

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»

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

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

# КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63

7 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ИЮЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**

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

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

**Зав. редакцией Л. А. Шанкина**

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

*Е.М. Архипова*

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 20.06.2018.

Подписано в печать 14.06.2018.

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

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

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

**WWW страница: www.medlit.ru**

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ  
СЕРВИС", 119049, г. Москва,  
Калужская пл., д. 1, корп. 2

**Индекс 71442 — для подписчиков**

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

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

**Подписка на электронную версию:**

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

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.  
2018. № 7. 385—456.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63  
7 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JULY

The Journal is founded in 1955.

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

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:  
8-495-430-03-63,

E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

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

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

**БИОХИМИЯ**

- Веснина Ж.В.* Новые и потенциальные биомаркеры острого повреждения почек ..... 388
- Пастушкова Л.Х., Захарова Н.Б., Каширина Д.Н., Бржозовский А.Г., Лях Р.В., Понукалин А.Н., Ларина И.М.* Особенности протеома мочи при хроническом пиелонефрите ..... 397
- Великий Д.А., Гичкун О.Е., Шевченко А.О.* МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения ..... 403
- Смирнов Г.П., Малышев П.П., Рожкова Т.А., Зубарева М.Ю., Шувалова Ю.А., Ребриков Д.В., Титов В.Н.* Влияние распространённого варианта RS2230806 гена ABCA1 на уровни липидов плазмы у пациентов с дислипидемией ..... 410
- Третьякова Ю.И., Булатова И.А., Щёкотова А.П., Шелудько В.С.* Способ диагностики степени тяжести атаки у пациентов с язвенным колитом ..... 414
- Бельская Л.В., Сарф Е.А.* Определение содержания органических кислот в слюне больных раком молочной железы методом капиллярного электрофореза ..... 419
- Яковлев А.К., Алёшкин А.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П.* Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина ..... 422

**ИММУНОЛОГИЯ**

- Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н.* Использование неопластической клеточной линии МТ-4 для изучения иммуномодулирующей активности плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов ..... 428
- Александрова Е.Н., Верижникова Ж.Г., Новиков А.А., Панафидина Т.А., Попкова Т.В., Лукина Г.В.* Клиническое значение мультиплексного иммунного анализа антиядерных антител при системной красной волчанке ..... 434
- Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Орлова Н.В., Хавка Н.Н., Горяйнова С.В., Хорева М.В., Спирыкина Я.Г.* Изучение цитокинового профиля у мужчин с артериальной гипертензией. .... 439

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

- Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М.* Масс-спектрометрический маркер вирулентности *Vibrio cholerae*. .... 445
- Панфёрцев Е.А., Баранова Е.В., Мочалов В.В., Соловьёв П.В., Горбатов А.А., Бикетов С.Ф.* Конструирование рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis*, продуцирующего рекомбинантный химерный боррелиозный антиген ..... 450

**РЕЦЕНЗИЯ**

- Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдонина А.С.* Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами ..... 455

**BIOCHEMISTRY**

- Vesnina Zh.V.* New and potential biomarkers of acute kidney damage ..... 388
- Pastushkova L.Kh., Zakharova N.B., Kashirina D.N., Brzhozovsky A.G., Lyakh R.V., Ponukalin A.N., Larina I.M.* Features of the proteome of the urine in chronic pyelonephritis ..... 397
- Velikiy D.A., Gichkun O.E., Shevchenko A.O.* MicroRNAs: a role in the development of cardiovascular disease, the possibility for clinical application ..... 403
- Smirnov G.P., Malyshev P.P., Rozhkova T.A., Zubareva M.Yu., Shuvalova Yu.A., Rebrikov D.V., Titov V.N.* The effect of ABCA1 rs2230806 common gene variant on plasma lipid levels in patients with dyslipidemia ..... 410
- Tretyakova Yu. I., Bulatova I. A., Shchekotova A. P., Sheludko V.S.* Method of diagnosis of the severity of the disease attack in patients with ulcerative colitis ..... 414
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A.* Determination of the content of organic acids in the saliva of patients with breast cancer by capillary electrophoresis ..... 419
- Yakovlev A.K., Aleshkin A.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P.* Improvement of erythropoietin bioassay ..... 422

**IMMUNOLOGY**

- Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Nosik D.N.* Application of mt-4 neoplastic cell line for the study immunomodulating activity of patient plasma with HIV-infection ..... 428
- Aleksandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Panafidina T.A., Popkova T.V., Lukina G.V.* Clinical value of multiplex immune assay of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus ..... 434
- Chukaeva I.I., Gankovskaya L.V., Orlova N.V., Havka N.N., Goryaynova S.V., Khoreva M.V., Spiryakina Ya.G.* Study of cytokine profile in men with hypertension ..... 439

**MICROBIOLOGY**

- Chaika S.O., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M.* Mass-spectrometry virulence marker *Vibrio cholerae* ..... 445
- Panfertsev E. A., Baranova E. V., Mochalov V. V., Soloviev P. V., Gorbатов A. A., Biketov S. F.* Construction of recombinant strain *Brevibacillus choshinensis* for chimeric borrelia dbpa antigen production ..... 450

**REVIEW**

- Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S.* Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods ..... 455

## БИОХИМИЯ

© ВЕСНИНА Ж.В., 2018

УДК 616.61-036.11-074

Веснина Ж.В.

### НОВЫЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

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

*В обзоре представлены данные литературы, посвящённой изучению эффективности новых и потенциальных биомаркеров для ранней диагностики острого повреждения почек. Ранние неинвазивные и рентабельные биомаркеры повреждения почек жизненно важны для определения тактики, эффективности и прогноза лечения. Их использование будет способствовать не только снижению заболеваемости и смертности, но и уменьшению расходов на здравоохранение.*

**Ключевые слова:** острое повреждение почек; биомаркеры; креатинин.

**Для цитирования:** Веснина Ж.В. Новые и потенциальные маркеры острого повреждения почек. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 388-396. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-388-396>  
Vesnina Zh.V.

#### NEW AND POTENTIAL BIOMARKERS OF ACUTE KIDNEY DAMAGE

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, 634012, Tomsk, Russia

*The review presents literature data on the efficacy of new and potential biomarkers for the early diagnosis of acute renal damage. Early non-invasive and cost-effective kidney damage biomarkers are vital for determining the tactics, effectiveness and prognosis of treatment. Their use will not only reduce morbidity and mortality, but also reduce health care costs.*

**Key words:** acute renal damage, biomarkers, creatinine

**For citation:** Vesnina Zh.V. New and potential biomarkers of acute kidney damage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (7): 388-396. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-388-396>

**For correspondence:** Vesnina Zh.V., Dr. Sci. Med., Head of the Laboratory of Radionuclide Research Methods ; e-mail: zh-vesnina@mail.ru

**Information about author:** Vesnina Zh.V., <https://orcid.org/0000-0002-9238-6814>

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

**Acknowledgment.** The article is prepared in the field of Fundamental scientific research № AAAA-A15-115123110026-3.

Received 01.03.2018  
Accepted 03.04.2018

Почечная недостаточность – это патологическое состояние, при котором почки частично или полностью утрачивают способность поддерживать постоянство химического состава внутренней среды организма, что приводит к нарушению водно-электролитного и кислотно-щелочного баланса, расстройству гемостаза, азотемии. В результате в организме нарушаются содержание и распределение воды и солей, задерживаются нелетучие кислоты и азотистые продукты обмена. Возникают условия для артериальной гипертензии, анемии, кровоточивости, изменяется гормональная регуляция и др.

Признаки повреждения почек и/или снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) выявляют как минимум у каждого десятого человека в общей популяции. При этом сопоставимые цифры были получены как в индустриальных странах с высоким уровнем жизни, так и в развивающихся странах со средним и низким доходом населения.

Таким образом, быстрый рост в популяции числа

пациентов со сниженной функцией почек – не узкоспециальная, а общемедицинская междисциплинарная проблема, имеющая серьезные социально-экономические последствия [1, 2]. Диагностика почечной патологии, особенно в ранних стадиях, является чрезвычайно важной и актуальной проблемой для современной урологии и нефрологии.

Однако традиционные маркеры повреждений почек, такие как креатинин, показывают отсроченную реакцию (около 24 ч после начала развития патологического процесса). Сывороточный креатинин (СКр), который традиционно использовался почти во всех случаях диагностики острого повреждения почек (ОПП), является субоптимальным маркером на ранних сроках повреждения, и его уровни часто не отражают СКФ. Таким образом, при ОПП временные различия между изменениями в уровнях СКр и СКФ не дают возможности точно оценить сроки и тяжесть повреждения почечной паренхимы.

Сказанное свидетельствует о настоятельной потребности в поиске биомаркеров, которые обеспечат раннюю диагностику ОПП и могут быть использованы для стратификации риска пациентов и стратегии их лечения.

Одним из перспективных направлений является ис-

**Для корреспонденции:** Веснина Жанета Владимировна, д-р мед. наук, зав. лаб. радионуклидных методов исследования ; e-mail: zhvesnina@mail.ru

следование специфических белков, которые указывают на повреждение почек. За последнее десятилетие широкое распространение получили лабораторные тесты, основанные на определении в моче уникальных белков-биомаркеров. В настоящее время в моче и сыворотке крови выделено более 60 биомаркеров для оценки нарушения функции почек. Чтобы биомаркер имел значимость для клиники, существуют определенные критерии и требования [3, 4].

Идеальный биомаркер ОПП должен помочь определить первичное место повреждения (проксимальные или дистальные каналцы, интерстиций или сосудистая сеть), продолжительность почечной недостаточности (ОПП, хроническая болезнь почек (ХБП) или «обострение хронического процесса»), её причину (токсины, сепсис, ишемия или комбинация факторов), подтип ОПП (преренальное, ренальное (intrinsic) или постренальное), дифференцировать ОПП от других типов острой почечной болезни (гломерулонефрит, интерстициальный нефрит или инфекция мочевых путей), определить риск и приблизительный прогноз (тяжесть и продолжительность ОПП, продолжительность пребывания в стационаре, необходимость в почечной заместительной терапии и смертность), а также отслеживать течение повреждения почек и вести мониторинг реакции на терапевтические вмешательства. Наконец, идеальный биомаркер должен быть как специфическим (типичным для повреждения органа), так и чувствительным (ранний признак повреждения органа). Его определение должно иметь хорошую воспроизводимость, быть относительно дешёвым и технически несложным.

Ранние маркеры повреждения почек жизненно важны для определения тактики и эффективности лечения и снижения заболеваемости и смертности. Концентрация биомаркеров должна изменяться в зависимости от степени повреждения органа даже при отсутствии типичных клинических признаков. Они должны быть также использованы для оценки реакции на раннее терапевтическое вмешательство и прогноза.

Краткое описание биомаркеров, представленных в данной статье, изложено в таблице.

**NGAL (липокалин).** Ранним предиктором нарушения функции почек может служить NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin – липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов). NGAL представляет собой транспортный белок для низкомолекулярных веществ массой 25 кДа, который принадлежит к надсемейству липокалинов. Гомодимерную форму NGAL продуцируют нейтрофилы. Мономерные (главным образом) и гетеродимерные формы являются преобладающими формами, продуцируемыми каналцами почек [5]. Концентрация NGAL у нормальных субъектов составляет 20 нг/мл как в сыворотке, так и в моче. NGAL фильтруется клубочками и затем реабсорбируется проксимальными каналцами, где он частично разлагается мегалином и выводится с мочой. Впервые NGAL был выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, но синтезироваться он может в разных органах и разных типах их клеток [6]. Хотя он присутствует во многих тканях человека, было обнаружено, что NGAL является одним из наиболее активированных транскриптов в почках после острой травмы, что указывает на его роль как раннего маркера структурного повреждения клеток каналцев [6].

При ишемическом и токсическом повреждении почек многократно увеличивается экспрессия липокалина

в клетках канальцевого эпителия, возрастает его концентрация в плазме крови (s-NGAL) и экскреция с мочой (u-NGAL), опережая на 24–48 ч повышение уровня креатинина [7]. У пациентов с альбуминурией наблюдается увеличение его экскреции даже без повреждения клеток канальцев.

В литературе опубликовано большое число клинических исследований и обзоров, касающихся потенциальной роли NGAL в качестве надежного диагностического и прогностического биомаркера ОПП. М. Naase и соавт. [8] провели объединённый анализ совокупных данных 10 проспективных исследований NGAL, включавших 2322 критически больных пациентов. У 19,2% пациентов был увеличен уровень NGAL без соответствующих изменений СКр. Таким образом, они определили «субклиническое ОПП», когда у пациентов увеличивается концентрация NGAL в моче, а СКр остаётся нормальным. Авторы обнаружили, что пациенты с повышенным уровнем NGAL и нормальным уровнем креатинина значительно чаще нуждаются в заместительной почечной терапии или умирают в стационаре, чем пациенты с нормальным уровнем NGAL и нормальным креатинином [8]. Примечательно, что в данном анализе у 43% пациентов диагноз ОПП по уровням NGAL не был бы установлен с использованием только параметров креатинина [8].

Согласно многочисленным исследованиям повышенные уровни NGAL – ранний маркер развития ОПП после кардиохирургических операций [4, 9, 10]. Повышение концентрации NGAL в плазме крови обнаруживается уже спустя 2–12 ч после кардиохирургических вмешательств у детей и отражает раннюю стадию послеоперационного ОПП с чувствительностью 100 и 89,5%, соответственно [10].

Аналогичные результаты были получены в проспективном исследовании взрослых кардиохирургических пациентов. G. Wagener и соавт. [9] исследовали 81 пациента, перенесших операцию на сердце: у 16 (20%) развилось послеоперационное ОПП. Эти пациенты имели значительно более высокие послеоперационные значения NGAL ( $5,994 \pm 7,616$  нг/мл;  $n = 16$ ) по сравнению с пациентами, у которых не развилось ОПП ( $1,760 \pm 3,527$  нг/мл;  $n = 65$ ;  $p = 0,0014$ ).

Кроме того, у кардиохирургических пациентов с наиболее высокими уровнями интерлейкина-6 через 1 ч после операции было обнаружено и более значительное содержание в крови NGAL. Впоследствии у 70% таких больных было диагностировано ОПП [11].

Специальные исследования показали, что NGAL является точным предиктором нефротоксического поражения почек после введения контрастов при проведении, в частности, чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА) [12]. Так, группой авторов из Польши в ряде исследований было установлено, что уровни s-NGAL достоверно повышаются через 2, 4 и 8 ч после ЧТКА, а уровни u-NGAL – через 2, 4 и 24 ч после рентгеноконтрастной процедуры [12]. При этом повышение уровней s-NGAL после ЧТКА указывает на вероятность развития нефропатии с чувствительностью 90% и специфичностью 74%.

Исследования также проводились у реципиентов, чтобы выяснить, может ли NGAL быть биомаркером почечной дисфункции после трансплантации. Y. Li и соавт. [13] оценили возможность использования NGAL в качестве маркера раннего повреждения почек у пациентов, пере-

### Обзор биомаркёров ОПП

Биомаркёр	Синтез и выделение	Основные исследования
Липокалин (NGAL)	Увеличивается экспрессия в клетках эпителия проксимальных и дистальных канальцев в ответ на повреждение	Haase M. и др. [8]
Цистатин С (Цис-С)	Синтезируется и высвобождается в плазме всеми ядерными клетками с постоянной скоростью. Концентрация в сыворотке определяется уровнем клубочковой фильтрации	Herget-Rosenthal S. и др. [22]
Интерлейкин-18 (ИЛ-18)	Продуцируется в клетках проксимальных канальцев после повреждения ишемией-реперфузией, но также активируется при общем воспалительном ответе	Liu Y. и др. [30]
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (NAG)	Лизосомный фермент высвобождается в почечные канальцы из повреждённых клеток проксимальных канальцев	Han W. и др. [46]
КИМ-1 (kidney injury molecule-1)	Активация в эпителиальных клетках проксимальных канальцев в ответ на травмы, такие как ишемия-реперфузия и нефротоксины	Han W. и др. [42]
Белок, связывающий жирные кислоты (БСЖК)	Увеличение уровня в моче пропорционально тяжести тубулоинтерстициального повреждения, вызванного чужеродным белком, цитотоксином и ишемией	Ferguson M. и др. [57]
Мидкин (Midkine)	Экспрессия в клетках проксимальных канальцев в ответ на повреждение, вызванное ишемией-реперфузией	Malyszko J. и др. [61]
Молекулы микроРНК (мРНК)	Экспрессия мРНК как результат реперфузионного повреждения почек и воспаления	Aguado-Fraile E. и др. [67]
Альфа-глутатион (α-ГСТ) и пилглутатион (π-GST) S-трансферазы	При повреждении почек α-ГСТ обнаруживается в клетках проксимальных канальцев, π-ГСТ – в клетках дистальных канальцев	de Geus H. и др. [35]
Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП) и щелочная фосфатаза	Появляются в моче при повреждении почечных проксимальных канальцев	
Маркёры остановки клеточного цикла (IGFBP7 и TIMP-2)	Активация факторов остановки клеточного цикла как следствие повреждения клеток, в частности ДНК	Kashani K. и др. [74]

несших трансплантацию печени. Уровни NGAL в моче были незначительно повышены в течение 2 ч у пациентов без ОПП, в то время как они поднимались и оставались высоким от 2 до 6 ч у пациентов с ОПП. У пациентов с задержкой функции почечного трансплантата из-за повреждения клеток канальцев пик уровня послеоперационного СКр, требующий диализа, приходился на 2–4-й день после трансплантации, тогда как уровни NGAL были повышены уже в день пересадки [14].

Было показано, что NGAL является ранним, чувствительным и прогностическим биомаркёром ОПП, индуцированного некоторыми нефротоксичными препаратами [15].

Как упоминалось выше, роль NGAL не ограничивается мочевыводящей системой. Установлено, что уровни s-NGAL связаны с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Так, в работе К. Choi и соавт. [11] было отмечено, что у пациентов с ангиографически подтверждёнными стенозами коронарных артерий средней уровень s-NGAL составил  $82,6 \pm 38,7$  нг/мл против  $43,8 \pm 27,8$  нг/мл в группе контроля. Авторы полагают, что измерение s-NGAL может быть полезным для оценки риска ССЗ, поскольку его уровни были независимо связаны не только с коронарным атеросклерозом, но также с инсулинорезистентностью и систолическим давлением. В исследовании Zh. Vesnina и соавт. [16] средняя величина липокалина-2 у обследованных пациентов с I–III функциональным классом составила  $67,76 \pm 6,8$  нг/мл, что превышает средний показатель для индивидуумов без ССЗ. Более того, авторами обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь между уровнями s-NGAL и фракцией выброса левого желудочка ( $R = -0,37$ ;  $p = 0,02$ ) [16]. Эти результаты показывают, что NGAL может быть чувствительным биомаркёром при кардиоренальном синдроме (КРС).

Хотя NGAL может играть ключевую роль в мониторинге КРС 1-го и 3-го типов, есть также доказательства

того, что он может прогнозировать ухудшение ХБП, и это впоследствии может повлиять на диагностику и лечение КРС 2-го и 4-го типов [17].

Таким образом, имеются основания рассматривать NGAL в качестве раннего чувствительного неинвазивного маркёра ОПП [8]. При этом уровни NGAL в плазме крови и моче имеют сходное диагностическое и прогностическое значение по отношению к ОПП [7]. Другие авторы указывают, что уровень плазменного NGAL менее специфичен, чем его концентрация в моче [18].

**Цистатин С.** В качестве гломерулярного тест-агента (маркёра СКФ) был предложен цистатин С – катионоактивная низкомолекулярная цистеинпротеаза (13 кДа), которая продуцируется всеми ядерными клетками с постоянной скоростью и не метаболизируется в сыворотке крови [19]. Принято считать, что элиминация цистатина С (Цис-С) более чем на 99% осуществляется почками путем гломерулярной фильтрации [20], и в интактном виде его молекула не подвергается канальцевой секреции и реабсорбции. Таким образом, его концентрация в сыворотке определяется уровнем клубочковой фильтрации. Более короткий период полувыведения Цис-С объясняет более раннее изменение его уровня в сыворотке по сравнению с креатинином при снижении СКФ [19]. Продукция Цис-С в отличие от креатинина считается малозависимой от различных факторов: возраста, пола, расы, мышечной массы и гидроволемии организма [19]. В связи с этим использование концентрации Цис-С для оценки СКФ имеет определённые преимущества перед другими маркёрами. Было высказано предположение, что Цис-С можно применять в клинических ситуациях, когда трудно доверять измерениям креатинина: у пожилых людей, пациентов с кахективными нарушениями или многочисленными сопутствующими заболеваниями [21].

При исследовании пациентов с высоким риском развития ОПП было установлено, что сывороточный Цис-С

позволяет обнаружить его развитие на 1–2 сут раньше, чем креатинин, с чувствительностью и специфичностью 82 и 95%, соответственно [22].

Было также показано, что Цис-С обладает хорошей прогностической ценностью. У 480 пациентов с острой сердечной недостаточностью уровень Цис-С выше медианы 1,30 мг/л был связан с самыми высокими рисками смерти от всех причин в течение 12 мес [21].

Определение сывороточного уровня Цис-С для диагностики контраст-индуцированной нефропатии (КИН) проводили в своём исследовании Н. Rickli и соавт. [20], которые показали, что концентрация Цис-С достигает своего пика через 24 ч после введения контраста и через 48 ч возвращается к исходному уровню, что позволяет выявлять даже небольшие изменения СКФ [20, 23]. Концентрация СКр к этому периоду ещё продолжает повышаться и обычно достигает максимального уровня через 2–5 сут после воздействия контраста [20].

С. Vriguoi и соавт. [23] показали, что повышение Цис-С в сыворотке крови на 10% в течение 24 ч исключает контраст-индуцированное ОПП (КИ-ОПП), в то время как повышение на 10% через 24 ч является независимым предиктором серьёзных побочных эффектов, включая смерть и диализ.

Вместе с тем Цис-С подвергается и критике. Исследование, в которое вошел 1621 пациент среднего возраста из общей популяции (без наличия коронарной или почечной патологии), показало, что Цис-С не был лучшим маркером для оценки СКФ по сравнению с плазменным креатинином [24]. Это связано с тем, что альбуминурия ингибирует почечную трубчатую реабсорбцию Цис-С, вызывая тем самым его экскрецию с мочой [7]. Поэтому по сравнению с сывороточным Цис-С мочевого Цис-С является более ранним биомаркером ОПП [7].

Кроме того, помимо функции почек на содержание цистатина С влияют подъём уровня С-реактивного белка, терапия стероидами, ревматоидный артрит [25].

Очевидно, необходимо провести дополнительные исследования с маркером, прежде чем можно будет определить его роль. Тем не менее, несмотря на то, что идеальный маркер КРС или повреждения почек вообще должен быть структурным, свидетельствующим о фактическом повреждении тканей (например, тропонины для диагностики повреждения миокарда), результаты исследования Цис-С указывают на то, что он может занять достойное место среди функциональных почечных биомаркеров.

**Интерлейкин-18.** Интерлейкин-18 (ИЛ-18) – это провоспалительный цитокин массой 18 кДа, который активируется во время эндогенных воспалительных процессов и играет важную роль в патофизиологии сепсиса [26]. Было показано, что мочевого ИЛ-18 продуцируется эпителиальными клетками проксимальных канальцев и служит медиатором острого ишемического тубулярного некроза у экспериментальных животных, что делает его возможным кандидатом в качестве раннего маркера ОПП при измерении его уровня в моче [27].

