеточных факторов иммунитета у мужчин с нарушением репродуктивной функции при наличии токсокарозной инвазии

Peculiarities of Cellular Factors of Immunity in Men with Disorder of Reproductive Function in the Presence of Toxocariasis Invasion

Резюме

Цель. Выявить особенности клеточных факторов врожденного и приобретенного иммунитета у мужчин с нарушением фертильности на фоне токсокарозной инвазии.

Материалы и методы. Обследовано 77 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет, которые были разделены на 5 групп. Первую (контрольную) группу составили 20 фертильных мужчин; вторую группу (группу сравнения) – 27 инфертильных пациентов с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и с отсутствием антител к токсокарам; третью группу – 20 инфертильных мужчин с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам; четвертую группу – 15 инфертильных мужчин с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам; пятую группу – 15 инфертильных пациентов с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и с отсутствием антител к токсокарам. Всем мужчинам было проведено комплексное исследование, включающее определение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, наличия токсокарозной инвазии, а также оценку клеточных факторов врожденного и приобретенного звена иммунной системы.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования установлено, что у мужчин с наличием токсокарозной инвазии определяется незавершенность фагоцитоза как нейтрофильного, так и моноцитарного его звеньев с изменениями формулы расстройств иммунной системы – от недостаточности до активации 2-й степени, на фоне истощения функционально-метаболического резерва, тогда как у мужчин без наличия токсокарозной инвазии также отмечалась незавершенность фагоцитоза обоих звеньев, но с изменениями формулы расстройств иммунной системы, проявляющихся недостаточностью 2–3-й степени на фоне сохранения функционально-метаболического резерва.

К тому же у инфертильных мужчин наблюдались разнонаправленные изменения и в клеточном звене специфического иммунитета в зависимости от уровня антител IgG к антигенам токсокар: от гиперреактивности к иммунодепрессии. Установлено, что на количество фрагментированных сперматозоидов влияет как состояние иммунной системы, так и проживание мужчин с нарушением репродуктивной функции в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Заключение. Инфертильным мужчинам, проживающим на территории г. Запорожья и области свойственны нарушения иммунного статуса, а заражение токсокарозом дополнительно вносит определенные изменения в состояние иммунной системы, а именно в клеточное его звено.

Ключевые слова: мужское бесплодие, клеточные факторы иммунитета, токсокароз.

Abstract

Purpose. To reveal the peculiarities of cellular factors of innate and acquired immunity in men with impaired fertility on the background of toxocariasis.
Materials and methods. For this purpose, 77 men at the age from 20 to 45 years, who were divided into 5 groups, were examined. The first (control) group consisted of 20 fertile men; the second group (comparison group) – 27 infertile patients with a normal level of fragmentation of sperm DNA and the lack of antibodies to toxocariasis; the third group included 20 infertile men with a normal level of fragmentation of sperm DNA and the presence of antibodies to toxocariasis; the fourth group included 15 infertile men with a high level of fragmentation of sperm DNA and the presence of antibodies to toxocariasis; the fifth group included 15 infertile patients with a high level of fragmentation of sperm DNA and the lack of antibodies to toxocariasis. All men underwent a comprehensive study, including determination of the level of fragmentation of sperm DNA, the presence of toxocariasis invasion, as well as evaluation of the cellular factors of innate and acquired link of the immune system.
Results and discussion. As a result of the study, it was found that in men with the presence of toxocariasis, there takes place incompleteness of phagocytosis of both neutrophilic and monocytic links with changes of the formula of the immune system disorders – from insufficiency to activation of the 2nd degree, on the background of depletion of the functional-metabolic reserve; while in men without the presence of toxocariasis, there was also observed incompleteness of phagocytosis of both links, but with changes of the formula of the immune system disorders, manifested by insufficiency of 2–3 degrees while maintaining a functional-metabolic reserve.
We also observed multidirectional changes in the cellular link of specific immunity, depending on the level of IgG antibodies to toxocariasis antigens, from hyperreactivity to immunosuppression in infertile men. It was revealed that the number of fragmented spermatozoa is affected both by the state of the immune system and by the residence of men with a violation of reproductive function in adverse environmental conditions.
Conclusion. Infertile men that live in the territory of Zaporizhzhya and the region are characterized by violations of the immune status. Toxocariasis invasion makes certain changes in the state of the immune system, namely, in the cellular link.
Keywords: male infertility, cellular factors of immunity, toxocariasis.

■ ВВЕДЕНИЕ

Успешное лечение мужского бесплодия является чрезвычайно важным как для социума в целом, так и для счастливой жизни конкретной семьи, поскольку в не менее чем 50% случаев причиной бесплодного брака является мужской фактор. По данным разных авторов, несмотря на интенсивное развитие андрологии и репродуктологии, от 30 до 75% случаев мужского бесплодия не имеют установленной причины, то есть являются идиопатическими [1].

В последнее время снижение фертильности у мужчин связывают с распространением негативного воздействия различных факторов окружающей среды (экологических, социально-экономических, инфекционных), оказывающих влияние на организменном, клеточном и молекулярном уровнях и могущих приводить к патозооспермии [2–5]. К числу факторов, способных вызвать нарушение репродуктивной функции у мужчин, относится токсокароз – один из самых распространенных

гельминтозов, заболеваемость которым стала серьезной медико-социальной проблемой для многих стран, включая Украину. В Украине, по данным официальной статистики, ежегодно регистрируют 150–300 случаев токсокароза [6].

Токсокароз как длительно текущая инвазия, безусловно, влияет на иммунную систему хозяина, а именно на клетки иммунитета как наиболее важного звена иммунной системы, конституционно предназначенного для элиминации клеток, несущих признаки генетической чужеродности, к которым можно отнести личинки токсокар [7].

Результатами многочисленных исследований доказано, что токсокароз вызывает иммунологические и иммунопатологические реакции [7, 8], обусловленные степенью взаимной адаптации паразита и хозяина [9]. Однако неизвестно, когда именно адекватный физиологический ответ становится иммунопатологическим, что является причиной тяжелых изменений [10], в каких звеньях иммунной системы могут возникать изменения, как нарушаются нормальные соотношения клеточных субпопуляций.

Долгое время мужской репродуктивный тракт и иммунную систему изучали отдельно как не связанные между собой. Однако установлено, что иммунная система играет важную роль в репродукции человека и изменение иммунного гомеостаза может нарушить нормальный репродуктивный процесс и вызвать бесплодие [11, 12]. Тем не менее конкретных данных о механизмах влияния паразитарной инвазии как на иммунную систему, так и на репродуктивный потенциал в доступной нам литературе мы не встретили.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить особенности клеточных факторов врожденного и приобретенного иммунитета у мужчин с нарушением фертильности на фоне токсокарозной инвазии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было обследовано 97 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет, которые дали информированное письменное согласие на участие в исследовании, одобренном комитетом по биоэтике ГЗ «ЗМАПО МЗ Украины», в соответствии с этическими и морально-правовыми требованиями приказа Министерства здравоохранения Украины № 281 от 01.11.2000 г.

Пациенты были разделены на пять групп. Первую (контрольную) группу составили 20 фертильных, практически здоровых мужчин, которые прошли обследование как доноры банка спермы (согласно приказу № 787 от 09.09.2013 г.). Во вторую группу (сравнения) вошли 27 инфертильных пациентов с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и с отсутствием антител к токсокарам. Третью группу составили 20 инфертильных мужчин с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам. В четвертую и пятую группы вошли по 15 инфертильных мужчин с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием/отсутствием антител к токсокарам соответственно.

Всем мужчинам было проведено комплексное исследование, включавшее определение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, наличия токсокарозной инвазии и изучение состояния клеточных факторов врожденного и приобретенного иммунитета.

Фрагментацию ДНК сперматозоидов проводили методом Sperm Chromatin Dispertion test (патент РФ № 2373288). За нормальные значения принимали встречаемость таких сперматозоидов в количестве до 30% из числа подсчитанных 500 сперматозоидов.

Наличие токсокарозной инвазии устанавливали путем выявления в сыворотке крови количества антител иммуноглобулинов G (IgG) к антигенам токсокар иммуноферментным методом с помощью анализатора фотометрического Immunochem-2100 (HTI, США) и с использованием набора реактивов «Витротест» (Украина); для каждой исследуемой пробы рассчитывали индекс позитивности по отношению оптической плотности исследуемого образца к предельному значению отрицательного контроля. Результат считали положительным при значениях >1,1.

Для исследования клеточных факторов врожденного иммунитета было проведено определение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов крови, основанное на использовании метода определения поглощающей и переваривающей их способности по отношению к микробной тест-культуре после совместной преинкубации (по Н. Фримелю) [13].

Определение кислородозависимого метаболизма нейтрофилов (НСТ-тест) и функционального резерва клеток (стимулированный НСТ-тест) проводили по М.Е. Виксману, А.Н. Маянскому [14]. Исследование активности миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов осуществляли цитохимически по модифицированному методу Р.П. Нарциссова [15].

Определение содержания катионных белков (КБ) в нейтрофилах проводили с помощью метода с бромфеноловым синим по М.Г. Шубичу [16].

Степень иммунных расстройств рассчитывали по универсальной формуле расстройств иммунной системы (ФРИС), предложенной А.М. Земсковым и др. [17]:

(Показатель больного / нормальный показатель – 1) × 100%.

Если рассчитанная величина имеет знак «минус», у пациента определяется иммунная недостаточность (-1, -2, -3), если «плюс» – гиперфункция иммунной системы (1, 2, 3). Если полученная величина «лежит» в интервале 1–33%, то это оценивается как первая ступень иммунных расстройств (1); диапазон колебаний от 34 до 66% соответствует второй степени (-2), а превышающий 66% – третьей (3).

Исследование показателей специфического звена иммунной системы (субпопуляционного состава лимфоцитов) проводили методом фенотипирования с использованием моноклональных антител к антигенам производства НПО «Гранум» (г. Харьков). Принцип метода основан на определении субпопуляций Т- и В-лимфоцитов с помощью реакций розеткообразования с эритроцитами, на которых адсорбированы моноклональные антитела к рецепторам CD_3^+ (Т-лимфоциты), CD_4^+ (Т-хелперы), CD_8^+ (Т-супрессоры / цитотоксические лимфоциты), CD_{16}^+ (NK-клетки), CD_{22}^+ (В-лимфоциты).

С помощью светового микроскопа проводили подсчет процента лимфоцитов в окрашенных мазках, которые образовали розетки (связали не менее 3 эритроцитов) с CD-диагностикумами на 200 лимфоцитов.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием компьютерных программ пакета Statistica (StatSoft Statistica v. 7.0). Статистическую значимость сравниваемых показателей с распределением, отличным от нормального (что определялось по критерию согласия Колмогорова – Смирнова), устанавливали с использованием критерия серий Вальда – Вольфовица (Wald – Wolfowitz runs test) при уровне значимости 0,05. Полученные данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (RQ) – разница между значениями 75-го и 25-го процентилей (RQ = 75% UQ – 25% LQ), где UQ – верхний квартиль; LQ – нижний квартиль.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования системы фагоцитоза у пациентов второй группы было выявлено снижение поглощающей функции нейтрофилов (ФИН) на 30 и 120 мин. на 25 и 29% соответственно, в то же время переваривающая способность нейтрофилов (ФЧН) также была снижена как на 30 мин. на 32%, так и на 120 мин. на 54% относительно показателей контрольной группы (табл. 1).

При исследовании моноцитарного звена наблюдалось снижение поглощающей функции на 30 мин. и увеличение на 120 мин. на 19 и 25% соответственно. Переваривающая способность была снижена как на 30 мин., так и на 120 мин. на 35 и 60% относительно показателей контрольной группы соответственно.

Показатели НСТ-теста (спонтанного) были снижены на 19%, тогда как стимулированного теста отвечали значениям контрольной группы.

При исследовании показателей микробицидной системы КБ были снижены на 20%, тогда как показатели МПО – увеличены на 9%, что является статистически не достоверным, но клинически значимым.

У пациентов третьей группы наблюдалось снижение как поглощающей способности нейтрофилов на 30 и на 120 мин. на 43 и 33%, так и переваривающей – на 32 и 54% относительно группы контроля. При исследовании моноцитарного звена наблюдалось снижение поглощающей функции на 30 мин. на 13% и увеличение на 120 мин. на 70%, тогда как переваривающая способность была снижена на 30 и 50% относительно группы контроля соответственно.

Показатели НСТ-теста (спонтанного и стимулированного) были снижены на 29 и 10% относительно группы контроля соответственно.

Содержание КБ снижалось на 22%, в то время как МПО увеличивалось на 27% относительно группы контроля.

У пациентов четвертой группы наблюдалось снижение на 30 и 120 мин. как поглощающей способности нейтрофилов, так и переваривающей их функции на 43 и 31%, 32 и 50% относительно контрольной группы. У моноцитов наблюдалось снижение поглощающей способности на 30 мин. на 13% и увеличение на 120 мин. на 50% относительно контрольной группы и снижение переваривающей способности на 30 и 120 мин. на 25 и 57% относительно контрольной группы соответственно.

Таблица 1
Состояние функционально-метаболического статуса нейтрофилов и моноцитов у фертильных и инфертильных мужчин, Me (75%Q – 25%Q = RQ)

Table 1
Functional and metabolic status of neutrophils and monocytes in fertile and infertile men, Me (75%Q – 25%Q = RQ)

Показатель / Index	1-я группа (n=12) / 1 group (n=12)	2-я группа (n=27) / 2 group (n=27)	3-я группа (n=20) / 3 group (n=20)	4-я группа (n=15) / 4 group (n=15)	5-я группа (n=15) / 5 group (n=15)
ФИН на 30 мин., % / NPI at 30 min, %	66,5 (68,0 – 66,0 = 2,0)	50,0* (54,0 – 38,0 = 16,0)	38,0* (53,0 – 35,0 = 18,0)	38,0* (48,0 – 38,0 = 10,0)	45,0* (58,0 – 38,0 = 20,0)
ФЧН на 30 мин., усл. ед. / NPN at 30 min, c. u	2,2 (2,3 – 2,1 = 0,2)	1,5* (1,8 – 1,3 = 0,5)	1,5* (1,7 – 1,4 = 0,3)	1,5* (1,7 – 1,4 = 0,3)	1,4* (1,5 – 1,3 = 0,2)
ФИН на 120 мин., % / NPI at 120 min, %	56,0 (57,0 – 55,0 = 2,0)	40,0* (50,0 – 33,0 = 17,0)	38,0* (50,0 – 25,0 = 25,0)	39,0* (50,0 – 30,0 = 12,0)	42,0* (52,0 – 30,0 = 22,0)
ФЧН на 120 мин., усл. ед. / NPN at 120 min, c. u	3,0 (3,1 – 2,9 = 0,2)	1,4* (1,7 – 1,2 = 0,5)	1,4* (1,8 – 1,2 = 0,6)	1,5* (1,7 – 1,4 = 0,3)	1,3* (1,5 – 1,0 = 0,5)
ФИМ на 30 мин., % / MPI at 30 min, %	34,5 (36,5 – 33,0 = 3,5)	28,0 (30,0 – 25,0 = 5,0)	30,0* (44,0 – 25,0 = 19,0)	30,0 (34,0 – 25,0 = 9,0)	27,0* (28,0 – 24,0 = 4,0)
ФЧМ на 30 мин., усл. ед. / MPN at 30 min, c. u.	2,0 (2,2 – 1,9 = 0,3)	1,3* (1,5 – 1,2 = 0,3)	1,4* (1,5 – 1,3 = 0,2)	1,5* (1,8 – 1,4 = 0,4)	1,3* (1,5 – 1,2 = 0,3)
ФИМ на 120 мин., % / MPI at 120 min, %	20,0 (21,5 – 19,0 = 2,5)	25,0* (30,0 – 20,0 = 10,0)	34 (40 – 20 = 20,0)	30,0 (31,0 – 22,0 = 9,0)	20,0 (25,0 – 20,0 = 5,0)
ФЧМ на 120 мин., усл. ед. / MPN at 120 min. c. u.	3 (3,2 – 2,8 = 0,4)	1,2* (1,5 – 1,1 = 0,4)	1,5* (1,7 – 1,4 = 0,3)	1,3* (1,7 – 1,2 = 0,5)	1,1*,** (1,3 – 1,0 = 0,3)
НСТсп, усл. ед. / NBTsp. c. u.	2,1 (2,2 – 1,9 = 0,3)	1,7* (1,8 – 1,3 = 0,5)	1,5 (2,0 – 1,5 = 0,5)	1,7* (1,7 – 1,4 = 0,3)	1,9 (2,0 – 1,7 = 0,3)
НСТст, усл. ед. / NBTst. c. u.	2,0 (2,2 – 1,9 = 0,3)	2,0 (2,0 – 1,8 = 0,2)	1,8 (2,0 – 1,3 = 0,7)	1,7** (2,0 – 1,5 = 0,5)	2,0 (2,3 – 1,9 = 0,4)
КБ, усл. ед. / CP, c. u.	2,3 (2,3 – 2,2 = 0,1)	1,6* (1,8 – 1,5 = 0,3)	1,8* (1,9 – 1,6 = 0,3)	2,0* (2,0 – 1,5 = 1,6)	1,5* (1,9 – 1,2 = 0,7)
МПО, усл. ед. / MPO, c. u.	2,2 (2,3 – 2,1 = 0,2)	2,4 (2,7 – 2,1 = 0,6)	2,8* (2,8 – 1,6 = 1,2)	2,3 (2,6 – 2,1 = 0,5)	2,3 (2,8 – 2,0 = 0,8)

Примечания: * P<0,05 по отношению к контрольной группе; ** P<0,05 по отношению к группе сравнения.
Notes: * statistically valuable differences (p<0,05) in relation to the control group; ** statistically valuable differences (p< 0,05) in relation to the comparison group.

Показатели НСТ-теста (спонтанного и стимулированного) были снижены на 19 и 15% относительно контрольной группы соответственно.

Содержание КБ снижалось на 13% относительно контрольной группы, а значение МПО практически соответствовало контролю.

У пациентов пятой группы наблюдалось снижение поглощающей и переваривающей способности нейтрофилов на 30 и 120 мин. на 33 и 25%, и 36 и 57% относительно контрольной группы соответственно. Поглощающая способность моноцитов снижалась на 30 мин. на 22% относительно контрольной группы, тогда как на 120 мин. соответствовала их значению. Переваривающая способность моноцитов была снижена на 30 и 120 мин. на 35 и 64% относительно контрольной группы соответственно.

Показатели НСТ-теста спонтанного были пониженными на 9%, тогда как стимулированного теста отвечали значениям контрольной группы.

Содержание КБ было снижено на 35% относительно контрольной группы, а МПО практически соответствовало контролю.

Результаты проведенных исследований показали, что незавершенность фагоцитоза нейтрофильного и моноцитарного звеньев наблюдалась во всех исследуемых группах (2–5-й группах) с сохранением функционально-метаболического резерва во второй и пятой группах и истощением его в третьей и четвертой.

Исходя из полученных данных представлялось важным определить степень иммунологических расстройств у пациентов с нарушениями репродуктивной функции на фоне токсокарозной инвазии. Определение степени расстройств неспецифической иммунной системы дало возможность установить наиболее иммунологически компрометированные звенья фагоцитоза.

Для второй группы ФРИС нейтрофильного звена имеет вид: $ФИН_{30}^{-1}$ $ФЧН_{30}^{-2}$ $ФИН_{120}^{-1}$ $ФЧН_{120}^{-2}$ $НСТсп^{-1}$ (что характерно для недостаточности 1–2-й степени), для моноцитарного звена: $ФИМ_{30}^{-1}$ $ФЧМ_{30}^{-2}$ $ФИМ_{120}^{+1}$ $ФЧМ_{120}^{-3}$ (что характерно для недостаточности 1–3-й степени).

Для третьей группы формула нейтрофильного звена имеет вид: $ФИН_{30}^{-2}$ $ФЧН_{30}^{-2}$ $ФИН_{120}^{-2}$ $ФЧН_{120}^{-2}$ $НСТсп^{-1}$ $НСТст^{-1}$ (что характерно для недостаточности 1–2-й степени), для моноцитарного звена – $ФИМ_{30}^{-1}$ $ФЧМ_{30}^{-1}$ $ФИМ_{120}^{+2}$ $ФЧМ_{120}^{-2}$ (характеризующая изменения от недостаточности до активации 2-й степени).

Для четвертой группы формула нейтрофильного звена имеет вид: $ФИН_{30}^{-2}$ $ФЧН_{30}^{-2}$ $ФИН_{120}^{-2}$ $ФЧН_{120}^{-2}$ $НСТсп^{-1}$ $НСТст^{-1}$ (что характерно для недостаточности 1–2-й степени), для моноцитарного звена – $ФИМ_{30}^{-1}$ $ФЧМ_{30}^{-1}$ $ФИМ_{120}^{+2}$ $ФЧМ_{120}^{-2}$ (характеризующая изменения от недостаточности до активации 2-й степени).

Для пятой группы формула нейтрофильного звена имеет вид – $ФИН_{30}^{-2}$ $ФЧН_{30}^{-2}$ $ФИН_{120}^{-1}$ $ФЧН_{120}^{-2}$ $НСТсп^{-1}$ (что характерно для недостаточности 1–2-й степени), для моноцитарного звена – $ФИМ_{30}^{-1}$ $ФЧМ_{30}^{-2}$ $ФЧМ_{120}^{-3}$ (что характерно для недостаточности 2–3-й степени).

Таким образом, судя по результатам оценки степени расстройств иммунной системы у представителей всех исследуемых групп, можно сделать вывод, что наиболее иммунологически компрометированными являются вторая и пятая группы (без наличия токсокарозной инвазии), в которых наблюдалась недостаточность 2–3-й степени.

В третьей и четвертой группах определялись изменения ФРИС от активации до недостаточности 2-й степени (за счет роста поглощающей функции моноцитов), что, возможно, обусловлено наличием токсокарозной инвазии, которая, в свою очередь, очевидно, и вызывает активацию именно моноцитарного звена. Учитывая, что в основном атака клеток паразита осуществляется с помощью антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, в роли эффекторных клеток выступают именно макрофаги, которые за счет фагоцитоза и продукции определенных цитокинов способствуют быстрому изгнанию поврежденного иммунной реакцией гельминта.

В результате изучения Т-клеточного звена иммунной системы у мужчин группы сравнения (2-я группа) установлено, что концентрация общего количества Т-лимфоцитов с фенотипом CD_3^+ практически отвечала значениям контрольной группы, тогда как уровень Т-лимфоцитов с хелперной (CD_4^+) и Т-лимфоцитов с супрессорной/цитотоксической функциями (CD_8^+) изменялся разнонаправленно – повышался на 35% и снижался на 17% в сравнении с контрольной группой. Иммунорегуляторный индекс был повышен на 40%. Содержание NK-клеток (CD_{16}^+), В-лимфоцитов с фенотипом (CD_{22}^+) было повышено на 66% и 36% относительно группы контроля (табл. 2).

Таким образом, у мужчин группы сравнения наблюдались дисбаланс показателей иммунной системы, сохранение общего количества лимфоцитов, активация NK-клеток и В-лимфоцитов, возможно свидетельствующие о наличии проявлений хронической инфекции, вероятно, грибковой природы.

Таблица 2
Состояние клеточного звена специфического иммунитета у мужчин с нарушениями фертильности на фоне токсокарозной инвазии Me (75% Q – 25% Q = RQ)

Table 2
The state of the cellular link of specific immunity in men with impaired fertility on the background of toxocariasis, Me (75% Q – 25% Q = RQ)

Показатель / Index	1-я группа (n=12) / 1 group (n=12)	2-я группа (n=27) / 2 group (n=27)	3-я группа (n=20) / 3 group (n=20)	4-я группа (n=15) / 4 group (n=15)	5-я группа (n=15) / 5 group (n=15)
CD_3^+, % / CD_3^+, %	66 (68 – 62 = 6)	66 (83 – 44 = 39)	83*, ** (89 – 52 = 37)	69 (75 – 67 = 8)	44*, ** (56 – 40 = 16)
CD_4^+, % / CD_4^+, %	38,5 (39 – 38 = 1)	52* (62 – 40 = 22)	60* (68 – 39 = 29)	48* (54 – 25 = 29)	40** (48 – 28 = 20)
CD_8^+, % / CD_8^+, %	31,5 (32 – 30,5 = 1,5)	26* (33 – 20 = 13)	35** (48 – 19 = 29)	32 (41 – 21 = 20)	23 (27 – 12 = 15)
CD_4^+/CD_8^+, усл. ед. / CD_4^+/CD_8^+, с.u.	1,21 (1,23 – 1,2 = 0,03)	1,7* (2,7 – 1,3 = 1,4)	1,7* (2,1 – 0,8 = 1,3)	1,5 (1,8 – 1,1 = 0,7)	1,7 (2,8 – 1,1 = 1,7)
CD_{16}^+, % / CD_{16}^+, %	18 (18,5 – 16,5 = 2,0)	30* (47 – 24 = 23)	61 * (65 – 21 = 44)	20 (27 – 19 = 8)	20 (43 – 16 = 27)
CD_{22}^+, % / CD_{22}^+, %	22 (22 – 21 = 1,5)	30* (44 – 19 = 25)	76*, ** (87 – 33 = 54)	20 (20 – 18 = 2)	24 (27 – 16 = 11)

Примечания: * P<0,05 по отношению к контрольной группе; ** P<0,05 по отношению к группе сравнения.

Notes: * statistically valuable differences (p<0,05) in relation to the control group; ** statistically valuable differences (p<0,05) in relation to the comparison group.

Состояние Т-клеточной системы у мужчин 3-й группы характеризовалось повышенными уровнями практически всех показателей: Т-, В-клеточных звеньев и NK-клеток. Так, содержание Т-лимфоцитов (CD_3^+), Т-лимфоцитов с хелперной (CD_4^+) и Т-лимфоцитов с супрессорной/цитотоксической функцией (CD_8^+), иммунорегуляторного индекса, NK-клеток и В-лимфоцитов повышалось на 25, 55, 11, 40, 238 и 245% относительно контроля соответственно.

Очевидно, при инвазии небольшим количеством личинок токсокар (уровень антител IgG к антигенам токсокар – индекс позитивности 1,8) происходит стимуляция иммунной системы хозяина за счет метаболитов, которые находятся на поверхности личинок и имеют свойства суперантигенов, с последующей солюбилизацией в кровоток. Такая гиперактивация Т-клеток обеспечивает достаточно быстрое выведение патогенов из организма, что делает практически невозможным повреждение ДНК сперматозоидов.

Состояние Т-клеточной системы у мужчин 4-й группы характеризовалось сохранением общего количества Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов с супрессорной/цитотоксической функцией (CD_8^+), увеличением уровня Т-лимфоцитов с фенотипом CD_4^+ на 25% и иммунорегуляторного индекса на 24% по отношению к группе контроля. Уровень NK-клеток был увеличен на 11%, тогда как уровень В-лимфоцитов (CD_{22}^+) был снижен на 9% относительно группы контроля.

Таким образом, развитие процесса, вызванного большим количеством личинок токсокар (уровень антител IgG к антигенам токсокар – индекс позитивности 2,4), способствует формированию патологического иммунного ответа. В процессе развития гельминтоза и его хронизации начинает развиваться иммунодепрессия, что приводит к смене острой фазы на хроническую. При хронизации процесса паразитогенная депрессия может возникать в различных звеньях иммунной системы (в частности, в системе В-лимфоцитов). Именно развитие иммунодепрессии способствует персистенции патогена, что в дальнейшем приводит к фрагментации ДНК сперматозоидов.

По мнению современных специалистов, на развитие бесплодия оказывают негативное влияние достаточно много различных факторов. Необходимо принять во внимание, что у всех мужчин, проживающих в г. Запорожье и на территории Запорожской области, есть один общий фактор – это загрязнение окружающей среды выбросами промышленных предприятий, содержащими 52 приоритетных химических вещества из общего списка и 80 химических поллютантов, которые могут оказывать вредное воздействие на здоровье населения [18].

По результатам выполненного анализа, наибольшее влияние на репродуктивную систему оказывают 1,3-бутадиен (дивинил), акрилонитрил, бензол и другие, являющиеся выбросами основных промышленных предприятий г. Запорожья.

Так, состояние Т-клеточного звена у мужчин 5-й группы характеризовалось снижением концентрации общего количества Т-лимфоцитов (CD_3^+) на 33% и Т-лимфоцитов с супрессорной/цитотоксической функцией (CD_8^+) на 27% относительно контрольной группы. Уровень Т-лимфоцитов с хелперной функцией (CD_4^+) отвечал группе контроля. Иммунорегуляторный индекс, содержание NK-клеток и В-лимфоцитов

(CD_{22}^{+}) были повышены на 40, 11 и 9% относительно контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии иммунодефицита, который присущ жителям г. Запорожья и области, которые являются зоной «экологического бедствия».

■ ВЫВОДЫ

1. Мужчинам с нарушением репродуктивной функции, проживающим на территории г. Запорожья и области, свойственны нарушения иммунного статуса, а зараженность токсокарозом вносит определенные изменения в состояние иммунной системы, а именно в клеточное ее звено.
2. У мужчин с наличием токсокарозной инвазии (третья и четвертая группы) определяется незавершенность как нейтрофильного, так и моноцитарного звеньев фагоцитоза с изменениями ФРИС – от недостаточности до активации 2-й степени, на фоне истощения функционально-метаболического резерва, тогда как у мужчин без наличия токсокарозной инвазии (вторая и пятая группы) также отмечалась незавершенность фагоцитоза обоих звеньев, но с изменениями ФРИС, проявляющихся недостаточностью 2–3-й степени на фоне сохранения функционально-метаболического резерва.
3. У инфертильних мужчин при незначительном инфицировании личинками токсокар (уровень антител IgG к антигенам токсокар – 1,8) наблюдается гиперактивация Т-клеточного звена иммунной системы, что обеспечивает достаточно быстрое выведение патогена из организма и делает практически невозможным повреждение ДНК сперматозоидов, в то время как при значительном инфицировании личинками токсокар (уровень антител IgG к антигенам токсокар – 2,4) наблюдается наличие иммунодепрессии, что способствует персистенции патогена и приводит к фрагментации ДНК сперматозоидов.
4. Исследование клеточного звена иммунитета у мужчин с нарушением репродуктивной функции является необходимой составляющей комплексного обследования, что позволяет усовершенствовать диагностику мужского бесплодия и способствует разработке патогенетически обоснованной тактики лечения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Boyko M.I., Chornokulskiy I.S., Boyko O.M. (2016) Dinamika pokaznikiv spermogrami pri likuvanni idiopatichnoyi cholovichoні neplidnosti preparatom Novofertil [The dynamics of spermatogram in treatment of idiopathic male infertility with the drug Novofertil]. *Medetsinskie aspektyi zdorovya muzhchinyi,* vol. 3, no 22, pp. 61–66.
2. Castillo J., Estanyol J.M., Balleska J. L., Oliva R. (2015) Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl*, vol. 17 no 4, pp. 601–609.
3. Povoroznyuk M.V. (2015) Prichini porushen reproduktivnogo zdorov'ya u cholovikiv iz bezplsddyam u shlyubi [Causes of reproductive health disorders in men with infertility in marriage]. *Zdorove muzhchini*, vol. 2, no 53, pp. 162–165.
4. Povoroznyuk M.V. (2015) Faktory, shcho vplyvaiut na stan fertylnosti u cholovikiv z nepliddiam u shliubi [Factors that affect the state of fertility in men with infertility in marriage]. *Medicinskie aspekty zdorov'ya muzhchiny*, vol. 2, no 17, pp. 63–68.
5. Farhi J., Ben-Haroush A. (2011) Distribution of causes of infertility in patients attending primary fertility clinics in Israel. *Isr Med Assoc J.*, vol. 13, no 1, pp. 51–54.

6. Usachova O.V., Dralova O.A., Konakova O.V., Bondareva V.V. (2013) Vistseralnyi toksokaroz: osoblyvosti klinichnoho perebihu (klinichnyi vypadok) [Visceral toxocariasis: clinical features (case report)]. *Zbirnyk naukovykh prats spivrobitnykiv NMAPO imeni P.L. Shupyka*, no 3, pp. 304–307.
7. Novikov P.D., Nikulin Yu.T., Hotetovskaya J.V., Novikov D.K. (2007) Immunodiagnostika toksokaroza [Immunodiagnostics of toxocariasis]. *Immunologiya, infektologiya, allergologiya*, no 2, pp. 65–72.
8. Adamenko G.P., Nikulin Yu.T. (2005) Toksokaroz – aktualnaya problema zdravoohraneniya [Toxocariasis is an urgent problem of public health]. *Vitebskiy gosudarstvennyiy meditsinskiy universitet*, no 2, pp. 31–36.
9. Natcheva L.V., Lityagina A.V. (2012) Kletochnye reakcii pri gel'mintozakh [Cellular reactions in helminthiasis]. *Rossijskij parazitologicheskij zhurnal*, no 3, pp. 80–86.
10. Bodnya E.I., Bodnya I.P. (2007) Kliniko-immunologicheskie aspektyi parazitarnyih bolezney [Clinical and immunological aspects of parasitic diseases]. *Klin immun, allerg, infekt*., no 8, pp. 25–30.
11. Tarasova M.N., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Gazieva, I.A. (2007) Ocenka vliyaniya immunologicheskikh faktorov na strukturnuyu organizaciyu khromatina spermatozoidov [Assessment of the influence of immunological factors on the structural organization of sperm chromatin]. *Immunologiya Urala. Proceedings of the VI Conference of immunologists of the Urals*, vol.1, no 6, pp. 165–167.
12. Bozhedomov V.A., Nikolayeva M.A., Ushakova I.V., Sporish, E.A., Rokhlikov, I.M., Lipatova N.A. (2013) Etiologiya autoimmunnogo muzhskogo besplodiya [Etiology of autoimmune male infertility]. *Akusherstvo i ginekologiya*, no 2, pp. 68–76.
13. Frimel' N. (1984) *Immunologicheskie metody* [Immunological methods]. M.: Medicina. (in Russian)
14. Viksman M., Mayanskij A. (1979) *Sposob ocenki funkcional'noj aktivnosti nejtrofilov cheloveka po reakcii vosstanovleniya nitrosinego tetrazoliya: metod. rekomendacii* [Method of assessment of the functional activity of human neutrophils by the reaction of reduction of nitroblue tetrazolium: methodological recommendations]. Kazan: Kazanskij NIIE'M. (in Russian)
15. Narcissov R. (1964) Citohimicheskie issledovaniya lejkocitov [Cytochemical researches of leukocytes]. *Laboratornoe delo*, no 3, pp. 150–151.
16. Shubich M. (1974) Vyyavlenie kationnogo belka v citoplazme lejkociotov s pomoshh'yu bromfenolovogo sinego [Identification of cationic protein in cytoplasm of leukocytes with bromophenol blue]. *Citologiya*, no 10, pp. 1321–1322.
17. Zemskov A.M., Zemskov V.M., Chereshnev V.A. (2011) *Rukovodstvo po klinicheskoj immunologii dlya klinicheskikh vrachej* [Guide to Clinical Immunology for Clinical Physicians]. Moscow: Triada-Kh. (in Russian)
18. Turos O.L. (2008) Analiz riziku dlya zdorov'ya naselennya vid zabrudnennya atmosfernogo povitrya promislovimi pidriemstvami m. Zaporizhzhya [Analysis of the risk to the population's health from atmospheric air pollution by industrial enterprises in Zaporozhye]. *Medetsinskie predspektivyi*, vol. 1, no 13, pp. 93–97.