При ОПП уровень ИЛ-18 увеличивается в течение 2 ч и остаётся повышенным в течение 24 ч [28]. В качестве маркера ОПП в самых ранних стадиях ИЛ-18 имеет чувствительность 87,5% [28]. Кроме того, мочевого ИЛ-18 повышается параллельно с NGAL и продолжает повышаться даже после того, как концентрация NGAL, напротив, начинает снижаться [29].

Метаанализ 23 исследований с участием 4512 паци-

ентов показал, что мочевого ИЛ-18 является хорошим биомаркером ОПП у пациентов, перенесших операции на сердце, и у пациентов, госпитализированных в отделение интенсивной терапии (ОИТ) [30]. С. Parikh и соавт. [29] оценивали, является ли ИЛ-18 прогностическим биомаркером ОПП после искусственного кровообращения (ИК), что ими уже было показано для мочевого NGAL. В исследование были включены 20 пациентов, у которых развилось ОПП, и 35 больных без признаков ОПП после операции с использованием ИК. Применение СКр в качестве маркера ОПП показало его повышение через 2–3 дня после ИК. Однако при измерении уровней мочевого ИЛ-18 было отмечено, что они увеличились уже через 4–6 ч после ИК, достигнув максимума через 12 ч, и оставались заметно повышенными в течение 48 ч после операции. Результаты указывают на то, что ИЛ-18, как и NGAL, является ранним прогностическим биомаркером развития ОПП под влиянием ИК.

С. Parikh и соавт. [14] показали, что уровни ИЛ-18 в моче (как и NGAL) можно использовать в качестве раннего прогностического биомаркера функции почечного трансплантата, в том числе в качестве раннего точного предиктора необходимости в диализе уже в первую неделю после пересадки почки [14].

Другие результаты были получены Е. Siew и соавт. [31], которые перспективно оценивали способность мочевого ИЛ-18, измеренного в течение 24 ч с момента поступления, предсказать ОПП, необходимость в диализе и летальный исход в большой смешанной группе взрослого населения (451 пациент), находящейся в ОИТ. У 86 пациентов ОПП развилось в течение 48 ч с момента регистрации. На основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что мочевого ИЛ-18 не является хорошим маркером ОПП.

Следует также отметить, что исследования ОПП, вызванного контрастными средствами, также дали противоречивые результаты в отношении ИЛ-18 в качестве биомаркера повреждения. Н. Не и соавт. [32] провели исследование, в которое вошли 180 пациентов, перенесших коронарные интервенционные процедуры. Были обнаружено, что уровни ИЛ-18 в моче увеличивались у пациентов с КИ-ОПП уже через 6–12 ч после инъекции рентгеноконтрастного средства (РКС) по сравнению с пациентами без КИ-ОПП ( $p < 0,01$ ). Авторы пришли к выводу, что мочевого ИЛ-18 является хорошим маркером КИ-ОПП.

Другие результаты были получены С. Vulent Gul и соавт. [33], проводивших исследование 157 пациентов со стабильной стенокардией, которые поступили в стационар для селективной коронарной ангиопластики. У 15 (9,5%) пациентов развилось КИ-ОПП. Однако статистически значимых различий в уровне в моче ИЛ-18 не наблюдалось как между двумя группами пациентов (с ОПП и без него), так и в группе больных с ОПП до и после ангиопластики. Данные авторы ставят под сомнение применение ИЛ-18 в качестве надёжного биомаркера КИ-ОПП.

Анализ литературы, посвящённой биомаркером, свидетельствует о вариабельности диагностической значимости ИЛ-18 в диагностике ОПП. В целом авторы приходят к заключению о высокой специфичности и высокой чувствительности ИЛ-18 в диагностике ОПП, но при этом его уровни слабо коррелируют с продолжительностью и тяжестью ОПП. Подобно изучению других биомаркеров, исследования ИЛ-18 в целом дали противоречивые результаты, однако ИЛ-18 остаётся перспективным кандидатом для будущей панели био-

маркёров при заболеваниях почек и сможет играть ключевую роль в диагностике и лечении КРС.

**N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (NAG).** N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (N-acetyl-β-D-glucosaminidase) – лизосомальный фермент, присутствующий во многих тканях организма и являющийся наиболее активным ферментом из всех глюкозидаз, обнаруженных в лизосомах клеток [34].

Наиболее высокая активность NAG выявлена в почках, где фермент секретируется эпителием проксимальных канальцев и участвует в деградации мукополисахаридов и гликопротеинов. Фермент расщепляет химические гликозидные и аминокислотные связи сахаров, которые образуют структурные компоненты во многих тканях. Это необходимо для утилизации различных частей клетки, включая клеточную мембрану. В норме из-за высокой молекулярной массы (~ 140 кДа) NAG не проходит через гломерулярный барьер. У здоровых лиц NAG присутствует в моче в небольших количествах. При повреждении клеток эпителия происходит высвобождение NAG, что приводит к увеличению концентрации фермента в первичной моче [35].

Повышение активности NAG в моче рассматривается как специфический маркёр раннего субклинического повреждения проксимальных канальцев и окружающей их соединительной ткани при острых и хронических заболеваниях почек [36]. Было показано, что увеличение уровня NAG происходит при ОПП раньше (от 12 ч до 4 дней), чем повышение уровня СКр [37]. Очень высокий уровень мочевого NAG при ОПП коррелирует с неблагоприятным прогнозом [38]. Повышенная экскреция NAG также может быть результатом повышенной лизосомальной активности без разрушения клеток [35]. L. Rep и соавт. [39] исследовали 590 пациентов, перенесших чрескожную коронарную ангиопластику (ЧКА). Уровень NAG в моче, осмолярность крови и концентрация креатинина в сыворотке крови были измерены до и через 1, 2 и 6 дней после введения неионного низкоосмолярного рентгеноконтрастного агента. КИ-ОПП развилось у 33 больных. У этих больных уровни мочевого NAG и креатинина в сыворотке крови в 1-й и 2-й дни после инъекции РКС были значительно выше, чем в исходном состоянии, и по сравнению с пациентами без контраст-индуцированной дисфункции почек (КИДП). Мочевой уровень NAG достиг пика раньше и увеличился намного больше, чем СКр. Авторы пришли к выводу, что NAG можно использовать в качестве раннего биомаркёра КИДП у пациентов, перенесших коронарную ангиографию и/или терапевтическую ЧКА.

NAG стабилен в моче, устойчив к изменению pH и температуры, имеет несколько изоферментов, различающихся по своей локализации в организме. Так, при повреждении почек в моче характерно увеличение общей активности фермента и его β-изоформы [40]. Активность NAG в моче значительно повышается при первичном и вторичном повреждении почек, отравлении тяжёлыми металлами, трансплантации почек, опухоли почек, гипертензии, преэклампсии, что происходит задолго до изменения показателей тестов, применяемых для оценки функции почек [37, 39].

При изучении NAG в моче было установлено отсутствие корреляции между активностью фермента и уровнем протеинурии, СКФ, экскреции креатинина с мочой, β2-микротеинурией. Так как данный показатель является исключительно стабильным, не изменяется у

пациентов с постуральной протеинурией, не зависит от бактериального загрязнения мочи, отсутствует зависимость от уровней лейко- и эритроцитурии, его принято считать наиболее точным и широко распространённым маркёром тубулярного повреждения почек. Активность NAG хорошо коррелирует с гистологическими признаками травмы проксимальных канальцев и служит маркёром, отражающим эффективность лечения.

**КИМ-1.** КИМ-1 (kidney injury molecule-1) представляет собой трансмембранный белок типа 1 (фосфатидилсеринный рецептор), который при экспрессии в эпителиальных клетках позволяет им распознавать и фагоцитировать мёртвые клетки, образующиеся при повреждении почек [41]. Было обнаружено, что эктодомен КИМ-1 появляется в моче человека в результате ишемического или токсического повреждения проксимальных канальцев. W. Nan и соавт. [42] показали, что экскреция КИМ-1 с мочой гораздо более выражена при ишемическом остром тубулярном некрозе, чем при КИ-ОПП. Также было показано, что мочевого КИМ-1 играет определённую роль в дифференцировании истинного острого тубулярного некроза от других видов поражения почек, таких как преренальная азотемия и ХБП [42].

В процессе повреждения почечных канальцев КИМ-1 усиливает свою активность, поступает в межклеточное пространство и мочу [43]. Использование мочевого КИМ-1 в качестве биомаркёра ОПП основано на том, что в почках здоровых лиц КИМ-1 никак не проявляет свою активность, в то время как при ОПП повышается его активность в мембранах апикальных клеток канальцев [43].

M. Vijayasimha и соавт. [44] провели исследование, чтобы оценить, позволяет ли КИМ-1 диагностировать КИ-ОПП до повышения уровня СКр. В исследование были включены 100 пациентов с нормальным уровнем креатинина, подвергшиеся ангиографической процедуре. Уровень КИМ-1 в моче определяли через 4, 8 и 24 ч после рентгеноконтрастного исследования. СКр измеряли исходно, через 24 и 48 ч после процедуры. КИ-ОПП возникло у 12% пациентов. Значительное увеличение мочевого КИМ-1 наблюдалось через 24 ч после коронарной ангиографии (с использованием йодиксанола или иопромида), в то время как изменения величины СКФ ранее 48 ч после ангиографии отмечены не были.

Исследования диагностической значимости КИМ-1 проводили и при ОПП, причиной которого являлось не РКС. Так, было показано, что мочевого КИМ-1 прогнозирует развитие ОПП значительно более эффективно по сравнению с NGAL у кардиохирургических пациентов [45]. O. Liangos и соавт. [36] показали, что уровни в моче КИМ-1 и NAG указывали на плохой прогноз у 201 пациента с ОПП, которое развилось по разным причинам. В перекрёстном исследовании на 44 пациентах с различными острыми и хроническими заболеваниями почек уровни КИМ-1 у пациентов с ОПП были значительно выше, чем в контрольной группе или у больных с инфекцией мочевыводящих путей [46].

K. Damman и соавт. [47] провели исследование по выявлению повреждения почечных канальцев после прекращения и возобновления терапии диуретиками у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Оказалось, что КИМ-1 превосходит другие маркёры повреждения почечных канальцев, такие как NGAL и NAG, так как уровни КИМ-1 были значительно выше уже через 8 ч после отмены диуретиков, оставались повышенными в течение 72 ч и возвращались к нормальному уровню только через 4 ч

после возобновления терапии фуросемидом [47]. В данном исследовании с помощью маркёров повреждения почек, КИМ-1 в первую очередь, было показано, как изменение объёма жидкости может привести к субклиническим повреждениям канальцев, которые могут быть не диагностированы с помощью традиционных биомаркёров. Хотя ранние результаты оценки КИМ-1 в качестве биомаркёра повреждения почек являются перспективными и обнадеживающими, необходимы дополнительные крупные исследования, прежде чем он может быть рекомендован для более широкого клинического применения.

**Белок, связывающий жирные кислоты.** Семейство белков, связывающих жирные кислоты (БСЖК), состоит из протеинов массой 15 кДа, присутствующих в цитоплазме тканей, где происходит метаболизм жирных кислот. Эти белки выступают в качестве внутриклеточных шаперонов, которые осуществляют транспорт липидов внутри клетки. В клетках проксимальных канальцев почек БСЖК переносят свободные жирные кислоты в митохондрии или пероксисомы, где они метаболизируются путем бета-окислации [48]. В почках встречаются 2 типа БСЖК: печёночный (L-БСЖК), расположенный в проксимальных извитых и прямых канальцах почек (он также может реабсорбироваться из клубочкового фильтра через Megalin – мультилиганд эндцитотического рецептора проксимальных канальцев), и сердечный (H-БСЖК), расположенный в почечных дистальных канальцах. У здоровых лиц L-БСЖК не обнаруживается в моче. А. Камію и соавт. [49], используя трансгенную модель на мышах для экспрессии человеческого L-БСЖК, сопоставили уровни мочевого L-БСЖК с тяжестью тубулоинтерстициального повреждения, вызванного чужеродным белком. Те же авторы представили клинические данные, согласно которым у пациентов с заболеваниями почек уровень мочевого L-БСЖК коррелировал с поражением почечных канальцев [49]. В нормальных условиях L-БСЖК присутствует в лизосомах проксимальных извитых и прямых канальцев.

Экспериментальные исследования показали, что увеличение в моче уровня L-БСЖК является хорошим маркёром ишемического ОПП. Так, К. Negishi и соавт. [50] провели экспериментальное исследование, чтобы оценить, может ли L-БСЖК быть использован для мониторинга тканевого повреждения при ОПП, индуцированного путём инъекции цисплатина (хлорид-аммиакат двухвалентной платины) и ишемией-реперфузией. Степень гистологических повреждений почечной ткани возрастала пропорционально дозе цисплатина и времени ишемии. При ОПП, индуцируемым цисплатином, содержание L-БСЖК экспоненциально увеличилось уже через 2 ч после инъекции цитотоксина. При ОПП, индуцированным ишемией, уровень L-БСЖК повысился более чем в 100 раз даже в условиях 5-минутной ишемии с последующей в течение 1 ч реперфузией. На основе этих результатов авторы пришли к выводу, что мочевого L-БСЖК является лучшим маркёром для раннего выявления гистологических и функциональных нарушений при ишемических и нефротоксин-индуцированных ОПП.

Установлено, что L-БСЖК является хорошим маркёром ОПП у пациентов, получавших цисплатин [50], у пациентов с септическим шоком [51] и у пациентов, которым вводили РКС [52]. Клинические исследования показали, что мочевого L-БСЖК был повышен через несколько часов после сердечно-лёгочного шунтирования, являясь независимым показателем риска, чувствительным и ран-

ним биомаркёром ОПП после кардиохирургического вмешательства [53]. Аналогичные результаты наблюдались у пациентов, госпитализированных в ОИТ с сепсисом [54].

Было показано, что уровни L-БСЖК в моче увеличены у пациентов, у которых развивается ОПП после внутривенного введения РКС [55, 56]. Н. Vachorzewska-Gajewska и соавт. [56] исследовали 25 пациентов с нормальным уровнем креатинина сыворотки крови, перенесших ЧКА по поводу нестабильной стенокардии: содержание L-БСЖК в моче значительно увеличилось, как и NGAL, через 4 ч и оставалось повышенным до 48 ч после рентгеноконтрастной процедуры.

Заслуживает внимания исследование М. Ferguson и соавт. [57], в которое был включён 91 госпитализированный пациент. Авторы отметили, что мочевого L-БСЖК является не только хорошим диагностическим маркёром ОПП (у 5 пациентов наблюдалось КИ-ОПП), но также имеет прогностическое значение, так как его уровни были значительно выше у пациентов, которым впоследствии потребовалась заместительная почечная терапия.

**Мидкин.** Мидкин (Midkine (МК)) представляет собой белок (фактор роста) массой 13 кДа, который выполняет различные биологические функции. Установлено, что он участвует в процессе воспаления [58], регенерации повреждённых тканей, регулирует рост, деление и выживаемость клеток, миграцию и активность ингибирующих факторов апоптоза [59].

Обнаружено, что в почках мышей экспрессия МК происходит в клетках проксимальных канальцев, где, как полагают, он играет определённую роль в выживании этих клеток [60]. В экспериментальной модели повреждения, вызванного ишемией-реперфузией, было установлено, что в клетках проксимальных канальцев происходило трехкратное увеличение уровня МК, и это сопровождалось мобилизацией нейтрофилов, воспалительной реакцией и канальцево-интерстициальным повреждением [60]. Полагают, что супероксиданты, образовавшиеся в процессе ишемии-реперфузии, потенцируют повышение уровня МК. На основании этого было сделано предположение, что активация МК может возникнуть и во время КИ-ОПП. J. Malyszko и соавт. [61] исследовали уровни МК в качестве раннего биомаркёра КИ-ОПП у 89 пациентов с нормальным уровнем креатинина в сыворотке крови, которым была выполнена ЧКА для лечения стенокардии с использованием изосолярного йодиксанола. Уровень МК в сыворотке крови оценивали до, через 2, 4, 8, 24 и 48 ч после введения РКС; уровень креатинина в сыворотке крови оценивали до, через 24 и 48 ч после инъекции контрастного агента. КИ-ОПП – увеличение уровня СКр более чем на 25% от базового значения через 48 ч после ЧКА – было отмечено у 10% пациентов. У этих больных авторы обнаружили значительное повышение в сыворотке МК уже через 2 ч ( $p < 0,001$  по сравнению с исходными значениями); его уровни оставались значительно повышенными через 4 ч после введения РКС и вернулись к исходным значениям через 24 ч. В этом же исследовании уровни NGAL были значительно выше через 2 ч (s-NGAL) и 4 ч (u-NGAL) после ЧКА. Цис-С был повышен через 8 и 24 ч после ЧКА у пациентов с КИ-ОПП.

**Молекулы микроРНК.** Молекулы микроРНК (мРНК) участвуют в пролиферации, дифференцировке и гибели клеток, а также в воспалительных процессах. Поэтому разумно предположить, что они могут быть вовлечены в патогенез КИ-ОПП. Определение таких молекул внесёт вклад в понимание патогенеза повреждения

почек, а также поможет оценить их роль в качестве биомаркёров такого повреждения. Одним из преимуществ использования мРНК в качестве биомаркёров является их стабильность в сыворотке, моче и слюне [62]. Был отмечен значительный уровень жизнеспособности молекул мРНК через 5 дней хранения при 4°C [63]. Недостаток заключается в том, что уровни мРНК в жидкостях организма являются низкими и требуют чувствительных и специализированных методов анализа.

Была тщательно изучена молекула мР-21 и обнаружено, что она может играть определённую роль в клеточной пролиферации и снижении апоптоза как результата реперфузионного повреждения почек и воспаления [64]. По уровням мР-21 в сыворотке и моче также было предсказано прогрессирование ОПП у кардиохирургических пациентов [65]. На экспериментальной модели было показано, что ишемия-реперфузия почек вызывает увеличение ряда молекул мРНК в плазме и почках по сравнению с ложнооперированными мышами через 3, 6 и 24 ч после ишемического повреждения [66].

В другом исследовании использовали образцы сыворотки от здоровых людей и пациентов с ОПП. Авторы пришли к заключению, что молекулы мРНК могут рассматриваться в качестве маркёров ОПП [67]. Уже доказано, что некоторые молекулы мРНК связаны с травмой почек (мР-127), IgA-нефропатией (мР-146a) и прогрессированием ХБП (мР-29a). Кроме того, уровни некоторых молекул мРНК коррелируют с тяжестью ОПП в соответствии с классификацией AKIN (Acute Kidney Injury Network) [67]. Группа исследователей обнаружила несколько мРНК, уровни которых в сыворотке крови были увеличены у пациентов с КИ-ОПП [68]. Будущие исследования могут быть направлены на выявление мРНК, экспрессия которых будет обнаружена непосредственно в почках [69], и позволят соотнести эти изменения с повреждением почек под влиянием РКС.

**Альфа-глутатион S-трансфераза и пи-глутатион S-трансфераза.** Альфа-глутатион S-трансфераза ( $\alpha$ -ГСТ) и пи-глутатион S-трансфераза ( $\pi$ -ГСТ) – энзимы, которые присутствуют во многих органах, включая почки. В моче здоровых людей они не определяются. При повреждении почек  $\alpha$ -ГСТ обнаруживается в клетках проксимальных канальцев,  $\pi$ -ГСТ – в клетках дистальных канальцев [35]. В проспективном исследовании J. Westhuyzen и соавт. [70] у 26 пациентов, госпитализированных в ОИТ, брали образцы мочи 2 раза в день в течение 7 дней для определения в ней уровня ферментов  $\alpha$ -ГСТ и  $\pi$ -ГСТ. У 4 (15,4%) пациентов развилось ОПП (т. е. по меньшей мере увеличение на 50% уровня СКр, которое произошло между 12 ч и 4 днями после госпитализации). Авторы пришли к выводу, что определение уровня указанных энзимов в моче может быть полезно при прогнозировании ОПП. Тем не менее в исследовании с использованием различных экспериментальных моделей гипертонии, диабета и нефропатии [71] не наблюдалось достоверного увеличения  $\alpha$ -ГСТ после внутривенного введения низкоосмолярного РКС йогексола.

**Гамма-глутамилтранспептидаза и щелочная фосфатаза.** Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП) и щелочная фосфатаза – это ферменты, расположенные на щёточной каёмке почечных проксимальных канальцев, которые появляются в моче при их повреждении [35]. J. Westhuyzen и соавт. [70] исследовали 4 случая ОПП у пациентов, которые были госпитализированы в ОИТ. Маркёры – ГГТП, щелочная фосфатаза, NAG,  $\alpha$ -ГСТ и

$\pi$ -ГСТ – были увеличены у пациентов с ОПП по сравнению с пациентами, у которых не было признаков патологии почек ( $p < 0,05$ ). Уровни ГГТП в моче были очень высоки у 22 пациентов, которым вводили высокоосмолярное РКС диатризоат, и у 12 больных, которым вводили йогексол, и оставались повышенными через 24 ч после введения РКС, в то время как увеличения креатинина в сыворотке крови не было отмечено [72].

В недавнем исследовании F. Oksuz и соавт. [73] исследовали прогностическую ценность ГГТП для оценки риска КИ-ОПП у пациентов, перенесших первичную ЧКА. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от уровня ГГТП, измеренного при поступлении (1-я группа: ГГТП < 19 Ед/л, 2-я группа: ГГТП 19–33 Ед/л, 3-я группа: ГГТП > 33 Ед/л). Исследование показало, что частота КИ-ОПП была значительно выше в 3-й группе. Авторы пришли к выводу, что ГГТП является значимым предиктором КИ-ОПП [73].

**Маркёры остановки клеточного цикла.** В исследовании K. Kashani и соавт. [74] было изучено содержание в моче протеина 7, связывающего инсулиноподобные факторы роста (IGFBP7), и тканевого ингибитора металлопротеиназы-2 (TIMP-2) – белков, участвующих в остановке клеточного цикла. Авторы провели проспективное многоцентровое исследование, в котором два новых потенциальных биомаркера – IGFBP7 и TIMP-2 – были обнаружены в моче у взрослых пациентов с высоким риском ОПП. Исследование имело две фазы: фаза изучения и фаза валидации. В стадии изучения образцы крови и мочи были получены от пациентов трех когорт (все три из ОИТ, после чего данные были объединены) с целью выявления новых биомаркёров ОПП среди 340 белков. На этапе валидации была сформирована четвертая когорта, которая называлась Sapphire-исследование [74], в которую вошли 35 пациентов ОИТ (всего 744 пациента) из Северной Америки (460) и Европы (284). ОПП развилось у 14% пациентов Sapphire-группы. Во второй стадии исследования были валидизированы 2 биомаркера – IGFBP7 и TIMP-2. Уровни в моче IGFBP7 и TIMP-2 вместе продемонстрировали значительно большую чувствительность, чем у всех известных маркёров ОПП. Авторы пришли к выводу, что оба белка являются превосходными биомаркёрами ОПП и могут предоставить дополнительную информацию к клиническим данным.

Ранее было показано, что введение РКС может приводить к повреждению клеточной ДНК [75]. Активация факторов остановки клеточного цикла может быть следствием повреждения клеток, в частности повреждения ДНК, таким образом, предотвращая вступление клетки в процесс деления. Следовательно, возможно, что РКС может провоцировать повышение уровня данных маркёров в клетках почечных канальцев и их обнаружение в моче в результате КИ-ОПП.

Следует отметить, что в то время как ряд других исследователей подтвердили, что TIMP-2 и IGFBP7 являются хорошими маркёрами ОПП [76, 77], другие авторы отрицают их пользу в качестве таких маркёров [78].

**Заключение.** Как и в других модальностях, таких как диагностика инфаркта миокарда, мультимаркёры и последовательная выборочная стратегия могут принести наибольшую пользу. Поэтому наиболее клинически полезные биомаркёры могут быть объединены в почечную панель для достижения максимальной чувствительности и специфичности. Концентрация биомаркёров должна изменяться в зависимости от степени повреждения органа

даже при отсутствии типичных клинических признаков. Кроме того, как можно больше биомаркёров должно количественно присутствовать в данной панели, чтобы правильно оценить степень почечной травмы. В этом отношении могут быть полезны более новые технологии для обеспечения быстрого и точного измерения нескольких молекул одновременно, такие как разработка наборов для мультиплексного иммуноанализа. Также можно ожидать дальнейшей оценки потенциальных биомаркёров, таких как использование молекул микроРНК и анализа метаболизма, для которых необходимо сложное и дорогостоящее оборудование и большой технический опыт, но это будет возмещено потенциальными выгодами.

**Финансирование.** Статья подготовлена в рамках темы фундаментальных научных исследований № АААА-А15-115123110026-3.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 5, 7-24, 26-78  
см. REFERENCES)

1. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Бодур-Ооржак А.Ш., Зверьков Р.В., Ларионова В.И., Глазков П.Б. и др. Эпидемиология и факторы риска хронических болезней почек: региональный уровень общей проблемы. *Терапевтический архив*. 2005; 77(6): 20-7.
3. Колесников С.В., Борисов А.С. Биомаркеры острого почечного повреждения: клинические аспекты. *Нефрология и диализ*. 2013; 15(3): 184-90.
6. Вельков В.В., Резникова О.И. Новые возможности для лабораторной диагностики хронической и острой ренальной дисфункции. *Клинико-лабораторный консилдум*. 2011; 3: 26-30.
25. Моисеев В.С., Мухин Н.А., Кобалава Ж.Д., Виллевальде С.В., Ефремовцева М.А., Козловская Л.В. и др. Основные положения проекта рекомендаций по оценке функционального состояния почек. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2008; 4: 8-20.

REFERENCES

1. Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Bodur-Oorzak A.Sh., Zverkov R.V., Larionova V.I., Glazkov P.B. et al. Epidemiology and risk factors for chronic kidney diseases: the regional level of the common problem. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2005; 77(6): 20-7. (in Russian)
2. de Portu S., Citarella A., Cammarota S., Menditto E., Mantovani L. Pharmaco-economic consequences of Losartan therapy in patients undergoing diabetic end stage renal disease in EU and USA. *Clin. Exp. Hypertens*. 2011; 33(3): 174-8.
3. Kolesnikov S.V., Borisov A.S. Biomarkers of acute renal damage: clinical aspects. *Nephrologiya i dializ*. 2013; 15(3): 184-90. (in Russian)
4. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr. Opin. Pediatr*. 2011; 23(2): 194-200.
5. Cai L., Rubin J., Han W., Venge P., Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2010; 5(12): 2229-35.
6. Vel'kov V.V., Reznikova O.I. New opportunities for laboratory diagnosis of chronic and acute renal dysfunction. *Kliniko-laboratornyi konsilium*. 2011; 3: 26-30. (in Russian)
7. Charlton J., Portilla D., Okusa M. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2014; 29(7): 1301-11.
8. Haase M., Devarajan P., Haase-Fielitz A., Bellomo R., Cruz D., Wagener G. et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2011; 57(17): 1752-61.
9. Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J., Sladen R., Lee H. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006; 105(3): 485-91.
10. Fadel F., Abdel Rahman A., Mohamed M., Habib S., Ibrahim M., Sleem Z. et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for prediction of acute kidney injury after cardio-pulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Arch. Med. Sci*. 2012; 8(2): 250-5.
11. Choi K., Lee J., Kim E., Baik S., Seo H., Choi D. et al. Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Endocrinol*. 2008; 158(2): 203-7.

12. Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J., Pawlak K., Mysliwiec M. et al. Could neutrophil-gelatinase-associated lipocalin and cystatin C predict the development of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions in patients with stable angina and normal serum creatinine values? *Kidney Blood Press. Res*. 2007; 30: 408-15.
13. Li Y., Zhu M., Xia Q., Wang S., Qian J., Lu R. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and L-type fatty acid binding protein as diagnostic markers of early acute kidney injury after liver transplantation. *Biomarkers*. 2012; 17(4): 336-42.
14. Parikh C., Jani A., Mishra J., Ma Q., Kelly C., Barasch J. et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am. J. Transplant*. 2006; 6(7): 1639-45.
15. Wasilewska A., Zoch-Zwierz W., Taranta-Janusz K., Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr. Nephrol*. 2010; 25(5): 889-97.
16. Vesnina Zh., Lishmanov Yu., Alexandrova E., Nesterov E. Evaluation of nephroprotective efficacy of hypoxic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Cardiorenal Med*. 2016; 6: 328-36.
17. Bolignano D., Basile G., Parisi P., Coppolino G., Nicocia G., Buemi M. Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Res*. 2009; 12(1): 7-14.
18. Haase M., Bellomo R., Devarajan P., Schlattmann P., Haase-Fielitz A. NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis*. 2009; 54(6): 1012-24.
19. Dharnidharka V., Kwon C., Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis*. 2002; 40(2): 221-26.
20. Rickli H., Benou K., Ammann P., Fehr T., Brunner-La Rocca H., Petridis H. et al. Time course of Cystatin levels in comparison with serum creatinine after application of radiocontrast media. *Clin. Nephrol*. 2004; 61(2): 98-102.
21. Lassus J., Harjola V. Cystatin C: a step forward in assessing kidney function and cardiovascular risk. *Heart Fail. Rev*. 2012; 17(2): 251-61.
22. Herget-Rosenthal S., Marggraf G., Hüsing J., Göring F., Pietruck F., Janssen O. et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004; 66(3): 1115-22.
23. Briguori C., Visconti G., Rivera N., Focaccio A., Golia B., Giannone R. et al. Cystatin C and contrast induced acute kidney injury. *Circulation*. 2010; 121(19): 2117-22.
24. Eriksen B., Mathisen U., Melsom T., Ingebretsen O., Jenssen T., Njølstad I. et al. Cystatin C is not a better estimator of GFR than plasma creatinine in the general population. *Kidney Int*. 2010; 78(12): 1305-11.
25. Moiseev V.S., Muhih N.A., Kobalava Zh.D., Villevalde S.V., Efreomovceva M.A., Kozlovskaya L.V. et al. The basic provisions of the draft recommendations for assessing the functional state of the kidneys. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika* 2008; 4: 8-20. (in Russian)
26. Tschoeke S., Oberholzer A., Moldawer L. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit. Med. Care*. 2006; 34(4): 1225-33.
27. Melnikov V., Ecker T., Fantuzzi G., Siegmund B., Lucia M., Dinarello C. et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest*. 2001; 107(9): 1145-52.
28. He H., Li W., Qian W., Zhao X., Wang L., Yu Y. et al. Urinary interleukin-18 as an early indicator to predict contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Exp. Ther. Med*. 2014; 8(4): 1263-6.
29. Parikh C., Mishra J., Thiessen-Philbrook H., Dursun B., Ma Q., Kelly C. et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2006; 70(1): 199-203.
30. Liu Y., Guo W., Zhang J., Xu C., Yu S., Mao Z. et al. Urinary interleukin 18 for detection of acute kidney injury: a meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis*. 2013; 62(6): 1058-67.
31. Siew E., Ikizler T., Gebretsadik T., Shintani A., Wickersham N., Bossert F. et al. Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2010; 5(8): 1497-1505.
32. He H., Li W., Qian W., Zhao X., Wang L., Yu Y. et al. Urinary interleukin-18 as an early indicator to predict contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Exp. Ther. Med*. 2014; 8(4): 1263-6.
33. Bulent Gul C., Gullulu M., Oral B., Aydinlar A., Oz O., Budak F. et al. Urinary IL-18: a marker of contrast-induced nephropathy following percutaneous coronary intervention? *Clin. Biochem*. 2008; 41: 544-7.

34. Skalova S. The diagnostic role of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica*. 2005; 48: 75-80.
35. de Geus H., Betjes M., Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin. Kidney J.* 2012; 5(2): 102-8.
36. Liangos O., Perianayagam M., Vaidya V., Han W., Wald R., Tighiouart H. et al. Urinary N-Acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adheres outcomes in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18(3): 904-12.
37. Westhuyzen J., Endre Z., Reece G., Reith D., Saltissi D., Morgan T. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18(3): 543-51.
38. Chew S., Lins R., Daelemans R., Nuyts G., De Broe M. Urinary enzymes in acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1993; 8(6): 507-11.
39. Ren L., Ji J., Fang Y., Jiang S., Lin Y., Bo J. et al. Assessment of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase as an early marker of contrast-induced nephropathy. *J. Int. Med. Res.* 2011; 39(2): 647-53.
40. Mohkam M., Ghafari A. The role of urinary N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase in diagnosis of kidney diseases. *J. Ped. Nephrology.* 2015; 3: 84-91.
41. Ichimura T., Asseldonk E., Humphreys B., Gunaratnam L., Duffield J., Bonventre J. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(5): 1657-68.
42. Han W., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002; 62(1): 237-44.
43. Bonventre J.V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24(11): 3265-8.
44. Vijayasimha M., Vijaya Padma V., Mujumdar S., Satyanarayana P. Kidney injury molecule-1: a urinary biomarker for contrast induced acute kidney injury. *Adv. Life Sci. Technol.* 2013; 15: 33-40.
45. Han W., Wagener G., Zhu Y., Wang S., Lee H. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 4(5): 873-82.
46. Han W., Waikar S., Johnson A., Betensky R., Dent C., Devarajan P., Bonventre J. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int.* 2008; 73(7): 863-9.
47. Damman K., Ng Kam Chuen M., MacFadyen R. Lip G., Gaze D., Collinson P. et al. Volume status and diuretic therapy in systolic heart failure and the detection of early abnormalities in renal and tubular function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57(22):2233-41.
48. Sweetser D., Heuckeroth R., Gordon J. The metabolic significance of mammalian fatty-acid-binding proteins: abundant proteins in search of a function. *Annu. Rev. Nutr.* 1987; 7: 337-59.
49. Kamijo A., Sugaya T., Hikawa A., Okada M., Okumura F., Yamanouchi M. et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(4): 1243-55.
50. Negishi K., Noiri E., Doi K., Maeda-Mamiya R., Sugaya T., Portilla D., Fujita T. Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* 2009; 174(4): 1154-9.
51. Nakamura T., Sugaya T., Koide H. Urinary liver-type fatty acid-binding protein in septic shock: effect of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion. *Shock.* 2009; 31(5): 454-9.
52. Manabe K., Kamihata H., Motohiro M., Senoo T., Yoshida S., Iwasaka T. Urinary liver-type fatty acid-binding protein level as a predictive biomarker of contrast-induced acute kidney injury. *Eur. J. Clin. Invest.* 2012; 42(5): 557-63.
53. Katagiri D., Doi K., Honda K., Negishi K., Fujita T., Hisagi M. et al. Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 2012; 93(2): 577-83.
54. Doi K., Noiri E., Maeda-Mamiya R., Ishii T., Negishi K., Hamasaki Y. et al. Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury. *Crit. Care Med.* 2010; 38(10): 2037-42.
55. Nozue T., Michishita I., Mizuguchi I. Predictive value of serum cystatin C,  $\beta$ 2-microglobulin, and urinary liver-type fatty acid-binding protein on the development of contrast-induced nephropathy. *Cardiovasc. Interv. Ther.* 2010; 25(2): 85-90.
56. Bachorzewska-Gajewska H., Poniatowski B., Dobrzycki S. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) and L-FABP after percutaneous coronary interventions due to unstable angina in patients with normal serum creatinine. *Adv. Med. Sci.* 2009; 54(2): 221-4.
57. Ferguson M., Vaidya V., Waikar S., Collings F., Sunderland K., Gioules C., Bonventre J. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2010; 77(8): 708-14.
58. Levey A., Stevens L., Schmid C., Zhang Y., Castro A. 3rd, Feldman H. et al; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150(9): 604-12.
59. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.* 2002; 132(3): 359-71.
60. Sato W., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Muramatsu H., Hotta N., Matsuo S., Muramatsu T. Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J. Immunol.* 2001; 167(6): 3463-9.
61. Malyszko J., Bachorzewska-Gajewska H., Koc-Zorawska E., Malyszko J., Kobus G., Dobrzycki S. Midkine: a novel and early biomarker of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 879509.
62. Weber J., Baxter D., Zhang S., Huang D., Huang K., Lee M. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010; 56(11): 1733-41.
63. Mall C., Rocke D., Durbin-Johnson B., Weiss R. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark. Med.* 2013; 7(4): 623-31.
64. Li Y., Jing Y., Hao J., Frankfort N., Zhou X., Shen B. et al. MicroRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury. *Protein Cell.* 2013; 4(11): 813-9.
65. Du J., Cao X., Zou L., Chen Y., Guo J., Chen Z. et al. MicroRNA-21 and risk of severe acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *PLoS One.* 2013; 8(5): e63390.
66. Bellinger M., Bean J., Rader M., Heinz-Taheny K., Nunes J., Haas J., Michael L., Reikter M. Concordant changes of plasma and kidney microRNA in the early stages of acute kidney injury: time course in a mouse model of bilateral renal ischemia-reperfusion. *PLoS One.* 2014; 9(4): e93297.
67. Aguado-Fraile E., Ramos E., Conde E., Rodríguez M., Martín-Gómez L., Lieter A. et al. A pilot study identifying a set of microRNAs as precise diagnostic biomarkers of acute kidney injury. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0127175.
68. Sun S., Zhang T., Ding D., Zhang W., Wang X., Sun Z. et al. Circulating microRNA-188, -30a, and -30e as early biomarkers for contrast-induced acute kidney injury. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(8): e004138.
69. Kito N., Endo K., Ikesue M., Weng H., Iwai N. miRNA profiles of tubular cells: diagnosis of kidney injury. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 465479.
70. Westhuyzen J., Endre Z., Reece G., Reith D., Saltissi D., Morgan T. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18(3): 543-51.
71. Rouse R., Stewart S., Thompson K., Zhang J. Kidney injury biomarkers in hypertensive, diabetic, and nephropathy rat models treated with contrast media. *Toxicol. Pathol.* 2013; 41(4): 662-80.
72. Parvez Z., Ramamurthy S., Patel N., Moncada R. Enzyme markers of contrast media-induced renal failure. *Invest. Radiol.* 1990; 25(suppl 1): S133-S134.
73. Oksuz F., Yarlioglu M., Cay S., Celik I., Mendi M., Kurtul A. et al. Predictive value of gamma-glutamyl transferase levels for contrast-induced nephropathy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who underwent primary percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 2015; 116(5): 711-6.
74. Kashani K., Al-Khafaji A., Ardiles T., Artigas A., Bagshaw S., Bell M. et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit. Care.* 2013; 17(1): R25.
75. Hizoh I., Strater J., Schick C., Kubler W., Haller C. Radiocontrast-induced DNA fragmentation of renal tubular cells in vitro: role of hypertonicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13(4): 911-8.
76. Wetz A., Richardt E., Wand S., Kunze N., Schotola H., Quintel M. et al. Quantification of urinary TIMP-2 and IGFBP-7: an adequate diagnostic test to predict acute kidney injury after cardiac surgery? *Crit. Care.* 2015; 19: 3.
77. Gocze I., Koch M., Renner P., Zeman F., Graf B., Dahlke M. et al. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120863.
78. Bell M., Larsson A., Venge P., Bellomo R., Martensson J. Assessment of cell-cycle arrest biomarkers to predict early and delayed acute kidney injury. *Dis. Markers.* 2015; 2015: 158658.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-002.3-036.12-07Ж616.633.96

Пастушкова Л.Х.<sup>1</sup>, Захарова Н.Б.<sup>2</sup>, Каширина Д.Н.<sup>1</sup>, Бржозовский А.Г.<sup>1</sup>, Лях Р.В.<sup>2</sup>, Понукалин А.Н.<sup>2</sup>, Ларина И.М.<sup>1</sup>

## ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА МОЧИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов, Российская Федерация

*Проведено клиническое наблюдение и обследование 12 больных хроническим пиелонефритом (ХПН). В первую группу (Г1) вошли пациенты с обострением данного заболевания, в группу сравнения (Г2) – те же больные спустя 1,5–3 мес после завершения лечения без клинических проявлений обострения ХПН. У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения. Дополнительно в дневное время после завтрака проведён сбор мочи в виде свободно отделяемой 2-й фракции и её пробоподготовка, состоящая из этапов восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина. Полученная полипептидная смесь разделялась при помощи жидкостной хроматографии в трех повторах и анализировалась на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra. Получен список белков с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, и параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была получена из базы данных UniProt. Идентифицировано и проанализировано 10 белков, достоверно различающихся по встречаемости в клинической группе пациентов в периоде обострения пиелонефрита. Появление данных белков в моче у больных с обострением ХПН позволяет рассматривать их как потенциальные биомаркеры, напрямую связанные с процессами воспаления и повреждения эпителиальной выстилки почечных канальцев.*

**Ключевые слова:** пиелонефрит; мочевые биомаркеры; протеомика; масс-спектрометрия.

**Для цитирования:** Пастушкова Л.Х., Захарова Н.Б., Бржозовский А.Г., Лях Р.В., Понукалин А.Н., Ларина И.М. Особенности протеома мочи при хроническом пиелонефрите. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 397-402. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-397-402>

*Pastyshkova L.Kh.<sup>1</sup>, Zakharova N.B.<sup>2</sup>, Kashirina D.N.<sup>1</sup>, Brzhozovsky A.G.<sup>1</sup>, Lyakh R.V.<sup>2</sup>, Ponukalin A.N.<sup>2</sup>, Larina I.M.<sup>1</sup>*

### FEATURES OF THE PROTEOME OF THE URINE IN CHRONIC PYELONEPHRITIS

<sup>1</sup> Institute of biomedical problems RAN, Russia, 123007 Moscow;

<sup>2</sup> FGBOU "Saratov state medical University n.a. V.I. Razumovsky" Ministry of health of Russia, 410012, Saratov, Russia

*Clinical observation and examination of 12 patients with chronic pyelonephritis (CPN) were performed. The first group (G1) included patients with exacerbation of the disease. In the comparison group (G2) - the same patients after 1.5-3 months after completion of treatment, without clinical manifestations of exacerbation of CPN. Laboratory signs of acute renal damage were not revealed in all examined patients. Additionally, urine was collected in the afternoon after Breakfast, in the form of a freely separated 2nd fraction and its sample preparation, consisting of the stages: recovery, alkylation, protein deposition and proteolysis using trypsin. The resulting polypeptide mixture was separated by liquid chromatography in three repetitions and analyzed on a system consisting of Agilent 1100 chromatograph and ltq-FT ultra hybrid mass spectrometer. A list of proteins was obtained, indicating the number of peptides by which they were identified, and the parameters of its reliability. Most of the information about the obtained proteins was obtained from UniProt databases. Identified and analyzed 10 proteins that differ significantly in occurrence in the clinical group of patients in the period of exacerbation of PN. The appearance of these proteins in urine in patients with exacerbation of chronic PH allows us to consider them as potential biomarkers directly associated with inflammation and damage to the epithelial lining of the renal tubules.*

**Key words:** pyelonephritis, urinary biomarkers, proteomics, mass spectrometry.

**For citation:** Pastyshkova L.Kh., Zakharova N.B., Kashirina D.N., Brzhozovsky A.G., Lyakh R.V., Ponukalin A.N., Larina I.M. FEATURES OF THE PROTEOME OF THE URINE IN CHRONIC PYELONEPHRITIS. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 397-402 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-397-402>

**For correspondence:** N.B. Zakharova, Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Doctor of Medical Science; e-mail: [lipidgormon@mail.ru](mailto:lipidgormon@mail.ru)

#### Information about authors:

Pastushkova L. Kh., <http://orcid.org/0000-0002-2071-0443>

Zakharova N.B., <http://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Kashirina D.N., <http://orcid.org/0000-0002-9646-7275>

Brzhozovsky A.G., <http://orcid.org/0000-0003-1128-1795>

Lyakh R.V., <http://orcid.org/0000-0001-9283>

Larina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-1571-2997>

Ponukalin A.N., <https://orcid.org/0000-0003-2547-5654>

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

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

Received 25.01.2018  
Accepted 15.03.2018

*Введение.* Важный вклад в развитие персонализированной медицины, объединяющей персональные данные человека с результатами лабораторной и инструментальной диагностики, вносит протеомика. Её задачей является существенное расширение списка маркерных молекул, пригодных для раннего обнаружения патологического процесса и мониторинга эффективности лечения [1]. Результаты исследования протеома мочи за последние 5 лет подтвердили диагностическое значение целого ряда мочевых молекулярных маркеров [2, 3]. Исследователями моча отнесена к идеальному источнику клинически значимых биомаркеров. Показано, что изменения протеомного состава крови могут быть с большей чувствительностью обнаружены в моче, чем в самой крови. Это привело к проведению многочисленных исследований, посвящённых поиску биомаркеров, появление которых в моче связано с заболеваниями почек или мочеполового тракта, прежде всего начальных стадий почечной недостаточности в результате гипертонической и диабетической нефропатии, врождённой обструктивной нефропатии и других [5–7].

Поиск надёжных, специфичных, доступных лабораторных маркеров, которые могут широко применяться в клинической практике в ранних стадиях поражения почек, представляет собой одно из актуальных направлений исследований. В многочисленных исследованиях установлено, что высокий сывороточный креатинин (СКр) не специфичен для повреждения почек. Его уровень может меняться в зависимости от многих факторов (возраст, пол, мышечная масса, статус обезвоживания и др.). Показано, что до 50% ренальных функций может быть утрачено ещё до повышения уровня креатинина [8]. Полученные в настоящее время результаты исследований протеома мочи подтвердили диагностическое значение целого ряда белковых маркеров для оценки состояния почечной паренхимы при заболеваниях почек и мочевыводящих путей [9–11]. Об актуальности таких исследований свидетельствуют клинические рекомендации по хронической болезни почек (K/DOQI): «Для выявления почечного повреждения до снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) при других типах хронического заболевания почек требуются новые маркеры» [12–14, 19]. Мочевая протеомика от небольших исследований переходит к фазе разработки технологий для массового обследования пациентов с хроническими заболеваниями почек.

В последние годы во многих странах мира наблюдается устойчивый рост заболеваемости пиелонефритом (ПН) во всех возрастных группах, особенно у пациентов пожилого возраста [15]. ПН ассоциируется с гломерулярной гиперfiltrацией, протеинурией, опосредованной ренином, гипертензией и снижением СКФ [16, 17]. Прогноз при ПН в решающей степени зависит от раннего и правильного выявления основной причины заболевания и немедленного начала терапии [18, 19].