Поступила/Received: 20.01.2020
Контакты/Contacts: kovalenkovika0809@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.031
УДК 796.01:612:001.891.53

Чиркин А.А., Алтани М.С., Степанова Н.А., Чиркина А.А.
Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь

Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A.
Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus

Зависимость биохимических маркеров здоровья от уровня спортивного мастерства в пубертатном периоде

Dependence of Biochemical Health Markers on the Level of Sports Skills in the Puberty

Резюме

Цель. Сравнительный анализ показателей оценки состояния обменных процессов у спортсменов в пубертатном периоде жизни с использованием традиционно применяемых в медицинских организациях лабораторных тестов.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 363 подростка женского пола, в том числе 320 спортсменок и 43 подростка, составивших контрольную группу, и 701 подросток мужского пола: 576 спортсменов и 125 представителей контрольной группы. Для характеристики обмена веществ в организме испытуемых использовалось определение показателей 24 рутинных лабораторных тестов и 7 коэффициентов.

Результаты и обсуждение. На основании полученных результатов установлено, что в возрастной группе 12–15 лет у спортсменов возможны пять вариантов изменений: 1) повышение показателей ИМТ, активности АсАТ, коэффициента глюкоза/ХС-ЛПНП у подростков-спортсменов обоего пола; 2) снижение показателей ОЖСС у подростков-спортсменов обоего пола; 3) повышение показателей содержания мочевины, триглицеридов и активности альфа-амилазы у спортсменов; 4) снижение показателей содержания кальция, коэффициента А/Г у спортсменов; 5) снижение показателей активности щелочной фосфатазы у спортсменок.

В возрастной группе спортсменов 16–18 лет также возможны пять вариантов изменений: 1) противоположные по направленности изменения показателей у спортсменов и спортсменок в содержании ХС-ЛПНП, активности АсАТ и коэффициента глюкоза/ХС-ЛПНП); 2) повышение показателей содержания мочевины, креатинина, значения индекса атерогенности у спортсменов; 3) снижение показателей активности АлАТ, щелочной фосфатазы, креатинфосфокиназы, коэффициента КФК/АсАТ у спортсменов; 4) повышение показателей содержания общего билирубина, коэффициента Глю/ОХС у спортсменок; 5) снижение показателей содержания ОХС у спортсменок.

Приведенные в статье значения биохимических показателей не выходят за пределы региональных референтных границ нормы, и поэтому они не могут считаться патологическими. Однако отмеченные при этом сдвиги в соотношении изучаемых биохимических показателей являются поводом для коррекции физических нагрузок и образа жизни для лиц, привлекаемых к занятиям физической культурой и спортом в возрастном периоде пубертата.

Заключение. Предложенные нами биохимические маркеры здоровья могут быть использованы для выявления нарушений обмена веществ в организме спортсменов на этапах пубертатного периода жизни.

Ключевые слова: пубертатный период, биомаркеры, спорт, обмен веществ, гендерные отличия.

Abstract

Purpose. A comparative analysis of indicators for assessment of the state of metabolic processes in athletes in the puberty period of life using laboratory tests traditionally used in medical institutions.
Materials and methods. There were 363 female adolescents under observation, including 320 sportswomen and 43 teenagers, who made up the control group, and 701 male adolescents: 576 athletes and 125 representatives of the control group. To characterize the metabolism in the body of the subjects, determination of 24 "routine" laboratory tests and 7 coefficients was used.
Results and discussion. On the base of results, it was found that in the age group of 12–15 years, athletes have five possible changes: 1) increase of rates in adolescents – athletes of both sexes (BMI, AsAT activity, Glu/LDL coefficient); 2) decrease of indicators in adolescents – athletes of both sexes (TIBC); 3) increased performance in athletes (urea and triglycerides, alpha-amylase activity); 4) decrease in athletes (calcium content, coefficient A/G); 5) decrease in sportswomen (alkaline phosphatase activity). In the age group of 16–18 years old, five variations are also possible for athletes: 1) opposite changes in the indicators among athletes and sportswomen (LDL content, AsAT activity, and Glu/LDL coefficient); 2) increased performance in athletes (urea, creatinine, atherogenicity index values); 3) decrease of indicators in athletes (activity of AlAT, alkaline phosphatase, creatine phosphokinase, coefficient of CPK/AsAT); 4) increase of performance in sportswomen (total bilirubin content, Glu/OXC coefficient); 5) decrease of performance in sportswomen (the content of total cholesterol). The values of biochemical indicators given in the article do not go beyond the regional reference boundaries of the norm and therefore they cannot be considered pathological. However, the ratio of the studied biochemical parameters is the reason for the correction of physical activity and lifestyle of people involved in physical education and sports in the age period of puberty.
Conclusion. The identified biochemical health markers can be used to detect metabolic disorders in the body of athletes at the stages of puberty.
Keywords: puberty, biomarkers, sports, metabolism, gender differences.

■ ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия проявилась тенденция к более раннему началу занятий спортом в детском и пубертатном периодах жизни с целью более эффективной подготовки спортсменов высоких квалификаций. Однако до настоящего времени недостаточно изучены действие физических нагрузок на растущий организм и их медико-биологическая эффективность в пубертатном периоде [1]. С помощью физических нагрузок можно влиять на признаки фенотипа, в том числе на обмен веществ. Особенности формируемого спортом фенотипа человека можно выявлять с помощью биомаркеров состояний здоровья и болезней, включая рутинные биохимические тесты [2]. Их анализ показал, что в процессе полового созревания (пубертатного периода) происходит повышение в сыворотке крови уровней креатинина, общего холестерола, холестерола липопротеинов высокой плотности, триглицеридов, мочевой кислоты, мочевины, билирубина, а также снижение активности щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы и уровня кальция (после прекращения роста) [3]. Выявленные нами ранее

изменения величин биомаркеров в сыворотке крови у лиц, занимающихся спортом в пубертатном периоде жизни, не выходили за рамки референтных возрастных границ нормы [1, 4]. Недавно были предложены семь лабораторных панелей исследования биомаркеров в спорте. Особый интерес представляет панель 1 – «Питание и метаболизм», которая предусматривает оценку метаболизма широко распространенными методами лабораторного биохимического анализа сыворотки крови [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ показателей оценки состояния обменных процессов у спортсменов в пубертатном периоде жизни с использованием традиционно применяемых в медицинских организациях лабораторных тестов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половое созревание (пубертатный период, пубертат) – процесс изменений в организме подростка, вследствие которых он становится взрослым и способным к продолжению рода. Согласно терминологии Фонда Организации Объединенных Наций в области народонаселения, к подросткам относят лиц в возрасте 10–19 лет (ранний подростковый возраст – 10–14 лет; поздний подростковый возраст – 15–19 лет). В настоящее время выделяют наиболее вероятные периоды пубертата: у девочек от 10–12 до 15–16 лет, у мальчиков от 12–14 до 17–18 лет [6]. Учитывая эти половозрастные характеристики пубертата, были сформированы 3 группы наблюдаемых подростков (12–15 лет; 16–18 лет и 19–20 лет). В каждой из групп выделяли по 2 подгруппы:

1) контрольная подгруппа формировалась из лиц, приступивших к занятиям спортом, но не получивших спортивной квалификации;
2) подгруппа «спортсмены» включала лиц, получивших спортивную квалификацию в результате систематических спортивных занятий.

Следовательно, критерием включения в контрольную группу явились занятия физическими упражнениями, которые пока не привели к присуждению спортивной квалификации. Такой принцип отбора снижает степень различий в физической активности обследуемых лиц случайной выборки, а также позволяет сформировать более адекватные контрольные группы для сравнения с группами спортсменов [1].

Под наблюдением находилось 363 подростка женского пола: 320 спортсменок и 43 подростка, составивших контрольную группу, и 701 подросток мужского пола: 125 были представителями контрольной группы, 576 – спортсменами. У всех обследуемых лиц оценивали индекс массы тела (ИМТ). В сыворотке крови определяли 24 рутинных биохимических маркера и 7 коэффициентов для характеристики обмена веществ испытуемых по методам, описанным ранее [1]. Содержание глюкозы, мочевины, общего холестерола (ОХС), холестерола липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), триглицеридов, холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), кальция, калия, выражали в ммоль/л; содержание общего билирубина, прямого билирубина, креатинина, мочевой кислоты, общей железосвязывающей способности сыворотки крови (ОЖСС), сывороточного железа выражали в мкмоль/л; содержание общего белка, альбумина и глобулинов выражали в г/л;

активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КФК), альфа-амилазы, гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) выражали в МЕ/л; индекс атерогенности (ОХС – ХС-ЛПВП / ХС-ЛПВП) и отношения альбумин/глобулины (А/Г), АсАТ/АлАТ, КФК/АсАТ, глюкоза/ОХС (Глю/ОХС), глюкоза/ХС-ЛПВП (Глю/ХС-ЛПВП), КФК/ЩФ, глюкоза/ХС-ЛПНП (Глю/ХС-ЛПНП) выражали в безразмерных условных единицах.

Статистическую обработку цифрового материала производили методами непараметрической статистики (Statistica 10.0, StatSoft inc.). Множественное сравнение групп выполнялось с помощью критерия Краскела – Уоллиса. Если этот критерий показывал, что имеются различия между группами, то затем выполнялось попарное сравнение групп с помощью U-критерия Манна – Уитни. Различия принимались статистически значимыми при $p<0,05$, при попарном сравнении учитывалась поправка Бонферрони ($p<0,01$). Результаты представлены в таблицах в виде медианы и процентилей (Me (25%–75%)).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены данные о биохимических показателях сыворотки крови подростков 12–15 лет, которые в результате систематических занятий спортом получили нормальную для их возраста юношескую спортивную квалификацию.

Анализ приведенного цифрового материала показал, что систематические занятия спортом у подростков обоего пола не оказывают отрицательного влияния на показатели транспорта холестерола, эндогенной антиоксидантной системы, состояния мембран печени и мышц и текущего энергообеспечения организма. Такое заключение основано на отсутствии статистически достоверных отличий в величинах глюкозы, прямого билирубина, мочевой кислоты, общего белка, глобулинов, ОХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, индекса атерогенности; активности АлАТ, АсАТ, ГГТ; содержания калия и железа, а также в значениях коэффициентов АсАТ/АлАТ, Глюкоза/ХС-ЛПВП и Глюкоза/ХС-ЛПНП у лиц, занимающихся спортом в возрастном периоде 12–15 лет. Следует отметить, что величины изменения показателей в сторону повышения или снижения не выходили за пределы референтных возрастных норм. Так, у спортсменов обоего пола статистически достоверно и однонаправленно изменялся в сторону снижения только один показатель – ОЖСС, что может свидетельствовать о том, что постоянные физические нагрузки повышают требования к транспорту железа. Были также обнаружены некоторые гендерные различия у спортсменов, получивших юношескую спортивную квалификацию. У юношей занятия спортом привели к повышению двух показателей – уровня триглицеридов и активности альфа-амилазы, а у девушек – повышению индекса массы тела. Следовательно, у юношей повышены требования к перевариванию в двенадцатиперстной кишке и транспорту триглицеридов в кровеносном русле, а у девушек имеются признаки более быстрого соматического созревания. Систематические занятия спортом привели у юношей к снижению семи биохимических показателей – содержание билирубина, кальция, активности КФК, а также величины коэффициентов А/Г, КФК/АсАТ, Глю/ОХС и КФК/ЩФ,

Таблица 1
Биохимические показатели здоровья у подростков 12–15 лет, получивших юношескую спортивную квалификацию

Показатели	Юноши		Девушки	
	Контроль (76)	Юношеский разряд (44)	Контроль (34)	Юношеский разряд (103)
ИМТ	19,7 (18,5–20,9)	19,4 (18,0–19,8)	18,2 (17,1–20,2)	19,1* (18,0–20,8)
Мочевина	4,10 (3,60–4,79)	4,00 (3,70–4,36)	4,68 (3,49–5,21)	3,82* (3,23–4,44)
Креатинин	83,0 (83,0–90,0)	80,0 (76,0–90,0)	80,0 (70,0–100)	70,0* (70,0–80,0)
Билирубин	13,4 (11,3–16,6)	12,0* (9,30–15,4)	14,5 (10,8–16,6)	12,6 (10,6–18,1)
ТГ	0,60 (0,46–0,87)	0,85* (0,78–0,99)	0,81 (0,69–1,26)	0,90 (0,74–1,20)
Щелочная фосфатаза	204 (140–484)	481 (209–638)	202 (150–396)	139* (97,9–304)
КФК	263 (182–376)	173* (120–224)	141,00 (124–179)	138,00 (109–177)
Альфа-амилаза	58,0 (43,0–78,0)	100* (47,5–113)	58,0 (46,5–77,5)	51,5 (37,7–84,7)
Кальций	2,50 (2,30–2,56)	2,20* (2,05–2,35)	2,33 (2,21–2,40)	2,35 (2,25–2,40)
ОЖСС	62,5 (54,7–67,0)	49,5* (46,7–54,0)	60,0 (51,25–64,75)	44,50* (40,00–51,25)
А/Г	1,67 (1,40–1,91)	1,39* (1,21–1,63)	1,46 (1,28–1,65)	1,39 (1,24–1,56)
КФК/АсАТ	10,0 (7,42–14,8)	6,00* (4,51–7,23)	5,81 (5,25–7,07)	6,13 (4,93–8,11)
Глю/ОХС	1,16 (1,04–1,39)	1,08 * (0,96–1,32)	1,12 (0,96–1,29)	1,06 (0,94–1,29)
КФК/ЩФ	1,07 (0,46–2,21)	0,39* (0,25–1,01)	0,80 (0,40–1,18)	0,88 (0,51–1,29)

Примечания:
в скобках указано количество обследованных лиц;
* P<0,05 по сравнению с группой «Контроль».

а у девушек – только трех показателей – содержание мочевины, креатинина и активность щелочной фосфатазы. Эти результаты показывают, что систематические занятия спортом обеспечивают более быструю динамику изменяющихся с возрастом биохимических показателей (уровень кальция, активность щелочной фосфатазы и аспартатаминотрансферазы) по сравнению с таковыми у подростков, только приступивших к подобным занятиям. В то же время важной особенностью обмена веществ юношей-спортсменов в этом возрастном периоде является уменьшение величин коэффициентов КФК/АсАТ и КФК/ЩФ за счет более высоких значений АсАТ и ЩФ, что подтверждает положение о более длительной возрастной динамике активности этих ферментов при прохождении этапа полового созревания у лиц мужского пола.

В табл. 2 представлены биохимические показатели здоровья спортсменов мужского пола пубертатного возраста в зависимости от спортивного мастерства, т. е. при наличии спортивных квалификаций 1–3 взрослых разрядов, кандидата в мастера спорта и мастера спорта.

У подростков-спортсменов 12–15 лет не изменялись по сравнению с контролем содержание глюкозы, мочевой кислоты, общего белка, ОХС, ХС-ЛПНП, активность АлАТ, ЩФ, ГГТ и величина коэффициента Глю/ХС-ЛПВП. Из анализа данных табл. 2 следует, что в возрастном периоде 12–15 лет у всех подростков мужского пола независимо от вида

Таблица 2
Зависимость биохимических показателей сыворотки крови спортсменов мужского пола от спортивного мастерства

Возрастная группа 12–15 лет				
Показатели	**Контроль (76)**	**1–3-й р-д взрослых (134)**	**КМС (34)**	**МС (11)**
ИМТ	19,7 (18,5–20,9)	20,5* (19,0–21,7)	21,8* (19,3–24,0)	20,7 (19,8–23,6)
Мочевина	4,10 (3,60–4,79)	4,60* (3,70–5,20)	5,25* (4,30–6,19)	5,05* (4,28–5,75)
Билирубин	13,4 (11,3–16,6)	13,4 (10,8–17,8)	14,8 (10,8–23,7)	11,3* (10,6–13,8)
Альбумин	44,0 (41,0–45,0)	41,0* (38,0–44,0)	43,0 (41,0–45,0)	40,0 (40,0–43,0)
Глобулины	26,0 (24,0–31,0)	30,0* (28,0–33,0)	29,0 (26,2–31,7)	32,0* (29,0–36,5)
ТГ	0,60 (0,46–0,87)	0,74* (0,53–1,00)	0,73 (0,50–1,00)	0,81* (0,71–1,24)
α-амилаза	58,0 (43,0–78,0)	89,5* (51,7–130)	54,0 (41,0–64,0)	141* (102–146)
Кальций	2,50 (2,30–2,56)	2,34* (2,24–2,44)	2,39 (2,27–2,52)	2,33* (2,29–2,36)
ОЖСС	62,5 (54,7–67,0)	54,0* (49,0–57,0)	53,3* (50,2–59,5)	55,0* (46,0–56,0)
А/Г	1,67 (1,40–1,91)	1,34* (1,19–1,56)	1,46 (1,30–1,76)	1,29* (1,06–1,56)
АсАТ/АлАТ	1,34 (1,06–1,89)	1,77* (1,34–2,12)	1,46 (1,31–1,92)	1,38 (1,29–1,89)
КФК/АсАТ	10,0 (7,42–14,8)	8,54* (6,19–12,2)	9,86 (7,26–13,0)	8,52 (6,41–12,3)
Глю/ОХС	1,16 (1,04–1,39)	1,19 (1,00–1,41)	1,12 (0,98–1,38)	1,02* (0,89–1,21)
Глю/ХС-ЛПНП	1,86 (1,60–2,30)	2,23* (1,84–2,85)	2,19* (2,01–2,91)	1,63 (1,38–1,98)
Возрастная группа 16–18 лет				
Показатели	**Контроль (49)**	**1–3-й р-д взрослых (194)**	**КМС (123)**	**МС (36)**
Мочевина	4,60 (3,90–5,59)	5,00 (4,10–5,89)	5,15* (4,25–6,10)	5,28* (4,50–5,92)
Мочевая к-та	270 (250–310)	310* (270–360)	290 (260–330)	330* (300–363)
ОХС	3,90 (3,50–4,30)	3,71 (3,40–4,30)	4,00 (3,60–4,50)	4,20* (3,65–4,7)
ЛПНП	2,05 (1,45–2,37)	2,09 (1,60–2,40)	2,30* (2,01–2,80)	2,53* (2,17–2,97)
АлАТ	32,0 (20,0–41,0)	23,0* (18,0–31,0)	22,0* (17,2–27,0)	22,0* (16,0–29,0)
АсАТ	38,0 (27,0–63,0)	35,0* (28,0–43,7)	31,0* (25,0–37,0)	26,0* (22,5–31,0)
ЩФ	356 (194–440)	198* (104–331)	191* (117–321)	158* (96,9–300)
КФК	511 (346–1740)	344* (224 – 628)	376* (221–609)	249* (175–352)
Железо	14,1 (11,0–16,6)	18,4* (12,5–22,8)	16,1(12,6–20,4)	17,5 (13,4–19,6)
КФК/АсАТ	15,1 (11,2–29,0)	11,6* (7,81–16,2)	11,7* (8,83–17,4)	8,78* (6,35–11,9)
Глю/ХС-ЛПВП	3,58 (3,17–4,78)	3,69 (3,13–4,23)	3,27* (2,82–3,89)	3,52 (3,10–4,80)
КФК/ЩФ	2,02 (1,21–5,16)	2,05 (1,29–3,70)	1,69 (0,98–3,70)	1,69* (0,64–2,84)
Глю/ХС-ЛПНП	2,53 (2,05–2,89)	2,31 (1,92–2,96)	2,00* (1,68–2,43)	1,82* (1,59–2,22)

Примечание: см. табл. 1.

спортивной квалификации был повышен по сравнению с контролем уровень мочевины и снижены значения ОЖСС. При наличии спортивных разрядов взрослых у подростков оказались повышенными шесть показателей (ИМТ, содержание глобулинов, триглицеридов, активность альфа-амилазы, величины отношений АсАТ/АлАТ и Глю/ХС-ЛПНП) и снижены четыре показателя (содержание альбумина, кальция и величины отношений А/Г и КФК/АсАТ). Итак, у подростков-спортсменов при наличии юношеских и взрослых спортивных разрядов отмечено однотипное снижение ОЖСС и повышение содержания триглицеридов и активности альфа-амилазы, а также снижение величин отношения А/Г и КФК/АсАТ. У подростков с квалификацией кандидата в мастера спорта найдено повышение величин ИМТ, содержания мочевины и величины коэффициента Глю/ХС-ЛПНП на фоне снижения значений ОЖСС. Систематическая нагрузка на организм подростков, приведшая к получению звания мастера спорта, сопровождалась биохимическими изменениями, более близкими к таковым при получении спортивных разрядов взрослых: совпали изменения содержания мочевины, глобулинов, триглицеридов, кальция, а также активности альфа-амилазы, величины ОЖСС и величины коэффициента А/Г. У подростков – мастеров спорта дополнительно были снижены содержание билирубина и величина отношения Глю/ОХС. Таким образом, у подростков-спортсменов возрастающие по интенсивности и сложности физические нагрузки дают два близких кластера измененных биохимических показателей – при достижении спортивной квалификации взрослых разрядов и при достижении квалификации мастера спорта.

На этапе завершения пубертатного возраста (16–18 лет) у юношей-спортсменов не изменялись величина ИМТ, содержание глюкозы, общего белка, альбумина, глобулинов, ХС-ЛПВП, триглицеридов, кальция, значения ОЖСС, активность ГГТ, величины коэффициентов АсАТ/АлАТ и Глю/ОХС. Независимо от уровня спортивной квалификации выявлено однотипное снижение по сравнению с контролем в рамках референтных возрастных границ нормы активности АлАТ, АсАТ, ЩФ, КФК и величины отношения КФК/АсАТ. Эти данные могут свидетельствовать о том, что постоянные физические нагрузки ускоряют возрастную динамику ряда биохимических показателей и формируют оптимальную адаптацию работы мышечной системы к предъявляемым нагрузкам. У юношей, получивших спортивную квалификацию в виде взрослых разрядов, было найдено дополнительное повышение содержания мочевой кислоты и железа, что отображает оптимальную тенденцию в функционировании эндогенных антиоксидантов на фоне лабилизации резервов железа. У юношей – кандидатов в мастера спорта повышено содержание мочевины, ХС-ЛПНП, а также снижены величины коэффициентов Глю/ХС-ЛПВП и Глю/ХС-ЛПНП, что, вероятно, связано с процессами оптимизации функций печени, в том числе мочевинообразовательной и липидтранспортной. Положительные эффекты влияния интенсивных занятий спортом на функциональное состояние печени, мышц, систему транспорта липидов и эндогенной антиоксидантной системы выявлены у юношей – мастеров спорта: повышение по сравнению с контролем содержания мочевины, мочевой кислоты, ОХС, ЛПНП и снижение величины коэффициентов КФК/ЩФ и Глю/ЛПНП.

Установлена зависимость биохимических показателей здоровья у спортсменов в пубертатном периоде от уровня спортивного мастерства у спортсменов-мужчин в возрасте 19–20 лет. Показано, что у этих спортсменов независимо от уровня спортивной квалификации снижены активность КФК и величины коэффициента КФК/АсАТ по сравнению с аналогичными данными контрольной группы. Специфические изменения для трех уровней спортивной квалификации: 1–3-й спортивные разряды взрослых – снижение содержания ОХС и калия; кандидат в мастера спорта – снижение содержания ОХС и активности АлАТ; мастер спорта – снижение ИМТ, активности АсАТ и величины коэффициента КФК/ЩФ и повышение уровня сывороточного железа.

В табл. 3 представлены биохимические показатели здоровья спортсменок пубертатного возраста в зависимости от спортивного мастерства.

Из данных табл. 3 следует, что у спортсменок в возрастной группе 12–15 лет на всех трех уровнях спортивной квалификации не изменялись

Таблица 3
Зависимость биохимических показателей сыворотки крови спортсменов женского пола от спортивного мастерства

Возрастная группа 12–15 лет				
Показатели	**Контроль (34)**	**1–3-й спорт. разряд (54)**	**КМС (30)**	**МС (12)**
ИМТ	18,2 (17,1–20,2)	19,8* (18,4–22,0)	19,8* (18,3–21,6)	22,0* (19,7–24,1)
Глюкоза	4,90 (4,76–5,10)	4,60* (4,38–4,93)	4,90 (4,53–5,20)	4,51* (4,15–4,80)
Мочевина	4,68 (3,49–5,21)	4,00 (3,34–4,62)	4,80 (3,80–5,69)	3,50* (2,95–4,27)
Альбумин	43,0 (42,0–45,0)	42,0* (40,0–44,0)	43,0 (40,7–45,0)	41,5* (38,5–43,0)
ХС-ЛПВП	1,43 (1,40–1,62)	1,46 (1,30–1,60)	1,36 (1,16–1,59)	1,23* (1,10–1,32)
ИА	2,00 (1,83–2,48)	1,82* (1,45–2,19)	1,79 (1,40–2,47)	2,58 (1,64–3,27)
ТГ	0,81 (0,69–1,26)	0,70* (0,60–0,83)	0,77 (0,52–1,23)	0,66 (0,43–1,53)
ЛПНП	2,93 (2,36–3,49)	2,24* (1,80–2,66)	2,24* (1,95–2,49)	2,18 (1,84–3,10)
АлАТ	14,0 (11,0–21,0)	18,0* (15,0–22,7)	15,5 (13,0–18,5)	18,0* (14,0–29,5)
АсАТ	25,0 (21,2–27,7)	28,0* (22,5–32,5)	25,0 (22,7–27,0)	32,5* (25,5–39,5)
ЩФ	202 (150–396)	260 (144–384)	115* (92,8–209)	128* (77,9–216)
ОЖСС	60,0 (51,2–64,7)	53,0* (48,0–56,0)	57,0 (51,5–60,5)	–
КФК/ЩФ	0,80 (0,40–1,18)	0,74 (0,43–1,60)	1,08 (0,61–1,54)	1,78* (0,94–3,68)
Глю/ХС-ЛПНП	1,70 (1,50–1,88)	2,09* (1,70–2,55)	2,27* (2,12–2,48)	1,86 (1,77–2,35)
Возрастная группа 16–18 лет				
Показатели	**Контроль (9)**	**1–3-й спорт. разряд (38)**	**КМС (52)**	**МС (31)**
Билирубин	11,8 (10,6–13,0)	12,8 (10,5–21,2)	14,8* (11,6–21,8)	16,9* (10,9–21,1)
ОХС	5,04 (5,00–5,30)	4,07* (3,80–4,58)	4,10* (3,68–4,60)	4,10 (3,70–4,86)
ТГ	0,79 (0,65–1,01)	0,75 (0,52–1,00)	0,75 (0,60–1,00)	0,60* (0,50–0,90)
ЛПНП	2,90 (2,65–3,10)	2,40* (2,06–2,60)	2,30* (1,90–2,50)	2,45 (1,87–3,02)
АсАТ	22,0 (19,0–23,0)	28,0* (20,5–32,0)	26,0* (21,0–30,2)	26,0* (23,0–33,5)
ЩФ	84,8 (66,5–102)	160* (99,0–219)	104 (79,4–215)	98,7 (81,1–148)
Глю/ОХС	0,86 (0,81–0,91)	1,10* (0,96–1,29)	1,13* (0,99–1,25)	1,05* (0,91–1,26)
Глю/ХС-ЛПНП	1,49 (1,30–1,80)	1,92* (1,67–2,15)	1,97* (1,80–2,43)	1,96* (1,47–2,33)

Примечание: см. табл. 1.

16 показателей: содержание билирубина, мочевой кислоты, общего белка, глобулинов, ОХС, кальция, калия, железа; активность КФК, α-амилазы, ГГТ; величины коэффициентов – А/Г, АсАТ/АлАТ, КФК/АсАТ, Глю/ОХС и Глю/ХС-ЛПВП. У подростков-спортсменок был повышен показатель ИМТ, что, очевидно, связано с ускоряющим действием постоянных физических нагрузок на процесс соматического развития. Как и у спортсменов-подростков мужского пола, у спортсменок в этом возрастном периоде совпадали изменения некоторых биохимических показателей в группах взрослых спортивных разрядов и мастеров спорта: по сравнению с контролем снижено содержание глюкозы и альбумина, а также повышена активность АлАТ и АсАТ. Кроме того, у подростков-спортсменок, получивших квалификацию взрослых спортивных разрядов, снижены индекс атерогенности, содержание триглицеридов и ХС-ЛПНП, уровень ОЖСС и повышено значение коэффициента Глю/ХС-ЛПНП. У девочек – мастеров спорта дополнительно снижены содержание мочевины, ХС-ЛПВП и активность ЩФ при повышении величины коэффициента КФК/ЩФ в рамках референтных возрастных показателей нормы. Эти данные могут означать, что при постоянных интенсивных физических нагрузках на фоне ускоренного протекания процесса полового созревания у девочек выявляются признаки напряжения и негативного развития ряда биохимических процессов: тенденция к относительной гипогликемии и гипоальбуминемии; повышение проницаемости плазматических мембран гепатоцитов и миоцитов, несовершенство транспорта липидов и железа, запаздывание в формировании мочевинообразовательной функции печени. Однако такие изменения не являются аргументами для прекращения занятий спортом, поскольку в группе девочек с квалификацией кандидата в мастера спорта отмечено лишь снижение содержания ЛПНП и активности ЩФ и повышение величины коэффициента Глю/ХС-ЛПНП. По всей видимости, у спортсменок в этом возрастном периоде наиболее важен контроль за состоянием обмена веществ с взаимосвязанной коррекцией физической активности, т. е. необходимо тесное взаимодействие спортивного врача и тренера.

На этапе завершения пубертатного возраста (16–18 лет) у девушек-спортсменок не изменялись по сравнению с контролем 22 показателя. У девушек-спортсменок на всех трех уровнях спортивной квалификации обнаружено повышение активности АсАТ и величин коэффициентов Глю/ОХС и Глю/ХС-ЛПНП. Дополнительно к этим общим изменениям у спортсменок с квалификацией разрядов взрослых повышена активность ЩФ и снижены содержание ОХС и ХС-ЛПНП; у спортсменок с квалификацией кандидата в мастера спорта повышено содержание билирубина и снижены содержание ОХС и ХС-ЛПНП; у спортсменок с квалификацией мастера спорта повышено содержание билирубина и снижено содержание триглицеридов. Все эти данные свидетельствуют о том, что систематические занятия спортом у девушек сопряжены с некоторой «напряженностью» транспорта липидов (возможно, с отвлечением ОХС на синтез половых гормонов), а также с избыточной нагрузкой на костно-мышечную систему.

После завершения процесса полового созревания в возрасте 19–20 лет у спортсменок с квалификацией кандидата в мастера спорта отмечается направленность к сдвигу в сторону повышения содержания

билирубина и снижения содержания триглицеридов, а у спортсменок с квалификацией мастера спорта незначительно повышено лишь содержание билирубина.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На четырех уровнях спортивного мастерства подростков можно выделить следующие изменения биохимических показателей здоровья. При получении юношеских спортивных квалификаций (разряды 1–3) у спортсменов обоего пола обнаружено статистически достоверное снижение величины ОЖСС. У юношей занятия спортом привели к повышению уровня триглицеридов и активности альфа-амилазы, а у девушек – к повышению индекса массы тела. Систематические занятия спортом сопряжены у юношей со сдвигом в сторону снижения семи биохимических показателей: содержания билирубина, кальция, активности креатинфосфокиназы, а также величины коэффициентов А/Г, КФК/АсАТ, Глю/ОХС и КФК/ЩФ. А у девушек – только трех показателей: содержания мочевины, креатинина и активности щелочной фосфатазы. Достижение спортивных разрядов взрослых (разряды 1–3) у всех подростков мужского пола независимо от вида спортивной квалификации было связано с повышением (по сравнению с контролем) уровня мочевины и снижением значений ОЖСС. Кроме того, у юношей-спортсменов оказались повышенными шесть показателей (ИМТ, содержание глобулинов, триглицеридов, активность альфа-амилазы, величины отношений АсАТ/АлАТ и Глю/ЛПНП) и снижены четыре показателя (содержание альбумина, кальция и величины отношений А/Г и КФК/АсАТ). У девушек-спортсменок снижены индекс атерогенности, содержание триглицеридов и ХС-ЛПНП, уровень ОЖСС и повышено значение коэффициента Глю/ХС-ЛПНП. При наличии квалификации кандидата в мастера спорта у спортсменов-подростков найдено повышение величин ИМТ, содержания мочевины и величины коэффициента Глю/ХС-ЛПНП на фоне снижения значений ОЖСС.

Наличие квалификации мастера спорта сопряжено с изменениями содержания мочевины, глобулинов, триглицеридов, кальция, а также активности альфа-амилазы, величины ОЖСС и величины коэффициента А/Г, аналогичным таковым при получении спортивных разрядов взрослых. У юношей – мастеров спорта дополнительно были снижены содержание билирубина и величина отношения Глю/ОХС, а у девушек – мастеров спорта дополнительно снижены содержание мочевины, ХС-ЛПВП и активность щелочной фосфатазы при повышении величины коэффициента КФК/ЩФ.