Актуальность поиска диагностически значимых белковых маркеров в моче при ПН в настоящее время связана с существенными диагностическими проблемами, возникающими при ранней диагностике заболевания. В последние десятилетия всё больше авторов указывают на стёртое и атипичное клиническое течение ПН, что затрудняет своевременную диагностику. Это часто приводит к развитию гнойных форм данного заболевания при остром ПН, а при хроническом течении редко наступает полная ремиссия или излечение. Одной из при-

чин развития тяжелых осложнений ПН является поздняя диагностика вследствие клинически маловыраженного дебюта болезни, скудной симптоматики и длительного периода функциональной сохранности почек, обусловленного их высокой адаптационной способностью. Вместе с тем дистрофические и деструктивные процессы в клетках паренхимы почек возникают задолго до клинической манифестации ПН. Считается, что мониторинг активности патологических процессов, ведущих к развитию повреждения инфекционными агентами почечной паренхимы при ПН, может стать основой в выборе тактики лечения.

Цель данного исследования – оценка достоверности различий между белками, выделяемыми с мочой, по частоте встречаемости в двух периодах: в периоде обострения и при переходе ПН в хроническую форму.

*Материал и методы.* В первую группу (Г1) вошли 6 пациентов с обострением хронического ПН (ХПН) без лабораторных признаков нарушения функции почек, находившихся на амбулаторном лечении в ГУЗ СО «Саратовская городская поликлиника № 9». Среди обследованных были пациенты с характерными клиническими проявлениями заболевания, без сопутствующих воспалительных заболеваний и вредных привычек. Критерием включения в Г1 было наличие у пациентов обострения ХПН, подтверждённого анамнестическими данными, наличием характерной клинической картины в соответствии с результатами инструментальных и лабораторных исследований (УЗИ мочевыводящих путей, общеклинические анализы крови и мочи, бактериологическое исследование мочи). В исследование не включали пациентов с врождённым гидронефрозом, стриктурами мочеточника или лоханочно-мочеточникового сегмента, выраженной сопутствующей общесоматической патологией (сахарный диабет, онкологические заболевания, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия III–IV стадии, нарушения почечной гемодинамики), перенесёнными ранее хирургическими вмешательствами на почках. Группу сравнения (Г2) составили пациенты группы Г1 через 1,5–3 мес после завершения лечения без клинических проявлений обострения ХПН, находящиеся на этапе амбулаторного поликлинического обследования. Средний возраст пациентов с ХПН (Г1 и Г2) составил 67,8 года. Обследование больных ХПН согласно клиническим рекомендациям включало обзорную рентгенографию и УЗИ почек и мочевых путей, общеклинические анализы крови и мочи, определение СКр и СКФ с помощью расчётного уравнения СКД-ЕР1 (2009). У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения [20].

Все пациенты, включённые в исследование, получали традиционную антибактериальную, противовоспалительную терапию.

Для количественного анализа биомаркеров вторую порцию утренней мочи объёмом не менее 10 мл собирали в специальные стаканы с крышками. Каждый раз мочу собирали в дневное время суток после завтрака в виде свободно отделяемой 2-й фракции, которая в дальнейшем была подготовлена для масс-спектрометрического анализа, в соответствии со стандартным протоколом [14]. Образцы мочи подвергались пробоподготовке, состоящей из этапов восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина. Полученная полипептидная смесь разделялась при помощи жидкостной хроматографии в трех повторах и

анализировалась на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 («Agilent Technologies Inc.», Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra («Thermo», Бремен, Германия). На каждый образец выполняли не менее трёх заколов (исследование каждого белка 3 раза увеличивало выборку до 18 величин показателя в каждой группе). В результате был получен список белков, обнаруживаемых в моче, с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, а также параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была экстрагирована из баз данных UniProt (<http://www.uniprot.org>). Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовался программный пакет Perseus.

Различия в клинических данных и клинические переменные сравнивали с помощью ранговых корреляций Спирмена и *t*-критерия. Разницу в частоте встречаемости белка между двумя группами пациентов оценивали с помощью непараметрического теста Краскела – Уоллиса, проведённого в программе Multi Experiment Viewer ( $p \leq 0,05$ ). Для поиска потенциальных биомаркёров обострения ПН анализировали белки, содержащиеся в образцах мочи пациентов в периоде обострения (Г1) и при переходе в хроническую форму заболевания (ГП). При анализе частоты встречаемости белков в моче пациентов двух групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ) в программе Multi Experiment Viewer.

**Результаты.** У пациентов группы сравнения комплект идентифицированных белков мочи состоял из 661 протеина, протеом больных – из 533 белков. Сравнение протеомных профилей мочи больных ПН в двух точках и лиц без клинических проявлений обострения ХПН и других воспалительных заболеваний показало, что в каждой из групп имеются как общие, так и специфические для каждой группы белки. В результате данного целевого анализа было выявлено статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ) для 10 белков при сравнении больных Г1 и ГП (см. таблицу).

Далее была сформирована ручная аннотация этих белков, выполненная по открытым базам данных.

**Обсуждение.** Период обострения и переход в хроническую форму ПН статистически значимо различался

( $p < 0,05$ ) для 10 белков в моче по частоте встречаемости.

ENOА-HUMAN –  $\alpha$ -енолаза (ген *ENO1*), представляющая собой фермент массой 47 кДа, который выполняет несколько ролей в различных клеточных процессах, включая контроль роста, участие в гликолизе и процессах гипоксической толерантности. У млекопитающих существует 3 изофермента енолазы, включая  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , как правило, обнаруживающиеся в различных тканях, в том числе в почке [21]. Этот белок имеет повышенный уровень экспрессии в повреждённых и регенерирующих клетках во время процесса заживления ран [22]. В почечных канальцах  $\alpha$ -енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах. В работе W. Chiangjong и V. Thongboonkerd [22] показано, что когда почечный эпителий канальцев подвергается воздействию СОМ-кристаллов (моногидрат оксалата кальция), клетки выделяют большое количество енолазы-1 в базолатеральный отсек. Это, в свою очередь, способствует вторжению кристаллов СОМ и миграции моноцитарных клеток через почечный интерстициум. Впоследствии данный процесс пролонгирует воспалительный ответ, а также способствует образованию камней в почках. Эти данные служат важной основой для дальнейшего выяснения сложных патогенетических механизмов заболевания почек.

KV201-HUMAN – переменная иммуноглобулина каппа 2D-40 (ген *IGKV2D-40*). Молекулы иммуноглобулина человека состоят из двух идентичных тяжёлых цепей, которые определяют классы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE), и одинаковых лёгких цепей (каппа или ламбда), которые ковалентно связаны с тяжёлыми цепями [24]. Циркулирующие в сыворотке крови свободные цепи иммуноглобулинов являются естественным секреторным продуктом В-лимфоцитов и представляют собой уникальный биомаркёр клеточных нарушений, связанных с неопластическими процессами в организме. Увеличение этого показателя свидетельствует об иммунопролиферативных расстройствах или злокачественных заболеваниях. Секретируемые иммуноглобулины опосредуют эффекторную фазу гуморального иммунитета, что приводит к элиминации связанных антигенов [25]. Лёгкие цепи способны проходить через почечный фильтр и поэтому обнаруживаются в моче.

GP2-HUMAN – панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин 2-го типа GP2 (ген *GP2*), количественно преобладающий белок мембраны экскреторных гранул ацинарных клеток поджелудочной железы. Синтез GP2, по-видимому, регулируется активированными Т-клетками человека и модулируется ингибиторами TNF. Кишечные эпителиальные клетки, стимулированные GP2, являются мощными хемотаксантами Т-клеток. Кроме того, GP2 оказывает антиапоптотическое и пролиферативное действие на энтероциты, выступая, таким образом, в качестве про-тективного фактора [26].

BGAL-HUMAN –  $\beta$ -галактозидаза (ген *GLB1*), фермент, который часто называют лактазой, катализирует реакцию гидролитического отщепления нередуцированных остатков  $\beta$ -D-галактозы.  $\beta$ -галактозидаза является широко используемым маркёром клеточного старения [27]. При изучении диабетической нефропатии 2-го типа у стареющих пациентов установлено, что экспрессия  $\beta$ -галактозидазы увеличивалась по сравнению с контрольной группой [28]. Нарастание экскреция

**Список белков, демонстрирующих статистически значимые различия при сравнении больных Г1 и ГП**

Белок	Значение <i>p</i>
ENOА-HUMAN	0,005708122
KV201-HUMAN	0,017941503
GP2-HUMAN	0,01861632
BGAL-HUMAN	0,02458857
K1C27-HUMAN	0,02458857
KI13B-HUMAN	0,02458857
KV113-HUMAN	0,037242543
S10A9-HUMAN	0,037242543
RS27A-HUMAN	0,039351836
GRM1A-HUMAN	0,047624078

$\beta$ -галактозидазы с мочой установлено при введении нефротоксических агентов, неосложненном ПН у женщин репродуктивного возраста [29].

K1C27-HUMAN – кератин I типа цитоскелета 27 (ген *KRT27*) необходим для правильной сборки кератина I и II и образования кератиновых промежуточных волокон. Кератины экспрессируются в эпителиальных клетках и их производных. Они являются самой многочисленной группой промежуточных филаментов и представлены двумя фракциями: кислыми (I тип) и основными (II тип) кератинами. Благодаря ряду экспериментальных работ установлена роль кератинов в регуляции клеточного цикла и роста клеток, развитии апоптоза, миграции кератиноцитов при повреждениях кожи и ремоделировании тканей.

K113B-HUMAN – кинезинподобный белок KIF13B (ген *KIF13B*). Кинезины – суперсемейство моторных белков эукариотических клеток. Кинезины продвигаются по микротрубочкам, используя энергию гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ), и являются тубулинзависимыми АТФазами. Кинезины участвуют в осуществлении различных клеточных функций и процессов, включая митоз, мейоз и везикулярный транспорт – транспорт мембранных пузырьков, в том числе быстрый аксональный транспорт [30].

KV113\_HUMAN – иммуноглобулин каппа, переменная 1-13 (ген *IGKV1-13*). Свободные лёгкие цепи каппа ( $\kappa$ ) или ламбда ( $\lambda$ ) (FLC), продуцируемые В-клетками во время синтеза иммуноглобулина, необходимы для корректировки и стимуляции функций полиморфно-ядерных лейкоцитов, дегрануляции тучных клеток, участвующих в воспалительных реакциях. Имея небольшую молекулярную массу, свободные лёгкие цепи иммуноглобулинов играют важную роль в развитии заболеваний почек [31]. Белки стимулируют окислительный стресс в различных клетках и тканях и непосредственно повреждают и клетки уротелия, и кардиомиоциты [32]. Повышение уровня лёгких цепей иммуноглобулинов в плазме и сыворотке выявлено у пациентов с уремией [33]. При хронических заболеваниях почек лёгкие цепи фильтруются через клубочки, а затем реабсорбируются в проксимальных канальцах [34]. В различных исследованиях показано, что повышенные уровни лёгких цепей иммуноглобулинов могут рассматриваться как лучший предиктор риска повреждения почек по сравнению с С-реактивным белком [35]. Лёгкие цепи иммуноглобулинов могут использоваться для скрининга повреждения паренхимы почек при диабете в качестве основного показателя диабетической нефропатии [36].

S10A9\_HUMAN – белок S100A9 (ген *S100A9*). Белок S100A9 представляет собой кальций- и цинксвязывающий белок, играющий заметную роль в регуляции воспалительных процессов и иммунного ответа [37]. Известно, что белок S100A9 активно экспрессируется в цитоплазме нейтрофилов и обнаруживается в высоких концентрациях во внеклеточной жидкости при воспалительных заболеваниях различной природы (хронические воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит и др.), чаще всего в комплексе с родственным белком S100A8 (кальпротектин). S100A8 и S100A9 входят в группу эндогенных молекулярных паттернов (danger associated molecular pattern – DAMP), усиливающих врождённый иммунный ответ и играющих важную роль в защите слизистой оболочки от микроорганизмов.

S100A8/A9 является активатором врождённой иммунной системы, увеличивается при различных воспалительных заболеваниях, что достигается посредством активации Toll-подобного рецептора 4 [38].

RS27A\_HUMAN – рибосомальный белок убиквитин-40S S27a (ген *RPS27A*). Убиквитин – это консервативный белок эукариот, который принимает участие в регуляции процессов внутриклеточной деградации множества белков и присутствует практически во всех тканях организма. До 80–90% внутриклеточного распада белков осуществляется убиквитин-протеасомным путем. Убиквитин-протеасомный путь отвечает за регулируемое расщепление многих белков, участвующих в контроле роста и пролиферации клеток, клеточной дифференцировке, иммунных и воспалительных реакциях, апоптозе и метаболической адаптации [39]. Убиквитинирование вовлечено в регуляцию функции почек, участие в высокоорганизованных ответах, при деградации мышечного белка в ответ на потерю функции почек [40]. С-терминальная гидролаза Ubiquitin L1 (UCH-L1) встречается в трубчатых и париетальных клетках почки и экспрессируется *de novo* в повреждённых подоцитах. У UCH-L1-дефицитных мышей развивается протеинурия без существенных изменений морфологии клубочков, но с увеличением тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения, приводящего к острой почечной недостаточности и гибели животных. Основной функцией UCH-L1 в почках является регулируемая деградация белка путём контроля числа протеасом.

GRM1A\_HUMAN – GRAM-содержащий белок 1A (ген *GRAMD1A*). GRAM-содержащий белок 1A впервые был обнаружен в эмбриональной стволовой клетке человека, он экспрессируется в тканях эктодермы, мезодермы и эндодермы и многих опухолевых клетках. GRAM-содержащий белок 1A может служить прогностическим фактором при гепатоцеллюлярной карциноме [41].

**Заключение.** Комплект идентифицированных белков мочи у больных ХПН состоял из 661 протеина, протеом больших – из 533 белков. Статистически значимое различие ( $p < 0.05$ ) установлено для 10 белков мочи у больных с обострением ХПН. Среди них  $\alpha$ -енолаза; KV201\_HUMAN – переменная иммуноглобулина каппа 2D-40; панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин GP2;  $\beta$ -галактозидаза BGAL; кератин I типа цитоскелета 27; кинезинподобный белок KIF13B; KV113\_HUMAN – иммуноглобулин каппа, переменная 1-13; белок S100A9; рибосомальный убиквитин; GRAM-содержащий белок 1A. Это даёт основание считать, что протеомный анализ можно отнести к методам выявления биомаркёров при заболеваниях почек и мочевыводящих путей. Как известно, вирулентность грамотрицательной флоры, в первую очередь, кишечной палочки и протей, обусловлена их способностью прилипать к эпителию мочевыводящих путей и продвигаться по нему вверх против тока мочи, снижая активность фагоцитоза и выделяя эндотоксин. Следствием данного процесса становится повреждение уротелиальной выстилки и выявление в моче пяти из вышеперечисленных белков, связанных с процессами повреждения и последующей трансформацией метаболических и функциональных свойств клеток уротелия. Альфа-енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах. GP2\_HUMAN относится к панкреатическим секреторным гранулярным мембранным

основным гликопротеинам. Увеличение экскреции с мочой BGAL\_HUMAN –  $\beta$ -галактозидазы наблюдается при повреждении почечной ткани нефротоксическими агентами. K1C27\_HUMAN – кератин I типа 27 нарастает при ремоделировании тканевых структур. RS27A\_HUMAN – рибосомальный белок убиквитин-40S S27a характеризует степень тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения. К участникам воспалительного процесса и нарушения локальной иммунной защиты уротелия канальцев почек могут быть отнесены ещё 5 выделенных белков: переменная иммуноглобулина каппа 2D-40, кинезинподобный белок KIF13B, белок S100A9, иммуноглобулин каппа, переменная 1-13, GRAM-содержащий белок 1A. Данные мочевые белки у больных на высоте воспалительного процесса можно считать биомаркерами имеющихся при ХПН дегенеративных и деструктивных изменений стенок канальцев, происходящих в зоне воспалительной инфильтрации. Эти процессы приводят к попаданию лейкоцитов в интерстиций почечной паренхимы.

Анализ протеома мочи у больных при обострении ПН позволяет выявлять особую группу пептидов, связанную с процессами повреждения эпителиальной выстилки почечных канальцев и формированием локального иммунного ответа. Это потенциальные биомаркеры, которые могут быть полезны в диагностике, мониторинге течения и оценке эффективности терапии при обострении ХПН.

Панель данных маркеров в дальнейшем может быть использована для разработки персонализированных методов лечения пациентов с ХПН, непрерывного мониторинга состояния эпителиальной выстилки почечных канальцев и контроля степени нарушения механизмов иммунной защиты почечной паренхимы.

**Финансирование.** Материалы подготовлены в рамках базовой тематики РАН 65.3.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-9, 11, 17, 19, 20, 22-41 см. REFERENCES)

1. Krochmal M., Fernandes M., Filip S. et al. PeptiCKDb – peptide - and protein-centric database for the investigation of genesis and progression of chronic kidney disease. Database (Oxford). 2016; 2016: baw128.
2. Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H., Wang S.M., Song C.J. et al. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2014; Mar; 19(3): 129-35.
3. Szeto C.C., Kwan B.C., Lai K.B., Lai F.M., Chow K.M. et al. Urinary expression of kidney injury markers in renal transplant recipients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Dec; 5(12): 2329-37.
4. Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J. Proteome Res.* 2007; Oct; 6(10): 3881-90.
5. Menglin L., Mindi Z., Youhe G. Changes of proteins induced by anticoagulants, can be more sensitively detected in urine rather than plasma. *Sci. China Life Sci.* 2013; 57(7): 649–56.
6. Li M.Z., Zhao M. Gao Y. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma. *Science China Life Sciences*. 2014. 57: 649–56.
7. Wu J., Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. *Expert Review of Proteomics*. 2015.12(6): 623–36.
8. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am. J. Kid. Dis.* 2002; 39 (suppl 1).
9. Schinstock C.A., Semret M.H., Wagner S.J., Borland T.M., Bryant S.C., Kashani K.B. et al. Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; May; 28(5): 1175-85.
10. Zakharova N.B., Pastushkova L.Kh., Larina I.M., Kashirina J.N., Lyakh, R.V., Popkov V.M. The value of the proteomic composition of the urine in diseases of the urinary tract (review of literature). *Ekspieriment'naya i klinicheskaya urologiya*. 2017; 1: 22-6. (in Russian)
11. Kamijo-Ikemori A., Ichikawa D., Matsui K., Yokoyama T., Sugaya T., Kimura K. Urinary L-type fatty acid binding protein (L-FABP) as a new urinary biomarker promulgated by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. *Rinsho Byori*. 2013 Jul; 61(7): 635-40.
12. Semchenkov A.Yu., Tomilina N.A. “DOQI” refers to the origins of chronic renal failure (On a new tab of the recommendations of K/DOQI for the diagnosis, classification and assessment of severity of chronic kidney disease). *Nefrologiya i dializ*. 2004; 6(3): 204-20. (in Russian)
13. Dobronravov V.A. Overview of the pathophysiology of acute kidney injury [Обзор патофизиологии острого повреждения почек]. In: Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Kayukov I.G. *Acute kidney injury [Ostroie povrezhdenie pochek]*. Moscow: MIA; 2015; 30-79. (in Russian)
14. Valeeva O.A., Pastushkova L.Kh., Pakhorukov N.A. Dobrokhotov V.I., Larina I.M. Heart rate Variability in the proteome of urine of a healthy person in the experiment with 105-day isolation in a pressurized. *Fiziologiya cheloveka*. 2011; 37(3): 98 - 102. (in Russian)
15. Kangari G., Esteghamati M., Ghasemi K., Mahboobi H. Predictive accuracy of urinary  $\beta$ 2-microglobulin for kidney injury in children with acute pyelonephritis. *Iran J. Kidney Dis.* 2015; Jan; 9(1):19-24.
16. Shatokhina C.N., Dasaev L.A., Shatokhina I.S., Shabalin V.N., Shilov E.M. the Pathogenetic features of the morphological picture of the facies of the urine of patients with chronic pyelonephritis. *Lechaschij Vrach*. 2014; (1): 36-42. (in Russian)
17. Fidan K., Kandur Y., Buyukkaragoz B., Akdemir U.O., Soylemezoglu O. Hypertension in pediatric patients with renal scarring in association with vesicoureteral reflux. *Urology*. 2013; Jan; 81(1): 173-7.
18. Kim A.J., Ro H., Kim H., Chang J.H., Lee H.H., Chung W. et al. Klotho and S100A8/A9 as Discriminative Markers between Pre-Renal and Intrinsic Acute Kidney Injury. *PLoS One*. 2016; Jan 22; 11(1): e0147255.
10. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.В., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы). *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017; 1: 22-6.
12. Земченков А.Ю., Томила Н.А. «К/ДОКИ» обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе Рекомендаций К/ДОQI по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек). *Нефрология и диализ*. 2004; 6(3): 204-20.
13. Добронравов В.А. Обзор патофизиологии острого повреждения почек. В кн.: Смирнов А.В., Добронравов В.А, Румянцев А.Ш., Каюков И.Г. Острое повреждение почек. М.: МИА; 2015; 30-79.
14. Валева О.А., Пастушкова Л.Х., Пахарукова Н.А., Доброхотов И.В., Ларина И.М. Вариабельность протеома мочи здорового человека в эксперименте с 105-суточной изоляцией в гермообъекте. *Физиология человека*. 2011; 37(3): 98 - 102.
16. Шатохина С.Н., Дасаева Л.А., Шатохина И.С., Шабалин В.Н., Шилов Е.М. Патогенетические особенности морфологической картины фаций мочи больных хроническим пиелонефритом. *Лечащий врач*. 2014; (1): 36-42.
19. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Шилов Е.М., Вагазин А.В. и др. Национальные рекомендации. Острое повреждение почек: основные принципы диагностики, профилактики и терапии. Часть 1. *Нефрология*. 2016; 20(1):79-104.

19. Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumjancev A.Sh., Shilov E.M., Vatazin A.V. et al. National recommendations. Sharp injury of kidneys: basic principles of diagnostics, prevention and therapy. Part 1. *Nefrologiya*. 2016; 20(1):79-104. (in Russian)
20. Kang H.J., Jung S.K., Kim S.J., Chung S.J. Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr. D. Crystallogr.* 2008; Jun; 64(Pt 6): 651-7.
21. Eltoweissy M., Müller G.A., Bibi A., Nguye P.V., Dihazi G.H., Müller C.A. et al. Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. *Mol. Biosyst.* 2011 Apr; 7(4): 1277-88.
22. Chiangjong W., Thongboonkerd V. Calcium oxalate crystals increased enolase-1 secretion from renal tubular cells that subsequently enhanced crystal and monocyte invasion through renal interstitium. *Sci Rep.* 2016; 6: 24064.
23. Schroeder H.W. Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; Feb; 125(2 Suppl 2): 41-52.
24. Wang N.S., McHeyzer-Williams L.J., Okitsu S.L., Burris T.P., Reiner S.L., McHeyzer-Williams M.G. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR $\alpha$ . *Nat. Immunol.* 2012; May 6; 13(6): 604-11.
25. Uchil P.D., Nagarajan A., Kumar P.  $\beta$ -Galactosidase. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017; Oct 3; 2017(10): pdb.top096198.
26. Verzola D., Gandolfo M.T., Gaetani G., Ferraris A., Mangerini R., Ferrario F. et al. Garibotto Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; Nov; 295(5): 1563-73.
27. Hamed S.A. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2017; Sep; 10(9): 993-1006.
28. Ossipova O., Chu C.W., Fillatre J., Brott B.K., Itoh K., Sokol S.Y. The involvement of PCP proteins in radial cell intercalations during *Xenopus* embryonic development. *Dev. Biol.* 2015; Dec 15; 408(2): 316-27.
29. Esparvarinha M., Nickho H., Mohammadi H., Aghebati-Maleki L., Abdolalizadeh J., Majidi J. The role of free kappa and lambda light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.* 2017; Jul; 91: 632-44.
30. Anderson G.P. Free immunoglobulin light chains in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185(8): 793-5.
31. Cohen G., Rudnicki M., Hörl W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int.* 2001; 59: 48-S52.
32. Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R. et al. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3(6): 1684-90.
33. Desjardins L., Liabeuf S., Lenglet A., Lemke H.-D., Vanholder R., Choukroun G. et al. E.U.T.W. Group. Association between free light chain levels, and disease progression and mortality in chronic kidney disease. *Toxins.* 2013; 5(11): 2058-73.
34. Jia J., Arif A., Terenzi F., Willard B., Plow E.F., Hazen S.L. et al. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell.* 2014; 159: 623-34.
35. Frosch M., Metz D., Foell T., Sorg C., Sunderkötter C., Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp. Dermatol.* 2005; 14(4): 259-65.
36. Champai boon C., Sappington K.J., Guenther B.D., Ross K.F., Herzberg M.C. Calprotectin S100A9 calciumbinding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. *J. Biol. Chem.* 2009 Mar 3; 284(11): 7078-90.
37. Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S., Leukert N., Ehrhardt C., van Zoelen M.A. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 2007; Sep; 13(9): 1042-9.
38. Turnbull A.P., Ioannidis S., Krajewski W.W., Pinto-Fernandez A., Heride C., Martin A.C.L. et al. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature.* 2017; Oct 26; 550(7677): 481-6.
39. Belgareh-Touzé N., Léon S., Erpapazoglou Z., Stawiecka-Mirota M., Urban-Grimal D., Haguenaer-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* 2008; Oct; 36(Pt 5): 791-6.
40. Rajan V., Mitch W. E. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2008; Dec.; 1782(12): 795-9.
41. Song X., Wang S., Gu B., Hou Q., Liu Y., Zhang M. Production and characterization of a monoclonal antibody against GRAM domain-containing protein 1A. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2014; Aug; 33(4): 246-53.

Поступила 25.01.18

Принята к печати 15.03.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.1-092:575.083.3

Великий Д.А.<sup>1</sup>, Гичкун О.Е.<sup>1,2</sup>, Шевченко А.О.<sup>1,3</sup>

## МИКРОРНК: РОЛЬ В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ ТИО им.ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, 123182, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

*Представлен анализ опубликованных данных о диагностической роли микроРНК при развитии сердечно-сосудистых заболеваний. МикроРНК представляют собой класс малых некодирующих РНК, регулирующих экспрессию генов и влияющих на различные функции клетки. Описаны современные методы исследования микроРНК. Проанализированы данные об изменении их концентрации при ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности и других заболеваниях. В настоящее время накопление клинических данных о роли этих биомаркеров позволит определить диагностическую и прогностическую значимость отдельных микроРНК или их панелей при сердечно-сосудистых заболеваниях.*

**Ключевые слова:** микроРНК; биомаркеры; сердечно-сосудистые заболевания; мультимаркерный анализ.

**Для цитирования:** Великий Д.А., Гичкун О.Е., Шевченко А.О. МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 403-409. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-403-409>

*Velikiy D.A.<sup>1</sup>, Gichkun O.E.<sup>1,2</sup>, Shevchenko A.O.<sup>1,3</sup>*

### MICRORNAS: A ROLE IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE, THE POSSIBILITY FOR CLINICAL APPLICATION

<sup>1</sup>V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia;

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

<sup>3</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

*This review summarizes the published literature devoted to the analysis of diagnostic role of microRNAs in cardiovascular disease. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression and affect various cellular functions. Modern methods for the detection of microRNA are described. The data of variations in their concentration in ischemic heart disease, heart failure and other diseases are analyzed. At present, the accumulation of clinical data on the role of these biomarkers will allow to determine the diagnostic and prognostic significance of microRNAs (microRNA sets) in cardiovascular diseases.*

**Key words:** microRNA, biomarkers, cardiovascular disease, multimarker analysis.

**For citation:** Velikiy D.A., Gichkun O.E., Shevchenko A.O. MicroRNAs: a role in the development of cardiovascular disease, the possibility for clinical application. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): (in Russ) 403-409. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-403-409>

**For correspondence:** Velikiy D.A., Ph.D. (Medicine), Lead Researcher of the Department of Regulatory Mechanisms in Transplantology; e-mail: [dim\\_vel@mail.ru](mailto:dim_vel@mail.ru)

#### Information about authors:

*Velikiy D.A.*, <https://orcid.org/0000-0002-8742-5102>

*Gichkun O.E.*, <http://orcid.org/0000-0002-3475-3161>

*Shevchenko A.O.* <http://orcid.org/0000-0003-4719-9486>

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

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

Received 28.03.2018  
Accepted 03.04.2018

Несмотря на открытие новых лекарственных препаратов и достижения в области терапии, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в первую очередь атеросклероз и его осложнения, тяжёлая хроническая сердечная недостаточность (СН), остаются основной причиной смертности в мире [1]. Лучшее понимание патофизиологии ССЗ может помочь в проведении более

эффективного мониторинга прогрессирования заболеваний и применения новых терапевтических стратегий. В последние десятилетия во всем мире активно изучается связь новых факторов и медиаторов воспаления, неоангиогенеза, деструкции тканей, тромбообразования с риском ССЗ и их осложнений. МикроРНК являются предметом исследований, направленных на понимание патогенеза ССЗ, поиск и валидацию новых биомаркеров для их диагностики [2]. Эту группу веществ можно отнести, очевидно, к потенциальным биомаркерам, которые либо недавно используются в клинической медицине, либо только в перспективе могут быть рекомендованы для

**Для корреспонденции:** Великий Дмитрий Алексеевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела регуляторных механизмов в трансплантологии; e-mail: [dim\\_vel@mail.ru](mailto:dim_vel@mail.ru)

практического применения. В то же время эти сведения информативно ёмки, клиническое применение лабораторных маркеров отражает современное состояние научных разработок в области аналитических технологий, а диагностическая значимость постоянно расширяется и уточняется [3].

МикроРНК относятся к классу небольших (приблизительно 22 нуклеотида) некодирующих РНК, которые после транскрипции регулируют экспрессию гена путём расщепления специфических мРНК или репрессии их трансляции. Первая микроРНК, *lin-4*, была идентифицирована в *Caenorhabditis elegans* в 1993 г. [4]. На сегодняшний день идентифицировано более 1000 микроРНК и подтверждено их участие в регуляции всех известных клеточных процессов [5]. Экспрессия микроРНК в основном тканеспецифична и позволяет контролировать экспрессию генов на разных стадиях биологических процессов. Благодаря разнообразию регуляторных функций микроРНК могут являть собой новый перспективный класс биомаркеров, пригодных как для диагностики, так и для мониторинга прогрессирования заболевания. Кроме того, их использование может помочь в выборе тактики лечения и/или подборе дозы лекарственных препаратов.

**Структура и функции микроРНК.** По своей структуре микроРНК представляют класс малых (около 22 нуклеотидов) некодирующих молекул, которые препятствуют иницированию трансляции, что приводит к распаду соответствующих мишеней [6]. В ядре с помощью РНК-полимеразы II/III происходит транскрипция микроРНК; далее - модификация (процессинг) с участием рибонуклеазы Droscha и внутриядерного белка DGCR8 в «шпилечные» РНК (пре-микроРНК), которые состоят из 70 нуклеотидов и более и имеют характерную конфигурацию. После экспорта в цитоплазму с помощью белков внутриядерного транспорта Exportin 5 и Ran-GTP пре-микроРНК расщепляются рибонуклеазой Dicer с образованием 21–23 нуклеотидных дуплексов. Затем эти дуплексы «разматываются» и могут непосредственно внутри клетки образовывать микроРНК-опосредованные блокирующие комплексы (miRISC),

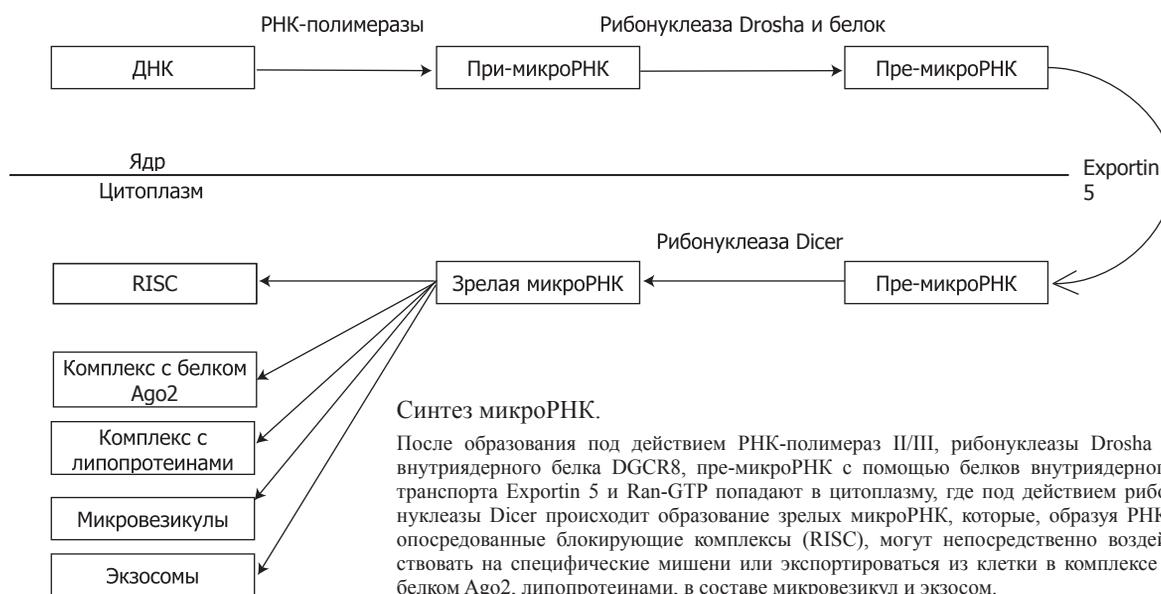
которые контролируют ингибирование трансляции мишеней данной микроРНК. При этом микроРНК могут также высвобождаться из клетки в виде комплексов с белком Ago2 или с липопротеинами, секретироваться в экзосомах или упаковываться в микровезикулы (см. рисунок) [7].

После образования под действием РНК-полимераз II/III рибонуклеазы Droscha и внутриядерного белка DGCR8 пре-микроРНК с помощью белков внутриядерного транспорта Exportin 5 и Ran-GTP попадают в цитоплазму, где под действием рибонуклеазы Dicer происходит образование зрелых микроРНК, которые, образуя РНК-опосредованные блокирующие комплексы (RISC), могут непосредственно воздействовать на специфические мишени или экспортироваться из клетки в комплексе с белком Ago2, липопротеинами, в составе микровезикул и экзосом.

Согласно некоторым данным, более 60% транскриптома человека может контролироваться с помощью микроРНК, тем самым делая этот путь посттранскрипционной регуляции одним из важнейших для общего функционирования клетки. При этом микроРНК играют ключевую роль в регулировании функций как здоровых, так и повреждённых клеток [8].

Как было показано, помимо регуляции процессов внутри клетки, микроРНК секретированы и могут быть обнаружены в биологических жидкостях организма, в том числе в крови и моче. Для перспективы клинического использования важным является тот факт, что циркулирующие микроРНК очень устойчивы и стабильны к различным повреждающим факторам: действию рибонуклеаз, замораживанию и оттаиванию и другим [9]. Показано, что секретлируемые микроРНК могут не только воздействовать на специфические мишени, но и функционировать в качестве вторичных мессенджеров. Упакованные в экзосомы микроРНК используются соседними клетками и индуцируют модификацию и/или регуляцию клетки [10].

**Методы исследования микроРНК.** МикроРНК стабильно сохраняются как в цельной крови, так и сыворотке или плазме. При использовании цельной крови



необходимо помнить, что в присутствии стандартного антикоагулянта (например, этилендиаминтетрауксусной кислоты – ЭДТА) с течением времени может изменяться уровень микроРНК в образце, так как транскрипция и деградация микроРНК продолжаются в белых кровяных клетках и тромбоцитах. Во избежание этого эффекта пробирки для сбора крови должны содержать стабилизирующие реагенты, которые разрушают клетки крови и тем самым останавливают экспрессию микроРНК [11]. Другие методы основаны на использовании химической экстракции на основе концентрированных хаотропных солей, таких как гуанидинтиоцианат, которые лизируют клетки и ингибируют РНКазу.

Для анализа уровня экспрессии микроРНК в плазме крови могут использоваться такие антикоагулянты, как ЭДТА, гепарин, цитрат [12]. Однако цитрат и гепарин ингибируют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), а ЭДТА является антикоагулянтом выбора при анализе микроРНК методом обратной транскрипции ПЦР (ОТ-ПЦР). Показано, что существует разница в концентрации микроРНК при сравнении образцов сыворотки и плазмы [13]. Последнее объясняется высвобождением микроРНК из тромбоцитов в процессе коагуляции. После подготовки соответствующих клинических образцов уровень экспрессии микроРНК можно проанализировать с помощью различных технологий. Известно несколько методов для определения экспрессии генов микроРНК в биологических образцах.

Первым методом является Нозерн-блот (англ. Northern blot). Он хорошо изучен и описан, однако довольно трудоёмок, а кроме того, существует много ограничений использования образцов. Для определения зрелой микроРНК в пробе общую РНК наносят на 12% денатурирующий полиакриламидный гель. В качестве маркера используют низкомолекулярный олигонуклеотид. После электрофореза пробы помещают на мембрану и проводят гибридизацию с олигонуклеотидными пробами (меченными <sup>32</sup>P изотопом или другой меткой), комплементарными зрелой форме изучаемой микроРНК. Далее мембраны отмывают от несвязавшихся олигонуклеотидных последовательностей и осуществляют детекцию с помощью радиочувствительной плёнки (если метка <sup>32</sup>P). Этот метод позволяет определить наличие интересующей последовательности микроРНК в исследуемом материале при изучении экспрессии генов [14].

В последнее время для обнаружения молекул микроРНК в биологическом образце используют метод микрочипов. Он позволяет исследовать образец на наличие одновременно большого количества молекул микроРНК. Недостаток такого подхода – необходимость содержания в образце больших количеств исследуемой РНК, что не всегда возможно. Из клеточной культуры, в которой нужно определить микроРНК, выделяют общую РНК. Выделенный материал инкубируют с малыми последовательностями РНК, меченными флуоресцентными метками. Далее меченый образец наносится на микрочип, содержащий ДНК-последовательности известных молекул микроРНК. После инкубации в течение 14 ч происходит гибридизация, затем планшет отмывается. Результат считывается при помощи флуоресцентного сканера. По свечению в лунках планшета определяют, какой из 200 образцов микроРНК экспрессируется в пробе [15].

Метод для определения уровня экспрессии генов микроРНК – количественная ОТ-ПЦР – имеет высокую специфичность и чувствительность. Чтобы исследовать

микроРНК с помощью ПЦР, необходимо модифицировать последнюю, так как праймеры в обычной системе для ПЦР имеют тот же размер, что и исследуемая микроРНК. Разработан новый методический подход, основанный на модификации ПЦР. Первым шагом в данной методике является встраивание последовательности искомого микроРНК в комплементарную ДНК (кДНК) с известной последовательностью. Это осуществляется при реакции обратной транскрипции. После проводят ПЦР и детекцию полученных ампликонов [16].

*Аналитические особенности количественного анализа микроРНК.* Существуют факторы, влияющие на точность анализа микроРНК. Критическое рассмотрение таких факторов имеет первостепенное значение, так как помогает избежать ошибочных результатов и обеспечить сопоставимость различных анализов. Например, при выделении РНК максимальная эффективность, воспроизводимость и надёжность имеют огромное значение, так как даже минимальная сопутствующая экстракция ингибирующих факторов может существенно влиять на результаты измерений. Для количественного определения уровня микроРНК используются различные методы выявления (секвенирование, ПЦР в реальном времени, микрочипы). Их применение необходимо определить согласно поставленным задачам, чтобы минимизировать разницу значений между результатами исследований. Важно отметить, что методы исследования должны быть стандартизованы, должны применяться воспроизводимые протоколы выделения и обнаружения; в противном случае сопоставимость значительно затруднена [17].

Помимо этих аналитических аспектов, существуют другие параметры, влияющие на уровень микроРНК в анализируемом биоматериале. Лекарственные препараты, такие как статины, антиагрегантные препараты и гепарин, могут изменять показатели определения микроРНК. Например, статины снижают уровень циркулирующего микроРНК-122, антитромбоцитарные препараты облегчают количество свободно циркулирующих тромбоцитарных микроРНК, а гепарин влияет на ПЦР в процессе количественной оценки [18]. Наконец, существуют различия в результатах количественной оценки микроРНК между клеточным и внеклеточным источниками биоматериала [19].

*МикроРНК при сердечно-сосудистых заболеваниях.* Многочисленные исследования последних лет показывают, что микроРНК могут выступать в качестве сильных диагностических биомаркеров и обладать прогностическим потенциалом при ССЗ. При ишемической болезни сердца (ИБС) и СН их надёжность сопоставима с таковой сердечных тропонинов и натрийуретических пептидов [20–23]. Кроме того, микроРНК были идентифицированы как специфические биомаркеры при заболеваниях, для которых не установлены белковые биомаркеры, – при фибрилляции предсердий и острой лёгочной эмболии [24, 25]. Имеются данные и о возможной диагностической роли микроРНК у реципиентов трансплантированного сердца.

Клиническая значимость микроРНК при ССЗ объясняется разнообразием регуляторных функций, которые контролируются этими молекулами. В частности, они выступают в качестве регуляторов метаболических процессов, таких как обмен липидов и гомеостаз глюкозы, играющих важную роль в развитии ССЗ и их осложнений [26]. Более того, установлена роль микроРНК в ре-

гуляции пролиферации, дифференцировки, миграции и выживаемости гладкомышечных клеток сосудов и клеток эндотелия [27, 28]. Всё указанное определяет большое количество исследований, направленных на установление роли микроРНК в качестве диагностических биомаркеров при ССЗ.

*МикроРНК при ИБС и вопросы совершенствования диагностики острого коронарного синдрома.* Острый коронарный синдром (ОКС), объединяющий нестабильную стенокардию и инфаркт миокарда (ИМ), характеризуется непредсказуемостью развития и связан с высоким риском осложнений и смерти. Появление клинических признаков ОКС свидетельствует об уже свершившемся повреждении атеросклеротической бляшки и образовании тромба в просвете коронарной артерии. Очень важной, но в настоящее время нерешённой проблемой является обнаружение признаков, предвещающих готовящуюся катастрофу.

При остром ИМ отмечается повышение концентрации определённых микроРНК в периферической крови [29]. Для более точной оценки их диагностического потенциала необходимо сравнение микроРНК с биомаркерами, используемыми в клинической практике, в первую очередь с тропонинами. В экспериментальном исследовании при индуцированном ИМ у мышей отмечено значительное повышение концентрации микроРНК-208 в плазме крови по сравнению с контролем; эти данные были подтверждены в клиническом исследовании, в котором приняли участие 424 пациента с острым ИМ. Концентрация микроРНК-208b и микроРНК-499-5p в плазме этих больных была значительно выше по сравнению с уровнем у здоровых людей. Однако диагностическая способность указанных микроРНК была ниже, чем у тропонина Т (площадь под ROC-кривой: тропонин Т – 0,95, микроРНК-208b – 0,82, микроРНК-499-5p – 0,79) [30]. Несмотря на постоянное совершенствование методик определения и внедрение высокочувствительного анализа тропонинов, процент ложноположительных реакций остаётся достаточно высоким [31], с этой точки зрения определение микроРНК может повысить точность диагностики острого ИМ с помощью биомаркеров крови. Было отмечено увеличение концентрации микроРНК-499-5p у пациентов с ИМ без повышения сегмента ST, причём диагностическая точность при дифференциальной диагностике этого заболевания с острой СН была выше, чем у тропонина [20]. В другом исследовании было показано, что совместное определение концентрации микроРНК-1, микроРНК-499 и микроРНК-21 с высокочувствительным тропонином Т значительно увеличивало его диагностический потенциал у пациентов с ОКС (площадь под ROC-кривой увеличивалась с 0,89 до 0,94) [32]. При развитии нестабильной стенокардии, когда уровень тропонина Т не изменяется, было отмечено дифференциально значимое повышение концентрации микроРНК-133a в сыворотке крови пациентов по сравнению с концентрацией у здоровых людей [33]. В исследовании, включившем 444 пациента с ОКС, установлено повышение концентрации микроРНК-1, микроРНК-133a и микроРНК-208b в группе больных с ИМ по сравнению с группой пациентов с нестабильной стенокардией [34].

С учётом многофакторности патогенеза атеросклероза и его осложнений, а также в связи с различной степенью выраженности разных факторов у каждого пациента в настоящее время разрабатывается концепция мульти-

маркерного анализа, т.е. создания панелей биомаркеров для диагностики и оценки риска развития осложнений. Предполагается, что применение мультимаркерного анализа может быть перспективным путём к персонализации наблюдения и лечения пациентов и позволит повысить чувствительность и специфичность диагностики [35]. Набор из шести микроРНК (микроРНК-1, микроРНК-134, микроРНК-186, микроРНК-208, микроРНК-223 и микроРНК-499) был валидизирован в качестве надёжного биомаркера развития острого ИМ. Диагностическая значимость этого набора была выше не только каждой микроРНК по отдельности, но и выше таких биомаркеров, как тропонин Т и креатининкиназа-МВ (площадь под ROC-кривой составляла 0,83 против 0,768 и 0,709 соответственно) [21]. В другом исследовании для диагностики ИМ оказался эффективным набор из 20 микроРНК, который как по своей чувствительности и специфичности, так и по диагностической способности был выше, чем каждая микроРНК по отдельности. Более того, указанный набор позволял проводить более раннюю диагностику инфаркта по сравнению с тропонином Т [36].

Помимо диагностического потенциала микроРНК могут иметь значение в качестве предикторов неблагоприятных сердечно-сосудистых событий как у здоровых людей, так и у пациентов с установленными ССЗ. Показана предиктивная роль набора из пяти микроРНК в отношении развития ИМ [37]. В другом исследовании набор из семи микроРНК был определён в качестве предиктора гибели пациентов с установленным диагнозом ИБС [38]. В крупном исследовании, включившем 820 пациентов, установлено, что микроРНК-126, микроРНК-197 и микроРНК-223 могут являться надёжными предикторами развития ИМ [39]. Эти же микроРНК, как было показано в исследовании с участием 873 пациентов, являются сильными предикторами гибели больных с диагностированной ИБС [40]. Приведённые данные показывают не только наличие у микроРНК прогностического потенциала, но и открывают возможности их использования при вторичной профилактике ССЗ.