В завершение изложения фактического материала хотелось бы еще раз подчеркнуть, что приведенные в статье значения биохимических показателей не выходят за пределы региональных референтных границ нормы, и поэтому они не могут считаться патологическими [4]. Однако соотношение изучаемых биохимических показателей является поводом для коррекции физических нагрузок и образа жизни для лиц, привлекаемых к занятиям физической культурой и спортом в возрастном периоде пубертата.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A. (2019) Zavisimost' biohimicheskih markerov zdorov'ya ot vozrasta i pola pri zanyatiyah sportom v pubertatnom periode [Dependence of Health Biochemical Markers on Age and Gender during Sports in Puberty]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, vol. 8, no 3, pp. 420–429.
2. German J.B., Hammok B.D., Watkins S.M. (2005) Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics*, vol. 1, no 1, pp. 3–9.
3. Adeli K., Higgins V., Nieuwesteeg M., Raizman J. (2015) Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian health measures survey. *Clinical Chemistry*, vol. 61, no 8, pp. 1049–1062.
4. CHirkin A., Docenko E., Kamyshnikov V. (2010) *Fiziologicheskie znacheniya laboratornyh testov u naseleniya Respubliki Belarus': spravochnoe posobie* [Physiological values of laboratory tests in the population of the Republic of Belarus: a reference guide]. Minsk: Adukacyya i vyhavanne, 88 p.
5. Lee E.C., Fragala M.S., Kavouras S.A. (2017) Biomarkers in sports and exercise: tracking health, performance, and recovery in athletes. *J. Strength Cond. Res.*, vol. 31, no 10, pp. 2920–2937.
6. Solodkov A., Sologub E. (2005) *Fiziologiya cheloveka. Obschaya. Sportivnaya. Vozrastnaya* [General, sports, and age-related human physiology]. M.: Olimpiya-Press, 528 p. (in Russian)

Поступила/Received: 10.11.2019
Контакты/Contacts: chir@tut.by

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.032
УДК 616.1

Камышников В.С.[1], Яковлев-Малых Н.Н.[1], Литвинко Н.М.[2], Свиридов О.В.[2], Дубовская Л.В.[2], Юрага Т.М.[1], Борисенко Т.Д.[3]
[1] Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь
[2] Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[3] 1-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Kamyshnikov V.[1], Yakovlev-Malykh N.[1], Litvinko N.[2], Sviridov O.[2], Dubovskaya L.[2], Yuraga T.[1], Borisenko T.[3]
[1] Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus
[2] Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[3] 1st City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Трансляционная лабораторная медицина: прогнозирование осложненного течения острого коронарного синдрома с использованием инновационных технологий оценки сопряжения процессов антиоксидантной защиты, протео- и фосфолиполиза

Translational Laboratory Medicine: Prediction of the Complicated Course of Acute Coronary Syndrome Using Innovative Technologies of Assessment of the Coupling of Antioxidant Protection Processes, Proteo- and Phospholipolysis

Резюме

Введение. В статье представлены сведения о разработанных и внедренных с участием сотрудников ИБОХ НАН Беларуси и БелМАПО новых, инновационных технологиях лабораторного исследования, использование которых позволяет оценить состояние сопряжения ключевых метаболических звеньев процесса формирования мембранной патологии при остром коронарном синдроме: общей антиокислительной активности («Оксистат»), общей активности фосфолипазы A_2 (ФЛА$_2$) и протеолитической активности, обусловливаемой уровнем содержания в плазме крови плазматического ассоциированного с беременностью белка А (ПАББ-А, паппализин-1, pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A).

Цель. Сравнительная оценка выраженности процессов некробиоза, снижения антиоксидантной защиты, протеолиза и фосфолиполиза по показателям определения уровня высокочувствительного тропонина I (вч TpI), отечественного набора «ОксиСтат», ассоциированного с беременностью плазменного белка А (PAPP-A) и разработанной Институтом биоорганической химии hs-ЛИФМА-ПАББ-А, и общей активности фосфолипазы A_2 (общ. ФЛА$_2$) сыворотки крови

у пациентов с атеросклеротической болезнью сердца, нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 160 человек с острыми формами ишемической болезни сердца. Всем пациентам произведено количественное определение содержания высокочувствительного тропонина I (методом хемилюминесцентного иммунологического анализа), антиоксидантного статуса организма при остром коронарном синдроме (осуществлялось тест-системой «ОксиСтат»), общей активности фосфолипазы A_2, также использовался оригинальный высокочувствительный метод (вч) лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА), реализуемый с использованием созданной в ходе выполнения задания БРФФИ модельной тест-системы для измерения концентрации ПАББ-А в сыворотке крови мужчин и небеременных женщин hs-ЛИФМА-ПАББ-А (вчЛП-А) и концентрации PAPP-A в сыворотке крови (иммунохимическим методом с электрохемилюминесцентной детекцией (PAPP-A «Roche»).

Результаты и обсуждение. При атеросклеротической болезни сердца и нестабильной стенокардии на фоне отсутствия патологических отклонений в содержании в сыворотке крови специфического белка, отражающего процессы некробиоза – высокочувствительного тропонина I, отмечается значительное возрастание общей активности $ФЛА_2$ и содержания ПАББ-А, сопровождающееся некоторым снижением общей антиокислительной активности.

Выявлена связь между степенью подъема уровня активности $ФЛА_2$, содержания ПАББ-А и возрастанием риска формирования острого инфаркта миокарда при нестабильной стенокардии, что позволяет прогнозировать угрозу трансформации нестабильной стенокардии в острый инфаркт миокарда.

Выводы. По мере усугубления тяжести клинических проявлений отдельных форм острого коронарного синдрома (в ряду – атеросклеротическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда) происходит прогрессирующее увеличение уровней плазменного ассоциированного с беременностью белка А, активности фосфолипазы A_2 на фоне уменьшения антиоксидантной активности сыворотки крови.

Разработана и апробирована высокочувствительная модельная тест-система вч-ЛИФМА-ПАББ-А для количественного определения ПАББ-А в сыворотке крови мужчин и женщин вне беременности методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа; валидирован реализуемый с ее применением метод исследования.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, общая антиокислительная активность, общая активность фосфолипазы A_2, высокочувствительный тропонин I, инновационные технологии лабораторного исследования.

Abstract

Introduction. The article presents information about innovative laboratory research technologies developed and introduced with the participation of employees of the Institute of Bioorganic Chemistry (IBC) of the National Academy of Sciences of Belarus and Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, the use of which lets to assess the state of pairing of key metabolic links in the process of membrane pathology formation in acute coronary syndrome: general antioxidant activity, total activity of phospholipase A2 (tot.PLA_2), and proteolytic activity due to the level of pregnancy-associated plasma protein-A, (PAPP-A).

Purpose. Comparative assessment of the severity of necrobiosis processes, reduction of antioxidant protection, proteolysis, and phospholipolysis based on the indicators of determination of the level of highly sensitive troponin I (hsTr I), domestic set "Oxystat", pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), developed by the IBC hs-LIFMA-PAPP-A, and the total activity of phospholipase A_2 (PLA_2) of blood serum in patients with atherosclerotic heart disease (AHD), unstable angina (UA), and acute myocardial infarction (MI).

Materials and methods. The study involved 160 people with acute forms of coronary heart disease. All patients underwent quantitative determination of the content of highly sensitive troponin I (with chemiluminescent immunological analysis), antioxidant status of the body in acute coronary syndrome (determined with the "Oxystat" test system), total activity of phospholipase A_2. There was also used the original highly sensitive method (hs) of lanthanide immunofluorimetric analysis (LIFMA), implemented using the model test system created by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research to measure the concentration of PAPP-A in the blood serum of men and non-pregnant women hs-LIFMA-PAPP-A (hsLP-A) and the concentration of PAPP-A in the blood serum (immunochemical method with electrochemiluminescent detection (PAPP-A "Roche").
Results and discussion. It was showed that in atherosclerotic heart disease and unstable angina pectoris on the background of absence of pathological abnormalities of specific protein in the blood serum that reflects the processes of necrobiosis – highly sensitive troponin I, there is observed a significant increase of the total activity of PLA2 and the content of PAPP-A, accompanied by a slight decrease of the total antioxidant activity.
There was found a relationship between the degree of increase of the level of activity of PLA2, the content of PAPP-A and the increased risk of acute myocardial infarction with unstable angina, which lets to predict the threat of transformation of unstable angina into acute myocardial infarction.
Conclusions. It was showed that as the severity of clinical manifestations of certain forms of acute coronary syndrome worsens (in the series "atherosclerotic heart disease", "unstable angina", "myocardial infarction"), there is a progressive increase of the levels of PAPP-A, phospholipase A_2 activity on the background of decrease of the antioxidant activity of blood serum.
The highly sensitive hs-LIFMA-PAPP-A model test system was developed and tested for quantitative determination of PAPP-A in the blood serum of men and non-pregnant women with lanthanide immunofluorimetric analysis; the research method implemented with its application was validated.
Keywords: acute coronary syndrome, general antioxidant activity, total activity of phospholipase A_2, highly sensitive troponin I, innovative technologies of laboratory research.

■ ВВЕДЕНИЕ

Отмеченные в последние годы технологические достижения в области медико-биологических исследований привели к формированию и активному становлению трансляционной лабораторной медицины, основывающейся на переносе открытий и других новаций из области фундаментальных исследований в медицинскую практику с целью повышения эффективности диагностики, прогнозирования и лечения заболеваний. Это направление развития лабораторной медицины коснулось и лабораторно-диагностических исследований в неотложной кардиологии.

Известно, что при поступлении пациентов в стационар с диагнозом «острый коронарный синдром» (ОКС) (под которым понимается любая группа клинических признаков или симптомов, позволяющих подозревать острый инфаркт миокарда или нестабильную стенокардию (НС)) [1] он, судя по результатам дальнейшего углубленного клинико-инструментального и лабораторного исследования, трансформируется в патологические состояния, выражаемые окончательными диагнозами «нестабильная стенокардия», «острый инфаркт миокарда» и др.

По данным статистики, ОКС продолжает оставаться наиболее тяжелым проявлением и главной причиной летальных исходов при

ишемической болезни сердца (ИБС), обусловленной, как правило, осложненным течением атеросклероза.

Согласно общепринятым представлениям, основным патоморфологическим субстратом в развитии ОКС является повреждение коронарных артерий, сопровождающееся формированием на внутренней их поверхности атеросклеротических бляшек, которые представляют собой покрытые оболочкой очаги липидного детрита. Под влиянием ряда факторов атеросклеротическая бляшка становится нестабильной. При разрыве (повреждении) ее оболочки происходит эмболизация липидным детритом мелких артериальных сосудов, что составляет угрозу развития острой ишемии с последующим возникновением очага омертвения, т. е. острого инфаркта миокарда.

В связи с этим в настоящее время особое внимание уделяется факторам (воспаления, свободнорадикального окисления и др.), вызывающим нестабильность атеросклеротических бляшек [2].

Согласно современным представлениям о генезе атеросклероза, важную роль в его становлении играет воспалительный процесс в стенке артериальных сосудов. Признаки локального неспецифического воспаления прослеживаются от самых ранних стадий атеросклеротического поражения стенки сосуда до момента дестабилизации и повреждения атеросклеротической бляшки [1, 3].

Как выяснилось, развитие воспалительного процесса в стенке сосудов предваряется нарушением функции эндотелия и сопровождается повреждением мембран клеток продуктами свободнорадикального (перекисного) окисления липидов. Происходящее при этом окисление фосфолипидов влечет за собой повышение активности $ФЛА_2$, вызывающей структурно-функциональные нарушения в липидной фазе мембран клеток, что способствует их разрушению.

Деструктивное влияние на мембраны клеток повышения активности $ФЛА_2$ дополняется проявлением протеолитической активности ПАББ-А, приводящей к высвобождению от связи с белком инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), который наряду с множеством производимых им эффектов оказывает и проатерогенное действие. Известно, что в организме взрослых людей (среднего и старшего возраста) к числу основных продуцентов ПАББ-А относятся фибробласты, гладкомышечные клетки, с пролиферацией которых и последующим превращением их в пенистые клетки связывают развитие атеросклероза. Высвобождаемый из связанного с белком состояния инсулиноподобный фактор роста (ИФР-1), в свою очередь, вызывает активацию макрофагов, приводящую к повышенному захвату ими липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). При этом макрофаги переобогащаются содержащимся в них холестерином и трансформируются в пенистые клетки, способствующие формированию детрита атеросклеротических бляшек. Сопровождающая этот процесс гибель моноцитов, как и макрофагов, приводит к секреции широкой панели медиаторов и цитокинов, вызывающих не только дестабилизацию атеросклеротических бляшек, но и способствующих усугублению выраженности воспалительного процесса в сосудистой стенке. Этим, по-видимому, можно объяснить сделанное наблюдение о том, что экспрессия ПАББ-А сопряжена с формированием легкоранимых или эрозированных атеросклеротических бляшек.

На основании изложенного нельзя не согласиться с высказанным рядом авторов мнением о том, что ассоциированный с беременностью белок плазмы PAPP-A может использоваться в роли чувствительного маркера воспаления, повреждения и нестабильности атеросклеротической бляшки, не уступающего С-реактивному белку, тропонинам или другим маркерам [2].

Наряду с производимым PAPP-A проатерогенным эффектом наблюдается и другой, защитный, состоящий в опосредованном инсулиноподобным фактором роста (ИФР-1) повышении чувствительности клеток к инсулину, вазодилатации и цитопротективном действии. По мнению Шевченко А.О. [2]: «Даже незначительные повреждения в тканях, такие как преходящая ишемия, приводят к активации этого механизма защиты, благодаря чему у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями PAPP-A может выступать в роли более чувствительного маркера воспаления и повреждения атеросклеротической бляшки, чем тропонины и другие маркеры».

Сопровождающие развитие системного воспаления процессы, связанные с активацией ферментативной деятельности $ФЛА_2$, других энзимов, а также свободнорадикального окисления липидов и белков, не могут не сказаться на истончении фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки с последующим ее разрывом [2, 3].

К настоящему времени врачи-клиницисты еще не располагают такими тест-системами, которые бы позволяли с большой долей вероятности выявлять критические изменения в атеросклеротической бляшке, поэтому поиск специфических маркеров – предикторов дестабилизации атеромы приобретает особо важное практическое значение. В качестве таковых могут выступать маркеры нестабильности атеросклеротической бляшки, деструкции атером, каковыми являются: ассоциированный с беременностью протеин плазмы А (pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A) и активность фосфолипазы A_2, влияние которой направлено на деструкцию фосфолипидов мембран, усиливающуюся по мере увеличения объема образования окисленных фосфолипидов вследствие ослабления антиокислительной защиты организма [2, 4].

Потенциальные предикторы (метаболические факторы риска) осложненного течения ИБС

Плазматический ассоциированный с беременностью белок А изначально был обнаружен в плазме крови беременных женщин и охарактеризован как гетеротетрамер с молекулярной массой около 500 kDa, состоящий из двух субъединиц ПАББ-А, связанных между собой одинарной ковалентной S-S-связью, и двух молекул предшественника основного белка эозинофилов, объединенных между собой и субъединицами ПАББ-А двойными дисульфидными связями [5]. ПАББ-А является высокоспецифичной металлопротеазой. В форме гетеротерамера белок не активен и только в виде гомодимера проявляет ферментативную активность. Каждая субъединица ПАББ-А содержит высококонсервативный Zn^{2+}-связывающий домен, аминокислотный состав которого обладает высокой степенью гомологии у всех представителей многочисленного («metzincins») суперсемейства Zn^{2+}-зависимых

металлопротеаз, и образует самостоятельное подсемейство паппализинов (паппализин-1) [6]. Каждая субъединица данного энзима помимо Zn^{2+}-связывающего содержит один Ca^{2+}-связывающий домен. Димерная форма фермента является высокоспецифичной протеазой[1], известными на данный момент субстратами которой являются белки (IGFBP-2; -4 и -5), связывающие инсулиноподобные факторы роста (IGF) I и II [7–9]. Предполагаемая функция данных белков состоит в защите IGF от протеолитического действия сывороточных ферментов. Один из доменов ПАББ-А имеет высокое сродство к глюкозаминогликанам, расположенным на поверхности клеточной мембраны, что позволяет ему специфически адсорбироваться на ней. Ферментативный протеолиз IGFBP-4 в положении между Met-135 и Lys-136 происходит лишь в том случае, если данный белок находится в комплексе с IGF I или II, при этом образуются два полипептидные фрагмента, имеющие значительно более низкое сродство к белковому гормону, чем интактная молекула связывающего белка [10]. Ферментативная активность паппализина-1 направлена на регуляцию локальной концентрации биоактивного IGF путем его высвобождения из связанного состояния с IGFBP в непосредственной близости от мембранного рецептора (рис. 1).

Секретируемый ПАББ-А специфически адсорбируется на глюкозаминогликанах клеточной мембраны и катализирует протеолиз IGFBP-4 с высвобождением биологически активного IGF, который взаимодействует с мембранными рецепторами IGFR. Одним из результатов активации клеток является синтез и секреция коллагена, эластина

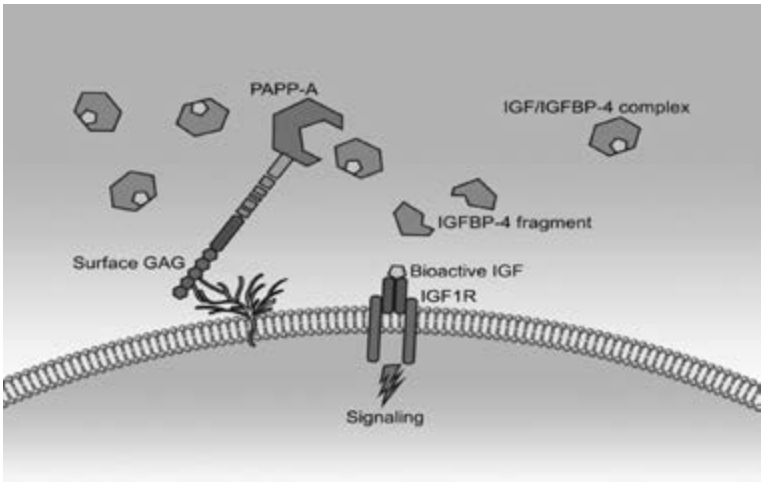


Рис. 1. Роль PAPP-A и IGFBP-4 в местном управлении передачей сигналов IGF [11]

Fig. 1. Role of PAPP-A and IGFBP-4 in the local control of IGF signaling [11]

[1] Международный ферментативный код EC3.4.24.79.

и мукополисахаридов, используемых для образования фиброзной оболочки атеросклеротической бляшки [11].

Процесс атерогенеза в большинстве случаев инициируется окислительным стрессом, приводящим к активации макрофагов. При этом наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода, действие которых неспецифично и направлено в первую очередь на липопротеины, входящие в состав клеток сосудистого эндотелия. Окисленные липиды являются медиаторами провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли, интерлейкин-1β и интерлейкин-6), инициирующих секрецию трипсина, матриксной металлопротеазы-9, ферментативная активность которых направлена на разрушение межклеточного матрикса и активацию молекул адгезии, что усиливает проникновение моноцитов в субэндотелиальное пространство. Последние дифференцируются в макрофаги, которые поглощают окисленные липиды и далее трансформируются в пенистые клетки. Провоспалительные цитокины инициируют секрецию ПАББ-А клетками эндотелия и гладкомышечными клетками сосудов, пролиферация которых сопровождается миграцией их в интиму.

Известно, что синтез PAPP-A возрастает вследствие повреждения ткани, которое возникает в период ее ишемии. Содержание ПАББ-А в нестабильных атеросклеротических бляшках, фиброзная оболочка которых истончена и подвержена разрывам, значительно выше, чем в стабильных [12]. В связи с этим его повышенный уровень расценивается как чувствительный маркер воспаления и повреждения атеросклеротических бляшек.

В процессе дестабилизации атеросклеротических бляшек принимает участие и фосфолипаза A_2. Как биохимический маркер фосфолипаза A_2 (PLA_2) представляет собой фермент, который относится к классу энзимов, катализирующих реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных (ковалентных) связей – гидролаз. Данная группа ферментов занимает основное место в метаболизме сложных липидов (фосфолипидов) [13, 14]. В семействе фосфолипаз выделяют 2 вида ферментов: первая группа – это секреторные фосфолипазы A_2 (секФЛ-A_2), выделяющиеся в плазму крови и во внеклеточное пространство, и вторая – цитозольные, которые находятся в цитоплазме клеток. Увеличение активности секФЛA_2 в крови рассматривается как ответная реакция на провоспалительные стимулы. В ряде исследований был установлен высокий уровень секФЛA_2 при отягощенном течении ИБС, что позволило считать повышение ее активности предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ОКС и стабильными формами ИБС [15].

Еще одним подвидом семейства фосфолипаз является липопротеин-ассоциированная фосфолипаза – A_2 (ЛП-ФЛA_2). Липопротеиновая фосфолипаза A_2 (ЛП-ФЛA_2, или Lp-PLA_2) привлекает к себе все большее внимание как провоспалительный фермент, специфичный в отношении индикации сосудистого воспаления [13, 16].

Полагают, что тест определения общей активности фосфолипазы A_2 (общ.ФЛ-A_2) оказывается в 100 раз более чувствительным в отношении детекции воспалительного процесса в стенке коронарных (артериальных) сосудов сердца, чем тест определения высокочувствительного

СРБ. По мнению ряда исследователей, липопротеиновая фосфолипаза A_2 является высокоспецифичным маркером васкулярного воспаления.

ЛП-ФЛА$_2$ представляет собой Ca^{2+}-независимую фосфолипазу с молекулярной массой 45 кДа, отличающуюся по своим метаболическим проявлениям от других, в том числе секреторных, фосфолипаз (cPLA, sPLA$_2$). Образующиеся под влиянием ФЛА$_2$ лизофосфатидилхолины (лизо-ФХ, лизолецитины) – провоспалительные липиды, которые, в свою очередь, стимулируют образование активных форм кислорода (АФК) – в том числе нейтрофилами, клетками эндотелия и макрофагами интимы артерий. Важно и то, что лизо-ФХ влияют на активность синтазы NO и, следовательно, на количество синтезируемого NO. В результате происходит нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации – за счет снижения биодоступности NO для гладкомышечных клеток артериол. Установлено, что лизо-ФХ (лизолецитины) играют ключевую роль в атерогенезе, проявляя цитотоксичность по отношению к клеткам сосудов, резко изменяя текучесть мембран и способствуя высвобождению медиаторов воспаления. Этот процесс усугубляется еще и тем, что обусловленное описанными изменениями повышение микровязкости липидной фазы мембран изменяет чувствительность рецепторов клетки к влиянию гормонов белковой природы [13].

Свободная же арахидоновая кислота, высвобождающаяся в процессе ферментативного гидролиза мембранных ФЛ, превращается под влиянием циклооксигеназы в тромбоксан и простагландины, а с участием липооксигеназы – в лейкотриены и липоксины. Таким образом, при высвобождении из связанного состояния арахидоновой кислоты образуется ряд биологически активных веществ, способных оказать существенное влияние на каждую клетку жизненно важных органов.

ЛП-ФЛА$_2$ в большом количестве обнаруживается в атеросклеротических бляшках, склонных к разрыву, и, по мнению ряда авторов, именно оттуда попадает в кровоток. Результаты специфического окрашивания тканевых элементов коронарных и сонных артерий свидетельствуют о наличии ЛП-ФЛА$_2$ в тонкой фиброзной покрышке бляшек, склонных к разрыву, а также об отсутствии фермента в бляшках на ранних стадиях их формирования [4].

Весьма важным оказалось то, что фермент вырабатывается в атеросклеротических бляшках, имеющих некротическое ядро, а также то, что наиболее высокая его концентрация выявляется в «плечевой» зоне тонкой покрышки фиброатеромы, проявляющей большую «склонность» к разрыву. Более интенсивный синтез и накопление ЛП-ФЛА$_2$ происходят в каротидных бляшках сонной артерии (что, как полагают, обусловливает их нестабильность и склонность к разрыву).

Выяснилось, что активность ЛП-ФЛА$_2$ внутри бляшек с некрозом и инфильтрацией лейкоцитами зависит от темпа накопления в них окисленных липидов. ЛП-ФЛА$_2$ активно продуцируется как макрофагами, так и пенистыми клетками, находящимися внутри уязвимых бляшек. Привлекаемые в интиму стенки сосудов моноциты, дифференцирующиеся в ней в макрофаги и затем превращающиеся в пенистые клетки, продуцируют ЛП-ФЛА$_2$, локально увеличивая концентрацию этого белка-фермента.

Показано, что лечение пациентов с коронарным атеросклерозом с использованием специфического ингибитора ЛП-ФЛА$_2$ приводит к уменьшению размера некротического ядра бляшки в коронарном сосуде.

В силу того, что уровень активности сывороточной ЛП-ФЛА$_2$ отражает выраженность внутрисосудистого воспаления и нестабильность бляшки, липопротеин-ассоциированную фосфолипазу А$_2$ рассматривают как перспективный маркер воспалительного прогрессирования и нестабильности атеросклеротических бляшек [4]. Особую значимость имеет и то обстоятельство, что фосфолипаза А$_2$ играет роль своеобразного «чистильщика», освобождающего мембраны от окисленных фосфолипидов: известно, что активность этого фермента индуцируется увеличением количества образуемых в мембране и других липидно-белковых комплексах окисленных фосфолипидов – вследствие активации процесса их свободнорадикального окисления (СРО).

Несмотря на вклад процессов, сопровождающихся повышением активности фосфолипазы А$_2$, в формирование атерогенных нарушений, тест определения активности ЛП-ФЛА$_2$, по заключению российских авторов, не используется в широкой клинической практике из-за сложности выполнения метода исследования и высокой стоимости необходимых для его постановки импортных наборов реагентов.

Для дальнейшего углубленного изучения затронутой проблемы в выполненной нами работе был впервые использован тест определения общей активности ФЛА$_2$ с применением оригинального набора реагентов отечественного производства.

Поскольку активность этого фермента во многом связана с выраженностью процесса свободнорадикального окисления фосфолипидов, зависящей, в свою очередь, от антиокислительной обеспеченности организма, представлялось целесообразным оценить состояние и этого звена метаболизма, тем более что в период развития острых коронарных событий сердечно-сосудистая система испытывает недостаточность антиоксидантной защиты ее органов и тканей. [17].

В ходе развития острого коронарного синдрома происходит сдвиг в системе прооксиданты – антиоксиданты со смещением в сторону накопления прооксидантов – активных форм кислорода. Участие АФК в метаболических реакциях при развивающейся острой коронарной патологии в условиях дефицита эндогенной системы антиоксидантной защиты организма оказывает прямое повреждающее действие на клетки миокарда – кардиомиоциты, вызывая нарушение в работе сердца (способствуя аритмогенной активности миокарда), а также оказывая влияние на систему свертывания крови и функцию эндотелия.

В итоге сочетанного дестабилизирующего влияния на мембранные структуры клеток и оболочек атеросклеротических бляшек исследованных систем протео- и фосфолиполиза возникает дестабилизация атеросклеротических бляшек у пациентов с острыми формами ИБС.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научное обоснование разработки новой методологии лабораторно-диагностического исследования пациентов с острым коронарным синдромом на основе выдвинутой концепции о значимости

патогенетически тесно связанных между собой процессов сопряжения фосфолиполиза (обусловливаемого влиянием фосфолипазы A_2), протеолиза (вызываемого в том числе специфическим влиянием плазменного ассоциированного с беременностью белка А) и антиоксидантной защиты в формировании мембранной патологии, усугубляющей тяжесть течения основного заболевания; а также адаптация соответствующих методов исследования применительно к их использованию для диагностики и прогнозирования развития острого коронарного синдрома.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовало 160 человек, из которых: 110 пациентов, госпитализированных в первые сутки от момента появления острых болей в области сердца (в среднем 6 часов) в профильный по заболеваниям сердечно-сосудистой системы стационар г. Минска (УЗ «1-ая городская клиническая больница»), с разными формами отягощенного течения ИБС (атеросклеротическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда) (средний возраст составил 69,3 года) и 50 человек практически здоровых, составивших группу «Контроль».

Всем пациентам, поступившим в стационар в экстренном порядке, проводилось комплексное обследование (в соответствии с положениями приложения № 2 к постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 30.12.2014 № 117 об оказании медицинской помощи пациентам с ОКС). На основании результатов клинико-лабораторного исследования, а также данных, полученных при клиническом и клинико-инструментальном исследовании, были сформированы три группы исследования:

1. Группа «АКС» (диагноз «атеросклеротическая болезнь сердца»): в исследовании участвовало 36 пациентов, средний возраст которых составил 71 год; представлены почти в равном соотношении по гендерному признаку: 52% мужчин и 48% женщин.
2. Группа «НС» (диагноз «нестабильная стенокардия»): в исследовании участвовало 32 пациента, средний возраст которых составил 71 год; из них 56% мужчин и 44% женщин.
3. Группа «ИМ» (диагноз «острый инфаркт миокарда»): в исследовании участвовало 42 пациента (69% мужчин и 31% женщин), средний возраст которых составил 66 лет.

В группу «Контроль» вошли 50 практически здоровых человек (40% мужчин и 60% женщин, средний возраст 37,6 года), которые на момент обследования не страдали острой формой патологии либо обострением хронических инфекционных заболеваний, а также проявлениями аллергии.

Взятие биологического материала (венозная кровь) у исследуемых производилось в период их госпитализации в стационар до постановки клинического диагноза и до проведения реперфузионной (тромболитической, интервенционной, фармакоинтервенционной) терапии путем венепункции локтевой вены с использованием вакуум-содержащих систем типа Vacutainer®. Преаналитический этап подготовки образца крови производился в условиях клинико-диагностической лаборатории

УЗ «1-я ГКБ». Полученную после подготовки сыворотку крови отбирали и хранили в микропробирках (типа эппендорф) объемом 1,5 мл при температуре –20 °С в холодильных камерах. Клинико-лабораторные исследования проб биологического материала производились в течение последующих нескольких суток.

Определение концентрации ПАББ-А (PAPP-A, «Roche Diagnostics», Швейцария) в сыворотке крови пациентов осуществлялось иммунохимическим методом с электрохемилюминесцентной детекцией – ECLIA (PAPP-A «Roche») на иммунохимическом анализаторе «Cobas e411», который представляет собой полностью автоматизированную систему для иммунохимического анализа. Преимуществами используемой технологии являются высокая аналитическая чувствительность метода, широкий диапазон измерения и малый объем образца исследуемой биологической жидкости.

Наряду с этим методом использовался оригинальный высокочувствительный метод (вч) (high sensitive – hs) лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА), реализуемый с использованием созданной в ходе выполнения задания БРФФИ («Разработка инновационных технологий лабораторного исследования предикторов осложненного течения ИБС на основе оценки характера сопряжения процессов антиокислительной защиты, протео- и фосфолиполиза», 2018–2020 гг.) модельной тест-системы для измерения концентрации ПАББ-А в сыворотке крови мужчин и небеременных женщин hs-ЛИФМА-ПАББ-А (вчЛП-А). Для определения ПАББ-А использовали пару мышиных моноклональных антител, направленных к пространственно разобщенным антигенным детерминантам, характерным как для гетеротетрамерной, так и для гомодимерной форм паппализина-1. При этом определяемый фермент взаимодействует по одному из двух эпитопов с МАт, модифицированным биотином (Бт) и биоспецифически адсорбированным на поверхности пластика, а по второму эпитопу – с детектирующим МАт, в структуру которого включен хелат иона Eu^{3+}. В результате происходит образование тройного комплекса Бт-МАт... PAPP-A..Eu^{3+}-МАт. Несвязавшиеся компоненты удаляются шестикратным промыванием. Последующее внесение усиливающего раствора способствует высвобождению ионов Eu^{3+} из иммунного комплекса и образованию сильно флуоресцирующих хелатов с компонентами раствора. Регистрация флюоресценции осуществляется с использованием флуориметра с временным разрешением («Delfia», «Victor» или другие, схожие с ними по своим характеристикам) [18].

Интенсивность измеренной флуоресценции прямо пропорциональна количеству ПАББ-А в калибровочной пробе или исследуемой сыворотке. Обсчет полученных результатов производят, откладывая в логарифмическом масштабе по оси ординат полученные значения флуоресценции, разрешенной во времени, в относительных единицах, а по оси абсцисс – показатели концентрации ПАББ-А мМЕ/л в калибровочных пробах, изготовленных с использованием ПАББ-А, который выделен методом аффинной хроматографии из ретроплацентарной сыворотки и чистота которого (по данным ДСН-электрофореза в восстанавливающих условиях) составляет не менее 90% [19].

Для суждения о «вкладе» изменения фосфолипазной активности ($ФЛА_2$) в процесс формирования дестабилизации и повреждения атеросклеротической бляшки был использован созданный в ИБОХ НАН Беларуси (д. х. н. Литвинко Н.М.), не имеющий мировых аналогов фотометрический, адаптированный к отечественной приборной базе метод исследования, апробация которого осуществлена в ходе выполнения задания Д.21 «Разработка и апробация новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы $А_2$ в крови» (подпрограмма «Диагностикумы» ГП «Импортозамещающая фармпродукция», научные руководители: д. х. н. Литвинко Н.М. (ИБОХ НАН Б) и д. м. н. Камышников В.С. (БелМАПО)).

Принцип исследования уникален и не имеет мировых аналогов: он основывается на использовании разностной спектрофотометрии образующегося в ходе определения комплекса метгемоглобина и жирной кислоты (патенты BY № 12552, № 13143). Набор реагентов фотометрического определения активности фосфолипазы «$ФЛА_2$-ФОА» адаптирован к отечественной приборной фазе.

Поскольку набор реагентов, согласно инструкции по его применению, ориентирован на определение активности панкреатической фосфолипазы с использованием на предварительном этапе исследования процедуры прогревания пробы при 60 °С в течение 45 минут для подавления активности фосфолипаз всех других видов, при определении общей активности фосфолипазы $А_2$ этот этап пробоподготовки опускался.

Определение антиоксидантного статуса организма при остром коронарном синдроме осуществлялось с использованием разработанной под руководством д. х. н. Киселева П.А. (ИБОХ НАН Беларуси) тест-системы, предназначенной для количественной оценки общей антиоксидантной активности – «ОксиСтат». Принцип метода базируется на взаимодействии антиоксидантов с ABTS-радикалом[2] (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)), в ходе которого наблюдается уменьшение оптической плотности катион-радикала в диапазоне длин волн 600–800 нм пропорционально концентрации (либо активности) антиоксиданта. В связи с этим для его постановки не требуется (в отличие от всех ранее известных методов) предварительно создавать специальную систему, продуцирующую активные формы кислорода, поэтому он осуществляется в один этап. Метод отличается высокой аналитической чувствительностью (что позволяет использовать весьма небольшой объем биологического материала), простотой исполнения (для его выполнения используется один-единственный реагент – хромоген в виде стабильного радикала), доступностью всем лабораториям

[2] ABTS-радикал является химическим соединением, которое используется для наблюдения за кинетическими реакциями специфических ферментов.

практического здравоохранения. Новизна предложенного метода подтверждена патентом «Способ определения общей антиоксидантной активности биологических жидкостей» (Киселев П.А., Орешко Н.А., Камышников В.С, Юрага Т.М., Кохнович Н.Н.).

В дополнение к этому в ходе лабораторного исследования пациентов исследуемых групп было предпринято определение уровня содержания высокочувствительного тропонина I – вчTpI (кардиомаркера некробиотических процессов в миокарде) методом, основанным на принципе хемилюминесцентного иммунологического анализа (CLEIA) с использованием технологии MAGTRATION®, реализуемой на хемилюминесцентном иммуноферментном анализаторе «PATHFAST» («LSI MEDIENCE Corporation», Япония).

Статистическая обработка данных осуществлена с применением программного пакета Statistica 8.0. Для непрерывных величин рассчитывались средние величины (M), стандартные отклонения (SD).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная модельная тест-система, как и референс-система, была использована для определения концентрации вчЛП-А в 130 сыворотках крови пациентов с различными формами ишемической болезни сердца. Сравнительный анализ результатов определения концентрации ПАББ-А с использованием созданной модельной тест-системы и референс-набора «PAPP-A» фирмы «Roche» проиллюстрирован на рис. 2.

Расчет коэффициента корреляции Пирсона, характеризующий существование линейной зависимости между двумя массивами данных, производили по формуле:

$$xy = \frac{\Sigma_{t=1}^{m}(xi - \bar{x})^2 \Sigma_{t=1}^{m}(yi - \bar{y})^2}{\sqrt{\Sigma_{t=1}(x_i - \bar{x})^2 \Sigma_{t=1}(y_i - \bar{y})^2}} = \frac{cor\,(x, y)}{\sqrt{S_x^2 S_y^2}},$$

где x_i – значения переменной X;
y_i – значения переменной Y;
x – среднее арифметическое для переменной X;
y – среднее арифметическое для переменной Y.

Значение коэффициента корреляции показателей концентрации PAPP-A проб сывороток крови, исследованных с использованием модельной тест-системы и набора реагентов фирмы «Roche», составило 0,92.

Обращает на себя внимание высокая степень корреляции сопоставляемых показателей, что позволило сделать вывод о возможности использования разработанной модельной тест-системы для определения концентрации вчЛП-А в сыворотках крови человека у мужчин и женщин вне беременности.

Разработанная отечественная модельная тест-система вчЛП-А характеризуется широким динамическим диапазоном и позволяет определять содержание ПАББ-А в сыворотках крови пациентов в пределах 1,0–1000,0 мМЕ/л. Высокая специфичность используемых в модельной системе пары МАт подтверждена тестом на «открытие», определяемым как соотношение полученного и предписанного значения ПАББ-А

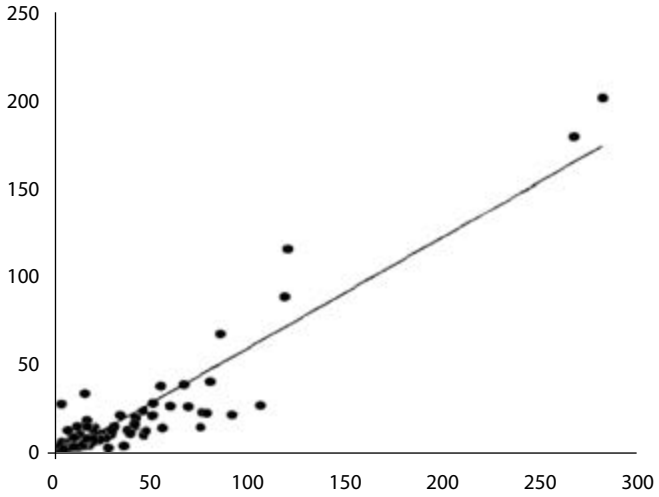


Рис. 2. Корреляция значений концентрации ПАББ-А, полученных модельной тест-системой hs-ЛИФМА-ПАББ-А (ИБОХ) и референс-набором PAPP-A («Roche»)

Fig. 2. Correlation of PAPP-A concentration values obtained with the hs-LIFMA-PAPP-A model test system (Institute of Bioorganic Chemistry) and the PAPP-A reference set ("Roche")

в образце, приготовленном смешением равных объемов сыворотки крови пациента и калибровочной пробы. Экспериментально установлено, что измеренная и теоретически рассчитанная концентрации белка различаются не более чем на 15%. Разработанная тест-система характеризуется высокой воспроизводимостью: коэффициент вариации

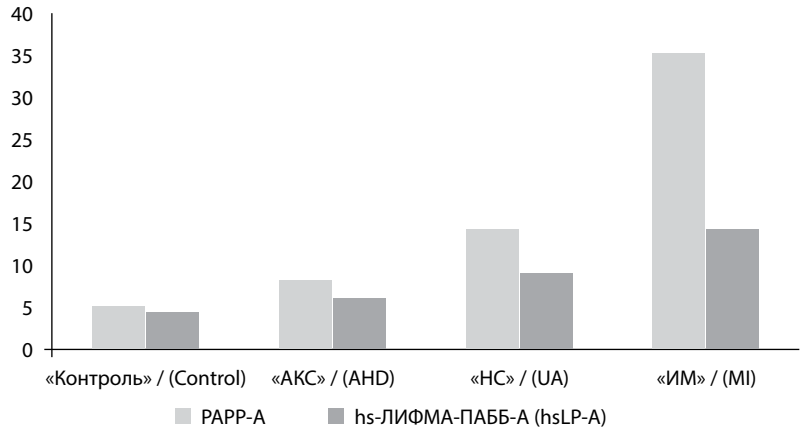


Рис. 3. Диаграмма изменения концентрации плазменного ассоциированного с беременностью белка А, определенного с использованием набора реагентов «PAPP-A-Roche» и тест-системы hs-ЛИФМА-ПАББ-А у пациентов разных групп исследования

Fig. 3. Diagram of changes of the concentration of plasma pregnancy-associated protein A determined using the "RARP-A-Roche" reagent set and the hs-LIFMA-PAPP-A test system in patients of different study groups

Таблица 1
Показатели содержания PAPP-A сыворотки крови ($X+S_x$) у пациентов с острыми формами ИБС и группы «Контроль»

Биохимические маркеры	«Контроль»		«АКС»		«НС»		«ИМ»	
PAPP-A «Roche», мМЕ/л	5,00±1,1	Р>П в 1,13 раза	8,28±4,97	Р>П в 1,33 раза	14,38±9,64	Р>П в 1,59 раза	35,28±23,05	Р>П в 2,46 раза
вчЛИФМА-ПАББ-А, мМЕ/л	4,39±0,97		6,2±4,13		9,02±6,97		14,31±10,2	

Table 1
Indicators of serum PAPP-A (X+Sx) in patients with acute forms of ischemic heart disease and the "Control" group

Biochemical marker	"Control"		"AHD" (atherosclerotic heart disease)		"UA" (unstable angina)		"MI" (myocardial infarction)	
PAPP-A "Roche" mIU/L	5.00±1.1	P>hsLP in 1.13	8.28±4.97	P>hsLP in 1.33	14.38±9.64	P>hsLP in 1.59	35.28±23.05	P>hsLP in 2.46
hs-LIFMA-PAPP-A (hsLP) mIU/L	4.39±0.97		6.2±4.13		9.02±6.97		14.31±10.2	

результатов измерения концентрации ПАББ-А в одном и том же образце сыворотки крови в одной постановке ЛИФМА не превышал 8%. Данные характеристики удовлетворяют требованиям, предъявляемым для иммуноанализа. Полученные при использовании двух методов оценки уровня содержания ПАББ-А данные представлены в табл. 1 и на рис. 3.

Из анализа полученных результатов следует, что значения концентрации PAPP-A, определенные с применением наборов реагентов фирмы «Roche», в среднем в 1,63 раза превышают таковые, получаемые с применением модельной тест-системы.

Анализ статистических данных свидетельствует также о том, что увеличение экспрессии PAPP-A по мере усугубления тяжести заболевания констатируется как при использовании электрохемилюминесцентного (PAPP-A «Roche»), так и лантанидного иммунофлюориметрического методов исследования (вчЛИФМА-ПАББ-А (hs-LIFMA-PAPP-A, hsLP-A)), что отображено на рис. 4 и 5.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что по мере усугубления тяжести заболевания наблюдается последовательное возрастание общей активности $ФЛА_2$ на фоне снижения общей антиокислительной активности.

Полученные данные позволяют полагать, что отмеченное при остром коронарном синдроме снижение общей антиокислительной активности сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления, повышенным образованием окисленных фосфолипидов и как следствие этого – возрастанием общей активности фосфолипазы A_2, что и констатировано результатами выполненного исследования. Отмеченное в ходе выполнения исследования увеличение уровня содержания PAPP-A и общей активности $ФЛА_2$, коррелирующее с усугублением тяжести течения заболевания, позволяет рассматривать тесты определения этих аналитов как новые биомаркеры осложненного течения острого коронарного синдрома, тем более что основными их продуцентами являются компоненты воспалительно измененной сосудистой стенки и нестабильных атеросклеротических бляшек.

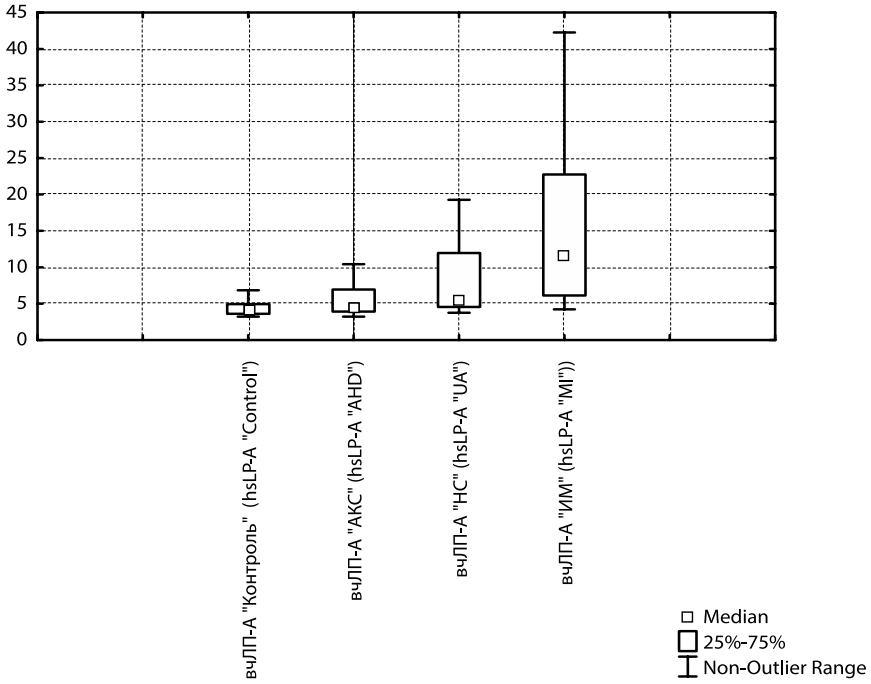


Рис. 5. Box plot 2. вчЛИФМА-ПАББ-А («ИБОХ») в разных группах исследования группы, p<0,05

Fig. 5. Box plot 2. hs-LIFMA-PAPP-A in different study group groups, p<0.05

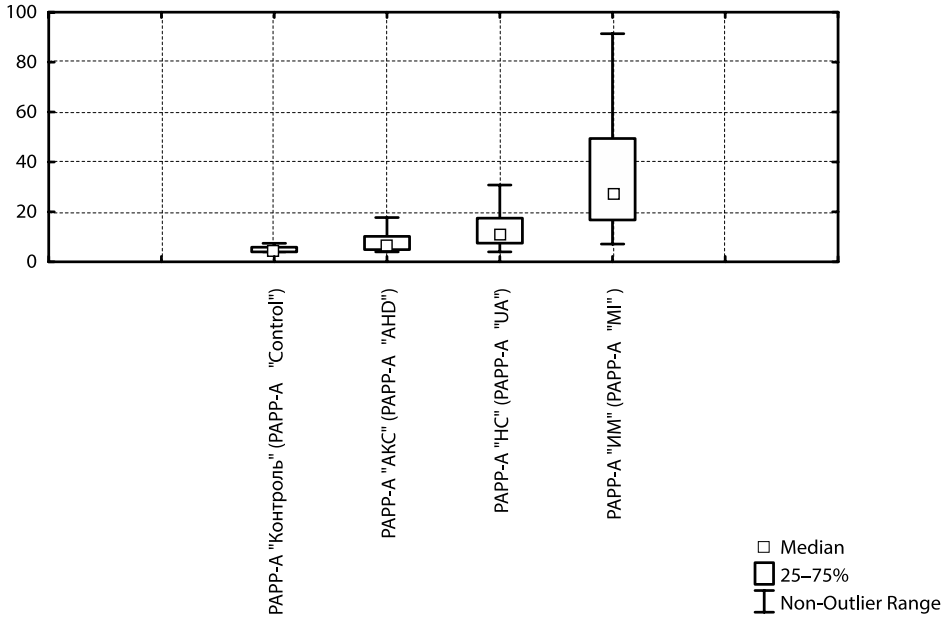


Рис. 4. Box plot 1. PAPP-A («Roche») в разных группах исследования группы, p<0,05

Fig. 4. Box plot 1. PAPA ("Roche") in different study group groups, p<0.05

Таблица 2
Биохимические показатели оценки общей активности фосфолипазы A_2, антиокислительной активности и высокочувствительного тропонина I ($X+S_x$) у пациентов с острыми формами ИБС и группы «Контроль»

Биохимические маркеры	«Контроль»	«АКС»	«НС»	«ИМ»
общ.ФЛ-A_2, МЕ/л	2,15±0,31	3,6±2,07	4,45±2,93	7,13±6,53
ОАА («ОксиСтат»), мкмоль/л	1,28±0,027	1,24±0,21	1,23±0,15	1,18±0,17
вчТр I нг/л	-//-	6,64±5,1	8,31±5,57	88,14±77,41

Table 2
Biochemical parameters for evaluating the total activity of phospholipase A_2, antioxidant activity, and highly sensitive Troponin I ($X+Sx$) in patients with acute forms of ischemic heart disease and the "Control" group

Biochemical marker	"Control"	"AHD" (atherosclerotic heart disease)	"UA" (unstable angina)	"MI" (myocardial infarction)
tot.PLA_2 IU/L	2.15±0.31	3.6±2.07	4.45±2.93	7.13±6.53
total antioxidant activity ("OxyStat") mkmol/L	1.28±0.027	1.24±0.21	1.23±0.15	1.18±0.17
hsTr I ng/L	-//-	6.64±5.1	8.31±5.57	88.14±77.41

■ ВЫВОДЫ

1. Показано, что по мере усугубления тяжести клинических проявлений отдельных форм острого коронарного синдрома (в ряду – атеросклеротическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда) происходит прогрессирующее увеличение уровней плазменного, ассоциированного с беременностью белка А, активности фосфолипазы A_2 на фоне уменьшения антиоксидантной активности сыворотки крови. Выявленные у пациентов с нестабильной стенокардией патогенетически тесно связанные между собой изменения в состоянии протеолитической, фосфолипазной и антиоксидантной активности, в отличие от таковых у пациентов с инфарктом миокарда, не сопровождаются характерным для него увеличением содержания высокочувствительного тропонина I, что позволяет, с учетом этого обстоятельства, прогнозировать осложненное течение острого коронарного синдрома на основании определения уровня PAPP-A, активности фосфолипазы A_2 и общей антиокислительной активности сыворотки крови при нестабильной стенокардии.
2. Разработана и апробирована высокочувствительная модельная тест-система вч-ЛИФМА-ПАББ-А для количественного определения ПАББ-А в сыворотке крови мужчин и женщин вне беременности методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа; валидирован реализуемый с ее применением метод исследования. Созданная отечественная модельная тест-система вчЛП-А характеризуется широким динамическим диапазоном и позволяет определять содержание ПАББ-А в сыворотках крови пациентов в пределах 1,0–1000,0 мМЕ/л.
3. Полученные с использованием технологии вчЛИФМА-ПАББ-А результаты исследования, сопоставимые с данными, полученными

с применением технологии иммунохимического электрохемилюминесцентного анализа, служат основанием для использования отечественной тест-системы определения PAPP-A в качестве предиктора неблагоприятного развития острого коронарного синдрома.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kamyshnikov V.S., Alekhnovich L.I., Kuz'menko A.T. (2015) *Laboratornaya diagnostika ishemicheskoj bolezni serdca. Uchebnoe posobie (prediktory oslozhnenij i monitoring metabolicheskih narushenij)* [Laboratory diagnostics of ischemic heart disease. Tutorial (predictors of complications and monitoring of metabolic disorders)]. Minsk, Belarus, pp. 27–32. (in Russian)
2. Shevchenko A.O. (2014) RARR-A – klinicheskoe znachenie u bol'nyh IBS [RARR-A – clinical significance in patients with ischemic heart disease]. *Biomarkery v laboratornoj diagnostike*. M., Triada, pp. 31–34. (in Russian)
3. Ross R. (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl J. Med*., vol. 340, pp. 115–126.
4. Kamyshnikov V.S., Litvinko N.M., Pekhtereva N.V., Yakovlev-Malyh N.N., Yuraga T.M. (2017) Lipoprotein-associirovannaya i sekretornaya fosfolipazy A2: osobennosti metabolicheskogo vliyaniya i klinicheskaya znachimost' issledovaniya [Lipoprotein associated and secretory phospholipase A2: features of metabolic influence and clinical significance of research]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, vol. 6, 32, pp. 184–195, pp. 196–206.
5. Oxvig C., Sand, O., Kristensen T., Gleich G.J., and Sottrup-Jensen L. (1993) Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J. Biol Chem*, vol. 268 (17), pp. 12243–12246.
6. Stocker W. (1995) The metzincins: topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.;* vol. 4, pp. 823–840.
7. Monget P., Mazerbourg S., Delpuech T., Maurel M.C., Manière S., Zapf J., Lalmanach G., Oxvig C., Overgaard M.T. (2003) Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol. Reprod*., vol. 68, pp. 77–86.
8. Laursen L.S., Overgaard M.T., Søe R., Boldt H.B., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Conover C.A., Oxvig C. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett*., vol. 504, pp. 36–40.
9. Kumar A., Mohan S., Newton J., Rehage M., Tran K., Baylink D., Qin X. (2005) Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem*., vol. 280, pp. 37782–37789.
10. Claus Oxvig. (2015) The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. *J. Cell Commun. Signal*., vol. 9, pp. 177–187. doi 10.1007/s12079-015-0259-9.
11. Cheryl A. (2017) Conover and Claus Oxvig. PAPP-A: a promising therapeutic target for healthy longevity. *Aging Cell*, vol. 16, pp. 205–209. doi: 10.1111/acel.12564.
12. Bayes-Genis A., Conover Ca., Overgaard Mt., Bailey Kr., Christiansen M., Holmes Dr. Jr., Virmani R., Oxvig C., Schwartz Rs. (2001) Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N. Engl J. Med*., vol. 345, pp. 1022–1029.
13. Litvinko N.M. (2002) *Aktivnost' fosfolipaz A2 i S pri biohimicheskom modelirovanii. Monografiya* [Activity of phospholipases A2 and S in biochemical modeling. Monograph]. Mn.: UP TEKHNOPRINT, 350 p. (in Russian)
14. Arabidze G.G. (2013) Klinicheskaya immunologiya ateroskleroza – ot teorii k praktike [Clinical immunology of atherosclerosis – from theory to practice]. *Ateroskleroz i dislipidemii*, no 1, pp. 4–19.
15. Kaminnyj A.I., Pavlunina T.O., Shuvalova YU.A., Korotaeva A.A. (2012) Rol' sekretornoj fosfolipazy A2 v razvitii ateroskleroza [Role of secretory phospholipase A2 in development of atherosclerosis]. *Ateroskleroz i dislipidemii*, no 4, pp. 63–67.
16. Yang E.H., McConnell J.P., Lennon R.J. (2006) Lipoprotein–Associated Phospholipase A2 Is an Independent Marker for Coronary Endothelial Dysfunction in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., pp. 106.
17. Luckij M.A., Kuksova T.V., Smelyanec M.A., Lushnikova Yu.P. (2014) Aktivnost' endogennoj sistemy antioksidantnoj zashchity v processe zhiznedeyatel'nosti organizma [Activity of endogenous system of antioxidant protection in the process of body activity]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*, no 12-1, pp. 20–23.
18. Sviridov O.V. Dubovskaya L.V. Yakovlev-Malyh N.N., Kamyshnikov V.S. (2019) Sozdanie reagentnoj bazy opredeleniya plazmaticheskogo associirovannogo s beremennost'yu belka A syvorotki krovi muzhchin i neberemennyh zhenshchin dlya vysokochuvstvitel'noj model'noj immunofluorimetricheskoj test-sistemy LIFMA-PABB-A. V dvuh chastyah. CHast' 2 [Creation of reagent base of determination of plasmatic pregnancy associated protein A of blood serum of men and non-pregnant women for highly sensitive model immunofluorimetric test system LIFMA-PABB-A. In two parts. Part 2]. *Tezisy dokladov uch. Respub. konf. s mezhdunar. uch. «Fiziko-himicheskaya biologiya kak osnova sovremennoj medicinу*. Minsk, pp. 92–93.
19. Dubovskaya L.V., Kamyshnikov V.S., YAkovlev-Malyh N.N., Sviridov O.V. (2019) Sozdanie reagentnoj bazy opredeleniya plazmaticheskogo associirovannogo s beremennost'yu belka A v syvorotke krovi muzhchin i neberemennyh zhenshchin dlya vysokochuvstvitel'noj model'noj immunofluorimetricheskoj test-sistemy "LIFMA-PABB-A" [Creation of reagent base of determination of plasmatic pregnancy associated protein A in blood serum of men and non-pregnant women for highly sensitive model immunofluorimetric test system "LIFMA-PABB-A"]. *Respubl. nauch. konf. s mezhdunar. uchast., posvyashch. 110-letiyu so dnya rozhdeniya V.A. Bandarina "Fiziko-himicheskaya biologiya kak osnova sovremennoj medicinу", Minsk, 24 maya 2019 g., tez. dokl. pod red. V.V. Hrustaleva, T.A. Hrustalevoj*. Minsk: Donarid, ch. 1, pp. 92–93.

Поступила/Received: 07.02.2020
Контакты/Contacts: dr.iakovlev@mail.ru

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.033
УДК 616.15:616-008.846.3]-074:577.121.7

Пехтерева Н.В., Камышников В.С., Хоровец А.И., Жуковец Т.А.
Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Pekhtserava N., Kamyshnikov V., Kharavets A., Zhukovets T.
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Оценка защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса

Evaluation of the Protective Reaction of the Lipid Structures of Blood Serum and Spermoplasm to the Effect of the Factor that Initiates the State of Oxidative Stress

Резюме

Введение. В статье описан новый метод, который предназначен для оценки состояния защитной, антиоксидантной способности липидсодержащих структур сыворотки крови и спермоплазмы с учетом характера ответной реакции фосфолипазы А2 (ФЛА2) на воздействие коротковолнового монохроматического светового потока, способного инициировать процесс свободнорадикального окисления и окислительную модификацию липидов в условиях in vitro.

Цель. Разработать метод определения состояния защитной антиокислительной способности липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы в условиях воздействия на пробы биологических жидкостей факторов инициации оксидативного стресса.

Материалы и методы. В исследование были включены 30 образцов сыворотки крови и 25 образцов эякулята практически здоровых мужчин. Исследования проводились на базе Научно-исследовательской лаборатории БелМАПО в период 2018–2019 гг. Проведены подбор аналитических характеристик разработанного метода, а также исследования по оценке состояния антиоксидантного статуса в сыворотке крови и спермоплазме с использованием разработанного метода при параллельном определении в образцах биологического материала продуктов перекисного окисления липидов.

Результаты и обсуждение. В ходе проведения эксперимента подобраны условия проведения облучения проб (длина волны (λ) 423 нм, время облучения сыворотки крови – 10 минут, облучения спермоплазмы – 15 минут) и определения активности ФЛА2 с использованием спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Республика Беларусь). Проявление ферментативной активности ФЛА2 в ответ на воздействие на биологический объект коротковолнового монохроматического излучения зависит от антиоксидантной обеспеченности организма, оказывающей эффект биологической защиты фосфолипидов мембран от свободнорадикального окисления (СРО). Сопоставление показателей активности ФЛА2 до и после воздействия фактора инициации свободнорадикального окисления в исследуемом биологическом материале

характеризует состояние антиокислительной защиты липидных комплексов биологических жидкостей.

Выводы. Разработанный метод оценки защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса, позволяет по изменению ферментативной активности ФЛА2 оценить состояние антиокислительной обеспеченности организма, а также дать представление о состоянии антиокислительной защиты липидных структур биологических жидкостей и мембран клеточных элементов и может быть использован для разработки новой методологии исследования антиоксидантной защиты на основе «сопряжения» фосфолипидных комплексов биологического материала и биологической (антиоксидантной) защиты организма.

Ключевые слова: фосфолипаза А2, оксидативный стресс, антиокислительная активность, перекисное окисление липидов, сыворотка крови, спермоплазма.

Abstract

Introduction. In the article, there is described a new method developed to assess the state of the protective, antioxidant capacity of lipid-containing structures of blood serum and spermoplasm, taking into account the nature of the response of phospholipase A2 (FLA2) to the effect of short-wave monochromatic light flux, which can initiate the process of free-radical oxidation and oxidative modification of lipids in vitro.

Purpose. To develop a method for determination of the state of protective antioxidant capacity of lipid structures of blood serum and spermoplasm in conditions of exposure to samples of biological fluids of the factors of initiation of oxidative stress.

Materials and methods. The study included 30 samples of blood serum and 25 samples of ejaculate from healthy men. The research was carried out on the base of the BelMAPO Research laboratory in the period 2018–2019. The analytical characteristics of the developed method were selected, as well as the studies to assess the state of the antioxidant status in blood serum and spermoplasm using the developed method for parallel determination of lipid peroxidation products in the samples of biological material.

Results and discussion. During the experiment, there were selected the conditions for irradiating samples (wavelength (λ) 423 nm, time of irradiation of blood serum – 10 minutes, irradiation of spermoplasm – 15 minutes) and determination of the activity of FLA2 using the spectrophotometer RV 2201 ("SOLAR", Republic of Belarus). The manifestation of the enzymatic activity of FLA2 in response to the effect of short-wave monochromatic radiation on a biological object depends on the antioxidant security of the body, which has the effect of biological protection of membrane phospholipids from free radical oxidation (SRO). Comparison of indicators of FLA2 activity before and after exposure of the factor of initiation of free radical oxidation in the studied biological material characterizes the state of antioxidant protection of lipid complexes of biological fluids.

Conclusions. The developed method for evaluation of the protective reaction of the lipid structures of blood serum and spermoplasm to the effect of the factor that initiates the state of oxidative stress lets to evaluate the state of antioxidant security of the body by changing the enzymatic activity of FLA2, as well as to give the idea of the state of antioxidant protection of lipid structures of biological fluids and membranes of cell elements. It can be used to develop a new methodology for the study of antioxidant protection based on the "pairing" of phospholipid complexes of biological material and biological (antioxidant) protection.

Keywords: phospholipase A2, oxidative stress, antioxidant activity, lipid peroxidation, blood serum, spermoplasm.

■ ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные факторы внешней и внутренней среды (радиация, ультрафиолетовое облучение, воспалительные процессы и др.) способны вызывать состояние оксидативного стресса, выраженность которого зависит от антиоксидантного статуса клеток, тканей отдельных органов и целостного организма. Под оксидативным стрессом понимают нарушение равновесия в организме между образованием активных форм кислорода и способностью биологических систем к их инактивации, а также восстановлению тканей в результате их повреждения. У здорового человека прооксидантная и антиоксидантная система постоянно находятся в сбалансированном состоянии. Образующиеся свободные радикалы инициируют так называемое перекисное окисление липидов (ПОЛ) – свободнорадикальное окисление ненасыщенных жирных кислот (НЖК) в биомембранах, приводящее к образованию гидроперекисей липидов. Следствием цепных реакций окисления является возрастание продуктов ПОЛ, способных вызывать нарушение структуры различных биосубстратов и тем самым повреждать белки и липиды биомембран, инактивировать ферменты, изменять строение макромолекул, целостность клетки и внутриклеточных органелл.

В живых организмах существует сложная система регуляции интенсивности процессов ПОЛ. В норме процессы образования и расходования продуктов ПОЛ хорошо сбалансированы, что определяет их относительно низкое содержание в клетках. При развитии патологического процесса баланс образования и расходования перекисей и других продуктов ПОЛ может нарушаться, метаболиты накапливаются в тканях и биологических жидкостях, что приводит к серьезным нарушениям, в первую очередь в биологических мембранах, а также к ослаблению системы антиокислительной защиты в целом [1, 2].

Вопреки «устоявшемуся» мнению о том, что про-/антиоксидантный баланс определяется соотношением прооксидантов и антиоксидантов, специалисты-биофизики не без основания полагают, что в его формировании существенную роль играют структурно-функциональные свойства мембран и липидно-белковых комплексов, во многом определяемые молярным соотношением фосфолипидов (ФЛ) и холестерола, а также фракционным составом общих ФЛ.

Фосфолипаза – фермент, гидролизующий фосфолипиды. Различают 4 основных класса фосфолипаз: A, B, C и D, каждый из которых гидролизует определенную связь в фосфолипиде. Фосфолипазы и продукты осуществляемых ими ферментативных реакций имеют важное значение в обеспечении жизнедеятельности организма. Увеличение содержания окисленных фосфолипидов в мембране влечет за собой повышение активности ФЛА2, осуществляющей высвобождение из молекул фосфолипидов полиненасыщенных жирных кислот (трансформирующихся в биологически активные соединения) с преобразованием фосфолипидов в лизофосфолипиды, которые отличаются своими биофизическими и биохимическими свойствами от молекул-предшественников и обладают детергентным действием. Особый интерес представляют данные о том, что ФЛА2 способна удалять окисленные и разрушенные фосфолипиды из мембран, обеспечивая защитную реакцию

против свободнорадикального окисления липидов. Все это позволяет судить и о защитной, антиоксидантной способности структурно-функциональных свойств мембран и находящихся в биологических жидкостях липидно-белковых комплексов. Выраженность этой способности предложено косвенно оценивать с использованием тестов, показатели которых отражают отклик поврежденных структур (мембран, липидно-белковых комплексов) в ответ на влияние факторов, создающих оксидативный стресс [3–6].

Н.М. Литвинко (и др.) было показано, что таким тестом является изменение активности ФЛА2 на облучение биологических объектов ультрафиолетовым светом [7].

Известно, что проявление ферментативной активности ФЛА2 тесно связано с объемом образования окисленных ФЛ в условиях «окислительного стресса». Развитие этого процесса зависит от антиоксидантной обеспеченности организма, оказывающей эффект биологической защиты ФЛ мембран от СРО.

В ходе выполненения исследований был использован новый разработанный метод определения состояния защитной антиокислительной способности липидсодержащих соединений (структур) сыворотки крови и спермоплазмы по характеру создаваемой ими ответной реакции ФЛА2 на воздействие коротковолнового монохроматического светового потока, вызывающего процесс СРО и окислительной модификации липидов в условиях in vitro.

Предложенный метод базируется на представлении о том, что эффект воздействия факторов, способных «провоцировать» в биологических жидкостях и клеточных элементах тканей свободнорадикальное окисление (СРО) липидов, во многом зависит от исходной антиоксидантной способности биологических объектов, определяемой комплексом факторов – как биохимических, так и биофизических (физико-химических), отчасти связанных со структурным строением мембран и липидно-белковых ассоциатов. В случае ослабления антиоксидантной защиты биологических структур возрастает вероятность СРО ненасыщенных жирных кислот (ЖК) – ФЛ. Поскольку окисленные ФЛ представляют собой наилучший субстрат для ФЛА2, это приводит к ее повышенной функциональной активности, а последующее сопоставление показателей активности ФЛА2 до и после воздействия фактора инициации СРО на биологический материал характеризует состояние антиокислительной защиты мембран клеток и липидно-белковых компонентов биологических жидкостей [2, 4].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать метод определения состояния защитной антиокислительной способности липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы в условиях воздействия на пробы биологических жидкостей факторов инициации оксидативного стресса.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе Научно-исследовательской лаборатории БелМАПО в период 2018–2019 гг.

В качестве биологического материала для исследования использовалась сыворотка крови 30 практически здоровых людей и эякулят 25 мужчин.

Всеми обследуемыми было подписано информированное согласие на участие в проведении исследований. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association declaration of Helsinki).

Взятие крови у пациентов (с целью получения сыворотки) осуществлялось утром натощак, путем венепункции локтевой вены, в количестве 5 мл в соответствии с положениями приложения к Приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 № 1123 «Об утверждении Инструкции о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований», а также совместных рекомендаций рабочей группы по преаналитическим вопросам (WG-PRE) Европейской федерации клинической химии и лабораторной медицины (EFLM) и Латиноамериканской рабочей группы по преаналитическим вопросам (WG-PRE-LATAM) Латиноамериканской конфедерации клинической химии (COLABIOCLI) – EFLM-COLABIOCLI – по взятию образцов венозной крови [8].

Эякулят исследовали после полового воздержания продолжительностью от 2 до 7 суток, получали путем мастурбации в специальном помещении в медицинском учреждении, располагающем необходимыми условиями для лабораторного (морфологического и биохимического) анализа. Эякулят собирали в специальный чистый контейнер с широким горлом из пластика или стекла. Контейнер с образцом доставлялся в лабораторию в течение 1 часа после сбора при температуре хранения +27–37 °С. При этом избегали резких температурных перепадов.

Лабораторные исследования сыворотки крови и спермоплазмы проводили сразу после доставки биологического материала в лабораторию. В случае необходимости выполнения отсроченных исследований аликвоты пробы сыворотки крови и спермоплазмы вносили в ряд пробирок (типа Эппендорфа), замораживали и хранили в рефрижераторе при температуре –20 °С, избегая повторного замораживания.

Методы исследования

Для определения активности ФЛА2 применялся гемопротеиновый метод, основанный на регистрации разностного спектра, особенностью которого является использование мицеллярной формы субстрата. В ходе работы проводили определение активности ФЛА2 нативного и облученного материала. Определение активности ФЛА2 в сыворотке крови и спермоплазме проводили с помощью набора реагентов «ФЛА2-ФОА» производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

Суть метода определения активности ФЛА2 заключается в том, что в процессе фосфолиполиза, осуществляемого с участием ФЛА2, под действием продукта фосфолиполитической реакции – жирной кислоты, происходит превращение метгемоглобина в гемихром, что регистрируется спектрофотометрически при записи в кинетическом режиме дифференциального спектра в видимой области с фиксацией

пика (максимума) абсорбции при 423 нм и минимума – при 405 нм. Интенсивность поглощения между этими экстремумами пропорциональна концентрации образующейся жирной кислоты, а следовательно, и активности ФЛА2 [7, 9].

Определение общей антиокислительной активности (ОАА) в сыворотке крови и спермоплазме проводили с помощью набора реагентов «ОксиСтат» производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Метод основан на учете изменения оптической плотности хромогена, содержащего катион-радикал 2,2-азино-бис-[3-этилбенз-тиазолин-6-сульфокислоты]-диаммонийная соль (АБТС•+), который придает раствору характерное зелено-голубое окрашивание. Содержащиеся в опытной и стандартной пробах антиоксиданты восстанавливают определенное число молекул АБТС•+ пропорционально своей активности и концентрации в образце, поэтому после их внесения выраженность окрашивания (оптическая плотность) уменьшается. Для оценки состояния ОАА учитывались показатели оптической плотности стандартной и опытных проб.

О состоянии процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию первичных и вторичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов $ДК_{233}$ и диенкетонов $ДК_{278}$ методом ультрафиолетовой фотометрии. Для количественной характеристики процессов ПОЛ использовали показатели поглощения липидными экстрактами ультрафиолетового света с длиной волны 233 нм, 278 нм, отражающие содержание соединений с конъюгированным типом связи и кетоновой группировкой (соответственно). Малоновый диальдегид (МДА) определяли методом, основанным на реакции образования окрашенных комплексов с тиобарбитуровой кислотой, при этом интенсивность окраски образованного комплекса измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре «СОЛАР» РВ 2201. Расчет проводили в единицах оптической плотности с пересчетом на 1 мл плазмы [10, 11].