На сегодняшний день диагностика нестабильной стенокардии на фоне нормальных значений уровня сердечного тропонина основывается на клинической оценке, при этом риск развития ИМ у данной категории больных значительно повышен. В клиническом исследовании с участием 95 пациентов было показано, что концентрация в сыворотке крови микроРНК-486 и микроРНК-92a может служить для дифференцирования пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией [41]. В другом исследовании установлено увеличение экспрессии на мононуклеарных клетках периферической крови микроРНК-134, микроРНК-198 и микроРНК-370 у пациентов с нестабильной стенокардией в отличие от пациентов со стабильной стенокардией [42]. Было установлено, что дифференциальная диагностика нестабильной стенокардии и боли в груди некоронарной этиологии может осуществляться с помощью определения концентрации в периферической крови набора из микроРНК-132, микроРНК-150 и микроРНК-186 [43]. Таким образом, исследования показывают, что для диагностики нестабильной стенокардии более перспективно использование наборов из нескольких микроРНК, позволяющих выявлять незначительные метаболические нарушения и изменения концентрации циркулирующих биомаркеров, которые происходят до развития ИМ.

*МикроРНК при сердечной недостаточности.* Ишемические нарушения в сердце, такие как ИМ, могут вызывать последовательное ремоделирование миокарда и фиброз, следствием чего является развитие СН. МикроРНК, как было показано, участвуют в регуляции процессов роста, гипертрофии, фиброза и жизнеспособности миокарда, поэтому изменение концентрации специфических микроРНК в крови отмечается у пациентов после ИМ. Был составлен набор из четырёх микроРНК: микроРНК-1, микроРНК-21, микроРНК-133а и микроРНК-208, концентрация которых повышалась после перенесённого ИМ [44]. В другом исследовании показано, что уровень микроРНК-208b и микроРНК-499 изменяется при повреждении миокарда. При этом уровень микроРНК-499 повышался и у пациентов с развившейся острой СН [45]. В ряде исследований была также описана возможная роль микроРНК в качестве биомаркеров для диагностики СН [46, 47]. Всего установлено 24 микроРНК, концентрация которых в периферической крови в той или иной степени изменяется у пациентов с СН по сравнению с таковой у здоровых людей [22].

На сегодняшний день в качестве биомаркеров диагностики СН используют N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) и ST2 (член семейства рецепторов интерлейкина-1) [48, 49]. Как и сердечный тропонин, NT-proBNP характеризуется как высокой чувствительностью, так и значительным процентом ложноположительных реакций. Поэтому с клинической точки зрения особенно большое значение имеет высокая диагностическая чувствительность и специфичность микроРНК. Недавно было описано пять микроРНК, снижение концентрации которых коррелировало как с развитием СН, так и с уровнем NT-proBNP. Значения площади под ROC-кривой составляли от 0,84 до 0,91, что отражает высокий диагностический потенциал данных микроРНК [22]. В другой работе при скрининговом исследовании циркулирующих микроРНК у пациентов с СН было показано повышение концентрации микроРНК-423-5p, микроРНК-320a, микроРНК-22 и микроРНК-92b по сравнению с уровнем у здоровых людей. При этом для микроРНК-320 и микроРНК-423-5p была установлена также корреляция с такими параметрами, как уровень NT-proBNP, широкий комплекс QRS и дилатация левого желудочка [50]. Большое клиническое значение имеют данные, которые показывают, что изменение концентрации в плазме микроРНК-23a, микроРНК-27b, микроРНК-324-5p и микроРНК-342-3p может помочь дифференцировать пациентов с СН и пациентов с обострением хронической обструктивной болезни лёгких или с одышкой другой этиологии. В этом же исследовании отмечено значительное увеличение диагностической способности биомаркеров при сочетанном определении микроРНК-423-5p и NT-proBNP [51]. Предполагается, что наборы, состоящие из двух микроРНК и более, могут иметь более высокий диагностический потенциал [46]. В исследовании, включившем 53 пациента с неишемической СН и сниженной фракцией выброса, был сформирован набор из восьми микроРНК (микроРНК-520d-5p, микроРНК-558, микроРНК-122, микроРНК-200b, микроРНК-622, микроРНК-519e, микроРНК-1231 и микроРНК-1228), который с высокой точностью (площадь под ROC-кривой 0,81) может использоваться для диагностики [52].

Ранняя диагностика СН у пациентов с сохранённой фракцией выброса затруднительна, вследствие того что

функциональные параметры часто остаются в пределах нормы, а клинические симптомы появляются на более поздних стадиях развития заболевания. При исследовании кардиомиоцитов крыс в модели СН с сохранённой фракцией выброса было показано значительное увеличение уровня микроРНК-21 по сравнению с таковым у здоровых животных [53]. В клинических исследованиях удалось выявить несколько микроРНК, изменение концентрации которых было связано с развитием заболевания, однако эти данные нуждаются в подтверждении на большем количестве пациентов [54, 55].

Показана прогностическая роль микроРНК при развитии СН [56]. При обследовании 42 пациентов микроРНК-182 была описана в качестве предиктивного биомаркера гибели больных с СН, причём её прогностическое значение было выше, чем у NT-proBNP и С-реактивного белка [23]. Известно, что развитие СН сопровождается нарушением функций других органов. Снижение уровня микроРНК-199a-3p в плазме крови было сильным предиктором развития почечной недостаточности у пациентов с острой СН [57]. Однако несмотря на перспективные результаты оценки прогностической роли микроРНК при развитии СН и нежелательных сердечно-сосудистых событий, на сегодняшний день нет данных исследований, проведённых с участием большого количества пациентов.

В настоящее время высказываются предположения о том, что измерение уровня микроРНК при трансплантации сердца может иметь значение для оценки риска развития отторжения и минимизации иммуносупрессивной терапии. Были установлены как отдельные микроРНК, так и мультимаркерные тесты на их основе, позволяющие достоверно различить пациентов после трансплантации сердца с острым клеточным отторжением и пациентов без отторжения [58, 59]. Известно, что васкулопатия сердечного трансплантата является лимитирующим фактором долгосрочного выживания реципиентов сердца. Было установлено, что уровни некоторых эндотелиальных микроРНК в плазме крови могут выступать в качестве диагностических маркеров распространённой васкулопатии независимо от клинических предикторов или других биомаркеров [60].

МикроРНК являются перспективными биомаркерами для диагностики ССЗ, наибольшее значение оценка их концентрации имеет при ИБС и СН. МикроРНК обладают высоким диагностическим потенциалом, который сопоставим с потенциалом широко используемых белковых биомаркеров или даже превосходит его, при этом применение наборов из нескольких микроРНК может повысить диагностическую точность. Более того, в нескольких крупных исследованиях была показана возможность использования наборов микроРНК в качестве предикторов нежелательных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4-34,36-46,48, 50-60 см. REFERENCES)

2. Щербо С.Н., Щербо Д.С., Кралин М.Ю. Биомаркеры персонализированной медицины часть 5. Некодирующие РНК и МикроРНК. *Медицинский алфавит*. 2015; 3(11): 5-11.

3. Долгов В.В., Шевченко О.П., Шевченко А.О. *Биомаркеры в лабораторной диагностике*. М.- Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2014.
35. Шевченко О.П., Аксенова А.В., Улыбышева А.А., Можейко Н.П., Никитина Е.А., Орлов В.И., Стаханова Е.А., Шевченко А.О. Сравнительный анализ диагностической значимости панелей биомаркеров у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19(2): 27-33.
47. Жиров И.В., Кочетов А.Г., Засеева А.В., Лянг О.В., Скворцов А.А., Абрамов А.А., Гимадиев Р.Р., Масенко В.П., Терещенко С.Н. МикроРНК в диагностике хронической сердечной недостаточности: состояние проблемы и результаты пилотного исследования. *Системные гипертензии*. 2016; 13(1): 39-46.
49. Шевченко О.П., Улыбышева А.А., Великий Д.А., Шевченко А.О. ST2 при отторжении трансплантированного сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17(4): 90-4.
18. Kaudewitz D., Zampetaki A., Mayr M. MicroRNA biomarkers for coronary artery disease? *Curr Atheroscler. Rep*. 2015; 17:70.
19. Shah R., Tanriverdi K., Levy D., Larson M., Gerstein M., Mick E. et al. Discordant expression of circulating microRNA from cellular and extracellular sources. *PLoS One* 2016; 11:e0153691.
20. Olivieri F., Antonicelli R., Lorenzi M., D'Alessandra Y., Lazzarini R., Santini G. et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int.J. Cardiol*. 2013;167: 531-6.
21. Li C., Fang Z., Jiang T., Zhang Q., Liu C., Zhang C. et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med. Genomics*. 2013; 6:16.
22. Marfella R., Di Filippo C., Potenza N., Sardu C., Rizzo M.R., Siniscalchi M. et al. Circulating microRNA changes in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: responders vs. non-responders. *Eur. J. Heart Fail*. 2013;15: 1277-88.
23. Cakmak H.A., Coskunpinar E., Ikitimur B., Barman H.A., Karadag B., Tiryakioglu N.O. et al. The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)* 2015;16:431-7.
24. Liu Z., Zhou C., Liu Y., Wang S., Ye P, Miao X. et al. The expression levels of plasma microRNAs in atrial fibrillation patients. *PLoS One* 2012;7:e44906.
25. Kessler T., Erdmann J., Vilne B., Bruse P., Kurowski V., Diemert P. et al. Serum microRNA-1233 is a specific biomarker for diagnosing acute pulmonary embolism. *J. Transl. Med*. 2016; 14: 120.
26. Zampetaki A., Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ. Res*. 2012; 110: 508-22.
27. Menghini R., Stohr R., Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis. *Ageing Res. Rev*. 2014;17c: 68-78.
28. Anand S. A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis. *Vasc. Cell* 2013; 5: 2.
29. Leistner D.M., Boeckel J.N., Reis S.M., Thome C.E., De Rosa R., Keller T. et al. Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics. *Eur. Heart J*. 2016; 37: 1738-49.
30. Gidlof O., Smith J.G., Miyazu K., Gilje P., Spencer A., Blomquist S. et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc. Disord*. 2013; 13: 12.
31. Jaeger C., Wildi K., Twerenbold R., Reichlin T., Rubini Gimenez M., Neuhaus J.D., et al. One-hour rule-in and rule-out of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Am. Heart J*. 2016; 171:92-102.e1-5.
32. Oerlemans M.I., Mosterd A., Dekker M.S., de Vrey E.A., van Mil A., Pasterkamp G., et al. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol. Med*. 2012;4: 1176-85.
33. Kuwabara Y., Ono K., Horie T., Nishi H., Nagao K., Kinoshita M. et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2011; 4: 446-54.
34. Widera C., Gupta S.K., Lorenzen J.M., Bang C., Bauersachs J., Bethmann K. et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J. Mol. Cell Cardiol*. 2011; 51: 872-5.
35. Shevchenko O.P., Aksyonova A.V., Ulybyшева A.A., Mozheiko N.P., Nikitina E.A., Orlov V.I., Stakhanova E.A., Shevchenko A.O. Comparative analysis of diagnostic significance of biomarkers' panels in cardiac recipients in the long term period after transplantation. *Vestnik transplantologii i iskustvennykh organov*. 2017;19(2):27-33. (in Russian)
36. Meder B., Keller A., Vogel B., Haas J., Sedaghat-Hamedani F., Kayvanpour E. et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol*. 2011;106: 13-23.
37. Bye A., Rosjo H., Nauman J., Silva G.J., Follstad T., Omland T. et al. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals – the HUNT study. *J. Mol. Cell Cardiol*. 2016; 97:162-8.

## REFERENCES

1. Moran A.E., Forouzanfar M.H., Roth G.A. et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*. 2014; 129:1483-92.
2. Shherbo S.N., Shherbo D.S., Kralin M.Ju. Biomarkers of personalized medicine part 5. Non-coding RNA and MicroRNA. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 3(11): 5-11. (in Russian)
3. Dolgov V.V., Shevchenko O.P., Shevchenko A.O. *Biomarkers in laboratory diagnostics [Биомаркеры в лабораторной диагностике]*. Moscow - Tver': ООО «Izdatel'stvo «Triada», 2014. (in Russian)
4. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*.1993; 75: 843-854.
5. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet*. 2011; 12: 846-60.
6. Chekulaeva M., Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; Jun;21(3): 452-60.
7. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; Jan 23;136(2):215-33.
8. Adams B.D., Kasinski A.L., Slack F.J. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol*. 2014; Aug 18; 24(16):762-76.
9. Guay C., Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol*. 2013; Sep; 9(9): 513-21.
10. Zhang J., Li S., Li L., Li M, Guo C., Yao J., Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):17-24.
11. Hantusch M., Tolios A., Beutner F., Nagel D., Thiery J., Teupser D. et al. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and miRNA profiles. *PLoS One* 2014;9:e113298.
12. Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3:e3694.
13. Wang K., Yuan Y., Cho J.H., McClarty S., Baxter D., Galas D.J. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012;7:e41561.
14. Varallyay E., Burgyan J., Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*. 2007;43: 140-5.
15. Zhou W.J., Chen Y., Corn R.M. Ultrasensitive microarray detection of short RNA sequences with enzymatically modified nanoparticles and surface plasmon resonance imaging measurements. *Anal. Chem*. 2011; 83: 3897-902.
16. Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L., Andreasen D., Bernard N., Chen C. et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat. Methods*. 2014; 11: 809-15.
17. Hardikar A.A., Farr R.J., Joglekar M.V. Circulating microRNAs: understanding the limits for quantitative measurement by realtime PCR. *J. Am. Heart Assoc*. 2014; 3: e000792.

38. Karakas M., Schulte C., Appelbaum S., Ojeda F., Lackner K.J., Munzel T. et al. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease—results from the large AtheroGene study. *Eur. Heart J.* 2017; Feb 14;38(7): 516–23.
39. Zampetaki A., Willeit P., Tilling L., Drozdov I., Prokopi M., Renard J.M. et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 60: 290–9.
40. Schulte C., Molz S., Appelbaum S., Karakas M., Ojeda F., Lau D.M. et al. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One.* 2015;10: e0145930.
41. Niculescu L.S., Simionescu N., Sanda G.M., Carnuta M.G., Stancu C.S., Popescu A.C. et al. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. *PLoS One.* 2015;10: e0140958.
42. Hoekstra M., van der Lans C.A., Halvorsen B., Gullestad L., Kuiper J., Aukrust P. et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394: 792–7.
43. Zeller T., Keller T., Ojeda F., Reichlin T., Twerenbold R., Tzikas S. et al. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *Eur. Heart J.* 2014; 35: 2106–14.
44. Zile M.R., Mehurg S.M., Arroyo J.E., Stroud R.E., DeSantis S.M., Spinale F.G. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011; 4: 614–9.
45. Corsten M.F., Dennert R., Jochems S., Kuznetsova T., Devaux Y., Hofstra L. et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010;3: 499–506.
46. Schulte C., Westermann D., Blankenberg S., Zeller T. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *World J. Cardiol.* 2015; 7: 843–60.
47. Zhironov I.V., Kochetov A.G., Zaseeva A.V., Liang O.V., Skvortsov A.A., Abramov A.A., Gimadiev R.R., Masenko V.P., Tereshchenko S.N. MicroRNA in the diagnosis of chronic heart failure: state of the problem and the results of a pilot study. *Sistemnye gipertenzii.* 2016; 13(1): 39–46. (in Russian)
48. McMurray J.J., Adamopoulos S., Anker S.D., Auricchio A., Bohm M., Dickstein K. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail.* 2012; 14: 803–69.
49. Shevchenko O.P., Ulybysheva A.A., Velikiy D.A., Shevchenko A.O. ST2 in rejection of the transplanted heart. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2015;17(4):90–4. (in Russian)
50. Goren Y., Kushnir M., Zafrir B., Tabak S., Lewis B.S., Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2012; 14: 147–54.
51. Ellis K.L., Cameron V.A., Troughton R.W., Frampton C.M., Ellmers L.J., Richards A.M. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur. J. Heart Fail.* 2013;15: 1138–47.
52. Vogel B., Keller A., Frese K.S., Leidinger P., Sedaghat-Hamedani F., Kayvanpour E. et al. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur. Heart J.* 2013; 34: 2812–22.
53. Dong S., Ma W., Hao B., Hu F., Yan L., Yan X. et al. MicroRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014;7: 565–74.
54. Wong L.L., Armugam A., Sepramaniam S., Karolina D.S., Lim K.Y., Lim J.Y. et al. Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* 2015;17: 393–404.
55. Watson C.J., Gupta S.K., O’Connell E., Thum S., Glezeva N., Fendrich J. et al. MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2015; 17: 405–15.
56. Satoh M., Minami Y., Takahashi Y., Tabuchi T., Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J. Card. Fail.* 2010; 16: 404–10.
57. Bruno N., terMaaten J.M., Ovchinnikova E.S., Vegter E.L., Valente M.A., van der Meer P. et al. MicroRNAs relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2016; 203: 564–9.
58. Sukma Dewi I., Hollander Z., Lam K.K., McManus J.W., Tebbutt S.J., Ng R.T. et al. Association of serum MiR-142-3p and MiR-101-3p levels with acute cellular rejection after heart transplantation. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0170842.
59. Duong Van Huyen J.P., Tible M., Gay A., Guillemain R., Aubert O., Varnous S. et al. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur. Heart J.* 2014; 35(45): 3194–202.
60. Singh N., Heggermont W., Fieuws S., Vanhaecke J. et al. Endothelium-enriched microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiac allograft vasculopathy. *J. Heart Lung. Transplant.* 2015; 34: 1376–84.

Поступила 28.03.18

Принята к печати 03.04.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.153.915-092

Смирнов Г.П.<sup>1</sup>, Малышев П.П.<sup>2</sup>, Рожкова Т.А.<sup>2</sup>, Зубарева М.Ю.<sup>2</sup>, Шувалова Ю.А.<sup>2</sup>, Ребриков Д.В.<sup>3,4</sup>, Титов В.Н.<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ РАСПРОСТРАНЁННОГО ВАРИАНТА RS2230806 ГЕНА ABCA1 НА УРОВНИ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ

<sup>1</sup>ГБУЗ г. Москвы «Городская поликлиника № 212 Департамента здравоохранения г. Москвы», 119620, Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, 121552, Москва;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва;

<sup>4</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава РФ, 117997, Москва

Целью данной работы стала оценка связи полиморфизма rs2230806 гена ABCA1 с липидным профилем у пациентов с выраженной дислипидемией. В исследование включили 363 пациента (из них 42,8% мужчин), средний возраст составил 48,7 года, 35,5% больных получали медикаментозную гиполипидемическую терапию (преимущественно статины). Количественное определение общего холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) осуществляли унифицированным ферментативным методом, ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) – прямым гомогенным методом в сыворотке натощак. Генотип по позиции rs2230806 гена ABCA1 определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием примыкающих проб и плавлением продуктов реакции после ПЦР. Частоты аллелей и генотипов варианта rs2230806 гена ABCA1 у больных с дислипидемией не отличались от таковых в группе здоровых лиц (спортсменов). Уровни липидов плазмы – общего ХС, ТГ и ХС ЛВП в среднем у пациентов с дислипидемией составили  $7,8 \pm 3,4$ ;  $3,4 \pm 6,5$  и  $1,29 \pm 0,40$  ммоль/л соответственно. При сравнении между пациентами с разными генотипами содержание липидов плазмы достоверно не различалось, однако при анализе различных моделей наследования изучаемого аллельного варианта обнаружена значимая ассоциация с уровнем ТГ в аддитивной модели, в которой каждый минорный аллель (А) дополнительно усиливал влияние на уровень ТГ плазмы на 1,02 ммоль/л ( $p = 0,044$ ). Результаты данного исследования демонстрируют наличие влияния распространённого варианта rs2230806 гена ABCA1 на уровень ТГ плазмы у больных с выраженной дислипидемией.

Ключевые слова: АТФ-связывающий кассетный транспортёр А1; полиморфизм R219K (rs2230806) гена ABCA1.

Для цитирования: Смирнов Г.П., Малышев П.П., Рожкова Т.А., Зубарева М.Ю., Шувалова Ю.А., Ребриков Д.В., Титов В.Н. Влияние распространённого варианта rs2230806 гена ABCA1 на уровни липидов плазмы у пациентов с дислипидемией. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(7): 410-413. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-410-413>

Smirnov G.P.<sup>1</sup>, Malyshev P.P., Rozhkova T.A.<sup>2</sup>, Zubareva M.Y.<sup>2</sup>, Shuvalova Y.A.<sup>2</sup>, Rebrikov D.V.<sup>3,4</sup>, Titov V.N.<sup>2</sup>

THE EFFECT OF ABCA1 RS2230806 COMMON GENE VARIANT ON PLASMA LIPID LEVELS IN PATIENTS WITH DYSLIPIDEMIA

<sup>1</sup>City Polyclinic № 212 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, 119620;

<sup>2</sup>National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, 121552;

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997;

<sup>4</sup>National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, 117997

The aim of this work was to assess the relationship of rs2230806 SNP of ABCA1 with lipid profile in patients with severe dyslipidemia. The study included 363 patients (42.8% of males), the average age was 48.7 years, 35.5% of patients received hypolipidemic drugs (mainly statins). Quantitative determination of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in fasting serum was carried out by a unified enzymatic method, and high density lipoproteins (HDL) – by a direct homogeneous method. Genotype according to the rs2230806 position in the ABCA1 gene was determined by polymerase chain reaction (PCR) «in real time» using adjacent samples and melting reaction products after PCR. The frequencies of alleles and genotypes of variant rs2230806 of ABCA1 gene in patients with dyslipidemia did not differ from those in the control group of healthy individuals (athletes). The levels of plasma lipids - TC, TG and HDL cholesterol, on average, in patients with dyslipidemia were  $7.8 \pm 3.4$ ,  $3.4 \pm 6.5$  and  $1.29 \pm 0.4$  mmol/l, respectively. Compared to different genotypes, the plasma lipid concentrations did not differ significantly, but the analysis of different inheritance models of the allelic variant studied showed a significant association with the level of TG in the additive model, in which each minor allele (a) further enhanced the effect on the level of plasma TG at 1.02 mmol/l ( $p=0.044$ ). The results of this study demonstrate the effect of a common variant rs2230806 of the ABCA1 gene on the plasma TG level in patients with severe dyslipidemia.

Key words: ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1 gene polymorphism, R219K, rs2230806.