Для достижения стандартизации в режиме исследования, необходимой для внедрения новой технологии в практику клинико-лабораторных исследований, требуется реализация ее с использованием зарегистрированного Министерством здравоохранения Республики Беларусь оборудования. Из такового, имеющегося на отечественном рынке, наиболее полно отвечает требованиям стандартизации этой технологии автоматизированный фотометр (спектрофотометр) РВ 2201 («СОЛАР», Республика Беларусь), обладающий достаточно мощной импульсной ксеноновой лампой и позволяющий в стандартизованном режиме производить облучение монохроматическим световым потоком биологических объектов, а также осуществлять инициацию процесса свободнорадикального окисления в биологическом материале с использованием той же длины волны светового потока, которая требуется для определения активности ФЛА2, что упрощает и повышает надежность лабораторного исследования.

Коротковолновое световое облучение содержащейся в реакционной кювете исследуемой пробы биологической жидкости проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см в кюветном отделении спектрофотометра «СОЛАР» РВ 2201, оснащенного оригинальной ксеноновой лампой серии 1100 (США) с короткой дугой. Лампа генерирует

микросекундные импульсы широкополосного света высокой интенсивности излучения (энергия вспышки 0,5 Дж, частота вспышки до 300 Гц, рассеиваемая мощность до 20 Вт) [10].

Спектрофотометр «СОЛАР» успешно прошел клиническую апробацию в лабораторной практике, его использование позволило стандартизовать не только условия облучения пробы, но и процедуру последующего проведения биохимической реакции in vitro с регистрацией результатов в спектральном диапазоне от 190 до 1100 нм, включая определение активности ФЛА2, $ДК_{233}$ и $ДК_{278}$, с применением прямоугольных кювет с длиной оптического пути 10, 20, 30, 50 и 100 мм.

Основными этапами выполненного исследования явились:

- оценка аналитических характеристик метода исследования способности биологических жидкостей (сыворотка крови, спермоплазма) ингибировать процесс активации свободнорадикального окисления в условиях воздействия коротковолнового светового облучения (в условиях in vitro);
- расчет аналитических параметров на предмет определения показателей сходимости, воспроизводимости, достоверности полученных результатов;
- апробация модели метода определения антиокислительной способности липидсодержащих структур биологических жидкостей (сыворотки крови и спермоплазмы) с целью выработки рекомендаций по его использованию в клинической практике.

Для статистической обработки результатов исследования использовали:

– пакеты приложений Microsoft Office XP и программы Statistica (версия 6.0);
– параметрические и непараметрические методы статистической обработки, использование которых рекомендовано для биологии и медицины.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная часть работы на первом этапе ее выполнения сводилась к обоснованию возможности использования для активации свободнорадикального окисления липидов монохроматических световых потоков в видимой области спектра и подбору аналитических характеристик метода исследования способности биологических жидкостей (сыворотки крови, спермоплазмы) ингибировать процесс активации свободнорадикального окисления в условиях воздействия коротковолнового светового облучения (в условиях in vitro).

Современное (в том числе отечественное) фотометрическое оборудование допускает возможность использования в клинико-лабораторной практике излучения в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра. Вызванные им биологические эффекты зависят от длины волны, дозы и энергетических параметров светового излучения. Данные характеристики являются биотропными, то есть обусловливают влияние излучения на биологические объекты [12].

Связь между длиной волны монохроматических световых потоков и эффектом их влияния на состояние молекул биологических объектов представлена в табл. 1.

Таблица 1
Значение длин волн, частот и энергий излучения, соответствующих различным областям электромагнитного спектра [13]

Длина волны, ммк	Частота, сек.$^{-1}$	Энергия излучения, ккал/моль	Область спектра	Результат действия излучения
1000	3×10^{14}	29	Инфракрасная	Возбуждение молекулярных колебаний
800	$3{,}8\times10^{14}$	36	Граница видимой области: красная оранжевая желтая зеленая синяя фиолетовая ультрафиолетовая	Электронное возбуждение, обусловленное поглощением в видимой и ультрафиолетовой областях спектра
700	$4{,}3\times10^{14}$	41		
620	$4{,}9\times10^{14}$	46		
580	$5{,}2\times10^{14}$	49		
530	$5{,}8\times10^{14}$	54		
470	$6{,}4\times10^{14}$	60		
420	$7{,}2\times10^{14}$	68		
400	$7{,}5\times10^{14}$	71		
300	$1{,}0\times10^{15}$	95		
200	$1{,}5\times10^{15}$	143		

Table 1
The value of wavelengths, frequencies and radiation energies corresponding to different regions of the electromagnetic spectrum [13]

Wavelength, mmk	Frequency, seconds^{-1}	Radiation energy, kcal/mol	Spectral region	The result of the action of radiation
1000	3×10^{14}	29	Infrared	Excitation of molecular vibrations
800	3.8×10^{14}	36	The border of the visible area: red orange yellow green blue purple ultraviolet	Electronic excitation due to absorption in the visible and ultraviolet regions of the spectrum
700	4.3×10^{14}	41		
620	4.9×10^{14}	46		
580	5.2×10^{14}	49		
530	5.8×10^{14}	54		
470	6.4×10^{14}	60		
420	7.2×10^{14}	68		
400	7.5×10^{14}	71		
300	1.0×10^{15}	95		
200	1.5×10^{15}	143		

Соотношение уровня энергии различных видов излучения (отражаемых показателями частоты и длины волны светового излучения) и величины энергии некоторых химических связей приведено на рис. 1.

Из представленных в табл. 1 и на рис. 1 сведений следует, что монохроматический световой поток с длиной волны λ 423 нм способен разрушать не только водородные, но и ковалентные связи (в том числе между атомами углерода).

Энергия светового излучения в области длин волн 200–400 нм лежит в пределах 140–70 ккал. Эта энергия может поглощаться разными биологическими важными субстратами и приводить к образованию высокоактивных продуктов – радикалов, способных вступать в многочисленные реакции с окружающей средой. Эти первичные высокоактивные химические продукты будут определять развитие последующих, вторичных реакций, приводящих к тому или иному биологическому эффекту [14, 15].

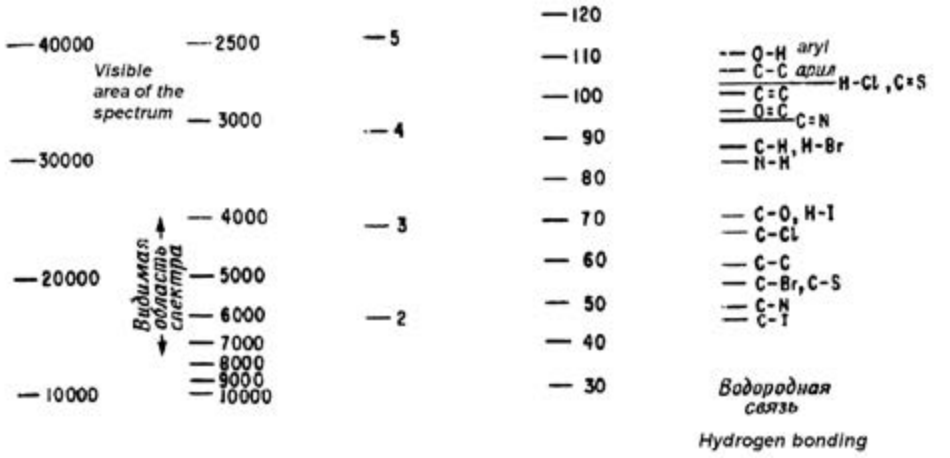


Рис. 1. Связь между уровнем энергии различных видов излучения (отражаемых показателями частоты и длины волны светового излучения) и величиной энергии некоторых химических связей

Примечание:
в первом, втором и четвертом вертикальных столбцах приведены показатели частоты, длины волны света и энергии химических связей.

Fig. 1. The relationship between the energy level of different types of radiation (reflected by the frequency and wavelength of light radiation) and the amount of energy of certain chemical bonds

Note:
The first, second, and fourth vertical columns show the frequency, wavelength, and energy of chemical bonds.

С учетом этого коротковолновое световое облучение содержащейся в реакционной кювете исследуемой пробы биологической жидкости проводилось при длине волны λ 423 нм и λ 340 нм в кюветном отделении спектрофотометра «СОЛАР» РВ 2201.

В ходе экспериментальной работы было проведено сравнительное изучение эффекта влияния монохроматических световых потоков с длиной волны λ 423 нм и λ 340 нм на активность ФЛА2, содержание продуктов ПОЛ (ДК$_{233}$, ДК$_{278}$, МДА и ОАА в пробах сыворотки крови (с предварительно установленной (до фотооблучения) активностью ФЛА2) в разные периоды времени – от 1 до 15 минут: через 1, 2, 5, 10 и 15 минут.

С учетом того, что энергетический эффект влияния монохроматического светового потока с более короткой длиной волны – 340 нм – значительно выше такового с длиной волны λ 423 нм, при использовании ультрафиолетового светового потока интервалы исследования показателей активности ФЛА2 и состояния системы «ПОЛ – общая ОАА» были выбраны более короткими (по сравнению с таковыми при использовании фиолетового светового потока – с λ 423 нм). Тем более что, судя по ранее полученным нами данным, при определении содержания продуктов ПОЛ и общей ОАА не было выявлено характерных для эффекта влияния фактора инициации СРО липидов – облучения монохроматическим световым потоком с λ 340 нм, изменений, сводящихся к накоплению продуктов ПОЛ и снижению ОАА.

Данные по изменению (в различные периоды времени) активности ФЛА2, отражающие проявление защитной способности биологических жидкостей – сыворотки крови, представлены в табл. 2.

Таблица 2
Сравнение показателей активности ФЛА2 и состояния системы «ПОЛ – ОАА» в пробах сыворотки крови при фотооблучении реакционной смеси монохроматическими световыми потоками в различные периоды времени, X±Sx

Показатель	Длина волны (λ), нм	
	340	423
ФЛА2, МЕ/л		
Натив	3,1±0,10	–
1 минута	3,12±0,11	–
2 минуты	3,44±0,11	–
5 минут	2,08±0,02	–
Натив	3,81±1,71	3,58±1,45
5 минут	1,53±0,57	1,86±0,71
10 минут	1,24±0,57	4,16±1,29
15 минут	1,08±0,58	1,86±0,72
ДК233, усл. ед.		
Натив	2,46±0,001	–
1 минута	2,03±0,01	–
2 минуты	1,17±0,13	–
5 минут	1,94±0,03	–
Натив	1,98±0,57	2,07±0,48
5 минут	1,13±0,33	1,89±0,43
10 минут	1,09±0,02	0,89±0,32
15 минут	0,94±0,22	1,22±0,26
МДА, мкмоль/л		
Натив	7,22±0,001	–
1 минута	6,61±0,25	–
2 минуты	5,54±0,34	–
5 минут	6,47±0,21	–
Натив	7,96±0,77	7,58±0,79
5 минут	7,02±0,67	7,49±0,70
10 минут	7,49±0,64	6,65±0,52
15 минут	7,06±0,81	6,61±0,44
ОАА, ммоль/л		
Натив	1,09±0,001	–
1 минута	1,13±0,02	–
2 минуты	1,18±0,001	–
5 минут	1,14±0,01	–
Натив	1,53±0,02	1,39±0,14
5 минут	1,65±0,02	1,48±0,20
10 минут	1,63±0,02	1,61±0,21
15 минут	1,61±0,02	1,58±0,13

Table 2
Comparison of indicators of FLA2 activity and the state of the "POL-AOA" system in blood serum samples during photo-irradiation of the reaction mixture with monochromatic light streams in different time periods, X±Sx

Indicator	Wavelength (λ), nm	
	340	423
FLA2, ME/l		
native	3.1±0.10	–
1 min	3.12±0.11	–
2 min	3.44±0.11	–
5 min	2.08±0.02	–
native	3.81±1.71	3.58±1.45
5 min	1.53±0.57	1.86±0.71
10 min	1.24±0.57	4.16±1.29
15 min	1.08±0.58	1.86±0.72
DK233, conv. unit		
native	2.46±0.001	–
1 min	2.03±0.01	–
2 min	1.17±0.13	–
5 min	1.94±0.03	–
native	1.98±0.57	2.07±0.48
5 min	1.13±0.33	1.89±0.43
10 min	1.09±0.02	0.89±0.32
15 min	0.94±0.22	1.22±0.26
MDA, mmol/l		
native	7.22±0.001	–
1 min	6.61±0.25	–
2 min	5.54±0.34	–
5 min	6.47±0.21	–
native	7.96±0.77	7.58±0.79
5 min	7.02±0.67	7.49±0.70
10 min	7.49±0.64	6.65±0.52
15 min	7.06±0.81	6.61±0.44
AOA, mmol/l		
native	1.09±0.001	–
1 min	1.13±0.02	–
2 min	1.18±0.001	–
5 min	1.14±0.01	–
native	1.53±0.02	1.39±0.14
5 min	1.65±0.02	1.48±0.20
10 min	1.63±0.02	1.61±0.21
15 min	1.61±0.02	1.58±0.13

Полученные в ходе эксперимента данные подтвердили ранее сделанное заключение о наблюдаемом в условиях выполнения фотометрического исследования с использованием конкретной модели стандартного отечественного фотометрического оборудования о том, что увеличение активности ФЛА2 приходится на 10-ю минуту (4,16/3,58) на фоне снижения уровня первичных продуктов ПОЛ – $ДК_{233}$ (0,89/2,07) и вторичных продуктов ПОЛ – МДА (6,65/7,58) и увеличения показателей ОАА (1,61/1,39). Вместе с тем полученные данные отражают правомочность применения новой методологии исследования, реализованной в стандартных условиях на конкретной модели

отечественного фотометрического оборудования – спектрофотометра «СОЛАР» РВ 2201, для оценки общей ОАА in situ по характерной динамике изменения активности ФЛА2.

Что касается серии исследований с применением для фотооблучения анализируемой пробы монохроматического светового потока с длиной волны 340 нм, то, как и ожидалось, увеличение активности ФЛА2 происходит через значительно более короткий промежуток времени – 2 минуты (3,44/3,10). И в этом случае, как и в условиях выполнения исследований с использованием монохроматического светового потока с λ 423 нм, происходило увеличение показателей общей ОАА (1,18/1,09) на фоне снижения уровней первичных – $ДК_{233}$ (1,17/2,46) и вторичных – МДА (5,54/7,22) продуктов ПОЛ.

Полученные результаты позволяют полагать, что под влиянием более энергичного светового облучения первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты ($ДК_{233}$) образуются в короткий промежуток времени, преобразуясь во вторичные продукты ПОЛ – МДА. Так, если до облучения соотношение показателей МДА/$ДК_{233}$ (7,22/2,46) составило 2,93, то через 2 минуты (5,54/1,17) – 4,73, что, с одной стороны, говорит об увеличении объема образования продуктов СРО под влиянием факторов его инициации, а с другой – о быстрой трансформации первичных продуктов ПОЛ во вторичные.

Далее проводили подбор временного интервала при коротковолновом световом облучении и установление аналитических характеристик метода оценки защитной (судя по характеру изменения активности ФЛА2) реакции биологических структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего СРО липидов.

Биологический материал (сыворотку крови, спермоплазму) с предварительно установленной в его пробах активностью ФЛА2 подвергали спектрофотометрическому облучению монохроматическим световым потоком с длиной волны (λ) 423 нм в течение 5, 10, 15 и 20 минут. По окончании отдельных периодов облучения проводили определение активности ФЛА2 облученного материала с последующим сопоставлением полученных результатов с данными, отражающими исходные (до облучения) показатели активности ФЛА2.

Данные по изменению (в различные периоды времени) активности ФЛА2, отражающие проявление защитной способности сыворотки крови и спермоплазмы, представлены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 данных следует, что оптимальным (по достижению максимума изменений активности ФЛА2) временным

Таблица 3

Показатели активности ФЛА2 сыворотки крови и спермоплазмы в различные периоды фотооблучения проб реакционной смеси с содержащимся в ней биологическим материалом (λ) 423

Показатель	Исследуемая биологическая жидкость							
	Сыворотка крови				Спермоплазма			
Время, мин.	**5**	**10**	**15**	**20**	**5**	**10**	**15**	**20**
Активность ФЛА2 (МЕ/л), X±Sx	3,41±0,02	7,72±0,05	4,04±0,03	3,43±0,02	12,54±0,11	13,38±0,04	19,02±0,10	13,38±0,04

Table 3
Indicators of FLA2 activity of blood serum and spermoplasm in different periods of photo-irradiation of samples of the reaction mixture with the biological material contained in it (λ) 423

Indicator	Biological fluid under study							
	Blood serum				Spermoplasma			
Time, min	5	10	15	20	5	10	15	20
FLA2 activity (ME/l), X±Sx	3.41±0.02	7.72±0.05	4.04±0.03	3.43±0.02	12.54±0.11	13.38±0.04	19.02±0.10	13.38±0.04

интервалом облучения объекта исследования монохроматическим световым потоком с длиной волны 423 нм для сыворотки крови является 10 минут, а для спермоплазмы – 15 минут.

Произведена оценка аналитических характеристик разрабатываемого метода по установлению показателей сходимости, воспроизводимости и достоверности результатов исследования в серии.

Для оценки сходимости результатов измерений (соответствие результатов повторных определений в одном и том же материале, полученных в максимально строго контролируемых условиях) использовали аликвоты двух различных образцов сливной облученной сыворотки крови. Данные образцы анализировали 20 раз в соответствии с методикой испытаний в условиях повторяемости (1 исследователь, 1 день, одно и то же оборудование). Полученные результаты подвергались статистическому анализу с установлением Хср., среднеквадратичного отклонения S и определением относительного стандартного отклонения (CV). Результаты измерений образцов находились в пределах Хср±2S и составляли 5,93±0,10, 3,59±0,28 соответственно. Коэффициент вариации в образцах составил 1,77; 7,80, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа.

Оценку воспроизводимости результатов исследования (соответствие результатов повторных определений, полученных при выполнении исследований проб одного и того же биологического материала в различных условиях его анализирования) в серии проводили с использованием 20 образцов одного и того же биологического материала: с использованием двух образцов сливной облученной сыворотки крови. Полученные результаты подвергались статистическому анализу с установлением Хср, среднеквадратичного отклонения S и определения относительного стандартного отклонения (CV). Результаты измерений образцов находились в пределах Хср±2S и составляли 2,03±0,03, 3,84±0,05, 2,57±0,85, 3,31±0,86. Коэффициент вариации в образцах составил 2,97; 5,88, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа.

При оценке сходимости и воспроизводимости результатов исследования установлено, что CV не превышал 15%, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа, 97% измерений образцов находились в пределах Хср±2S.

О достоверности полученных результатов судили на основании данных, полученных с применением программы внутрилабораторного контроля качества SOLAR QC TooL (Республика Беларусь). При оценке воспроизводимости результатов исследования в серии методом контрольных карт (метод Шухарта) установлено, что двойное среднее квадратическое отклонение не выходит за пределы (Хср±2s), что считается критерием точности анализа.

Таким образом, метод оценки состояния защитной антиоксидантной способности липидсодержащих соединений и структур сыворотки крови и спермоплазмы по характеру создаваемой ими ответной реакции ФЛА2 на воздействие коротковолнового монохроматического светового потока, вызывающего процесс СРО и окислительной модификации липидов в условиях in vitro, по своим аналитическим свойствам удовлетворяет установленным критериям и предъявляемым к нему требованиям, имеет рабочие характеристики, соответствующие регламентированным, а измеренные с помощью данного метода параметры соответствуют должным.

Осуществлена апробация модели метода определения антиокислительной способности липидсодержащих структур биологических жидкостей (сыворотки крови и спермоплазмы) с целью выработки рекомендаций по его использованию в клинической практике.

Исследована активность ФЛА2 30 проб сыворотки крови и 25 проб спермоплазмы в соответствии с установленными оптимальными интервалами замера оптической плотности анализируемых образцов биологического материала (табл. 4).

Выявлена одинаковая для всех проб направленность (в сторону увеличения) изменений активности ФЛА2 исследуемой биологической жидкости, наибольшая выраженность которой констатирована через 10 минут после облучения сыворотки крови и через 15 минут после облучения спермоплазмы.

Для установления зависимости между показателями, отражающими состояние про-/антиоксидантного баланса и активности ФЛА2,

Таблица 4
Показатели активности ФЛА2 (МЕ/л) в отдельных пробах сыворотки крови и спермоплазмы до и после фотооблучения монохроматическим световым потоком с длиной волны 423 нм содержащегося в реакционной смеси биологического материала, X±Sx

Показатели	Среднее значение, X±Sx
Сыворотка крови (n=30)	
Активность ФЛА2, МЕ/л (до фотооблучения)	4,29±1,16
Активность ФЛА2, МЕ/л (после 10' фотооблучения)	7,30±1,87
Спермоплазма (n=25)	
Активность ФЛА2, МЕ/л (до фотооблучения)	7,77±3,35
Активность ФЛА2, МЕ/л (после 15' фотооблучения)	19,53±6,70

Table 4
Indicators of FLA2 activity (ME/l) in individual samples of blood serum and spermoplasm before and after photo-irradiation with a monochromatic light stream with a wavelength of 423 nm of the biological material contained in the reaction mixture, X±Sx

Indicator	Average, X±Sx
Blood serum (n=30)	
FLA2 activity, ME/l (before photo-radiation)	4.29±1.16
FLA2 activity, ME/l (after 10' photo-radiation)	7.30±1.87
Spermoplasma (n=25)	
FLA2 activity, ME/l (before photo-radiation)	7.77±3.35
FLA2 activity, ME/l (after 15' photo-radiation)	19.53±6.70

параллельно выполнено исследование содержания $ДК_{233}$, $ДК_{278}$ и активности ФЛА2 через определенные интервалы времени.

Выявленная направленность изменения содержания $ДК_{278}$ к повышению через 10 минут после облучения позволяет сделать вывод о том, что уменьшение содержания $ДК_{233}$ сопровождается увеличением $ДК_{278}$ вследствие превращения $ДК_{233}$ в $ДК_{278}$. При этом уровень $ДК_{278}$ в динамике наблюдения возрастает.

Для суждения о состоянии про-/антиоксидантного баланса проведено определение всех анализируемых проб сыворотки крови на содержание общей ОАА. Происходящие под влиянием фотооблучения сыворотки крови изменения показателей про-/антиоксидантной системы отражены на рис. 2.

На рис. 2 показано, что на фоне уменьшения $ДК_{233}$ увеличивается общая антиокислительная активность (с пиком общей ОАА через 10 минут после облучения).

Установлено, что увеличение ОАА в периоде «натив – облучение 10 мин.» сопровождается увеличением активности ФЛА2 почти в два раза, по сравнению с активностью ФЛА2 в сыворотке крови до облучения. Вместе с тем повышение активности ФЛА2 под влиянием облучения биологической пробы проявляет обратную зависимость по отношению к показателям содержания $ДК_{233}$.

К тому же были рассчитаны соотношения показателей, отражающих содержание $ДК_{233}$, $ДК_{278}$, ОАА и активности ФЛА2 до и после облучения. Полученные значения соотношений измеряемых показателей в динамике фотооблучения представлены на рис. 3.

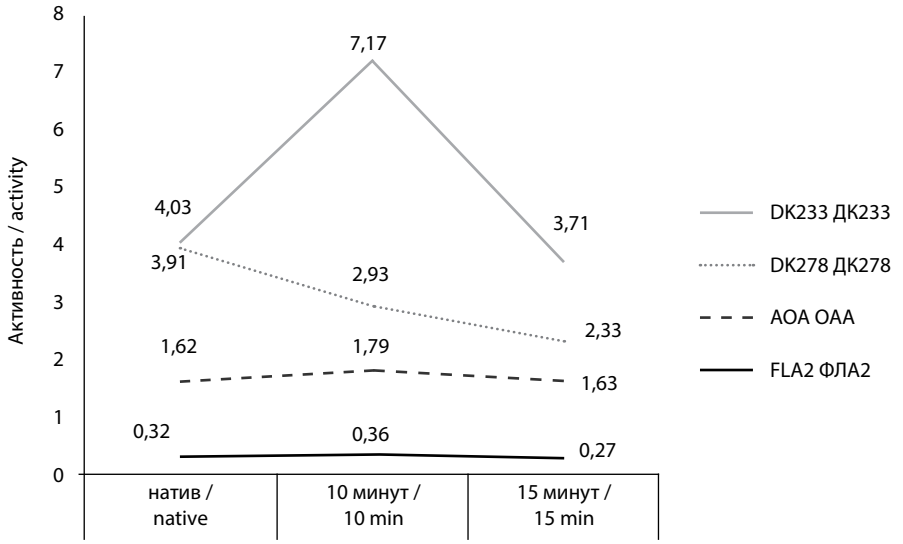


Рис. 2. Изменение показателей про-/антиоксидантной системы под влиянием фотооблучения

Fig. 2. Changes in pro-/antioxidant system parameters under the influence of photo-radiation

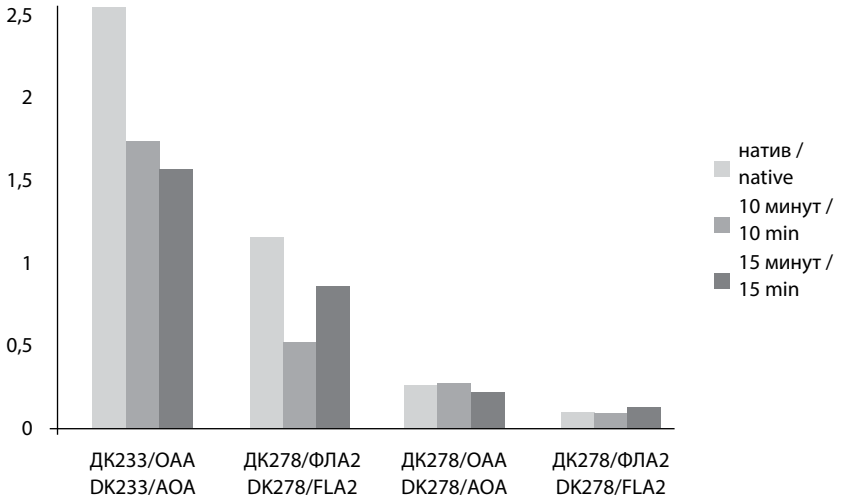


Рис. 3. Значение соотношений $ДК_{233}$/ОАА, $ДК_{278}$/ФЛА2, $ДК_{278}$/ОАА, $ДК_{278}$/ФЛА2 в динамике фотооблучения

Fig. 3. The value of the ratios DK233/AOA, DK278/FLA2, DK278/AOA, DK278/FLA2 in the dynamics of photo-radiation

Для оценки влияния фотооблучения на активность ФЛА2 и про-/антиоксидантный баланс спермоплазмы исследованы 25 проб спермоплазмы в соответствии с установленными оптимальными интервалами замера оптической плотности анализируемых образцов. Результаты представлены в табл. 5 и на рис. 4.

Таблица 5
Показатели, отражающие активность ФЛА2, содержание первичных, вторичных продуктов ПОЛ и ОАА спермоплазмы до и через 15 минут после фотооблучения анализируемой пробы биологической жидкости монохроматическим световым потоком с длиной волны 423 нм (n=25)

Показатель	Время измерения	
	До фотооблучения	После фотооблучения
ФЛА2, МЕ/л	21,07±9,24	28,4±12,1
$ДК_{233}$, усл. ед.	2,62±0,60	1,96±0,50
МДА, мкмоль/л	8,58±2,52	6,80±1,100
ОАА, ммоль/л	1,12±0,26	1,31±0,18

Table 5
Indicators reflecting the activity of FLA2, the content of primary and secondary POL and AOA products of spermoplasm before and 15 minutes after foto-irradiation of the analyzed sample of biological fluid with a monochromatic light stream with a wavelength of 423 nm (n=25)

Indicator	Measurement time	
	Before photo-radiation	After photo-radiation
FLA2, ME/l	21.07±9.24	28.4±12.1
DK_{233}, conv. unit	2.62±0.60	1.96±0.50
MDA, mmol/l	8.58±2.52	6.80±1.100
AOA, mmol/l	1.12±0.26	1.31±0.18

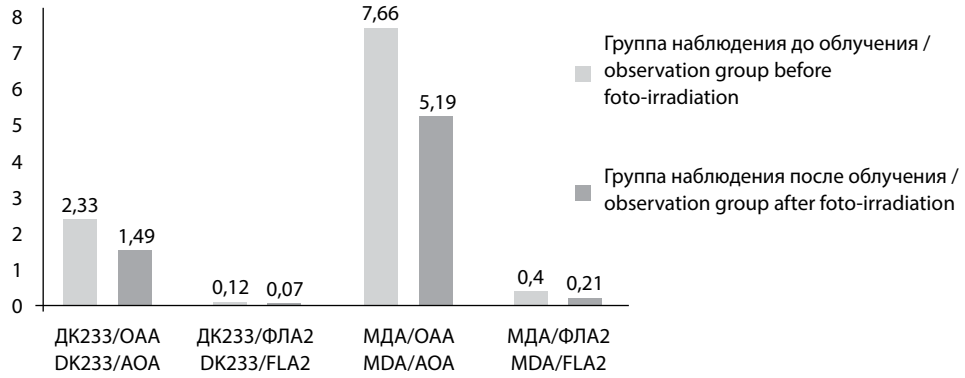


Рис. 4. Значение соотношений $ДК_{233}$/ОАА, $ДК_{233}$/ФЛА2, $МДА_{8}$/ОАА, МДА/ФЛА2 в динамике фотооблучения при длине волны 423 нм в спермоплазме

Fig. 4. The value of the ratios DK233/AOA, DK233/FLA2, MDA/AOA, MDA/FLA2 in the dynamics of photo- irradiation at a wavelength of 423 nm in spermoplasm

Из представленных в табл. 5 и на рис. 4 данных следует, что отмеченное возрастание активности ФЛА2 сопровождается увеличением общей ОАА на фоне снижения уровня $ДК_{233}$. Так, если до облучения про-/антиоксидантный баланс ($ДК_{233}$/ОАА) составил (2,62/1,12) 2,33, то после облучения (1,96/1,31) – 1,49. То же самое подтверждается результатами определения соотношения показателей содержания МДА и активности ФЛА2.

Отмеченные сочетанные сдвиги показателей исследованных тестов согласуются с таковыми, выявленными при использовании сыворотки крови, позволяя судить о том, что изменение активности ФЛА2 в спермоплазме после облучения отражает сдвиги в про/антиоксидантном балансе в сторону увеличения антиоксидантного потенциала.

На основании установленных данных можно полагать, что проявление ферментативной активности ФЛА2 тесно связано с объемом образования окисленных ФЛ в условиях «окислительного стресса»; развитие этого процесса зависит от антиоксидантной обеспеченности организма, оказывающей эффект биологической защиты ФЛ мембран от СРО. Сопоставление показателей активности ФЛА2 до и после воздействия фактора инициации СРО на биологический материал характеризует состояние антиокислительной защиты липидных структур биологических жидкостей.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С применением разработанного метода оценки защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса, оказывается возможным по изменению ферментативной активности ФЛА2 оценить состояние антиокислительной обеспеченности организма, а также дать представление о состоянии антиокислительной защиты нативных липидных структур биологических жидкостей и мембран клеточных элементов.

Представленный метод оказывается значительно более информативным, чем традиционный, базирующийся на непосредственном (прямом) определении отдельных антиоксидантов либо общей антиоксидантной активности биологического материала. А сопоставление показателей активности ФЛА2 до и после воздействия фактора инициации СРО на биоматериал характеризует состояние антиокислительной защиты мембран клеток.

Особенностью выполненного фотометрического исследования явилось то, что оно реализовано на базе современного зарегистрированного Министерством здравоохранения Республики Беларусь измерительного оборудования – спектрофотометра «СОЛАР» РВ 2201. Это не только повысило надежность лабораторного исследования, но и открыло потенциальную возможность для широкого внедрения в клинико-лабораторной практике новой технологии исследования. Применение данного прибора позволило стандартизовать условия облучения пробы (длина волны (λ) 423 нм, время облучения пробы сыворотки крови – 10 минут, облучения спермоплазмы – 15 минут), а также процедуру последующего определения активности ФЛА2. Это обстоятельство сделало возможным в наибольшей мере унифицировать процесс разработанной лабораторной технологии, базирующейся на использовании одной и той же длины волны как для фотооблучения пробы, так и для выполнения аналитического исследования: определения активности ФЛА2.

Данный метод оценки защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса, может быть использован специалистами различных областей клинической медицины, в том числе терапии, урологии, кардиологии, эндокринологии, гинекологии, онкологии и хирургии, для диагностики состояний антиоксидантного дефицита и мониторинга антиоксидантной терапии, проводимой пациентам с различными формами соматической патологии (ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом, воспалительными заболеваниями кишечника, бесплодием и др.), а также для оценки воздействия лекарственных препаратов на антиоксидантную систему организма, и позволяет судить об антиоксидантной емкости биологической жидкости, проявляющей эффект биологической защиты. Исследования целесообразно проводить в динамике наблюдения, что даст объективную информацию о реакции организма на воздействие внешних и внутренних факторов.

Данный метод предполагается использовать в качестве основы для разработки новой методологии исследования антиоксидантной защиты на основе своеобразия «сопряжения» фосфолипидных комплексов биологического материала и биологической (антиоксидантной) защиты организма.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Men'shchikova E. (ed.) (2006) Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. Moscow: Slovo. (in Russian)
2. McLean L.R., Hagaman K.A., Davidson W.S. (1993) Role of lipid structure in the activation of phospholipase A2 by peroxidasae phospholipids. *Lipids*, vol. 28, no 6, pp. 505–509.
3. Litvinko N., Kisel M. (1991) *Endogennye fosfolipazy A2. Struktura i funktsiya* [Endogenous phospholipases A2. Structure and function]. Minsk: Navuka i tekhnika. (in Russian)

4. Litvinko N., Gerlovskiy D., Skorostetskaya L. (2016) Antioksidantnaya sposobnost' biologicheskoy zhidkosti [Antioxidant ability of body fluid]. *Izobretatel',* no 3, pp. 10–11.
5. Litvinko N., Gerlovskiy D., Skorostetskaya L. (2015) *Sposob opredeleniya obshchey antioksidantnoy sposobnosti biologicheskoy zhidkosti s ispol'zovaniem lipidnoy fazy* [Method of determination of the total antioxidant ability of biological fluid using a lipid phase]: patent BY 19670. (in Russian)
6. Litvinko N., Skorostetskaya L., Gerlovskiy D. (2017) Fosfolipaza A2 IB – novyy indikator otsenki pro-antioksidantnogo statusa organizma [Phospholipase A2 IB is a new indicator of assessment of the pro-antioxidant status of organism]. *Doklady Natsional'noy akademii nauk Belarusi,* vol. 61, no 4, pp. 60–68.
7. Litvinko N., Kamyshnikov V., Skorostetskaya L., Antonchik G., Gerlovskiy D., Gudko T. (2014) Aprobatsiya novoy test-sistemy v model'nykh eksperimentakh na klinicheskom materiale [Testing a new test system in model experiments on clinical material]. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe,* no 4, pp. 49–57.
8. Simundich A.-M., Belenius K., Kadamuro Ya., Cherch S., Kornes M.P., van Dongen-Lazes E.K., Eker P., Erdelyanovich T., Grankvist K., Gimaraynsh Zh.T., Khok R., Ibarz M., Ivanova E., Kovalevskaya S., Kristensen G.B.B., Lima-Oliveyra G., Lippi D., fon Meyer A., Nibo M., de la Sal' B., Zaypel't K., Sumarak Z., Vermeersh P. (2019) Sovmestnye rekomendatsii EFLM-COLABIOCLI po vzyatiyu obraztsov venoznoy krovi [Joint recommendations of EFLM-COLABIOCLI for sampling venous blood]. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe,* vol. 8, no 1, pp. 101–140.
9. Kiselev P., Oreshko N., Kamyshnikov V., Yuraga T., Kokhnovich N. (2019) *Sposob opredeleniya obshchey antioksidantnoy aktivnosti biologicheskoy zhidkosti* [A method of determination of the total antioxidant activity of biological fluid]: patent BY 22479. (in Russian)
10. Kamyshnikov V., Yuraga T. (2017) Vozmozhnosti primeneniya i opyt ispol'zovaniya otechestvennogo avtomatizirovannogo biokhimicheskogo fotometra novogo pokoleniya spektrofotometra RV 2201 v praktike vypolneniya rutinnykh i nauchnykh klinicheskikh laboratornykh issledovaniy [Possibilities of application and experience of using domestic automated biochemical photometer of a new generation RV 2201 in the practice of routine and scientific clinical laboratory studies]. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe,* vol. 6, no 4, pp. 590–595.
11. Kamyshnikov V. (2002) *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike* [Handbook on clinical and biochemical laboratory diagnostics]: 2 vol. Minsk: Belarus. (in Russian)
12. Kireev P., Zagoryanskaya E. (1961) *Molekulyarnyy spektral'nyy analiz* [Molecular spectral analysis]. Moscow: Vysshaya shkola. (in Russian)
13. Zhuravlev A. (1975) *Svechenie syvorotki krovi i ego znachenie v kompleksnoy diagnostike* [Luminescence of blood serum and its significance in complex diagnostics]. Moscow: Meditsina. (in Russian)
14. Goldberg D. (eds.) (2010) *Lazero- i svetolechenie Lasers and Light* [Lasers and Light]: 2 vol. Moscow: Rid Elsiver. (in Russian)
15. Fartkhutdinov R., Likhovskikh V. (1995) *Khemilyuminestsentnye metody issledovaniya svobodnoradikal'nogo okisleniya v biologii i meditsine* [Chemiluminescent methods of research of free radical oxidation in biology and medicine]. Ufa: Bashkirskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet. (in Russian)

Поступила/Received: 18.02.2020
Контакты/Contacts: kam-prof@mail.ru, dissovet@tut.by, ahorovec@mail.ru, shahra@list.ru

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.034
УДК 577.112.3:543.632.522]:611.018:543.544.5

Дорошенко Е.М., Новогродская Я.И.
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Doroshenko Ye., Novogrodskaya Ya.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

Laboratory Diagnostic Technology for Simultaneous Determination in a Sample of the Analyzed Material (Tissue, Biological Fluid) of Homocysteine and Other Physiologically Active Aminothiols Using Highly Efficient Liquid Chromatography

Резюме

Введение. Существующие методы определения гомоцистеина в плазме (сыворотке) крови не могут быть использованы для определения в тканях из-за их недостаточной разрешающей способности.
Цель. Разработать способ одновременного определения гомоцистеина и других биологически важных аминотиолов в тканях, пригодный также для биологических жидкостей.
Материалы и методы. Обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография с предколоночной дериватизацией, градиентным элюированием и детектированием по флуоресценции. Пробоподготовка: восстановление аминотиолов в гомогенатах тканей трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлоридом и дериватизация аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом.
Результаты и обсуждение. Предложен новый способ параллельного определения в пробах анализируемого биологического материала основных представителей низкомолекулярных аминотиолов – гомоцистеина (Hcy), цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), гамма-глутамилцистеина (γGluCys) и глутатиона (GSH), пригодный для их определения в тканях. Оптимизированная селективность системы (pH и ионная сила буфера в подвижной фазе, температура

и профиль градиента) позволила уверенно детектировать Нсу и основные аминотиолы тканей крыс. Метод может быть использован при проведении исследований в области экспериментальной медицины и биохимии.
Заключение. Разработанный способ определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в тканях методом ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции после предколоночной дериватизации является воспроизводимым, чувствительным и пригодным для использования в экспериментальных и клинико-биохимических исследованиях.
Ключевые слова: аминотиолы, гомоцистеин, ткани, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Abstract

Introduction. The existing methods of determination of blood plasma homocysteine cannot be applied for tissue samples due to insufficient resolution.
Purpose. To develop a method for simultaneous determination of homocysteine and other biologically important aminothiols in tissues, which would be also suitable for biological fluids.
Materials and methods. Reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization followed by gradient elution and fluorescence detection. Sample preparation: reduction of aminothiols in the homogenates of tissues with tris(2-carboxyethyl)phosphine and derivatization with 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt.
Results and discussion. We developed a new method for quantitative measurement of low-molecular weight aminothiols – homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), cysteinylglycine (CysGly), gamma-glutamylcysteine (γGluCys), and glutathione (GSH) with resolution high enough for their determination in tissues. The optimized selectivity of the chromatographic system (pH and ionic strength of the buffer in mobile phase, temperature and profile of the gradient) let to detect the main aminothiols of rat tissues. The described method can be used in studies in the field of experimental medicine and biochemistry.
Conclusion. The proposed method for determination of low molecular weight thiol-containing compounds in tissues with HPLC method with fluorescence detection after pre-column derivatization is reproducible, sensitive and suitable for use in experimental and clinical biochemical studies.
Keywords: aminothiols**,** homocysteine, tissues, highly effective liquid chromatography.

■ ВВЕДЕНИЕ

Гомоцистеин (Нсу), а также промежуточные продукты гамма-глутамильного цикла играют важную роль в обмене серосодержащих соединений, процессах транспорта и биотрансформации веществ. По содержанию этих веществ можно судить о скорости протекания ряда метаболических процессов. Уровни низкомолекулярных аминотиолов в тканях и биологических жидкостях организма могут являться показателями метаболических нарушений при ряде форм патологии. Однако количественное определение соединений, относящихся к низкомолекулярным аминотиолам, в тканях является очень трудной задачей, разрешение которой весьма важно для установления патохимических изменений в организме при многих заболеваниях.

В литературе встречается достаточно много работ, посвященных определению низкомолекулярных аминотиолов в биологических жидкостях человека и животных [1–9], но крайне мало – в тканях.

Первые попытки определения Hcy в тканях животных были предприняты Ueland P.M., Helland S., Broch O.J., Schanche J.S. в 1984 году. Ими описан хроматографический метод определения Hcy в тканях: печени, почках, мозге, сердце, легких и селезенке мышей и крыс. Метод отличается большой сложностью, поскольку в его основе лежит радиометрическое определение Hcy по радиоактивности меченого S-аденозилгомоцистеина (AdoHcy), для образования которого сначала требуется проведение адсорбции аденозина и эндогенного AdoHcy в экстракте ткани углем, покрытым декстраном; при этом Hcy остается в растворе. Затем Hcy конденсировали с радиоактивным аденозином, а метка AdoHcy количественно определялась с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ [10].

Guan X.C. с соавт. пытались детектировать низкомолекулярные тиолсодержащие соединения: цистеин (Cys), Hcy и глутатион (GSH) в мозге, легких, сердце, почках, эритроцитах и плазме крови крыс методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией. В гомогенаты, приготовленные на хлориде калия, добавляли этиловый эфир GSH и реактив Эллмана. Белки осаждали сульфосалициловой кислотой.

Авторы подчеркивают бóльшую чувствительность данного метода по сравнению с ВЭЖХ с УФ-детектированием: метод имел одинаковую или бóльшую чувствительность по сравнению с таковым, основанным на ВЭЖХ с флуоресцентным/электрохимическим детектированием или на использовании капиллярного электрофореза. Однако Hcy был уверенно обнаружен только в мозге, плазме и эритроцитах: предположено, что в других тканях он находился в концентрации ниже предела обнаружения данного метода [11].

Поскольку авторы не восстанавливали дисульфиды, результаты применения метода не позволяют судить о полной концентрации соответствующих тиолов, так как большая часть аналитов будет присутствовать в виде дисульфидов различного состава, существенно усложняя интерпретацию результатов. Однако констатированный уровень Hcy даже в плазме крови крыс (115±146 ммоль/л) вызывает сомнения, так как многочисленные работы указывают на его более низкие значения [12–14].

Kamińska A. с соавт. предложили простой, быстрый, точный и дешевый, по их мнению, метод одновременного определения общего Cys, Hcy, GSH и N-ацетилцистеина (NAC) в гомогенатах мозга свиньи, основанный на восстановлении дисульфидных связей трис(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлоридом, с предколоночной дериватизацией свободных тиоловых групп тетрафторборатом 2-хлор-1-метилхинолиния и последующим разделением ион-парной ВЭЖХ на обращенной фазе с УФ-детектированием [15]. Метод, однако, не воспроизводился на других тканях, в частности в печени, характеризующейся весьма высокой интенсивностью обмена серосодержащих соединений.

Все перечисленные хроматографические методы характеризуются трудоемкостью, сложностью и длительностью процедуры, что затрудняет их использование в биомедицинских исследованиях. Однако основным ограничением является разрешающая способность методов, которая затрудняет их использование для проб тканей, так как спектр соединений родственной структуры в тканях значительно шире, чем в биологических жидкостях.

Беленичев И.Ф. с соавт. определяли уровень Hcy в гомогенате тканей мозга крыс иммуноферментным методом с помощью стандартного тест-набора производства PLIVA-Lachema Diagnostika в соответствии со стандартной процедурой. Однако, поскольку этот набор реагентов предназначен для определения Hcy в сыворотке крови, корректность получаемых результатов требует дальнейшей проверки. Уровень Hcy в гомогенатах мозга ложнооперированных крыс, составивших контрольную группу, – 5,6±0,52 ммоль/г ткани [16] – представляется нам сильно завышенным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка способа определения Hcy одновременно с возможно более широким кругом других тиолсодержащих соединений в тканях, с возможностью использования его и для биологических жидкостей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США), $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ (Panreac, Испания), ЭДТА (НТПК «Анализ-Х», Беларусь), трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (TCEP) (Aldrich, США), аммониевую соль 7-фторбензофуразан-4-сульфоновой кислоты (SBD-F) (Sigma, США), стандарты L-цистеина, L-гомоцистеина, цистеинилглицина (CysGly), γ-глутамилцистеина (γGluCys), глутатиона (Sigma, США), N-ацетилцистеин (Белмедпрепараты, Беларусь), трихлоруксусную кислоту (Panreac, Испания) и другие реактивы квалификации не ниже «хч». Трижды дистиллированную воду фильтровали через мембранный фильтр Millipore GV с размером пор 0,22 мкм.

Оборудование и программное обеспечение

Использовали одноканальные дозаторы переменного объема серии Лайт (Ленпипет, Россия) объемами 10–100 и 100–1000 мкл, лабораторный шейкер MS 3 basic (Ika, Германия), аналитические весы AR 2140 (Ohaus, Китай), pH-метр HI 931400 (Hanna Instruments, Германия), центрифугу Heraeus Biofuge Primo R+ (Thermo Scientific, США), водяную баню (Daihan Scientific, Южная Корея).

Жидкостный хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) включал 4-канальную систему подачи растворителя с вакуумным дегазатором G1311A, термостатируемый автосамплер G1329A, термостат колонок G1316A, детектор флуоресценции G1321C.

Идентификация веществ и количественная обработка хроматограмм производилась программой Agilent ChemStation C.01.05 по методу внутреннего стандарта. Калибровочные коэффициенты определяли по смеси стандартов определяемых веществ, которая обрабатывалась так же, как соответствующие пробы ткани.

Приготовление стандартов

Для калибровки хроматографической системы из сухих стандартов готовили водные растворы Hcy, Cys, CysGly, γGluCys и GSH концентрации

10 ммоль/л. Затем из этих растворов готовили смесь, которую доводили водой до концентрации 100 мкмоль/л (нмоль/г ткани).

Приготовление рабочих реактивов

Среду для гомогенизации готовили на основе 0,15 моль/л раствора KCl, в который ежедневно вносили 240 мг TCEP на 20 мл раствора KCl и 82 мкл 0,4% раствора NAC.

Раствор SBD-F готовили ежедневно, 1 мг SBD-F растворяли в 1 мл 0,125 моль/л Na-боратного буфера (pH 9,5).

Пробоподготовка

Наиболее близким к заявляемому методу является метод определения Hcy в биологических жидкостях [17]. За основу был взят его этап пробоподготовки.

Для отработки метода использовали образцы тканей, замороженных в жидком азоте. Пробы тканей гомогенизировали в среде для гомогенизации в соотношении 1:5 (масса/объем) и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. для восстановления аминотиолов [18]. Осаждали белки 10% раствором трихлоруксусной кислоты, пробы центрифугировали при 4 °C 15 мин. при 16 000 g и выполняли дериватизацию. Для дериватизации в микропробирку, содержащую 4 мкл 1,55 моль/л NaOH, 25 мкл 0,125 моль/л Na-боратного буфера (pH 9,5) и 10 мкл раствора SBD-F [19], добавляли 20 мкл супернатанта, инкубировали 1 час при 60 °C. В хроматографическую систему вводили 20 мкл реакционной смеси. Смесь стандартов обрабатывали аналогичным способом.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием по флуоресценции

Определение Hcy в тканях с использованием условий хроматографического разделения, оптимизированных для плазмы крови [17], невозможно ввиду интерференции пиков неизвестных компонентов пробы и пика Hcy. Для элюирования веществ, соответствующих пикам Cys и Hcy, требуется весьма низкая концентрация органического модификатора, поэтому, чтобы получить удерживание Hcy, достаточное для его четкого разделения, требуется сорбент, допускающий низкие (нулевые) концентрации органического модификатора. Нами использован сорбент Zorbax SB C_{18} (размер частиц 3,5 мкм). Разделение осуществляли с градиентным элюированием, используя две колонки 2,1×150 мм в тандемном включении с целью получения максимальной эффективности.

Состав подвижной фазы: 0,1 моль/л NaH_2PO_4, 17,4 ммоль/л H_3PO_4, 40 мг/л ЭДТА (A), ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (B). Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 29 °C. Элюирование проводили по следующей программе: 0 мин. – 0% B, 26 мин. – 0% B, 47 мин. – 15% B, 53 мин. – 25% B. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм.

Результаты выражали в нмоль определяемых веществ на 1 г массы образца (влажной ткани). Для этого концентрацию стандартов в их растворе, используемом для калибровки (100 мкмоль/л каждого), принимали за 100 нмоль/г. Данную смесь подвергали полной процедуре пробоподготовки.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подвижная фаза в начале анализа – Na-фосфатный буфер без органического модификатора. Это дает возможность:

1) использовать подвижную фазу с низкими значениями pH (ниже 3,5);
2) достичь существенно большего удерживания пика Hcy, что важно для обеспечения разрешения пиков с пиками интерферирующих соединений;
3) обеспечить высокую эффективность разделения (малую ширину пиков).

Удовлетворительного разрешения пика Hcy от интерферирующих пиков в данных условиях удалось достичь при использовании 0,1 моль/л Na-фосфатного буфера с величиной pH около 3,5 (доводится добавлением ортофосфорной кислоты до наилучшего разделения пика гомоцистеина) и с применением длительного изократического этапа перед началом градиента ацетонитрила. Использование изократического элюирования невозможно, так как время удерживания внутреннего стандарта значительно превышает 1 час. Типичная хроматограмма смеси стандартов приведена на рис. 1.

На рис. 2 и 3 представлена хроматограмма гомогената печени крысы. Видно, что эта ткань богата соединениями, дериватизирующимися с SBD-F в описанных условиях, т. е. содержащими тиольную группу. Большинство из них в данной системе выходят пиками с достаточно хорошим разрешением (неидентифицированные соединения обозначены

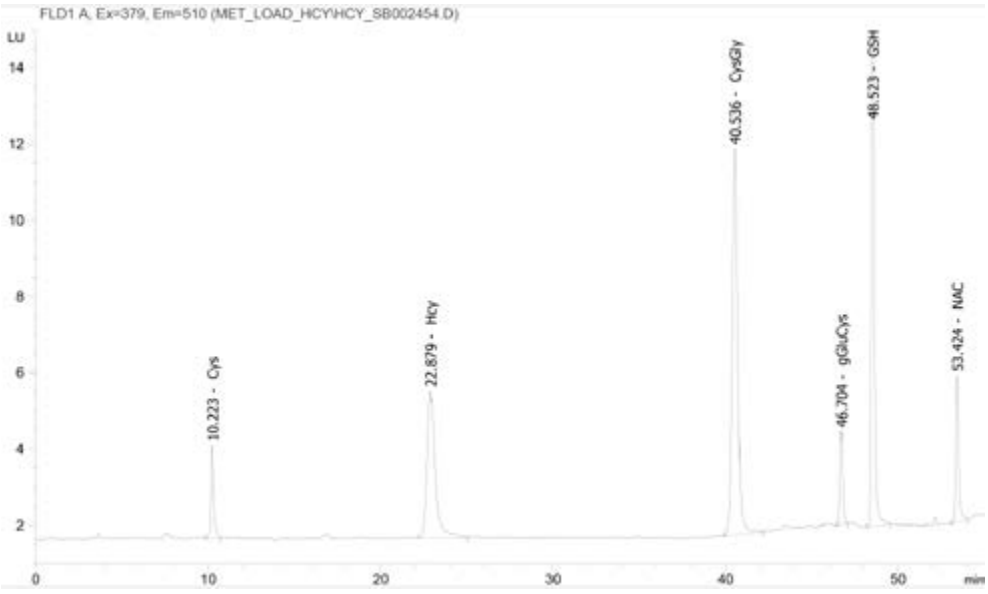


Рис. 1. Хроматограмма стандартов Cys, Hcy, CysGly, γGluCys и GSH для их определения в тканях

Fig. 1. Chromatogram of standards of Cys, Hcy, CysGly, γGluCys, and GSH for their determination in tissues

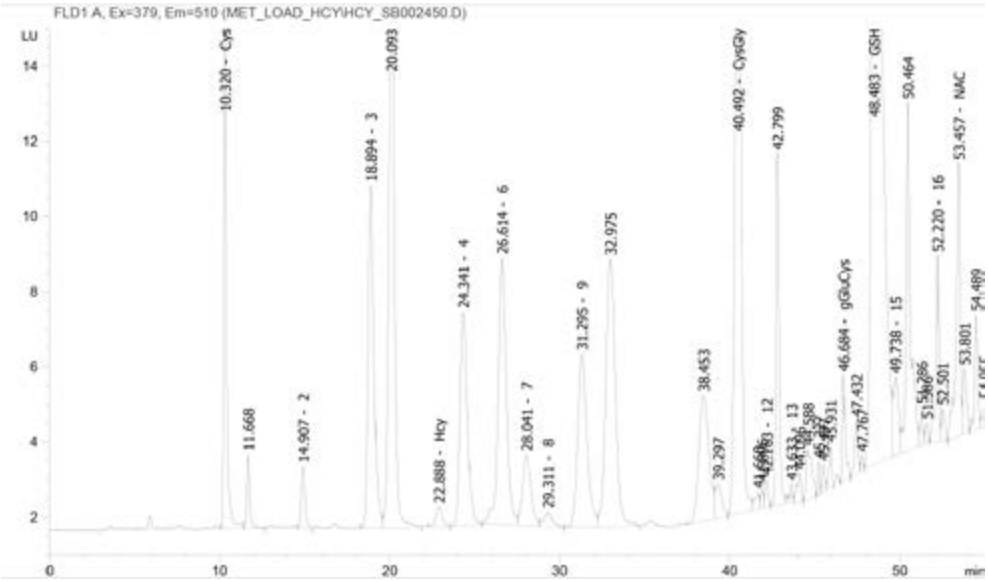


Рис. 2. Хроматограмма общего Cys, Hcy, CysGly, γGluCys и GSH печени крыс

Fig. 2. Chromatogram of total Cys, Hcy, CysGly, γGluCys, and GSH in rat liver

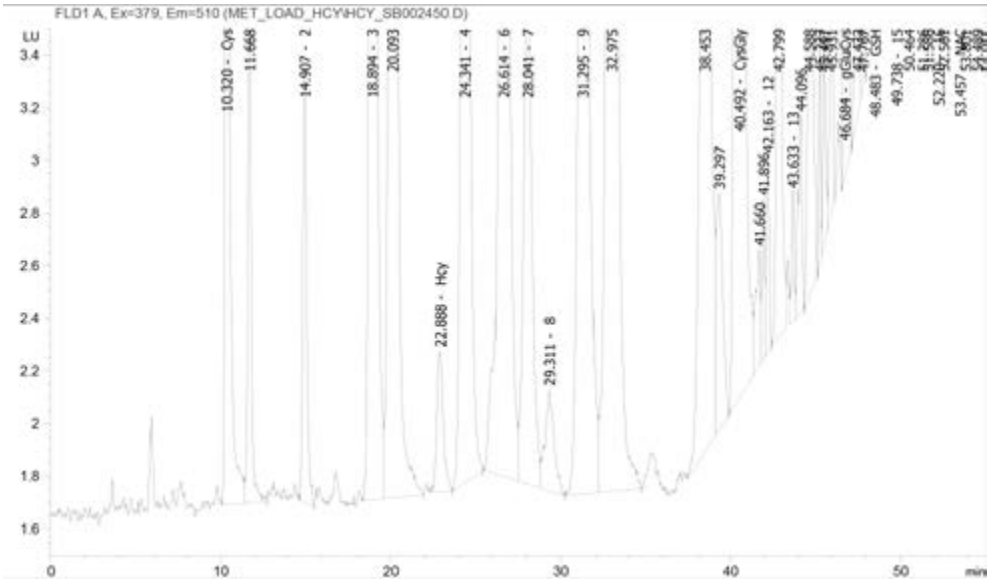


Рис. 3. Та же хроматограмма, что и на рис. 2, в более крупном масштабе. Отчетливо виден пик Hcy

Fig. 3. Larger-scale chromatogram from fig. 2. Hcy peak is clearly visible

цифрами). Уровень Hcy, пик которого имеет хорошее разрешение от интерферирующих пиков, в тканях является весьма низким.

Для подтверждения надежности определения Hcy данным способом в отдельной серии опытов нами был определен аналитический выход Hcy с использованием метода добавления стандарта. Пробу печени делили на 2 части, к одной из которых добавляли внесенную в среду для гомогенизации смесь стандартов Cys, GSH и Hcy в концентрации, соответствующей 50 нмоль/г ткани, к другой – эквиобъемное количество воды.

Аналитический выход определяли как разность полученных уровней веществ в обеих частях пробы, которую сравнивали с калибровочной кривой с учетом внутреннего стандарта и выражали в процентах от добавленного количества. Аналитический выход составил (n=10): для Cys – 97,3±15,1%; для Hcy – 103,7±4,9%; для GSH – 95,5±14,0%. Это означает, что в процессе пробоподготовки не происходит существенных потерь аналитов и уровней Hcy, определяемых в ходе исследования.

Апробация способа

Данный способ был апробирован на образцах ткани печени крыс. Показатели содержания (средние значения со средними ошибками) анализируемых компонентов в печени крыс составили: для Cys 286,71±54,697**,** Hcy – 1,16±0,168, CysGly – 82,02±8,509, γGluCys – 28,79±4,10 нмоль/г, а медиана и нижняя и верхняя квартили для GSH – 1813,50 [1559,94; 1931,21] нмоль/г. Эти данные существенно ниже приведенных в работах отдельных авторов [10, 15], что свидетельствует о том, что указанные методы не свободны от интерференций, а реальный уровень Hcy в печени сравним или ниже, чем в крови.

Для исследования предложенным способом биологических жидкостей (плазма/сыворотка крови) применения двух колонок в тандемном включении не требуется. Для разделения на одной колонке используется градиентное элюирование: 0 мин. – 0% B, 4 мин. – 5,3% B, 14,5 мин. – 9,8% B, 18 мин. – 20% B. Остальные параметры, а также состав подвижных фаз те же, что и в методе для выполнения определений в тканях. Пробоподготовка полностью аналогична [17].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в тканях методом ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции после предколоночной дериватизации является воспроизводимым, чувствительным и пригодным для использования в экспериментальных и клинико-биохимических исследованиях.

В отличие от других, описанных в литературе методов, заявляемый способ позволяет одновременно детектировать ряд биологически важных соединений: общий гомоцистеин и цистеин, цистеинилглицин, гамма-глутамилцистеин и глутатион. Кроме этого, преимуществами данного метода являются:

1) высокое разрешение, благодаря чему определение гомоцистеина возможно в такой сложной матрице, как гомогенат печени;
2) отсутствие при пробоподготовке реакций с участием аналитов, катализируемых ферментами (SAH-гидролаза);

3) химический принцип дериватизации с SBD-F, который широко используется для определения гомоцистеина в крови; его надежность не вызывает сомнений.

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования, выполнение определений, редактирование – Дорошенко Е.М.; концепция и дизайн исследования, подготовка биологического материала, написание текста – Новогродская Я.И.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen W., Zhao Y., Seefeldt T., Guan X. (2008) Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 48, pp. 1375–1380.
2. Ling Y.-Y., Yin X.-F., Fang Z.-L. (2005) Simultaneous determination of glutathione and reactive oxygen species in individual cells by microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 4759–4766.
3. Inoue T., Kirchhoff J.R. (2002) Determination of thiols by capillary electrophoresis with amperometric detection at a coenzyme pyrroloquinoline quinone modified electrode. *Anal. Chem*., vol. 74, pp. 1349–1354.
4. Yang S., Jiang W., Ren L., Yuan Y., Zhang B., Luo Q., Guo Q., Bouchard L.S., Liu M., Zhou X. (2016) Biothiol xenon MRI sensor based on thiol-addition reaction. *Anal. Chem*., vol. 88, no 11, pp. 5835–5840.
5. Nikitin D., Dutov A., Rudakova L. (2017) Ekstraktsionno-khromatograficheskoe opredelenie serosoderzhashchikh aminokislot v biologicheskikh zhidkostiakh [Extraction-chromatographic determination of sulfur containing amino acids in biological fluids]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, vol. 17, no 4, pp. 574–583.
6. Yin C., Huo F., Zhang J., Martínez-Máñez R., Yang Y., Lv H., Li S. (2013) Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition. *Chem. Soc. Rev*., vol. 42, no 14, pp. 6032–6059.
7. Wang J., Liu H.-B., Tong Z., Ha C.-S. (2015) Fluorescent/luminescent detection of natural amino acids by organometallic systems. *Coord. Chem. Rev.*, vol. 303, pp. 139–184.
8. Jun M.E., Roy B., Ahn K.H. (2011) Turn-on fluorescent sensing with "reactive" probes. *Chem. Commun*., vol. 47, pp. 7583–7601.
9. Xu Y., Zhang Y., Tang B., Laskin J., Roach P.J., Chen H. (2010) Study of highly selective and efficient thiol derivatization using selenium reagents by mass spectrometry. *Anal. Chem*., vol. 82, no 16, pp. 6926–6932.
10. Ueland P.M., Helland S., Broch O.J., Schanche J.S. (1984) Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J. Biol. Chem*., vol. 259, no 4, pp. 2360–2364.
11. Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Matthees D.P. (2003) A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 31, no 2, pp. 251–261.
12. Alisievitch S., Dubichev A., Levina A., Nazarova G., Zolotov N., Krzhechkovskaya V., Pavlova N., Romanova E., Rudko I., Cherkasova K., Kubatiev A. (2006) Stress induced platelet dysfunction in rats with folic acid-deficient hyperhomocysteinemia. *General Reanimatology*, vol. 2, no 6, pp. 61–65.
13. Nikolic T.T., Arsic A., Vucic V., Petrovic S., Ristic-Medic D., Zivkovic V., Srejovic I., Jeremic J., Radonjic T., Milosavljevic I., Bolevich S., Bolevich S., Djuric D., Jakovljevic V. (2019) Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors differentially modulate plasma fatty acids in rats with diet-induced-hyperhomocysteinemia: is ω-3 fatty acids supplementation necessary? *Front Physiol*., vol. 10, no 892, pp. 1–9.
14. Baranovicova E., Kalenska D., Tomascova A., Lehotsky J. (2018) Metabolomic study of altered energy metabolism during global forebrain ischemia and ischemic preconditioning in blood plasma in homocysteine treated rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, no 6. doi: 10.26402/jpp.2018.6.04.
15. Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., Głowacki R., Chwatko G. (2018) Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no 16, pp. 3241–3249.
16. Belenichev I., Gorbacheva S., Demchenko A., Bukhtiyarova N. (2014) The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: The therapeutic effects of nootropic drugs. *Neurochemical Journal*, vol. 8, no 1, pp. 24–27.
17. Doroshenko E., Snezhitskij V., Lelevich V. (2017) Struktura pula svobodnykh aminokislot i ikh proizvodnykh plazmy krovi u patsientov s ishemicheskoi bolezn'iu serdtsa i proiavleniiami khronicheskoi serdechnoi nedostatochnosti [Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ischemic heart disease and chronic cardiac insufficiency]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, vol. 15, no 5, pp. 551–556.
18. Gilfix B.M., Blank D.W., Rosenblatt D.S. (1997) Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clinical Chemistry*, vol. 43, pp. 687–688.
19. Ubbink J.B., Hayward Vermaak W.J., Bissbort S. (1991) Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J. Chromatogr*., vol. 565, no 1–2, pp. 441–446.

Поступила/Received: 19.12.2019
Контакты/Contacts: dgi03@mail.ru

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.035
УДК 616-006.6:577.121

Таганович А.Д.[1], Ковганко Н.Н.[1], Прохорова В.И.[2], Готько О.В.[2], Левандовская О.В.[3]
[1] Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
[2] Республиканский научно-практический центр онкологии и радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь
[3] Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

Taganovich A.[1], Kauhanka N.[1], Prohorova V.[2], Got'ko O.[2], Levandovskaya O.[3]
[1] Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
[2] N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus
[3] Minsk Scientific-Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Belarus

К обсуждению проблемы «нормальных» величин: сравнительный анализ клеточного состава крови и уровней содержания в ней белков у спорадических и регулярных доноров

Discussion of the Problem of "Normal" Values: Comparative Analysis of Cell Composition of Blood and the Level of Blood Serum Proteins in Sporadic and Regular Donors

Резюме

Введение. В статье приводятся результаты сравнения концентрации клеток и белков крови у регулярных (не менее 6 раз сдававших кровь) и спорадических (забор крови не чаще 1 раза в год) доноров.
Цель. Выяснить наличие или отсутствие отклонений в концентрации клеток и белков крови у людей без признаков патологии, сдававших кровь как на регулярной основе, так и спорадически (разово), чтобы дать рекомендации относительно адекватности их использования в качестве группы контроля при проведении научных исследований.
Материалы и методы. Обследованы добровольцы без признаков патологии в возрасте 40–60 лет, 29 мужчин и 30 женщин, среди которых 16 человек были курящими.
Материалом для исследования служила цельная кровь, в которой определялось содержание ее форменных элементов, а также сыворотка крови, использовавшаяся для определения концентрации альбумина, С-реактивного белка и онкомаркера CYFRA 21-1.
Результаты и обсуждение. Обнаружена существенная (статистически достоверная) разница в уровне некоторых из определяемых показателей регулярных и спорадических доноров. В крови регулярных доноров была выше концентрация тромбоцитов (в 1,15 раза) и ниже – альбумина (в среднем, на 4%). Эти различия проявлялись только у некурящих людей. В группе регулярных доноров отсутствовала статистически достоверная разница в показателях исследованных лабораторных тестов у представителей мужского и женского пола, за исключением

отношения концентрации лимфоцитов к концентрации моноцитов, величина которого у женщин оказалась статистически достоверно больше. В группе спорадических доноров уровень тромбоцитов был существенно ниже у мужчин, чем у женщин, в то время как показатель отношения СРБ к концентрации альбумина, наоборот, у мужчин был статистически достоверно выше. При этом, несмотря на выявленные различия в уровне исследованных компонентов крови, их содержание в ней не выходило за пределы референтных значений.

Заключение. Полученные данные обосновывают необходимость включения в контрольную группу здоровых людей только спорадических доноров, обязательно с учетом их пола и фактора курения.

Ключевые слова: доноры, немелкоклеточный рак легкого, кровь, тромбоциты, альбумин, лимфоциты.

Abstract

Introduction. The article presents the results of comparison of the concentration of blood cells and blood serum proteins in regular (donating blood at least 6 times) and sporadic (blood sampling not more than 1 time per year) donors.

Purpose. To find out the presence or absence of the difference in the concentration of cells and blood proteins in people without the signs of pathology, who donated blood on a regular basis or sporadically (once) in order to give recommendations on the adequacy of their use as a control group for scientific research.

Materials and methods. Volunteers with no signs of pathology at the age of 40–60 years, 29 men and 30 women (16 smokers among them) were examined. The whole blood was the material for research, in which there was determined the content of its formed elements, and the blood serum used to determine the concentration of albumin, C-reactive protein, and the tumor marker CYFRA 21-1.

Results and discussion. A statistically significant difference was found in the level of some of the determined parameters among regular donors, if compared to sporadic ones. In the blood of regular donors, there was a higher platelet concentration (1.15 times) and lower albumin (4% on average). The difference appeared only in non-smokers. In the group of regular donors, there was no significant difference in the level of all determined parameters between men and women, except for the ratio of the concentration of lymphocytes to the concentration of monocytes, which was significantly higher in women. In the group of sporadic donors, the platelet count was lower in men than in women. On the contrary, the ratio of C-RP to albumin concentration was essentially higher in men. All determined parameters were within the range of reference values.

Conclusion. The obtained data justify the need to include only sporadic donors in the control group of healthy persons, strictly taking into account their gender and smoking factor.

Keywords: donors, non-small cell lung cancer, blood, platelets, albumin, lymphocytes.

■ ВВЕДЕНИЕ

Мотивом для написания данной статьи явилась постоянная необходимость в ходе проведения научных исследований сравнивать полученные при той или иной патологии данные с аналогичными показателями пациентов контрольной группы. Чаще всего последняя включает в себя здоровых людей или, как нередко указывают, людей с отсутствием признаков патологии, под которым подразумевается отсутствие у обследуемого изучаемого заболевания, а также сопутствующих

заболеваний, что обычно оговаривается в разделе статьи (или другого документа) «материалы и методы исследования». Сведения об этой категории обследуемых людей обычно содержат информацию о половом, возрастном составе, а также, возможно, о других специальных данных, которые зависят от изучаемого заболевания. В частности, при изучении патологии бронхолегочной системы обычно имеет значение фактор курения.

Мы сосредоточили свои усилия на поиске маркеров немелкоклеточного рака легкого. В настоящее время проводятся интенсивные исследования показателей крови в качестве потенциальных «кандидатов» на роль таких маркеров при этом заболевании. Как ни удивительно, внимание привлекли «рутинные» показатели, такие как клетки крови лейкоцитарного ряда [1–3], белки плазмы крови (С-реактивный белок (СРБ)), альбумин, цитокины [4, 5].