For citation: Smirnov G.P., Malyshev P.P., Rozhkova T.A., Zubareva M.Y., Shuvalova Y.A., Rebrikov D.V., Titov V.N. The effect of ABCA1 rs2230806 common gene variant on plasma lipid levels in patients with dyslipidemia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 410-413 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-410-413>

For correspondence: Malyshev P.P., e-mail: pavel-malyshev@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 14.03.2018  
Accepted 01.04.2018

Для корреспонденции: Малышев Павел Прокопьевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. отдела проблем атеросклероза ; e-mail: pavel-malyshev@mail.ru

АТФ-связывающий кассетный транспортёр А1 (АВ-СА1) – ключевой белок одной из первых стадий обратного транспорта холестерина (ХС), опосредующий отток ХС и фосфолипидов от мембран клеток к апо-липопротеинам (апо) плазмы А-I и Е. Белок кодируется одноимённым геном (*ABCA1*), локализуемым на хромосоме 9 в области 9q31.1. Известно, что изменения структуры этого гена могут предопределять уровни ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) плазмы и риск ишемической болезни сердца (ИБС). Мутации гена *ABCA1* являются причиной танжерской болезни и наследственного дефицита ЛВП, характеризующихся низкими уровнями ХС ЛВП и апоА-I плазмы, а также повышенным риском раннего развития коронарного атеросклероза [1]. Идентифицировано также несколько полиморфизмов (вариантов) гена *ABCA1*, включая наиболее распространённый – rs2230806 (R219K, G1051A) в положении 107620867 соответствующей хромосомы. Данные метаанализов относительно влияния этого аллельного варианта на риск развития ИБС и уровень ХС ЛВП противоречивы и в значительной степени определяются этнической принадлежностью. Так, в работе Х. Ма и соавт. [2] показано, что К-аллель данного полиморфизма ассоциирован с более высоким уровнем ХС ЛВП и защитным эффектом против ИБС у представителей как монголоидной, так и европеоидной расы, тогда как позже, в более крупном метаанализе, проведённом Y. Yin и соавт. [3], не выявлено значимой связи rs2230806 с риском атеросклероза у лиц европеоидной расы, хотя у представителей монголоидной расы протективное влияние сохранялось. Вместе с тем в ряде исследований ассоциация между rs2230806 *ABCA1* и ХС ЛВП плазмы была документирована, однако результаты многих работ противоречивы, а взаимосвязь зависела от национального состава обследованных лиц. Следует также отметить, что большая часть исследований по ассоциациям данного аллельного варианта с липидным профилем проведена среди больных ИБС и контрольных выборок из общей популяции, тогда как работы среди субпопуляций пациентов отдельных групп, в частности, с наследственными нарушениями липидного обмена (семейной гиперхолестеринемией) или ожирением, малочисленны [4, 5]. В данной работе мы оценили связь полиморфизма rs2230806 гена *ABCA1* с липидным профилем у пациентов с различными формами выраженного нарушения липидного обмена (дислипидемии).

**Материал и методы.** В исследование включили 363 пациента (156, или 43% мужчин, средний возраст 43,8 года, и 207, или 57% женщин, средний возраст – 52,4 года), у которых были доступны результаты генетического тестирования. Группа состояла из лиц с различными типами гиперлипопротеинемии, обратившихся первично или уже наблюдавшихся в Институте клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова по поводу нарушения липидного обмена. Часть больных (35,55%) находилась на гиполипидемической терапии препаратами разных групп: 23,9% пациентов – на монотерапии статином, 1,9% – на монотерапии фибратом, 1,7% – на монотерапии эзетимибом, 0,55% – на монотерапии  $\omega$ -3-полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), 3,9% – на комбинации статина с эзетимибом, 2,5% – на комбинации статина с фибратом, 0,8% – на комбинации статина с  $\omega$ -3-ПНЖК, 0,3% – на комбинации статина с фибратом и  $\omega$ -3-ПНЖК. Среди принимаемых лекарственных препаратов наиболее частыми были статины,

однако при сравнении пациентов с разными генотипами *ABCA1* статистически значимых различий по частоте использования статинов не отмечалось: 24,6% – среди носителей генотипа G/G, 23% – генотипа G/A и 22,5% – генотипа A/A. Группы также достоверно не отличались по частоте использования остальных, реже применявшихся препаратов.

**Измерение липидов сыворотки крови.** Количественное определение общего ХС, триглицеридов (ТГ) и ХС ЛВП в сыворотке крови натощак проводили на биохимическом анализаторе Architect С8000 («Abbott», США) фотометрическими методами с использованием реактивов фирмы – производителя оборудования. Общий ХС и ТГ определяли унифицированным ферментативным методом, ХС ЛВП – прямым гомогенным методом.

**Генотипирование варианта rs2230806 гена ABCA1.** Генотип по позиции rs2230806 гена *ABCA1* определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием примыкающих проб и плавлением продуктов реакции после ПЦР [6]. Использовали коммерческую тест-систему «Генетика метаболизма» («ДНК-Технология», Россия, кат. №: R1-H908-N3/4). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия, кат. № O-DTPRIME4M1). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C – 10 с, 64°C – 30 с, в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации получали кривые плавления путём повышения температуры реакционной смеси с 25 до 75°C с шагом 1°C, измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. Процедуру генотипирования проводили в двух повторностях.

**Статистический анализ.** Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ STATISTICA 10.0 и SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. При сравнении групп по количественному признаку использовали параметрический (однофакторный ANOVA) и непараметрический (ранговый анализ по Краскелу–Уоллису) методы. SNPStats – программа, разработанная для анализа генетических эпидемиологических исследований для изучения ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). С помощью данной программы для каждого выбранного SNP получены результаты: частота аллелей и генотипов, тест на распределение по закону Харди–Вайнберга, анализ ассоциации SNP с ответом на основе линейной регрессии. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты. Распределение частот генотипов аллельного варианта rs2230806 гена ABCA1 среди пациентов с дислипидемией.** Частоты аллелей и генотипов варианта rs2230806 гена *ABCA1* сравнивали среди здоровых лиц (спортсменов) и больных с дислипидемией (табл. 1). Аллельные частоты между группами были аналогичными.

Распределение генотипов у больных с дислипидемией подчинялось уравнению равновесия Харди–Вайнберга.

**Клинико-биохимические данные пациентов с дислипидемией согласно генотипу ABCA1 и оценка связи генотипа с уровнями липидов плазмы.** Клинико-биохимические данные пациентов с дислипидемией в зависимости от генотипа *ABCA1* представлены в табл. 2. Различия в представленных характеристиках, включая липиды сыворотки, между разными генотипами не достигали статистической значимости.

Таблица 1

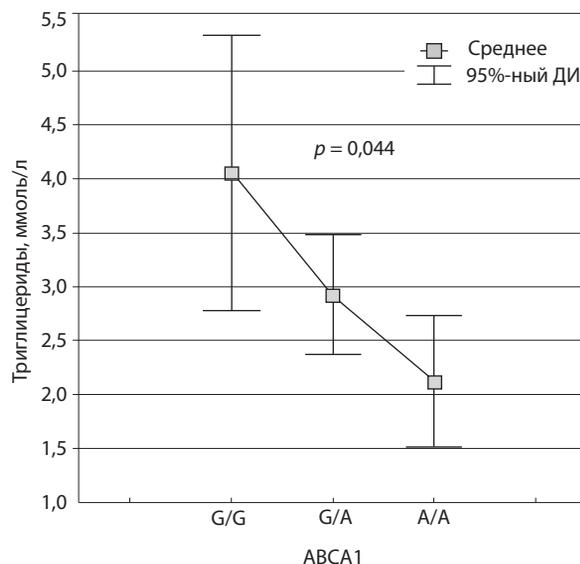
**Распределение частот аллелей и генотипов аллельного варианта rs2230806 гена ABCA1 среди здоровых лиц и больных с дислипидемией (ДЛ)**

Группа	Частоты генотипов				Аллельные частоты	
	G/G	G/A	A/A	G/A+A/A	G	A
Здоровые лица (n = 95)	46%	46%	8%	54%	0,7	0,3
Пациенты с ДЛ (n = 363)	50%	39%	11%	50%	0,7	0,3

Однако при анализе различных моделей наследования изучаемого SNP (single nucleotide polymorphism) обнаружена значимая ассоциация с уровнем ТГ сыворотки в аддитивной модели (additive inheritance model), тогда как в других моделях и с другими фенотипическими (липидными) признаками достоверной связи не обнаружено. Аддитивная модель наследования количественного признака предполагает, что ожидаемое значение признака у гетерозигот является средним ожидаемых значений признака гомозигот. В данной модели каждый минорный аллель дополнительно усиливает влияние на уровень ТГ плазмы на 1,02 ммоль/л (см. рисунок).

**Обсуждение.** Мы исследовали влияние варианта rs2230806 гена ABCA1 на липидный профиль у больных с дислипидемией. Частота минорного аллеля (А) данного полиморфизма довольно высока и, как показано в исследовании S. Clee и соавт. [7], в европейской популяции составляет 46%. Распространённость варианта rs2230806 в российской популяции, по-видимому, существенно не отличается от таковой в западных популяциях, так как оценки, полученные в работах Т.И. Родыгиной и соавт. (49,8% в контрольной группе и 49,6% – среди больных атеросклерозом) [8], Т.В. Мартынович и соавт. (46,7% среди больных с ИБС и хронической сердечной недостаточностью) [9], а также наши данные (54% в контрольной группе и 50% – среди пациентов с дислипидемией) довольно близки.

Данные проведённых метаанализов свидетельствуют, что полиморфизм rs2230806 ассоциируется со снижением риска ИБС [2, 3], что может быть обусловлено влиянием ABCA1 на уровни липидов плазмы, особенно ХС ЛВП. Тем не менее в ряде исследований протективный эффект rs2230806 в отношении ИБС не сопровождался достоверными изменениями содержания ЛВП плазмы [2, 7]. В нашем исследовании также не было обнаружено значимого влияния изучаемого полиморфизма на уровень ХС ЛВП. Необходимо отметить,



Эффект минорного аллеля варианта rs2230806 гена ABCA1 на уровень триглицеридов плазмы у больных с дислипидемией.

что этот эффект может быть незначительным и проявляться лишь при анализе достаточно большого массива данных. Так, в исследовании J. Mokuo и соавт. [10] при анализе данных 5133 лиц, включённых в исследование, средняя концентрация ХС ЛВП у носителей генотипа КК (минорного аллеля) оказалась выше, чем у носителей аллеля «дикого» типа, всего на 1,18 мг/дл, или 0,03 ммоль/л.

Наиболее значимым результатом нашего исследования является обнаружение связи rs2230806 гена ABCA1 с уровнем ТГ; в аддитивной модели наследования минорный аллель дополнительно усиливает влияние на уровень ТГ плазмы на 1,02 ммоль/л. Гипотриглицеридемический эффект данного аллельного варианта ранее был отмечен и в зарубежных исследованиях [7, 11]. Выявленное снижение уровней ТГ плазмы у носителей аллеля А в нашем исследовании объясняется, очевидно, спецификой включённых пациентов (дислипидемия с преобладанием гипертриглицеридемии); работ среди подобного контингента больных ранее не проводилось. Ассоциация полиморфизма rs2230806 как со снижением содержания ТГ плазмы, так и тяжестью и риском ИБС, выявленная в зарубежных исследованиях, свидетельствует о том, что этот аллельный вариант повышает функцию белка и обратный транспорт ХС [7]. Экспериментальные работы

Таблица 2

**Клинико-биохимические данные пациентов с дислипидемией в зависимости от генотипа ABCA1**

Признак	Все лица (n = 358)	Генотип ABCA1			P
		G/G (n = 180)	G/A (n = 138)	A/A (n = 40)	
Возраст, годы	48,7 ± 14,3	48,9 ± 13,7	47,6 ± 14,9	51,9 ± 12,1	нд*
Мужчины, %	42,8	43,9	47,1	32,5	нд
Лечение, %	35,5	37,6	30,9	30	нд
Общий ХС, ммоль/л	7,8 ± 3,4	7,89 ± 3,10	7,56 ± 3,80	7,97 ± 2,10	нд
Триглицериды, ммоль/л	3,4 ± 6,5	4,05 ± 8,60	2,9 ± 3,3	2,1 ± 1,9	нд
Холестерин ЛВП, ммоль/л	1,29 ± 0,40	1,29 ± 0,40	1,27 ± 0,40	1,38 ± 0,40	нд

Примечание. \* – различия статистически недостоверны.

на культуре клеток показывают, что увеличение оттока свободного ХС из гепатоцитов (обратного транспорта ХС) вследствие повышения экспрессии *ABCA1* уменьшает секрецию печенью липопротеинов очень низкой плотности, богатых ТГ, в кровотоки [12, 13].

В заключение отметим, что полученные данные показывают наличие эффекта распространённого варианта rs2230806 гена *ABCA1* на уровень ТГ плазмы у больных с дислипидемией, который, по-видимому, значительно выше при наличии гипертриглицеридемии, однако для подтверждения этого факта необходимы более крупные исследования у лиц с исходно повышенным уровнем ТГ.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 7, 10-13  
см. REFERENCES)

6. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ. *Лаборатория знаний*; 2009.
8. Родыгина Т.И., Дёмина Е.П., Шейдина А.М., Зверева В.В., Курьянов П.С., Вавилов В.Н. и др. Влияние вариантов генов *ABCA1* транспортера и параоксоназы 1 на риск развития и тяжесть течения атеросклероза. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2007; 6(4): 21-8.
9. Мартынович Т.В., Акимова Н.С., Федотов Э.А., Шварц Ю.Г. Полиморфизм генов, ассоциированных с повышенным сердечно-сосудистым риском, и когнитивные расстройства у пациентов с ишемической болезнью сердца, осложнённой хронической сердечной недостаточностью. *Сердце*. 2015;14(1):13-8.

## REFERENCES

1. Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S.M., Zhang L.H., Roomp K., van Dam M., et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 1999; 22(4): 336-45.
2. Ma X.Y., Liu J.P., Song Z.Y. Associations of the ATP-binding cassette transporter A1 R219K polymorphism with HDL-C level and coronary artery disease risk: A meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011; 215: 428-34.
3. Yin Y.W., Li J.C., Gao D., Chen Y.X., Li B.H., Wang J.Z., et al.

- Influence of ATP-binding cassette transporter 1 R219K and M883I polymorphisms on development of atherosclerosis: a meta-analysis of 58 studies. *PLoS*. 2014; 9(1):e86480.
4. Cenarro A., Artieda M., Castillo S., Mozas P., Reyes G., Tejedor D., et al. A common variant in the *ABCA1* gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J. Med. Genet.* 2003; 40(3):163-8.
  5. Yao M.H., Guo H., He J., Yan Y.Z., Ma R.L., Ding Y.S., et al. Interactions of six SNPs in *ABCA1* gene and obesity in low HDL-C disease in Kazakh of China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016;13(2):176.
  6. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. «Real time» PCR [PCR в реальном времени]. Москва: БИНОМ; 2009. (in Russian)
  7. Clee S.M., Zwinderman A.H., Engert J.C., Zwarts K.Y., Molhuizen H.O.F., Roomp K. et al. Common genetic variation in *ABCA1* is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103:1198-1205.
  8. Rodigina T.I., Demina E.P., Scheidina A.M., Zvereva V.V., Kur'yanov P.S., Vavilov V.N. et al. The role of *ABCA1* and *PON1* genetic variants in atherosclerosis development and severity. *Regionarnoe krovoobrachshenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2007; 6(4): 21-8. (in Russian)
  9. Martynovich T.V., Akimova N.S., Fedotov E.A., Shvarts Y.G. Polymorphism of genes, associated with increased cardiovascular risk, and cognitive disorders in patients with ischemic heart disease complicated with chronic heart failure. *Serdtshe*. 2015;14(1):13-8. (in Russian)
  10. Mokuno J., Hishida A., Morita E., Sasakabe T., Hattori Y., Suma S., et al. ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) R219K (G1051A, rs2230806) polymorphism and serum high-density lipoprotein cholesterol levels in a large Japanese population: cross-sectional data from the Daiko Study. *Endocr. J.* 2015; 62(6):543-9.
  11. Padsar A., Yadegarfar G., Cumming A., Whalley L., St Clair D., MacLeod M.J. The effect of *ABCA1* gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile. *BMC Med. Genet.* 2007;8:30.
  12. Sahoo D., Trischuk T.C., Chan T., Drover V.A., Ho S., Chimini G., et al. *ABCA1*-dependent lipid efflux to apolipoprotein A-I mediates HDL particle formation and decreases VLDL secretion from murine hepatocytes. *J. Lipid Res.* 2004;45:1122-31.
  13. Liu M., Chung S., Shelness G.S., Parks J.S. Hepatic *ABCA1* and VLDL triglyceride production. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):770-7.

Поступила 14.03.18  
Принята к печати 01.04.18

Третьякова Ю.И., Булатова И.А., Щёкотова А.П., Шелудько В.С.

## СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ АТАКИ У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия

*Цель - разработать математическую модель и оценить её прогностическую значимость для определения степени тяжести атаки (СТА) у больных язвенным колитом (ЯК) на основании малоинвазивных лабораторных воспалительных тестов и альбумина.*

*В исследовании приняли участие 64 пациента (33 мужчины и 31 женщина) с ЯК в стадии активного воспаления. Диагностику СТА осуществляли с помощью определения концентрации в крови фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), С-реактивного белка (СРБ), скорости оседания эритроцитов (СОЭ),  $\alpha_2$ -глобулина и альбумина. В качестве референсного метода оценки СТА у пациентов с ЯК применялись критерии Truelove и Witts (1955г.).*

*При построении математической модели в качестве зависимой переменной использовали СТА ЯК, в качестве независимых переменных или предикторов - пять лабораторных параметров: ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулины и альбумин, которые имели высокую взаимосвязь с СТА. При значении СТА в интервале 0–0,5 определяют отсутствие атаки или ремиссию заболевания, значение СТА в интервале 0,5–1,2 соответствует лёгкой СТА ЯК, значение СТА в интервале 1,2–2,2 соответствует умеренной тяжести атаки ЯК, при СТА более 2,2 следует говорить о тяжёлой атаке ЯК. Модель статистически достоверна: критерий Фишера  $F = 439,9$  при  $p < 0,0001$ , множественный  $R = 0,981$ ;  $R^2 = 0,961$ . Диагностическая чувствительность данной математической модели составила 98,4 %, специфичность – 96,7%.*

*Показатель тяжести атаки, рассчитанный по предлагаемой нами формуле, способен дифференцировать лёгкую, среднюю и тяжёлую СТА, в том числе выделять пациентов со стадией ремиссии с высокой степенью чувствительности и специфичности.*

**Ключевые слова:** язвенный колит; степень тяжести атаки.

**Для цитирования:** Третьякова Ю.И., Булатова И.А., Щёкотова А.П., Шелудько В.С. Способ диагностики степени тяжести атаки у пациентов с язвенным колитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 414-418  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-414-418>

*Tretyakova Yu. I., Bulatova I. A., Shchekotova A. P., Sheludko V.S.*

### METHOD OF DIAGNOSIS OF THE SEVERITY OF THE DISEASE ATTACK IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Perm State University of Medicine named after Academician E.A. Wagner of the Russian federation Ministry of Health, 614990, Perm, Russian federation

*To develop a mathematical model and evaluate its prognostic significance for determining the severity of attack (SA) in patients with ulcerative colitis (UC) on the basis of minimally invasive laboratory inflammatory tests and albumin.*

*The study involved 64 patients (33 men and 31 women) with UC in the stage of active inflammation. The method for diagnosing SA was performed by determining the concentration in the blood of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR),  $\alpha_2$ -globulin and albumin. Truelove and Witts criteria (1955) were used as a reference method for the evaluation of SA in patients with UC.*

*In constructing a mathematical model, the severity of the attack of the UC emerged as a dependent variable. As independent variables or predictors - five laboratory parameters: TNF- $\alpha$ , CRP, ESR,  $\alpha_2$ -globulins and albumin, which had a high relationship with SA. At SA value in the range from 0 to 0.5, absence of attack or remission of the disease is determined, SA value in the range from 0.5 to 1.2 corresponds to mild severity of UC attack, SA value in the range from 1.2 to 2.2 corresponds to the moderate severity of the attack of the UC, at SA more than 2.2 one should speak of a severe attack of the UC. The model is statistically significant: the Fisher test  $F = 439.9$ ;  $p < 0.0001$ , multiple  $R = 0.981$ ;  $R^2 = 0.961$ . The diagnostic sensitivity of this mathematical model was 98.4%, specificity - 96.7%.*

*The index of the severity of the attack, calculated by the formula proposed by us, is able to differentiate the mild, moderate and severe SA, including the isolation of patients with a stage of remission. In this case, the method is non-traumatic, has a low cost and high sensitivity and specificity.*

**Key words:** ulcerative colitis; the severity of the disease attack.

**For citation:** Tretyakova Yu.I., Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Sheludko V.S. Method of diagnosis of the severity of the disease attack in patients with ulcerative colitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (7): 414-418 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-414-418>

**For correspondence:** Tretyakova Yu.I., candidate of Medical Sciences, assistant professor of the department of outpatient therapy; e-mail: [tretyakovay@gmail.com](mailto:tretyakovay@gmail.com)

#### Information about authors:

Tretyakova Yu. I., <http://orcid.org/0000-0002-7411-6204>

Shchekotova A.P., <http://orcid.org/0000-0003-0298-2928>

Bulatova I.A., <http://orcid.org/0000-0002-7802-4796>

Sheludko V.S., <https://orcid.org/0000-0002-7080-9142>

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

**Acknowledgment.** *The study is being conducted within the framework of the state task and relates to a complex theme №115030310053.*

Received 24.03.2018

Accepted 31.03.2018

**Введение.** В настоящее время в структуре болезней пищеварительной системы язвенный колит (ЯК) продолжает занимать одно из первых мест [1]. Социальную значимость ЯК определяет преобладание заболевания среди лиц молодого трудоспособного возраста, а также ухудшение качества жизни из-за хронизации процесса, развития осложнений и ранней инвалидизации больных [2, 3]. В последние годы распространённость ЯК возросла не только в Европе, но и во всем мире [4]. Особенностью течения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности ЯК, в России является наличие тяжёлых осложнённых форм заболевания с высокой летальностью, что обусловлено поздней диагностикой патологического процесса [5].

Эндоскопическое исследование с биопсией и гистологическим исследованием слизистой оболочки толстой кишки – ректороманоскопия, колоноскопия – является основным методом верификации ЯК [6]. Тяжесть заболевания в целом определяется: тяжестью текущего обострения (атаки), наличием внекишечных проявлений и осложнений, рефрактерностью к лечению, в частности, развитием гормональной зависимости и резистентности. Тяжесть атаки заболевания необходимо определять для формулирования диагноза и определения тактики лечения. Для диагностики степени тяжести ЯК в повседневной клинической практике используются критерии Truelove-Witts, которые основаны на измерении количества дефекаций с кровью, оценке частоты пульса и температуры тела. Также оценивают уровень гемоглобина, СОЭ в общем анализе крови и наличие контактной ранимости слизистой оболочки толстой кишки по данным эндоскопического исследования. Исходя из совокупности названных показателей выделяют лёгкую, среднетяжёлую и тяжёлую атаки ЯК [7, 8].

В последние годы значительные усилия были направлены на развитие неинвазивных лабораторных тестов оценки воспалительного процесса при ЯК, которые обладают высокой специфичностью и могут использоваться как для диагностики, так и для динамического наблюдения за данной категорией больных [9, 10]. Для оценки активности воспаления при ЯК широко используют определение острофазовых показателей, в частности СОЭ, С-реактивного белка (СРБ), белковых фракций [11]. Разработаны новые лабораторные методы диагностики, включающие определение альфа-1-антитрипсина, интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), фекального кальпротектина. ФНО $\alpha$  – самый мощный провоспалительный цитокин, который участвует в патогенезе ЯК. Он продуцируется макрофагами в толстой кишке и может непосредственно повреждать её слизистый барьер, вызывая воспалительные изменения [12].