Нередко исследователи набирают контрольную группу людей, исходя из своих возможностей, не дифференцируя кратность сдачи ими крови. Регулярные, или как иногда их называют «профессиональные», доноры тоже используются с целью образования группы сравнения. Преимуществом является быстрый и неограниченный по количеству вовлекаемых здоровых людей набор материала для исследования.

Вместе с тем есть указания на то, что некоторые компоненты крови у регулярных доноров отличаются от разовых, или спорадических, доноров. Так, например, известно, что у регулярных доноров нередко снижен уровень гемоглобина и железа [6, 7], ферритина [8]. Выраженность уменьшения зависела от кратности сдачи крови и была более значима у женщин [9]. У мужчин, сдававших кровь несколько раз, насыщенность железом ферритина и трансферрина была меньше, чем у тех, кто сдавал кровь только 1 раз [10]. С другой стороны, на основании результатов обследования здоровых мужчин-курильщиков сообщают, что по сравнению с некурящими у них был выше уровень гемоглобина, гематокрита и фибриногена. При этом выраженность увеличения зависела от количества выкуриваемых сигарет [11–13].

Большинство описанных различий были статистически достоверны, хотя и оставались в пределах референтных значений. Естественно, возникает вопрос, имеют ли эти особенности прикладное значение. Оказалось, что они существенны, поскольку демонстрируют разнородность объекта сравнения, то есть той точки отсчета, по которой выявляется или не выявляется отклонение определяемых параметров в ходе мониторирования того или иного заболевания. Корректность его определяется адекватностью контрольной группы.

Руководствуясь этими соображениями, мы подвергли анализу те «рутинные» показатели в крови, которые характеризуют концентрацию клеток лейкоцитарного ряда, а также концентрацию белков плазмы крови. Данные доступной нам литературы об этом отсутствовали.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнить две группы здоровых людей, сдающих кровь регулярно или разово, чтобы дать рекомендации относительно адекватности их использования при проведении научных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы добровольцы без явных признаков патологии. Возраст их находился в интервале 40–60 лет. Одну группу составили здоровые люди в количестве 16 человек, сдававшие кровь регулярно, не менее 6 раз, с частотой 1 раз в 3 месяца (11 мужчин и 5 женщин). Курящих среди них было 6 человек (выкуривали не менее 10 сигарет в сутки). Вторую группу составили волонтеры, давшие согласие на одноразовую сдачу крови для обследования, в количестве 43 человека (18 мужчин и 25 женщин). Фактор курения присутствовал у 10 человек, у которых интенсивность курения составляла не менее 10 сигарет в сутки.

В крови всех обследованных определялось содержание нейтрофильных, базофильных и эозинофильных лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов с помощью анализатора Sysmex XE-5000 (Sysmex Group, Япония). В сыворотке крови оценивалась концентрация С-реактивного белка, альбумина и онкомаркера CYFRA 21-1 с использованием наборов реагентов Roche Diagnostis (США). Определение CYFRA 21 проводилось на иммунохимическом анализаторе Cobas e411, концентрации СРБ и альбумина определялись на биохимическом анализаторе Cobas c311 (Rosche Diagnostics, США). Сравнение выборок осуществлялось с использованием методов непараметрической статистики. Различия в сравниваемых группах считались статистически достоверными при $P \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали наличие существенной (статистически достоверной) разницы в уровне некоторых из определяемых показателей у регулярных доноров по сравнению с аналогичными данными у спорадических (табл. 1). В частности, в крови регулярных доноров оказалась выше концентрация тромбоцитов (в 1,15 раза) и ниже – альбумина (в среднем, на 4%).

В группе спорадических доноров уровень тромбоцитов был существенно более низкий у мужчин, чем у женщин (табл. 2), а показатель отношения СРБ к концентрации альбумина, наоборот, заметно выше. Снижение последнего показателя у женщин обусловлено, главным образом, более низкими значениями концентрации у них СРБ. В группе регулярных доноров отсутствовали статистически достоверные различия в уровне определяемых показателей у мужчин и женщин за исключением отношения концентрации лимфоцитов к концентрации моноцитов, величина которого у женщин оказалась статистически достоверно больше. Обнаруженные особенности послужили причиной того обстоятельства, что только у лиц мужского пола концентрация тромбоцитов у регулярных доноров была выше, чем у мужчин группы спорадических доноров, а концентрация альбумина в сыворотке крови регулярных доноров была существенно ниже, чем у спорадических доноров, – как мужчин, так и женщин.

Анализ полученных данных демонстрирует отсутствие статистически достоверных различий в показателях у курящих и некурящих людей (табл. 3). Несмотря на это, различия, аналогичные упомянутым в общих (без учета курения) группах доноров для концентрации в крови тромбо-

Таблица 1
Концентрация клеток крови и белков сыворотки крови у регулярных и спорадических доноров

Исследуемые показатели	Вид донора		P_1	Пол		P_2
	регулярный, n=16	спорадический, n=43		мужчины, n=29	женщины, n=30	
Нейтрофилы, $\times10^9$/л	3,28 (2,92; 4,17)	3,14 (2,57; 4,06)	0,53	3,11 (2,70; 3,85)	3,38 (2,87; 4,16)	0,43
Лимфоциты, $\times10^9$/л	2,04 (1,63; 2,41)	1,84 (1,59; 2,04)	0,16	1,80 (1,48; 2,24)	1,93 (1,70; 2,05)	0,34
Нейтрофилы/ лимфоциты	1,80 (1,28; 2,19)	1,75 (1,41; 2,42)	0,77	1,86 (1,27; 2,49)	1,75 (1,49; 2,27)	0,79
Моноциты, $\times10^9$/л	0,49 (0,40; 0,61)	0,47 (0,40; 0,60)	0,46	0,48 (0,41; 0,63)	0,46 (0,38; 0,54)	0,08
Лимфоциты/ моноциты	3,92 (3,23; 5,28)	3,94 (3,10; 4,80)	0,60	3,41 (2,94; 4,50)	4,32 (3,21; 5,30)	0,03
Эозинофилы, $\times10^9$/л	0,11 (0,09; 0,14)	0,12 (0,08; 0,20)	0,59	0,12 (0,08; 0,18)	0,12 (0,08; 0,20)	0,86
Базофилы, $\times10^9$/л	0,03 (0,02; 0,04)	0,02 (0,02; 0,04)	0.123	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,02; 0,04)	0.91
Тромбоциты, $\times10^9$/л	300,00 (246,50; 333,00)	260,00 (216,00; 286,00)	0,025	244,00 (212,00; 297,00)	276,00 (237,00; 308,00)	0,11
Тромбоциты/ лимфоциты	147,98 (107,60; 190,10)	139,38 (114,04; 166,28)	0,75	140,80 (109,20; 171,07)	142,15 (121,67; 167,00)	0,63
С-РБ, г/л, $\times10^{-2}$	1,2 (0, 9; 2,7)	1,1 (0,3; 1,8)	0,19	1,2 (0,9; 2,2)	1,1 (0,3; 1,7)	0,24
Альбумины, г/л	42,15 (41,00; 42,85)	43,70 (42,60; 44,60)	0,0004	43,40 (42,10; 44,60)	43,30 (42,40; 44,20)	0,90
С-РБ/альбумины, $\times10^{-2}$	2,17 (1,28; 10,05)	2,54 (0,48; 4,13)	0,59	3,08 (2,21; 4,92)	1,35 (0,21; 4,02)	0,06
CYFRA 21-1, мкг/л	1,60 (1,14; 2,18)	1,53 (1,24; 2,09)	0,85	1,78 (1,14; 2,03)	1,44 (1,24; 2,09)	0,60

Примечание: здесь и в последующих таблицах данные представлены как медиана (25%;75%).
P_1 – значения критерия статистической достоверности разницы между регулярными и спорадическими донорами;
P_2 – значения критерия статистической достоверности разницы между донорами – мужчинами и женщинами.

Table 1
The concentration of blood cells and serum proteins in regular and sporadic donors

Parameters	Type of blood donation		P_1	Gender		P_2
	regular, n=16	sporadic, n=43		men, n=29	women, n=30	
Neutrophils, $\times10^9$/L	3.28 (2.92; 4.17)	3.14 (2.57; 4.06)	0.53	3.11 (2.70; 3.85)	3.38 (2.87; 4.16)	0.43
Lymphocytes, $\times10^9$/L	2.04 (1.63; 2.41)	1.84 (1.59; 2.04)	0.16	1.80 (1.48; 2.24)	1.93 (1.70; 2.05)	0.34
Neutrophils/ lymphocytes	1.80 (1.28; 2.19)	1.75 (1.41; 2.42)	0.77	1.86 (1.27; 2.49)	1.75 (1.49; 2.27)	0.79
Monocytes, $\times10^9$/L	0.49 (0.40; 0.61)	0.47 (0.40; 0.60)	0.46	0.48 (0.41; 0.63)	0.46 (0.38; 0.54)	0.08
Lymphocytes/ monocytes	3.92 (3.23; 5.28)	3.94 (3.10; 4.80)	0.60	3.41 (2.94; 4.50)	4.32 (3.21; 5.30)	0.03
Eosinophils, $\times10^9$/L	0.11 (0.09; 0.14)	0.12 (0.08; 0.20)	0.59	0.12 (0.08; 0.18)	0.12 (0.08; 0.20)	0.86
Basophils, $\times10^9$/L	0.03 (0.02; 0.04)	0.02 (0.02; 0.04)	0.123	0.03 (0.02; 0.04)	0.03 (0.02; 0.04)	0.91

Table 1

Parameters	Type of blood donation		P_1	Gender		P_2
	regular, n=16	sporadic, n=43		men, n=29	women, n=30	
Thrombocytes, $\times10^9$/L	300.00 (246.50; 333.00)	260.00 (216.00; 286.00)	0.025	244.00 (212.00; 297.00)	276.00 (237.00; 308.00)	0.11
Thrombocytes/ lymphocytes	147.98 (107.60; 190.10)	139.38 (114.04; 166.28)	0.75	140.80 (109.20; 171.07)	142.15 (121.67; 167.00)	0.63
C-RP, g/L, $\times10^{-2}$	0.12 (0.09; 0.27)	0.11 (0.03; 0.18)	0.19	0.12 (0.09; 0.22)	0.11 (0.03; 0.17)	0.24
Albumins, g/L	42.15 (41.00; 42.85)	43.70 (42.60; 44.60)	0.0004	43.40 (42.10; 44.60)	43.30 (42.40; 44.20)	0.90
C-RP/Albumins, $\times10^{-2}$	2.17 (1.28; 10.05)	2.54 (0.48; 4.13)	0.59	3.08 (2.21; 4.92)	1.35 (0.21; 4.02)	0.06
CYFRA 21-1, mg/L	1.60 (1.14; 2.18)	1.53 (1.24; 2.09)	0.85	1.78 (1.14; 2.03)	1.44 (1.24; 2.09)	0.60

Note: here and in the following tables, the data are presented as median (25%; 75%).
P_1 – values of the criterion of statistical reliability of the difference between regular and sporadic donors;
P_2 – values of the criterion of statistical reliability of the difference between donors – men and women.

Таблица 2
Концентрация клеток крови и белков сыворотки крови у регулярных и спорадических доноров в зависимости от пола

Исследуемые показатели	**Регулярные доноры, n=16**		**P_1**	**Спорадические доноры, n=43**		**P_1**	**P_2**	**P_3**
	мужчины, n=11	**женщины, n=5**		**мужчины, n=18**	**женщины, n=25**			
Нейтрофилы, $\times10^9$/л	3,11 (2,20; 3,85)	4,43 (3,11; 5,61)	0,07	3,10 (2,70; 4,06)	3,14 (2,57; 4,04)	0,97	0,70	0,06
Лимфоциты, $\times10^9$/л	1,80 (1,53; 2,30)	2,10 (2,00; 2,80)	0,31	1,77 (1,36; 2,24)	1,85 (1,70; 2,03)	0,38	0,35	0,10
Нейтрофилы/ лимфоциты	1,39 (1,25; 2,01)	1,92 (1,73; 2,89)	0,21	1,97 (1,40; 2,53)	1,75 (1,42; 2,08)	0,42	0,21	0,23
Моноциты, $\times10^9$/л	0,48 (0,40; 0,71)	0,50 (0,40; 0,51)	0,46	0,49 (0,41; 0,61)	0,45 (0,38; 0,55)	0,22	0,54	0,93
Лимфоциты/ моноциты	3,44 (2,94; 4,50)	5,30 (4,20; 7,0)	0,04	3,33 (2,89; 4,59)	4,29 (3,18; 5,05)	0,13	0,87	0,11
Эозинофилы, $\times10^9$/л	0,11 (0,08; 0,14)	0,10 (0,09; 0,13)	0,73	0,12 (0,08; 0,18)	0,13 (0,08; 0,20)	0,73	0,86	0,52
Базофилы, $\times10^9$/л	0,03 (0,02; 0,04)	0,04 (0,02; 0,04)	0,91	0,03 (0,01; 0,04)	0,02 (0,02; 0,04)	0,81	0.27	0.33
Тромбоциты, $\times10^9$/л	297,00 (242,00; 338,00)	303,00 (263,00; 308,00)	0,73	234,00 (183,00; 260,00)	275,00 (237,00; 301,00)	0,005	0,005	0,66
Тромбоциты/ лимфоциты	152,20 (105,20; 211,52)	125,20 (110,00; 167,00)	0,43	126,75 (109,20; 157,76)	143,60 (122,64; 166,28)	0,22	0,36	0,50
С-РБ, г/л, $\times10^{-2}$	0,10 (0,09; 0,25)	0,14 (0,11; 0,54)	0,43	0,14 (0,07; 0,22)	0,08 (0,02; 0,17)	0,16	0,93	0,11
Альбумины, г/л	42,10 (40,80; 43,60)	42,40 (41,20; 42,50)	0,95	43,95 (42,80; 45,40)	43,40 (42,60; 44,40)	0,38	0,009	0,017
С-РБ/альбумины, $\times10^{-2}$	2,42 (1,19; 9,26)	1,41 (1,29; 10,83)	0,99	3,51 (2,42; 4,92)	1,14 (0,09; 3,70)	0,04	0,42	0,20

Окончание таблицы 2

Исследуемые показатели	Регулярные доноры, n=16		P_1	Спорадические доноры, n=43		P_1	P_2	P_3
	мужчины, n=11	женщины, n=5		мужчины, n=18	женщины, n=25			
CYFRA 21-1, мкг/л	1,78 (1,10; 2,03)	1,42 (1,36; 2,32)	0,57	1,67 (1,30; 2,51)	1,45 (1,24; 1,84)	0,38	0,77	0,47

Примечание: P_1 – значения критерия статистической достоверности разницы между мужчинами и женщинами внутри одной из групп доноров;
P_2 – значения критерия статистической достоверности разницы между регулярными и спорадическими донорами мужского пола;
P_3 – значения критерия статистической достоверности разницы между регулярными и спорадическими женского пола.

Table 2
The concentration of blood cells and serum proteins in regular and sporadic donors depending on gender

Parameters	Regular donation, n=16		P_1	Sporadic donation, n=43		P_1	P_2	P_3
	men, n=11	women, n=5		men, n=18	women, n=25			
Neutrophils, $\times10^9$/L	3.11 (2.20; 3.85)	4.43 (3.11; 5.61)	0.07	3.10 (2.70; 4.06)	3.14 (2.57; 4.04)	0.97	0.70	0.06
Lymphocytes, $\times10^9$/L	1.80 (1.53; 2.30)	2.10 (2.00; 2.80)	0.31	1.77 (1.36; 2.24)	1.85 (1.70; 2.03)	0.38	0.35	0.10
Neutrophils/ lymphocytes	1.39 (1.25; 2.01)	1.92 (1.73; 2.89)	0.21	1.97 (1.40; 2.53)	1.75 (1.42; 2.08)	0.42	0.21	0.23
Monocytes, $\times10^9$/L	0.48 (0.40; 0.71)	0.50 (0.40; 0.51)	0.46	0.49 (0.41; 0.61)	0.45 (0.38; 0.55)	0.22	0.54	0.93
Lymphocytes/ monocytes	3.44 (2.94; 4.50)	5.30 (4.20; 7.0)	0.04	3.33 (2.89; 4.59)	4.29 (3.18; 5.05)	0.13	0.87	0.11
Eosinophils, $\times10^9$/L	0.11 (0.08; 0.14)	0.10 (0.09; 0.13)	0.73	0.12 (0.08; 0.18)	0.13 (0.08; 0.20)	0.73	0.86	0.52
Basophils, $\times10^9$/L	0.03 (0.02; 0.04)	0.04 (0.02; 0.04)	0.91	0.03 (0.01; 0.04)	0.02 (0.02; 0.04)	0.81	0.27	0.33
Thrombocytes, $\times10^9$/L	297.00 (242.00; 338.00)	303.00 (263.00; 308.00)	0.73	234.00 (183.00; 260.00)	275.00 (237.00; 301.00)	0.005	0.005	0.66
Thrombocytes/ lymphocytes	152.20 (105.20; 211.52)	125.20 (110.00; 167.00)	0.43	126.75 (109.20; 157.76)	143.60 (122.64; 166.28)	0.22	0.36	0.50
C-RP, g/L, $\times10^{-2}$	0.10 (0.09; 0.25)	0.14 (0.11; 0.54)	0.43	0.14 (0.07; 0.22)	0.08 (0.02; 0.17)	0.16	0.93	0.11
Albumins, g/L	42.10 (40.80; 43.60)	42.40 (41.20; 42.50)	0.95	43.95 (42.80; 45.40)	43.40 (42.60; 44.40)	0.38	0.009	0.017
C-RP/Albumins, $\times10^{-2}$	2.42 (1.19; 9.26)	1.41 (1.29; 10.83)	0.99	3.51 (2.42; 4.92)	1.14 (0.09; 3.70)	0.04	0.42	0.20
CYFRA 21-1, mg/L	1.78 (1.10; 2.03)	1.42 (1.36; 2.32)	0.57	1.67 (1.30; 2.51)	1.45 (1.24; 1.84)	0.38	0.77	0.47

Note: P_1 – values of the criterion of statistical significance of the difference between men and women within one of the groups of blood donors;
P_2 – values of the criterion of statistical reliability of the difference between regular and sporadic male donors;
P_3 – values of the criterion of statistical reliability of the difference between regular and sporadic female donors.

цитов и альбумина, проявлялись, но только у некурящих людей (табл. 2). У курящих они отсутствовали.

Таким образом, проведенное сравнение регулярных и спорадических доноров впервые позволяет привлечь внимание исследователей к различиям в показателях концентрации форменных элементов крови и белков (помимо железосодержащих). Прежде всего, это относится к уровню тромбоцитов (у мужчин, некурящих людей) и концентрации

Таблица 3
Концентрация клеток крови и белков сыворотки крови доноров в зависимости от статуса курения

Исследуемые показатели	Вид донора		P
	Курящие, n=16	Некурящие, n=43	
Нейтрофилы, $\times10^9$/л	3,02 (2,61; 4,33)	3,31 (2,70; 4,06)	0,90
Лимфоциты, $\times10^9$/л	1,99 (1,76; 2,30)	1,80 (1,53; 2,10)	0,17
Нейтрофилы/ лимфоциты	1,83 (1,33; 2,35)	1,75 (1,39; 2,36)	0,93
Моноциты, $\times10^9$/л	0,50 (0,45; 0,63)	0,47 (0,38; 0,55)	0,06
Лимфоциты/ моноциты	3,66 (3,03; 4,52)	3,94 (3,13; 5,13)	0,53
Эозинофилы, $\times10^9$/л	0,13 (0,08; 0,19)	0,10 (0,08; 0,19)	0,88
Базофилы, $\times10^9$/л	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,02; 0,04)	0.41
Тромбоциты, $\times10^9$/л	269,00 (242,50; 311,50)	260,00 (218,00; 303,00)	0,36
Тромбоциты/ лимфоциты	147,98 (107,60; 190,10)	140,80 (110,00; 188,30)	0,98
С-РБ, г/л, $\times10^{-2}$	0,11 (0,06; 0,18)	0,11 (0,04; 0,22)	1,00
Альбумины, г/л	43,20 (42,30; 43,85)	43,40 (42,10; 44,60)	0,46
С-РБ/альбумины, $\times10^{-2}$	2,97 (1,62; 7,39)	2,42 (0,48; 4,16)	0,22
CYFRA 21-1, мкг/л	1,66 (1,18; 2,00)	1,45 (1,17; 2,09)	1,00

Примечание: данные представлены как медиана (25%; 75%).
P – значения критерия статистической достоверности разницы между курящими и некурящими донорами.

Table 3
Blood cell counts and concentration of serum proteins in donors depending on their smoking status

Parameters	Smokers, n=16	Nonsmokers, n=43	P
Neutrophils, $\times10^9$/L	3.02 (2.61; 4.33)	3.31 (2.70; 4.06)	0.90
Lymphocytes, $\times10^9$/L	1.99 (1.76; 2.30)	1.80 (1.53; 2.10)	0.17
Neutrophils/ lymphocytes	1.83 (1.33; 2.35)	1.75 (1.39; 2.36)	0.93
Monocytes, $\times10^9$/L	0.50 (0.45; 0.63)	0.47 (0.38; 0.55)	0.06
Lymphocytes/ monocytes	3.66 (3.03; 4.52)	3.94 (3.13; 5.13)	0.53
Eosinophils, $\times10^9$/L	0.13 (0.08; 0.19)	0.10 (0.08; 0.19)	0.88
Basophils, $\times10^9$/L	0.03 (0.02; 0.04)	0.03 (0.02; 0.04)	0.41
Thrombocytes, $\times10^9$/L	269.00 (242.50; 311.50)	260.00 (218.00; 303.00)	0.36
Thrombocytes/ lymphocytes	147.98 (107.60; 190.10)	140.80 (110.00; 188.30)	0.98

Table 3

Parameters	Smokers, n=16	Nonsmokers, n=43	P
C-RP, g/L, $\times 10^{-2}$	0.11 (0.06; 0.18)	0.11 (0.04; 0.22)	1.00
Albumins, g/L	43.20 (42.30; 43.85)	43.40 (42.10; 44.60)	0.46
C-RP/Albumins, $\times 10^{-2}$	2.97 (1.62; 7.39)	2.42 (0.48; 4.16)	0.22
CYFRA 21-1, mg/L	1.66 (1.18; 2.00)	1.45 (1.17; 2.09)	1.00

Note: P – values of the criterion of statistical significance of the difference between smoking and non-smoking donors.

Таблица 4

Концентрация клеток крови и белков сыворотки крови у регулярных и спорадических доноров с разным статусом курения

Исследуемые показатели	**Регулярные доноры n=16**		**P_1**	**Спорадические доноры n=43**		**P_1**	**P_2**	**P_3**
	курящие, n=6	**некурящие, n=10**		**курящие, n=10**	**некурящие, n=33**			
Нейтрофилы, $\times 10^9$/л	3,01 (2,83; 5,61)	3,34 (3,11; 3,90)	0,87	3,10 (2,45; 4,04)	3,14 (2,70; 4,06)	0,93	0,63	0,61
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	2,05 (1,80; 2,91)	1,91 (1,60; 2,30)	0,55	1,98 (1,72; 2,05)	1,80 (1,52; 2,03)	0,28	0,42	0,34
Нейтрофилы/ лимфоциты	1,84 (1,26; 2,89)	1,80 (1,29; 1,93)	0,86	1,82 (1,40; 2,15)	1,75 (1,45; 2,42)	0,72	0,79	0,63
Моноциты, $\times 10^9$/л	0,50 (0,48; 0,52)	0,48 (0,40; 0,65)	0,63	0,60 (0,41; 0,63)	0,45 (0,38; 0,54)	0,06	0,78	0,56
Лимфоциты/ моноциты	4,11 (3,31; 4,50)	3,73 (3,15; 5,30)	0,82	3,23 (2,63; 4,53)	4,00 (3,13; 4,92)	0,31	0,36	0,87
Эозинофилы, $\times 10^9$/л	0,13 (0,03; 0,17)	0,10 (0,09; 0,14)	0,84	0,13 (0,08; 0,20)	0,12 (0,08; 0,20)	0,65	0,52	0,88
Базофилы, $\times 10^9$/л	0,04 (0,02; 0,04)	0,03 (0,02; 0,04)	0,95	0,03 (0,02; 0,04)	0,02 (0,02; 0,04)	0,56	0.63	0,20
Тромбоциты, $\times 10^9$/л	265,50 (251,00; 334,00)	305,50 (242,00; 332,00)	0,79	269,00 (234,00; 308,00)	247,00 (210,00; 282,00)	0,20	0,70	0,02
Тромбоциты/ лимфоциты	138,70 (86,25; 167,00)	150,00 (110,00; 190,80)	0,55	147,47 (124,80; 164,80)	136,51 (112,50; 171,07)	0,64	0,80	0,51
С-РБ, г/л, $\times 10^{-2}$	0,14 (0,08; 0,17)	0,11 (0,09; 0,28)	0,70	0,10 (0,05; 0,18)	0,12 (0,02; 0,17)	0,91	0,42	0,29
Альбумины, г/л	42,45 (42,20; 43,20)	41,65 (40,70; 42,30)	0,13	43,35 (42,40; 44,00)	43,70 (42,80; 44,70)	0,42	0,21	0,0009
С-РБ/ альбумины, $\times 10^{-2}$	2,59 (0,68; 17,59)	1,83 (1,29; 9,26)	0,96	3,67 (2,40; 4,92)	2,42 (0,24; 4,02)	0,20	0,79	0,49
CYFRA 21-1, мкг/л	1,60 (1,20; 2,32)	1,63 (1,10; 2,03)	0,63	1,67 (0,99; 1,86)	1,45 (1,25; 2,09)	0,91	0,70	0,94

Примечание: P_1 – значения критерия статистической достоверности разницы между курящими и некурящими внутри одной из групп доноров;

P_2 – значения критерия статистической достоверности разницы между курящими регулярными и спорадическими донорами;

P_3 – значения критерия статистической достоверности разницы между некурящими регулярными и спорадическими донорами.

Table 4
Blood cell counts and serum proteins in regular and sporadic donors with different smoking status

Parameters	Regular donors, n=16		P_1	Sporadic donors, n=43		P_1	P_2	P_3
	smokers, n=6	nonsmokers, n=10		smokers, n=10	nonsmokers, n=33			
Neutrophils, $\times10^9$/L	3.01 (2.83; 5.61)	3.34 (3.11; 3.90)	0.87	3.10 (2.45; 4.04)	3.14 (2.70; 4.06)	0.93	0.63	0.61
Lymphocytes, $\times10^9$/L	2.05 (1.80; 2.91)	1.91 (1.60; 2.30)	0.55	1.98 (1.72; 2.05)	1.80 (1.52; 2.03)	0.28	0.42	0.34
Neutrophils/ lymphocytes	1.84 (1.26; 2.89)	1.80 (1.29; 1.93)	0.86	1.82 (1.40; 2.15)	1.75 (1.45; 2.42)	0.72	0.79	0.63
Monocytes, $\times10^9$/L	0.50 (0.48; 0.52)	0.48 (0.40; 0.65)	0.63	0.60 (0.41; 0.63)	0.45 (0.38; 0.54)	0.06	0.78	0.56
Lymphocytes/ monocytes	4.11 (3.31; 4.50)	3.73 (3.15; 5.30)	0.82	3.23 (2.63; 4.53)	4.00 (3.13; 4.92)	0.31	0.36	0.87
Eosinophils, $\times10^9$/L	0.13 (0.03; 0.17)	0.10 (0.09; 0.14)	0.84	0.13 (0.08; 0.20)	0.12 (0.08; 0.20)	0.65	0.52	0.88
Basophils, $\times10^9$/L	0.04 (0.02; 0.04)	0.03 (0.02; 0.04)	0.95	0.03 (0.02; 0.04)	0.02 (0.02; 0.04)	0.56	0.63	0.20
Thrombocytes, $\times10^9$/L	265.50 (251.00; 334.00)	305.50 (242.00; 332.00)	0.79	269.00 (234.00; 308.00)	247.00 (210.00; 282.00)	0.20	0.70	0.02
Thrombocytes/ lymphocytes	138.70 (86.25; 167.00)	150.00 (110.00; 190.80)	0.55	147.47 (124.80; 164.80)	136.51 (112.50; 171.07)	0.64	0.80	0.51
C-RP, g/L, $\times10^{-2}$	0.14 (0.08; 0.17)	0.11 (0.09; 0.28)	0.70	0.10 (0.05; 0.18)	0.12 (0.02; 0.17)	0.91	0.42	0.29
Albumins, g/L	42.45 (42.20; 43.20)	41.65 (40.70; 42.30)	0.13	43.35 (42.40; 44.00)	43.70 (42.80; 44.70)	0.42	0.21	0.0009
C-RP/ Albumins, $\times10^{-2}$	2.59 (0.68; 17.59)	1.83 (1.29; 9.26)	0.96	3.67 (2.40; 4.92)	2.42 (0.24; 4.02)	0.20	0.79	0.49
CYFRA 21-1, mg/L	1.60 (1.20; 2.32)	1.63 (1.10; 2.03)	0.63	1.67 (0.99; 1.86)	1.45 (1.25; 2.09)	0.91	0.70	0.94

Note: P_1 – values of the criterion of statistical significance of the difference between smokers and non-smokers within one of the groups of donors;
P_2 – values of the criterion of statistical significance of the difference between smoking regular and sporadic donors;
P_3 – values of the criterion of statistical significance of the difference between non-smoking regular and sporadic donors.

альбумина (у некурящих, у мужчин и женщин). Обращает на себя внимание и то, что эти различия находятся в пределах референтных значений. Они по-разному проявляются у мужчин и женщин, курящих и некурящих людей.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные сведения позволяют рекомендовать при исследовании параметров крови «набирать» в контрольную группу здоровых людей только «разовых» доноров. При этом по половому составу и статусу курения они должны неформально соответствовать группам обследуемых пациентов. При возможности целесообразно проводить сравнение отдельно у мужчин и женщин, а также у курящих и некурящих людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Liangyou G., Hongzhao L., Luyao C. (2016) Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio for patients with cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, vol. 7(22), pp. 31926–31942.
2. Yaping G., Yun W. (2016) Pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio is associated with poor survival in patients with stage I-III non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, vol. 11(10), 0163397.
3. Kumagai S., Marumo S., Shoji T. (2014) Prognostic impact of preoperative monocyte counts in patients with resected lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, vol. 85(3), pp. 457–464.
4. Fanrong Z., Lisha Y., Jiaoyue J. (2017) The C-reactive protein/albumin ratio predicts long-term outcomes of patients with operable non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, vol. 8(5), pp. 8835–8842.
5. Xiaoguang X., Shujing W., Guoxian L. (2019) C-reactive protein is a significant predictor of improved survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Medicine*, vol. 98:26, e16238.
6. da Silva M.A., de Souza R.A., Carlos A.M. (2012) Etiology of anemia of blood donor candidates deferred by hematologic screening. *Rev Bras Hematol Hemoter*, vol. 34(5), pp. 356–60.
7. Buhari H.A., Erhabor O., Imrana S. (2010) Prevalence of iron deficiency anaemia among blood donors in Sokoto, North Western, Nigeria. *Blood Transfus*, vol. 8, pp. 113–117.
8. Fouz A.A., Uday Y.H., Norhaza A.R. (2014) Correlation of serum erythropoietin and ferritin levels with the frequency of blood donation. *J. Blood Disorders Transf.*, vol. 5(8), pp. 232–237.
9. Mantilla-Gutiérrez C., Cardona-Arias J. (2013) Meta-análisis: prevalencia de deficiencia de hierro en donantes de sangre repetitivos y asociación con sexo, 2001–2011. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, vol. 29, pp. 59–72.
10. Manascero-Gómez A.R., Bravo-Espinosa M., Solano-Muriel K., Poutou-Piñales R.A. (2015) Influence of blood donation time intervals on ferritin and hemoglobin concentration. *Transfus Apher Sci.*, vol. 53(2), pp. 213–219.
11. Tauheed S., Shoaib S., Kamal A. (1992) Haemoglobin, haematocrit and plasma fibrinogen in cigarette smokers. *J. Pak Med Assoc.*, vol. 42(7), pp.162–163.
12. Mast A.E. (2014) Low hemoglobin deferral in blood donors. *Transfus Med Rev.*, vol. 28(1), pp. 18–22.
13. Hsuan-Hui W., Li-Na L., Ci-Wen C. (2019) The alteration of ferritin and transferrin saturation under body mass index and blood pressure in first-time and regular male blood donors in Taiwan. *Medicine*, vol. 98(22), e15854.

Поступила/Received: 04.02.2020
Контакты/Contacts: taganovich@bsmu.by

DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.036
УДК 616-056.43:615.331

Лапцевич А.В., Кондаурова С.Л., Липницкий А.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Laptcevich A., Kandaurava S., Lipnitski A.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Аллергическая реакция на β-лактамные антибиотики – карбапенемы (обзор литературы и клинический случай)

Allergic Reaction to β-lactam Antibiotics – Carbapenems (Literature Review and Clinical Case Report)

Резюме

Карбапенемы имеют наиболее широкий спектр активности среди всех β-лактамных антибиотиков и играют важную роль в лечении различных инфекционных заболеваний. С учетом их значения в клинической практике информация о вероятности развития побочных реакций имеет важное значение для клиницистов. Целью данной статьи является обзор текущей литературы и описание собственного клинического случая аллергических реакций на карбапенемы, частоты возникновения реакций, факторов риска и возможности перекрестной чувствительности внутри группы карбапенемов. По данным постмаркетинговых исследований, частота возникновения сыпи, зуда, крапивницы на карбапенемы составляет 0,3–3,7%. Из-за низкой частоты встречаемости к настоящему времени не определены факторы риска, по которым можно предсказать вероятность развития аллергии на карбапенемы. Данные о перекрестной чувствительности между карбапенемами и другими представителями β-лактамных антибиотиков и карбапенемами ограничены описанием отдельных случаев, однако риск таких осложнений низкий. На данный момент нет полных исследований, описывающих частоту встречаемости перекрестных реакций внутри самой группы карбапенемов.
Ключевые слова: карбапенемы, аллергия, перекрестная чувствительность, имипенем/циластатин, меропенем, β-лактамные антибактериальные лекарственные средства, дети.

Abstract

Carbapenems possess the broadest spectrum of activity of the beta-lactams and considered crucial for management of various infectious diseases. Taking into account the important role of carbapenems in clinical practice, understanding carbapenem side effects is essential for clinicians. The purpose of this review article is to provide a review of carbapenem allergies, describing the overall incidence, risk factors, and the possibility of cross sensitivity in the group of carbapenems. The reported incidence of rash, pruritus, and urticaria was 0.3–3.7% in post-marketing studies of carbapenems. Taking into account the low incidence reported in post-marketing studies, the risk factors that predispose patients to carbapenem allergy have not been described in the literature. The data on cross sensitivity between β-lactam antibiotics and carbapenems are limited. However,

the risk of such complications is low. There are no clinical studies that have described cross sensitivity between the carbapenem agents.
Keywords: carbapenems, allergy, cross sensitivity, imipenem/cilastatin, meropenem, β-lactam antibiotics, children.

■ ВВЕДЕНИЕ

Карбапенемы относятся к группе β-лактамных антибиотиков широкого спектра действия и играют решающую роль в лечении различных инфекционных заболеваний. Среди β-лактамных антибиотиков карбапенемы имеют самый широкий спектр активности, выступая в качестве сильнодействующих агентов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая анаэробные бактерии.

Особенностью химической структуры β-лактамного кольца карбапенемов, отличающей их от пенициллинов, является замена углерода азотом в 1-й позиции и наличие двойных связей между 2 и 3 атомами углерода, а также высокая устойчивость к гидролизу β-лактамного кольца в 6-й позиции и наличие тиогруппы во 2-й позиции пятичленного кольца. Эти замены и выделяют карбапенемы из группы β-лактамных антибиотиков, обеспечивая более широкий спектр активности по сравнению с пенициллинами и цефалоспоринами [1]. Поскольку проблема лекарственной устойчивости в отношении грамотрицательных микроорганизмов продолжает расти, использование карбапенемов все шире внедряется в рутинную клиническую практику.

Карбапенемы проявляют быстрое бактерицидное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Природной устойчивостью к карбапенемам обладают метициллин-резистентные стафилококки, Enterococcus faecium и Stenotrophomonas maltophilia. В отношении анаэробных микроорганизмов карбапенемы показывают равную и более высокую активность в сравнении с таковой метронидазола, клиндамицина, цефокситина [2]. Карбапенемы одобрены FDA (Food and Drug Administration – Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов) для использования в борьбе с широким спектром инфекций, включающих инфекции респираторного тракта, мочеполовой системы, интраабдоминальные инфекции, остеомиелит, бактериемию, инфекции кожи и придатков [3–6].

Ввиду все более частого применения карбапенемов актуальным становится вопрос безопасности применения данных лекарственных средств. Карбапенемы обладают достаточно хорошей переносимостью, к наиболее распространенным побочным эффектам их применения относятся: головная боль, тошнота, диарея, рвота и сыпь. Инструкция по применению также содержит указание и на возможное развитие судорог (как побочное действие со стороны центральной нервной системы) [3–6]. Карбапенемы показывают низкий риск развития аллергических реакций. По данным постмаркетинговых исследований, частота возникновения сыпи, зуда, крапивницы составляет 0,3–3,7% [7–12].

В 2007 г. проведено исследование [10], в котором профиль безопасности меропенема был оценен более чем у 6000 тыс. пациентов

(как взрослых, так и детей). Оценка включала анализ безопасности на основе данных клинических испытаний меропенема, а также данных мировой литературы о лечении пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями. Пациенты, в анамнезе у которых имелись случаи предшествующих реакций на другие бета-лактамы, исключались из обзора. Аллергическая сыпь появилась только в 1,4% случаев, а зуд – в 0,3% случаев. Ни в одном случае анафилактических реакций зафиксировано не было [10].

После одобрения и введения в клиническую практику был проведен анализ профиля безопасности имипенема/циластатина среди 3470 пациентов (в материалах исследования приводились данные о преимущественно взрослых пациентах, однако данные о применении препарата среди педиатрических пациентов также были включены в анализ). Частота возникновения сыпи, зуда, крапивницы составила 3%, но, по данным исследования, менее 50% аллергических реакций были достоверно связаны с использованием именно имипинема/цилостатина. Жизнеугрожающих аллергических реакций отмечено не было. Часть пациентов с зарегистрированной сыпью на введение имипинема/циластатина имела в анамнезе аллергические реакции в виде сыпи на предшествующее лечение β-лактамными антибиотиками. Ни один из пациентов, включенных в исследование, не имел в анамнезе анафилактических реакций на β-лактамные антибиотики [9]. В большом клиническом исследовании среди более 9000 пациентов, получавших имипенем/циластатин, ни одной анафилактической реакции зарегистрировано не было, однако пациенты с предшествующими эпизодами анафилактических реакций на β-лактамные антибиотики были исключены из исследования [8, 9].

Ввиду редкой встречаемости аллергических реакций на карбапенемы в постмаркетинговых исследованиях факторы риска, по которым можно предсказать предрасположенность пациента к аллергии на карбапенемы, не определены. Несмотря на это, из-за структурного подобия бета-лактамного кольца к факторам риска может относиться наличие в анамнезе аллергических реакций на пенициллины или/и цефалоспорины, женский пол, пожилой возраст, генетическая предрасположенность [13–20].

Вероятность развития аллергии на карбапенемы у пациентов с аллергией на β-лактамные антибиотики коррелирует с частотой перекрестной чувствительности между пенициллинами/цефалоспоринами и карбапенемами. Согласно данным ранних постмаркетинговых исследований, перекрестная чувствительность между пенициллинами и карбапенемами достигает 47,4% [21]. Тем не менее, такой относительно высокий уровень перекрестной чувствительности был получен путем нестандартизированного метода кожного тестирования с имипенемом/циластатином, пациенты не получали имипенем/циластатин в качестве лекарственного средства, и истинных аллергических реакций зафиксировано не было. Дальнейшие исследования, выполненные в различных группах пациентов с применением других методологий, показывают более низкую степень перекрестной чувствительности между пенициллинами и карбапенемами [21–23]. В систематическом обзоре, опубликованном в 2014 г., частота возникновения реакций

гиперчувствительности любого типа в отношении карбапенемов составила 4,3% среди 838 пациентов с указанной в анамнезе IgE-опосредованной реакцией на пенициллины [24]. Среди пациентов с положительным кожным тестом на пенициллины только 0,3% (1 из 295) имели реакции гиперчувствительности на карбапенемы (95% CI, 0,06–1,9%) [24]. Другое исследование включало 212 пациентов с реакцией немедленного типа и позитивным результатом кожного теста на пенициллины. При выполнении этим пациентам кожного теста с карбапенемом результат был отрицательным. 211 пациентов, согласившихся на дальнейшее участие в исследовании, переносили введение карбапенемов без осложнений [25]. По данным литературы, частота встречаемости перекрестной чувствительности у пациентов с IgE-опосредованной реакцией на цефалоспорины по отношению к карбапенемам составляет 25% [24]. В большом проспективном исследовании, включавшем 98 пациентов с подтвержденной IgE-опосредованной реакцией на цефалоспорины, только у одного пациента был позитивный кожный тест на карбапенемы. Среди 97 пациентов, продолживших участие в исследовании, только у 1 пациента наблюдалась реакция в виде легкой уртикарной сыпи на введение имипенема/циластатина в течение 30 минут после инфузии полной дозы [26].

Из-за сходной структуры можно ожидать высокой частоты перекрестной чувствительности внутри группы карбапенемов. Однако к настоящему времени не было выполнено исследований, достоверно описывающих вероятность возникновения таких реакций. Для изучения доступны только отдельные эпизоды с описанием перекрестных реакций в группе карбапенемов, которые в целом демонстрируют хорошую переносимость даже при наличии у пациента IgE-опосредованной аллергии [27–31].

■ КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Нам довелось столкнуться с клиническим случаем развития анафилактической реакции на применение антибиотиков из группы карбапенемов у пациентки, получавшей лечение по поводу острого лимфобластного лейкоза в центре детской онкологии, гематологии и иммунологии.

У пациентки С., 19 лет, с массой тела 42 кг, в анамнезе ранее аллергических реакций на лекарственные средства не отмечалось.

Злокачественное гематологическое заболевание впервые диагностировано в октябре 2012 г. в возрасте 14 лет, когда мама заметила на шее у девочки безболезненное увеличение шейных лимфатических узлов. В общем анализе крови выявлены бластные клетки. Проведен первичный диагностический комплекс, и установлен диагноз «острый лимфобластный лейкоз, L1 по FAB-классификации, common-B иммунофенотип, стандартная группа риска. ЦНС статус I». Пациентка получала лечение по протоколу ALL-MB 2008, ремиссия достигнута 3.12.2012 г. (42-й день индукционной терапии), специальное лечение окончено в ноябре 2014 г.

Поздний комбинированный рецидив (исследование костного мозга, лейкемиды грудной клетки) диагностирован в феврале 2016 г. Пациентка получала специальное лечение по протоколу ALL-REZ BFM 2002,

терапевтическая группа S2. Согласно терапевтическому плану лечения для группы S2 она получила 7 блоков интенсивной полихимиотерапии. Во время прохождения химиотерапии у пациентки на фоне введения L-аспаргиназы развился отек Квинке, в остальном лечение перенесла удовлетворительно. 30.08.2016 г. выполнена аллогенная трансплантация костного мозга от неродственного донора; во время трансплантации у пациентки был эпизод фебрильной нейтропении, по поводу которого пациентка получала антибактериальную терапию ванкомицином и меропенемом, перенесла удовлетворительно. На +100 сутки после трансплантации ввиду стабилизации состояния пациентка переведена под наблюдение в амбулаторных условиях.

Через 1 год после трансплантации у нее диагностирован 2-й изолированный костномозговой рецидив. Лечение проводилось по протоколу ALL-REZ BFM 2002. Через 5 суток после проведения блока химиотерапии FLAG (включает флюдарабин, идарубицин, цитозар) у пациентки развилась химиоиндуцированная нейтропения: абсолютное число нейтрофилов (АЧН) в периферической крови менее $0{,}5\times10^9$/л. На фоне нейтропении у пациентки появилась фебрильная лихорадка до 38,0 °С. Выполнено исследование крови на стерильность (посев крови из просвета центрального венозного катетера). С целью эмпирической антибиотикотерапии фебрильной нейтропении к лечению добавлен цефепим в возрастной дозировке. Спустя сутки из флаконов с гемокультурой был получен рост грамотрицательной флоры. В связи с продолжающейся лихорадкой, ростом С-реактивного протеина в динамике, нахождением пациентки в высокой группе риска по развитию тяжелых инфекционных осложнений (рецидив острого лимфобластного лейкоза, реципиент аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, ожидаемая продолжительность нейтропении более 7 суток) до идентификации возбудителя эмпирически назначен карбапенем, а именно – меропенем в дозе 100 мг/кг/сут, разделенной на 3 введения. На фоне 6-го введения меропенема появились сухой кашель, явления бронхообструкции, повышение температуры тела до 39,0 °С с ознобом. Введение препарата было остановлено, реакция купирована введением антигистаминных лекарственных средств и глюкокортикостероидов, проведена смена меропенема на имипенем/циластатин в дозе 100 мг/кг/сутки, разделенной на 3 введения. На фоне 2-го введения имипенема/циластатина появилось затрудненное дыхание (жалобы на ком в горле с правой стороны), повышение температуры тела до 38,3 °С. Аллергическая реакция повторно купирована введением антигистаминных средств и глюкокортикостероидов. Имипенем/циластатин отменен, к лечению добавлены левофлоксацин и метронидазол в возрастных дозировках.

Идентификация возбудителя инфекции кровотока выявила Pseudamonas putida с чувствительностью к цефтазидиму, цефепиму, имипенем/циластатину, меропенему и колистину. В это же время микробиологическое исследование флоры ротовой полости пациентки выявило наличие Pseudamonas putida++ с той же чувствительностью.

На фоне проводимой терапии состояние пациентки прогрессивно ухудшалось, для дальнейшего лечения она была переведена в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). В динамике наблюдались рост СРБ до 334 мг/л, появление узелковой сыпи по всему телу

максимальным размером до 2 см в диаметре (по типу септических «отсевов» при гематогенной диссеминации). По данным морфологического исследования биоптатов кожи с элементами сыпи была подтверждена картина септического поражения кожи бактериального генеза. Микробиологическое исследование биопсийного материала кожных очагов выявило рост бактерий Pseudamonas putida с чувствительностью к амикацину, имипенем/циластатину и колистину. Для лечения инфекции, вызванной Pseudamonas putida, к проводимому лечению был добавлен колистин 150 000 МЕ/кг/сут путем суточного титрования.

В это же время микробиологическое исследование флоры ротовой полости и кишечника выявило рост Acinetobacter baumannii с чувствительностью только к колистину. Ввиду неконтролируемого инфекционного процесса, тяжести состояния пациентки и высокой вероятности неблагоприятного исхода была предпринята попытка комбинированной терапии колистином в сочетании с карбапенемом, а именно – дорипенемом.

Введение дорипенема решено было проводить по протоколу десенсибилизации (пример схемы десенсибилизации представлен в таблице [32]). На 3-м часу введения 1 дозы раствора дорипенема, несмотря на десенсибилизацию, у пациентки наблюдалась анафилактическая реакция с ухудшением состояния: затруднение дыхания, одышка, О2-зависимость (5–6 л/мин), аллергическая сыпь по типу крапивницы по всему телу, падение АД до 90/50 мм рт. ст., тахикардия до 170 ударов в мин. В связи с вышеперечисленным инфузия дорипенема была прекращена.

Протокол десенсибилизации (на примере карбоплатина)

Получите письменное согласие пациента/родителей / законного представителя. Для начала протокола переведите пациента в отделение реанимации для динамического наблюдения и мониторирования жизненных показателей. Установите внутривенный доступ, контролируйте основные витальные показатели: температура, частота сердечных сокращений, частота дыхания, сатурация, артериальное давление. Перед началом процедуры подготовьте раствор эпинефрина (0,3 мл для взрослого пациента) для внутримышечной инъекции в случае возникновения неотложной ситуации. Установите непрерывное наблюдение за пациентом отдельной медицинской сестры на время проведения протокола.
Премедикация: введение дифенгидрамина внутривенно и ранитидина внутривенно в возрастной дозировке за 20 минут до начала протокола. Для пациентов, развивших эритему во время своей первой реакции гиперчувствительности, рекомендован аспирин (325 мг перорально для взрослых пациентов) за ночь до проведения протокола. Для пациентов с респираторными симптомами во время своей первой реакции гиперчувствительности рекомендован монтелукаст (10 мг перорально для взрослых пациентов) за ночь до проведения и утром в день проведения протокола.
Проведение: последовательное введение указанного в протоколе объема раствора с лекарственным средством с указанной скоростью. Смена пакетов с раствором проводится каждые 15 минут. Нет необходимости в ожидании определенного времени между сменой пакетов. Основные витальные показатели должны измеряться каждые 15 минут на протяжении 1–11-го шага и каждые 30 минут на протяжении 12-го шага.
Название лекарственного средства: карбоплатин. **Необходимая доза:** 400 мг. **Стандартный объем пакета с раствором:** 250 мг. **Конечная целевая скорость инфузии:** 75 мл/час. **Целевая концентрация лекарственного средства:** 1,6 мг/мл. **Суммарное время введения:** 200 минут.

Окончание таблицы

	Объем раствора	Концентрация раствора	Количество лекарственного средства в растворе, мг	Объем введенного раствора из пакета, мл
Раствор № 1	250 мл	0,016 г/л	4000	8,67
Раствор № 2	250 мл	0,160 г/л	40 000	17,58
Раствор № 3	250 мл	1,588 г/л	397 049	250,00

Шаг	Номер пакета с раствором	Скорость введения, мл/час	Время введения, мин.	Объем раствора, введенного за этот шаг, мл	Количество лекарственного средства, введенного за этот шаг, мг	Суммарная доза лекарственного средства, полученного пациентом, мг
1	1	1,9	15	0,47	0,0075	0,0075
2	1	4,7	15	1,17	0,0188	0,0263
3	1	9,4	15	2,34	0,0375	0,0638
4	1	18,8	15	4,69	0,0750	0,1388
5	2	4,7	15	1,17	0,1875	0,3263
6	2	9,4	15	2,34	0,3750	0,7013
7	2	18,4	15	4,69	0,7500	1,4513
8	2	37,5	15	9,38	1,5000	2,913
9	3	9,4	15	2,34	3,7223	6,6736
10	3	18,4	15	4,69	7,4447	14,1182
11	3	37,5	15	9,38	14,8893	29,0076
12	3	75,0	186,875	233,59	370,9924	400,0000

Лечение при возникновении аллергических реакций:

Для реакций легкой степени тяжести: в случае развития зуда, эритемы, крапивницы, легкого чувства стеснения в груди, тошноты, боли в животе или спине при нормальных витальных показателях – остановить введение раствора и ввести дифенгидрамин внутривенно в возрастной дозировке. Наблюдать пациента до разрешения реакции и возобновить введение протокола.
Для тяжелых реакций: в случае развития гипотензии, отека гортани, появления хрипов / признаков респираторного дистресс-синдрома, снижения сатурации – остановить введение раствора и ввести эпинефрин внутримышечно, дифенгидрамин и метилпреднизолон внутривенно в возрастной дозировке, ингаляция с сальбутамолом для купирования бронхоспазма, внутривенное введение физиологического раствора. Если пациент стабилен, проведение протокола может быть возобновлено

Platinum desensitization protocol (example)

Receive a written consent in medical record. Initial desensitization is performed in the medical ICU.
Obtain access IV and vital signs: temperature, heart rate, respiratory rate, oxygen saturation, blood pressure, and diuresis.
Prepare Epinephrine 0.3 mg (for adults) for IM injection in case of emergency.
A nurse must closely observe the patient throughout the protocol.

Premedications: Give diphenhydramine IV and ranitidine IV in proper dose 20 minutes before starting the protocol. For patients with flushing during their initial hypersensitivity reaction, give aspirin (325 mg orally for adults) the night before the protocol. For patients with respiratory symptoms during their initial reaction, give montelukast (10 mg orally for adults) the night before and in the morning of the protocol.

Administration: Hang each solution successively, changing the rate every 15 minutes, per protocol. There is no reason to wait between bags. Vital signs should be taken and recorded every 15 minutes, and every 30 minutes during the last step (step 12).

Name of medication: Carboplatin.
Target dose, mg: 400.
Standard volume per bag, mL: 250.
Final rate of infusion, mL/hr: 75.
Calculated target concentration, mg/mL: 1.6.
Standard time of infusion, minutes: 200.

Table end

		Solution		Concentration		Total mg per bag	Amount of bag infused, ml.
Solution №1		250mL		0.016 g/L		4.000	8.67
Solution №2		250mL		0.160 g/L		40.000	17.58
Solution №3		250mL		1.588 g/L		397.049	250.00
Step	Solution	Rate, mL/hr	Time, min	Volume infused per step, mL	Dose administered with this step, mg	Cumulative dose, mg	
1	1	1.9	15	0.47	0.0075	0.0075	
2	1	4.7	15	1.17	0.0188	0.0263	
3	1	9.4	15	2.34	0.0375	0.0638	
4	1	18.8	15	4.69	0.0750	0.1388	
5	2	4.7	15	1.17	0.1875	0.3263	
6	2	9.4	15	2.34	0.3750	0.7013	
7	2	18.4	15	4.69	0.7500	1.4513	
8	2	37.5	15	9.38	1.5000	2.913	
9	3	9.4	15	2.34	3.7223	6.6736	
10	3	18.4	15	4.69	7.4447	14.1182	
11	3	37.5	15	9.38	14.8893	29.0076	
12	3	75.0	186.875	233.59	370.9924	400.0000	
Treatment of allergic reactions:							
For mild reactions: in case of isolated itching, flushing, hives, mild chest tightness, nausea, abdominal pain, or back pain, with normal vital signs, stop the infusion and treat with IV diphenhydramine. Observe patient until the reaction stops, and then resume the protocol at the last step that was tolerated. For severe reactions: in case of hypotension, throat swelling, wheezing/respiratory distress, or decreased oxygen saturation, stop the infusion and treat with Epinephrine 0.3 mg IM, diphenhydramine and methylprednisolone IV in proper dose, nebulized salbuterol for bronchospasm, and IV fluids (normal saline). If the patient is stable, the protocol can be resumed.							

Попыток введения карбапенемов больше не предпринималось.

Несмотря на проводимое лечение, состояние пациентки прогрессивно ухудшалось. Инфекционный эпизод завершился летальным исходом. Общая длительность эпизода составила 27 дней от начала фебрильной нейтропении.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Карбапенемы имеют наиболее широкий спектр активности среди всех β-лактамных антибиотиков и играют важную роль в лечении различных инфекционных заболеваний. Карбапенемы обладают хорошей переносимостью, благоприятным профилем безопасности и достаточно низкой частотой встречаемости аллергических реакций.

В литературе на данный момент существует мало описаний перекрестной реактивности внутри группы карбапенемов, в основном данные сводятся к описанию отдельных случаев. Однако, несмотря на редкую встречаемость, возможность перекрестных реакций внутри группы карбапенемов существует.

Основываясь на имеющихся ограниченных данных, в отсутствие других доступных вариантов лечения альтернативное лекарственное средство из группы карбапенемов должно быть использовано с осторожностью у пациентов с предшествующей аллергией на карбапенемы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Henry R. (2019) Etymologia: Carbapenem. *Emerg. Infect. Dis.*, 25. Epub Ahead of Print. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/7/et-2507_article.
2. Blumer J.I. (1997) Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. *Intern J Antimicrob Agent,* 8 (2), pp. 73–92.
3. (1985) *Primaxin (Imipenem/Cilastatin).* Merck & Co Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050587s074lbl.pdf.
4. (1996) *Merrem (Meropenem).* AstraZeneca: Wilmington, DE, USA. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050706s037lbl.pdf.
5. (2001) *Invanz (Ertapenem).* Merck & Co Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021337s038lbl.pdf.
6. (2007) *Doribax (Doripenem).* Janssen Pharmaceuticals, Inc.: Titusville, NJ, USA. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022106s008lbl.pdf.
7. Terico A.T., Gallagher J.C. (2014) Beta-lactam hypersensitivity and cross-reactivity. *J. Pharm. Pract.,* 27, pp. 530–544.
8. Calandra G.B., Wang C., Aziz M., Brown K.R. (1986) The safety profile of imipenem/cilastatin: Worldwide clinical experience based on 3470 patients. *J. Antimicrob. Chemother.,* 18 (Suppl. E), pp. 193–202.
9. Calandra G.B., Ricci F.M., Wang C., Brown K.R. (1988) The results and safety profile of imipenem/cilastatin from the clinical research trials. *J. Clin. Pharmacol.,* 28, pp. 120–127.
10. Linden P. (2007) Safety profile of meropenem: An updated review of over 6,000 patients treated with meropenem. *Drug Saf.*, 30, pp. 657–668. Available at: https://link.springer.com/content/pdf/10.2165%2F00002018-200730080-00002.pdf.
11. Teppler H., Gesser R.M., Friedland I.R., Woods G.L., Meibohm A., Herman G., Mistry G., Isaacs R. (2004) Safety and tolerability of ertapenem. *J. Antimicrob. Chemother.,* 53 (Suppl. 2), pp. ii75–ii81.
12. Redman R., File T.M., Jr. (2009) Safety of intravenous infusion of doripenem. *Clin. Infect. Dis.*, 49 (Suppl. 1), pp. 28–35.
13. Mirakian R., Leech S.C., Krishna M.T., Richter A.G., Huber P.A., Farooque S., Khan N., Pirmohamed M., Clark A.T., Nasser S.M. (2015) Standards of Care Committee of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. Management of allergy to penicillins and other beta-lactams. *Clin. Exp. Allergy*, 45, pp. 300–327.
14. Macy E., Poon K.-Y.T. (2009) Self-reported antibiotic allergy incidence and prevalence: Age and sex effects. *Am. J. Med.*, 122, pp. 778.e1–778.e7.
15. Idsoe O., Guthe T., Willcox R.R., deWeck A.L. (1968) Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull. World Health Org.,* 38, pp. 159–188.
16. Adkinson N.F., Jr. (1984) Risk factors for drug allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 74, pp. 567–572.
17. Moss R.B. (1991) Drug allergy in cystic fibrosis. *Clin. Rev. Allergy,* 9, pp. 211–229.
18. Apter A.J., Kinman J.L., Bilker W.B., Herlim M., Margolis D.J., Lautenbach E., Hennessy S., Strom B.L. (2006) Is there cross-reactivity between penicillins and cephalosporins? *Am. J. Med.*, 119, pp. 354.e11–354.e19.
19. Apter A.J., Schelleman H., Walker A., Addya K., Rebbeck T. (2008) Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.,* 122, pp. 152–158.
20. Attaway N.J., Jasin H.M., Sullivan T.J. (1991) Familial drug allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.,* 87, 227.
21. Saxon A., Adelman D.C., Patel A., Hajdu R., Calandra G.B. (1988) Imipenem cross-reactivity with penicillin in humans. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 82, pp. 213–217.
22. Frumin J., Gallagher J.C. (2009) Allergic cross-sensitivity between penicillin, carbapenem, and monobactam antibiotics: What are the chances? *Ann. Pharmacother.*, 43, pp. 304–315.
23. Prescott W.A., Jr., DePestel D.D., Ellis J.J., Regal R.E. (2004) Incidence of carbapenem-associated allergic-type reactions among patients with versus patients without a reported penicillin allergy. *Clin. Infect. Dis.*, 38, pp. 1102–1107.
24. Kula B., Djordjevic G., Robinson J.L. (2014) A systematic review: Can one prescribe carbapenems to patients with IgE-mediated allergy to penicillins or cephalosporins? *Clin. Infect. Dis.*, 59, pp. 1113–1122.
25. Gaeta F., Valluzzi R.L., Alonzi C., Maggioletti M., Caruso C., Romano A. (2015) Tolerability of aztreonam and carbapenems in patients with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 135, pp. 972–976.
26. Romano A., Gaeta F., Valluzzi R.L., Caruso C., Rumi G., Bousquet P.J. (2010) IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins: Cross-reactivity and tolerability of penicillins, monobactams, and carbapenems. *J. Allergy Clin. Immunol.,* 126, pp. 994–999.
27. Chen Z., Baur X., Kutscha-Lissberg F., Merget R. (2000) IgE-mediated anaphylactic reaction to imipenem. *Allergy,* 55, pp. 92–93.
28. Seth L., Bauer G.C., Wall K.J., Skoglund L.K. (2004) Peters/Lack of cross-reactivity to meropenem in a patient with an allergy to imipenem-cilastatin. *J. Allergy Clin. Immunol.,* 113, pp. 173–175. Available at: https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(03)02549-1/.
29. Karim Lakhal, Brice Lortat-Jacob, Catherine Neukirch (2007) Safe Use of Meropenem in a Patient with a Possible Nonimmediate Allergy to Imipenem. *Pharmacotherapy*, 27, pp. 1334–1338. Available at: https://accpjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1592/phco.27.9.1334 (accessed 12 June 2019).
30. Noguerado-Mellado B., Fernández C.P., Pineda-Pineda R., Lezcano P.M., Álvarez-Perea A., De Barrio Fernández M. (2014) Cross-reactivity between carbapenems: Two case reports. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.,* 2, pp. 816–817.
31. Gil-Serrano J., Cardona V., Luengo O., Guilarte M., Sala-Cunill A., Galvan-Blasco P., Labrador-Horrillo M. (2019) Anaphylactic shock to meropenem with ertapenem tolerance: A case report. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 7, pp. 2057–2058.
32. Mariana C. Castells, Ursula A. Matulonis, Terzah M. Horton (2019) Platinum desensitization (example). *Infusion reactions to systemic chemotherapy.* Available at: https://www.uptodate.com/contents/infusion-reactions-to-systemic-chemotherapy?search=desensitization%20protocols&sectionRank=1&usage_type=default&anchor=H29&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display_rank=1#H29.

Поступила/Received: 07.02.2020
Контакты/Contacts: aliaksandralap@mail.ru

Памяти Лунёвой Анны Геннадиевны – главного редактора журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» в Украине

30.01.2020 года перестало биться сердце прекрасного человека, талантливого ученого, педагога и врача Лунёвой Анны Геннадиевны.

Родилась Анна Геннадиевна 01.05.1961 года в городе Славянске Донецкой области. Среднюю школу закончила с золотой медалью в 1978 году. В 1984 году с отличием закончила лечебный факультет Донецкого государственного медицинского института имени М. Горького. Являлась представителем врачебной династии в третьем поколении.

В своей трудовой деятельности Анна Геннадиевна достигла вершины профессионализма благодаря упорной и постоянной работе над собой.

С 1985 по 2007 годы она прошла путь от врача-лаборанта иммунологической группы отделения хронического гемодиализа и трансплантации почки до областного специалиста по клинической лабораторной диагностике Донецкой области. Работая в практической медицине, постоянно повышала свой профессиональный уровень и параллельно занималась научной работой.

С 1985 года проходила стажировку, а в последующем усовершенствование по специальности «иммунология» в странах СНГ (Москва, Ленинград, Витебск, Киев) и в ведущих научных центрах мира (Великобритания 1992 год, Австрия 1993 год, Хьюстон, США 1995–1996 годы, Германия 2011–2012 годы, Франция 2015 год).

В 1991 году Анна Геннадиевна защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Диагностика кризиса отторжения и оптимизации иммуносупрессивной терапии у пациентов с аллотрансплантированной почкой».

В 2004 году защитила докторскую диссертацию «Роль Т-хелперной цепи иммунитета в реакции отторжения почечного трансплантата».

С 1 февраля 2007 года Анна Геннадиевна заведовала кафедрой клинической лабораторной диагностики НМАПО имени П.Л. Шупика. С 2012 года стала главным внештатным специалистом по клинической лабораторной диагностике Министерства здравоохранения Украины.

Успешно совмещая общественную, педагогическую, научную и лечебно-диагностическую деятельность, Анна Геннадиевна внесла существенный вклад в развитие лабораторной медицины в Украине. Являлась главным редактором от Украины в профессиональном международном научно-практическом журнале «Лабораторная диагностика. Восточная Европа».

Автор 275 научных работ, 6 изобретений, 8 монографий, 6 учебно-методических пособий и 2 учебников. На ее счету многочисленные

выступления на конференциях и съездах, в том числе на десяти международных конгрессах по лабораторной медицине.

Среди учеников, помимо слушателей многочисленных и разнообразных циклов, более 20 клинических ординаторов и магистров, в том числе иностранных, и 3 аспиранта, которые успешно защитили кандидатские диссертации.

Невозможно перечислить все заслуги Анны Геннадиевны. В ее лице коллектив, в котором она работала, потерял профессионального наставника и настоящего друга.

Сотрудники кафедры клинической лабораторной диагностики НМАПО имени П.Л. Шупика, Всеукраинская ассоциация клинической химии и лабораторной медицины, редакционная коллегия международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» и коллектив издательства «Профессиональные издания» скорбят и выражают соболезнования родным и близким Лунёвой Анны Геннадиевны в связи с ее преждевременной смертью.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Изменены правила оформления научных статей, предоставляемых авторами для публикации

Редакция рассматривает статьи, нигде ранее не публиковавшиеся и не предоставленные для публикации в другие редакции.

Авторские материалы принимаются редакцией на условиях: однократной публикации в одном журнале; переделки или иной переработки, а также подбора и расположения авторских материалов в журнале; безвозмездной уступки авторских прав на данный материал в порядке неисключительной лицензии, размещаемый по усмотрению редакции в электронных библиотеках.

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят многоступенчатое рецензирование. Замечания рецензентов направляются автору без указания имен рецензентов. После получения рецензий и ответов автора редколлегия принимает решение о публикации (или отклонении) статьи. Редакция оставляет за собой право отклонить статью без указания причин. Очередность публикации устанавливается в соответствии с редакционным планом издания журнала. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного и формального характера вносятся в статью без согласования с автором. Если статья перерабатывалась автором в процессе подготовки к публикации, датой поступления считается день поступления окончательного текста.

Статья должна быть предоставлена в редакцию в электронной версии с подписями авторов. Статья должна сопровождаться письмом-заявлением в произвольной форме.

Авторы должны представить в редакцию информацию о конфликте интересов.

Авторы должны представить в редакцию информацию об участии в работе над статьей.

Упомянутые в статье лекарственные средства или изделия медицинского назначения должны иметь действующую регистрацию в стране проведения исследования, а способы их применения – соответствовать утвержденной инструкции либо иметь разрешение на проведение клинического исследования. В статье должны использоваться только международные наименования лекарственных средств (за исключением статей, публикующихся с пометкой «На правах рекламы»).

Статья должна содержать: код УДК; название; фамилию, имя, отчество (полностью) каждого автора с указанием места работы; контактную информацию для публикации в свободном доступе для общения читателей с автором (почтовый адрес, телефон, e-mail); структурированное резюме (аннотацию) объемом от 1800 до 2500 знаков для оригинальных исследований), включая ключевые слова, на русском языке. Для обзорных статей и описаний клинических случаев требований к структуре резюме нет, объем его должен составлять не менее 1000 знаков с пробелами.

Название статьи, резюме, ключевые слова, фамилию, полное имя, отчество автора и место работы необходимо перевести на английский язык.

Названия таблиц, рисунков и диаграмм, подписи в них также должны быть продублированы на английском языке.

Объем оригинального исследования, включая таблицы, список литературы и резюме, не должен превышать 30 тыс. знаков с пробелами, обзора – 45 тыс. знаков с пробелами.

Электронная версия статьи должна быть создана с помощью текстового редактора Microsoft Word любой версии.

Ориентация – книжная.

Шрифт – Times New Roman.

Кегель – 12 пунктов.

Междустрочный интервал – полуторный.

Расстановка переносов – переносов нет.

Форматирование – в параметре «по ширине».

Цвет шрифта – черный.

Отступ (красная строка) – 1,5 см.

При наборе основного текста не допускается установление двух и более символов «пробел» подряд, абзацных и других отступов с помощью клавиши «Табуляция», отступа (пробела) между словом и символами «точка», «запятая», «кавычка», «скобка».

Заголовки и подзаголовки набираются полужирным шрифтом с выравниванием слева, точка в конце заголовка не ставится. Иного форматирования (выделения курсивом, подчеркиванием) в тексте статьи не допускается. Перед заголовками оставляется один абзацный отступ.

Нумерованный и маркированный списки формируются только автоматически.

Названия схем и рисунков помещают под ними, выравнивают слева, в две строки номер и собственно название рисунка или схемы.

Таблицы должны иметь название, быть компактными, наглядными, заголовки граф должны точно соответствовать их содержанию, иметь ссылки в тексте. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте.

Таблица должна быть создана в текстовом редакторе Microsoft Word любой версии. Название таблицы помещают над таблицей слева, без абзацных отступов: ее номер и собственно название. В конце заголовков и подзаголовков таблиц точки не ставятся. После таблицы текст размещается с одним абзацным отступом.

Математические и химические формулы должны быть написаны очень четко, с указанием на полях букв алфавита (строчных, прописных, греческих, латинских), показателей степени, индексов надстрочных и подстрочных.

Аббревиатуры, приводимые в статье, должны быть расшифрованы при первом упоминании.

Библиография должна быть приведена в конце статьи. В самом тексте следует указывать только номер ссылки в квадратных скобках цифрами. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. За точность библиографии несет ответственность автор. Список литературы ограничен 30 источниками для оригинального исследования и 50 – для обзора.

В связи с вхождением в международные наукометрические базы данных библиографические списки предоставляемых статей должны быть приведены в переводе названий источников на английский язык.

При условии соблюдения всех указанных выше требований статья должна быть отправлена на электронный адрес редакции интересующего вас журнала, который указан на странице каждого из изданий.