Существует ряд запатентованных лабораторных и инструментальных методик стратификации степени тяжести ЯК [13–15]. Э.И. Белобородова и соавт. предложили способ определения степени тяжести ЯК с помощью теста на всасывание Д-ксилозы с мочой (RU (11) 2276789 (13) С1; 2006). Изучение биохимического состава пузырчатой желчи и определение литогенных индексов позволило стратифи-

цировать тяжесть течения ЯК [8]. Проводились исследования по определению клинико-прогностического значения оксида азота (NO) у больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК) с помощью выявления его стабильных метаболитов в моче и плазме крови [16]. А. Wiercinska-Drapalo и соавт. проведён анализ уровня плазменного ИЛ-18 у больных ЯК с целью определения связи между его концентрацией в крови и активностью воспалительного процесса в кишечнике [17]. Известен способ диагностики степени тяжести атаки (СТА) у пациентов с ЯК путём определения индекса эндоскопической активности, а также васкулоэндотелиального фактора роста и количества десквамированных эндотелиоцитов в крови [18].

Стоит подчеркнуть, что некоторые из указанных выше методов диагностики сопряжены с инвазивными манипуляциями, что в ряде случаев ограничивает их применение. Следует также отметить достаточно высокую стоимость многих из существующих на сегодняшний день методик. Именно поэтому проведение дополнительных исследований в этой области позволит разработать новые и, возможно, более эффективные и общедоступные способы оценки СТА у пациентов с ЯК.

Цель исследования – разработать математическую модель и оценить её прогностическую значимость для определения СТА у больных ЯК на основании малоинвазивных лабораторных воспалительных тестов и альбумина.

**Материал и методы.** В исследовании приняли участие 64 пациента (33 мужчины и 31 женщина) с ЯК в стадии обострения и с впервые выявленными формами заболевания, средний возраст  $39,2 \pm 9,3$  года. Также обследовали 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Набор материала проводили на базе гастроэнтерологического и хирургического отделений ГБУЗ ПК КМСЧ №1, отделения колопроктологии ГКБ №2 (г. Пермь). Диагноз ЯК установлен на основании результатов клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования, включающих ирригографию, ректороманоскопию, колонофиброскопию, биопсию с последующей патоморфологической оценкой. Степень тяжести ЯК определяли на основании критериев Truelove и Witts [7].

Для диагностики СТА у всех пациентов были измерены концентрация в крови ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулина и альбумина.

Концентрацию ФНО $\alpha$  в сыворотке крови обследуемых измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) с регистрацией результатов на фотометре «Stat-Fax-2100» (Awareness Technology, США). Для определения СРБ в сыворотке крови применяли СРБ-латекс-тест с использованием метода реакции агглютинации латекса с применением набора реагентов (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Уровень СОЭ определя-

ли по методу Панченкова с использованием прибора ПР-3 (СОЭ-метр) и  $\alpha_2$ -глобулины сыворотки крови методом электрофореза белков на аппарате УЭФ-01 «Астра» ООО НПЦ «Астра», г. Уфа. Кроме этого, на автоматическом биохимическом анализаторе Architect с4000 (Abbott Laboratories, США) исследовали сывороточный уровень альбумина фотометрическим методом с использованием набора «Альбумин-Ново» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

В качестве референсного метода оценки СТА у пациентов с ЯК применялись критерии Truelove и Witts (1955 г.) [7].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием встроенного пакета анализа табличного процессора Excel® 2013 MSO (© Microsoft, 2013), авторского (© В.С. Шелудько, 2001–2014) пакета прикладных электронных таблиц (ППЭТ) «Stat2000», а также с помощью статистической программы MedCalc® 15.8 Portable (© MedCalc Software, 1993–2014) [19]. Приведённые коэффициенты корреляции –  $r$  рассчитывались по методу парной линейной корреляции Пирсона. Для вычисления уравнения, позволяющего рассчитать прогнозируемое значение СТА при ЯК по лабораторным показателям, использовался метод множественной регрессии. В качестве зависимой переменной использовалась СТА ЯК по критериям Truelove и Witts [7], в качестве независимых переменных или предикторов – те диагностические параметры, которые обнаружили высокую взаимосвязь с СТА. Оценка адекватности прогноза проводилась по четырехпольной таблице с расчётом показателей чувствительности и специфичности, воспроизводимости и соответствия. Прогноз считался удовлетворительным при чувствительности  $\geq 80\%$ , специфичности  $\geq 75\%$ , воспроизводимости  $\geq 50\%$  и соответствия  $\geq 75\%$  [20]. Статистическая значимость уравнения регрессии оценивалась по критерию Фишера, нулевая гипотеза отвергалась при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ . Для расчёта пороговых значений и диагностической эффективности показателей, имеющих предикторную ценность, проводился ROC-анализ и расчёт отношения шансов (OR). ROC-кривая отображает графически зависимость количества правильно верифицированных истинно положительных результатов от количества отрицательных и позволяет оценить эффективность тестов. Оценку графических моделей проводили по экспертной шкале значений площади под ROC-кривой (Area Under Curve) [20].

**Результаты.** В рамках данного исследования у пациентов с ЯК была установлена сильная корреляционная связь СТА ЯК по критериям Truelove и Witts с пятью лабораторными параметрами крови: ФНО $\alpha$  ( $r = 0,77$ ), СРБ ( $r = 0,93$ ), СОЭ ( $r = 0,94$ ),  $\alpha_2$ -глобулинами ( $r = 0,97$ ) и альбумином ( $r = -0,89$ ), которые были включены в математическую модель диагностики СТА ЯК.

Построение модели расчёта СТА ЯК было выполнено по данным группы из 64 пациентов с ЯК в активную фазу заболевания, из которых у 22 (%) выявлена атака лёгкой степени (СТА 1), у 22 (%) человек – атака средней тяжести (СТА 2) и у 20 (%) пациентов – тяжёлая атака заболевания (СТА 3). Также были обследованы 30 практически здоровых лиц (СТА 0).

Уравнение множественной регрессии выглядит следующим образом:

$$\text{СТА} = -0,815 \cdot X + Y + Z + K + L + M$$

где СТА – степень тяжести атаки язвенного колита (0, 1, 2, 3), -0,815 – константа; X, Y, Z, K, L – коэффициенты показателей, вычисленные методом множествен-

Таблица 1

Диагностические характеристики математической модели оценки степени тяжести атаки у пациентов с ЯК

Диагностические характеристики	Значение, %
Чувствительность	98,4
Специфичность	96,7
Показатель воспроизводимости	96,9
Показатель соответствия	97,9

ной регрессии; ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа сыворотки крови (в пг/мл); СРБ – С-реактивный белок в сыворотке крови (в мг/л), СОЭ – скорость оседания эритроцитов (в мм/ч),  $\alpha_2$ -ГЛ –  $\alpha_2$ -глобулины сыворотки крови (в %), АЛ – альбумин сыворотки крови (в г/л) [21].

При значении СТА в интервале 0–0,5 определяют отсутствие атаки или ремиссию заболевания, значение СТА в интервале 0,5–1,2 соответствует лёгкой степени тяжести атаки ЯК, значение СТА в интервале 1,2–2,2 соответствует умеренной тяжести атаки ЯК, при СТА более 2,2 следует говорить о тяжёлой атаке ЯК.

Модель статистически достоверна: критерий Фишера  $F = 439,9$  при  $p < 0,0001$ , множественный  $R = 0,981$ ;  $R^2 = 0,961$ .

Диагностические характеристики математической модели оценки СТА при ЯК представлены в табл. 1.

Для возможности индивидуального использования значимых предикторов прогрессирования воспалительного процесса в толстой кишке при ЯК нами были построены графики ROC-кривых для параметров ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулинов, альбумина (см. рисунок на 3-й полосе обложки).

Площадь ROC-кривой ФНО $\alpha$  для 0,01 (доверительный интервал 0,88–0,98),  $p < 0,0001$  (см. рисунок). Индекс Юдена для данного показателя составил 0,90. Точка разделения критерия ФНО $\alpha$  для стадии ремиссии (СТА 0) от лёгкой атаки (СТА 1) составила 0 пг/мл (чувствительность 90,6%, специфичность 100%). Площадь ROC-кривой СРБ для стратификации ремиссии и лёгкой атаки ЯК составила AUC 0,99  $\pm$  0,00 (доверительный интервал 0,95–1,00),  $p < 0,0001$ . Индекс Юдена для данного показателя составил 0,95. Точка разделения критерия СРБ для СТА 0 от СТА 1 – 5 мг/л (чувствительность 98,4%, специфичность 96,7%). Площадь ROC-кривой СОЭ для стратификации ремиссии и лёгкой атаки ЯК составила AUC 0,97  $\pm$  0,01 (доверительный интервал 0,9–0,99),  $p < 0,0001$ . Индекс Юдена для данного показателя составил 0,93. Точка разделения критерия СОЭ для СТА 0 от СТА 1 составила 9 мм/ч (чувствительность 96,9%, специфичность 96,7%). Площадь ROC-кривой  $\alpha_2$ -глобулинов для стратификации ремиссии и лёгкой атаки ЯК составила AUC 0,98  $\pm$  0,01 (доверительный интервал 0,93–0,99),  $p < 0,0001$ . Индекс Юдена для данного показателя составил 0,95. Точка разделения критерия  $\alpha_2$ -глобулинов для СТА 0 от СТА 1 составила 9% (чувствительность 98,4%, специфичность 96,7%). Площадь ROC-кривой альбумина для стратификации ремиссии и лёгкой атаки ЯК составила AUC 0,95  $\pm$  0,02 (доверительный интервал 0,89–0,98),  $p < 0,0001$ . Индекс Юдена для данного показателя составил 0,91. Точка разделения критерия альбумина для СТА 0 от СТА 1 составила 36,4 г/л (чувствительность 95,3%, специфичность 96,7%) (см. рисунок, на 3-й полосе обложки).

Таким образом, переход от стадии ремиссии (СТА 0) к стадии активного воспаления (СТА1–3) у ряда па-

Таблица 2

Точки разделения ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулинов и альбумина для степеней тяжести атаки при ЯК

Предикторы тяжести атаки	Степень тяжести атаки у больных ЯК			
	ремиссия (0)	лёгкая (1)	среднетяжёлая (2)	тяжёлая (3)
ФНО $\alpha$ , пг/мл	0	> 0	>1	> 6
СРБ, мг/л	5	> 5	>10	> 26
СОЭ, мм/ч	9	> 9	>18	> 36
$\alpha_2$ -Глобулины, %	9	> 9	>12,7	> 17
Альбумин, г/л	36,4	$\leq$ 36,4	$\leq$ 31	$\leq$ 24,9

циентов, при отсутствии других критериев активности, может свидетельствовать о наступающем рецидиве или отсутствии полной ремиссии. Для активного воспаления характерно повышение концентрации ФНО $\alpha$  более 0 пг/мл, уровня СРБ – более 5 мг/л, СОЭ – более 9 мм/ч,  $\alpha_2$ -глобулинов – более 9 %, снижение альбумина – менее 36,4 г/л. Точки разделения ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулинов и альбумина для верификации степени тяжести атаки при ЯК представлены в табл. 2.

Стадия ремиссии (СТА 0), т. е. отсутствие активного воспаления у пациентов с ЯК, диагностируется при количестве ФНО $\alpha$  в крови, равном 0 пг/мл, уровне СРБ в сыворотке менее или равном 5 мг/л, значении СОЭ менее или равном 9 мм/ч, концентрации  $\alpha_2$ -глобулинов менее или равном 9% и количестве альбумина более 36,4 г/л.

Лёгкая СТА ЯК устанавливается при концентрации ФНО $\alpha$  в крови более 0 и менее или равной 1 пг/мл, уровне СРБ в сыворотке более 5 мг/л и менее или равном 10 мг/л, значении СОЭ более 9 мм/ч и менее или равном 18 мм/ч, концентрации  $\alpha_2$ -глобулинов более 9% и менее или равном 12,7% и количестве альбумина менее или равном 36,4 г/л и более 31 г/л.

Среднетяжёлая атака ЯК верифицируется при концентрации ФНО $\alpha$  в крови более 1 и менее или равной 6 пг/мл, уровне СРБ в сыворотке более 10 и менее или равном 26 мг/л, значении СОЭ более 18 и менее или равном 36 мм/ч, концентрации  $\alpha_2$ -глобулинов более 12,7% и менее или равной 17% и количестве альбумина менее или равном 31 г/л и более 24,9 г/л.

Атаку ЯК высокой степени тяжести можно констатировать при концентрации ФНО $\alpha$  в крови более 6 пг/мл, уровне СРБ в сыворотке более 26 мг/л, значении СОЭ более 36 мм/ч, концентрации  $\alpha_2$ -глобулинов более 17% и количестве альбумина менее или равном 24,9 г/л (см. табл. 2).

**Обсуждение.** Предложенное нами уравнение множественной регрессии для определения степени тяжести атаки ЯК включает следующие лабораторные показатели: ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулины и альбумин. Данные тесты в комплексе не предлагались ранее для стратификации тяжести атаки ЯК. Такие маркеры, как ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ и  $\alpha_2$ -глобулины являются традиционными маркерами воспаления и прямо отражают активность процесса. Альбумин выступает в роли обратного критерия воспаления; его концентрация снижается по мере нарастания воспалительных изменений в толстой кишке из-за нарушений процессов переваривания и всасывания. Определение тяжести атаки ЯК является обязательным и необходимо для формулирования диагноза и выбора терапевтической тактики [10, 11].

В качестве референсного метода оценки СТА у пациентов с ЯК применялись критерии Truelove и Witts [7]. Недостатком данного способа оценки тяжести является

то, что все показатели не являются специфичными для ЯК и могут быть обусловлены другой сопутствующей патологией. К недостатку следует отнести и невозможность в некоторых случаях проведения повторных эндоскопических исследований с необходимой частотой в динамике на фоне лечения для определения степени тяжести заболевания по вышеуказанным критериям [8].

Известны различные способы диагностики СТА у пациентов с ЯК [8,16–18]. Так, В.А. Бурковская и соавт. (2012, RU 2339956) описали способ определения степени тяжести ЯК по уровню панкреатической эластазы-1 в кале [13]. В отдельных работах для оценки тяжести ЯК анализировали экспрессию опухолевых маркёров: раково-эмбрионального антигена (РЭА), кишечного антигена (P1-МА), тробластического р1-глобулина, эмбрионального преальбумина-1 [14]. В.В. Павленко (2002) изучал особенности синтеза *in vitro* в слизистой оболочке толстой кишки больных ЯК простагландинов 6-кето F1a, F2a, E2 и тромбксана B2. Тяжёлое течение НЯК характеризовалось высоким накоплением всех изучаемых простаноидов в биоптатах [15].

Однако некоторые из указанных выше методик сопряжены с инвазивными манипуляциями, что в ряде случаев ограничивает их применение. Большинство известных способов диагностики тяжести атаки ЯК позволяют диагностировать только тяжёлые формы заболевания и не всегда обладают достаточной информативностью для диагностики лёгкого течения и стадии ремиссии.

Показатель тяжести атаки, рассчитанный по предлагаемой нами формуле способен дифференцировать фазу активного воспаления у больных ЯК, обладает высокой информативностью для диагностики лёгкой, средней и тяжёлой СТА, в том числе выделении пациентов со стадией ремиссии. Показатели, которые входят в СТА, обладают достаточной статистической значимостью и демонстрируют высокую корреляционную связь со степенью тяжести ЯК по стандартным критериям. При этом способ нетравматичен, доступен для широкого круга пациентов, быстр в применении и может использоваться в условиях, когда имеются трудности в выполнении эндоскопического исследования. Кроме того, способ можно использовать как для диагностики, так и для динамического наблюдения за пациентами, в том числе для оценки эффективности терапии. Данная диагностическая панель, созданная на основе отечественных тестов, имеет низкую себестоимость и высокую чувствительность и специфичность.

Кроме того, индивидуальное использование значимых предикторов активности воспалительного процесса в толстой кишке при ЯК с учётом точек разделения, позволяет диагностировать наличие активного воспаления в слизистой толстой кишки, что может прогнозировать рецидив болезни и своевременно проводить терапевтические мероприятия для предупреждения прогрессирования заболевания.

**Заключение.** Предложенное уравнение множественной регрессии позволяет определять СТА ЯК по пяти параметрам: ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулины и альбумин. Показатель СТА демонстрируют высокую корреляционную связь со степенью тяжести ЯК по стандартным критериям (Truelove-Witts). Диагностическая чувствительность данной математической модели составила 98,4%, специфичность – 96,7%.

Использование индивидуальных уровней ФНО $\alpha$ , СРБ, СОЭ,  $\alpha_2$ -глобулинов и альбумина также позволяет с высокой точностью диагностировать наличие активиро-

го воспаления в слизистой толстой кишки у пациентов с ЯК, дифференцировать степени тяжести атаки ЯК и стадию ремиссии.

**Финансирование.** Исследование проводилось в рамках государственного задания и относится к комплексной теме №115030310053.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140 (6): 1785–94.
2. Белоусова Е.А., Никитина Н.В., Цодикова О.М. Лечение язвенного колита легкого и среднетяжелого течения. *Фарматека*. 2013; 2: 42–6.
3. Marchal J., Hilsden R. Environment and epidemiology of inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory bowel disease*. Satsangi J., Sutherland L., eds. Churchill-Livingstone; 2003: 17–28.
4. Kostić M., Djaković L., Šujić R., Godman B., Janković S. Inflammatory Bowel Diseases (Crohn's Disease and Ulcerative Colitis): Cost of Treatment in Serbia and the Implications. *Appl. Health Econ. Health Policy*. 2017; 15 (1): 85–93.
5. Ткачев А.В., Девликамова Т.А., Розенберг Т.Г. Оценка распространенности воспалительных заболеваний кишечника в Ростовской области. В сб.: Симпозиум: Гастроэнтерология Юга России, г. Ростов-на-Дону; 2009: 103–4.
6. Андреев А.И., Тертычный А.С., Карэл Г. Современные подходы к морфологической диагностике воспалительных заболеваний кишечника на материале эндоскопических биопсий. *Архив патологии*. 2011; 1: 40–7.
7. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита. *Колопроктология*. 2017; 59 (1): 6–30.
8. Белобородова Э.И., Бурковская В.А., Маркидонова А.А., Наумова Е.Л., Колосовская Т.А. Диагностика тяжести и течения язвенного колита. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 3: 136–8.
9. Матюхин А.А., Никитин А.В. Неинвазивная оценка активности заболевания у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. *Вестник новых медицинских технологий*. Электронное издание. 2013; 1: 73.
10. Маркова А. А., Кашкина Е.И. Современные методы диагностики и оценки тяжести течения язвенного колита. *Вестник ТГУ*. 2012; 17 (3): 916–9.
11. Степанов Ю.М., Фёдорова Н.С. Содержание фекального кальпротектина у больных хроническими воспалительными заболеваниями кишечника. *Сучасна гастроентерологія*. 2010; 52 (2): 44–8.
12. Wang Y., Mao J. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13 (44): 5926–32.
13. Белобородова Э.И., Бурковская В.А., Белобородова Е.В., Глинская О.Н., Маркидонова А.А., Наумова Е.Л. и др. Внешнесекреторная недостаточность поджелудочной железы при язвенном колите. *Сибирский медицинский журнал*. 2010; 4: 22–4.
14. Пугачев К.К., Белоусова Е.А., Никитина Н.В., Шимбирева И.Б. Возможности использования опухолевых маркеров для уточнения тяжести течения язвенного колита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1997; 10: 40–1.
15. Павленко В.В. Клинико-патогенетическое значение простаноидов при язвенном колите. *Российский журнал ГГК*. 2002; 5: 45–49.
16. Лазебник Л.Б., Барышников Е.Н., Дроздов В.Н. и др. Оксид азота как маркер воспаления при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2006; 3: 4–8.
17. Wiercinska-Drapalo A., Flisiak R., Jaroszewicz J., Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol*. 2005; 11(4): 605–8.
18. Стёпина Е.А., Хлынова О.В., Туев А.В. Диагностическая и прогностическая значимость маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов с язвенным колитом. *Казанский медицинский журнал*. 2016; 97 (2): 187–91.
19. Шелудько В.С., Подлужная М.Я. Теоретические основы медицинской статистики: методические рекомендации. Пермь; 2001.
20. Власов В.В. Эффективность диагностических исследований. М.: Медицина; 1988.
21. Третьякова Ю.И., Щёкотова А.П., Булатова И.А., Шелудько В.С.

Способ диагностики степени тяжести атаки у пациентов с язвенным колитом. Решение о выдаче патента от 24.01.2018 г. по заявке № 2017109528/15; 2018.

#### REFERENCES

1. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140 (6): 1785–94.
2. Belousova E.A., Nikitina N.V., Tsodikova O.M. Treatment of ulcerative colitis of mild and moderate course. *Farmateka*. 2013; 2: 42–6. (in Russian)
3. Marchal J., Hilsden R. Environment and epidemiology of inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory bowel disease*. Ed. Satsangi J., Sutherland L. Churchill-Livingstone; 2003: 17–28.
4. Kostić M., Djaković L., Šujić R., Godman B., Janković S. Inflammatory Bowel Diseases (Crohn's Disease and Ulcerative Colitis): Cost of Treatment in Serbia and the Implications. *Appl. Health Econ. Health Policy*. 2017; 15 (1): 85–93.
5. Tkachev A.V., Devlikamova T.A., Rozenberg T.G. Estimation of the prevalence of inflammatory bowel diseases in the Rostov Region. In: *Symposium: Gastroenterology of the South of Russia*. [V sb.: Simpozium: Gastroenterologiya Yuga Rossii]. Rostov-on-Don; 2009: 103–4. (in Russian)
6. Andreev A.I., Tertychnyy A.S., Karel G. Modern approaches to the morphological diagnosis of inflammatory bowel disease on the material of endoscopic biopsies. *Arkhiv patologii*. 2011; 1: 40–7. (in Russian)
7. Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Khalif I.L. et al. Clinical recommendations of the Russian gastroenterological association and association of coloproctologists of Russia on the diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Koloproktologiya*. 2017; 59 (1): 6–30. (in Russian)
8. Beloborodova E.I., Burkovskaya V.A., Markidonova A.A., Naumova E.L., Kolosovskaya T.A. Diagnosis of severity and course of ulcerative colitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 3: 136–8. (in Russian)
9. Matyukhin A.A., Nikitin A.V. Noninvasive assessment of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. [Elektronnoe izdanie]. Electronic edition. 2013; 1: 73. (in Russian)
10. Markova A. A., Kashkina E.I. Modern methods of diagnosis and evaluation of the severity of ulcerative colitis. *Vestnik TGU*. 2012; 17 (3): 916–9. (in Russian)
11. Stepanov Yu.M., Fedorova N.S. The content of fecal calprotectin in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Suchasna gastroenterologiya*. 2010; 52 (2): 44–8.
12. Wang Y., Mao J. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13 (44): 5926–32.
13. Beloborodova E.I., Burkovskaya V.A., Beloborodova E.V., Glinkskaya O.N., Markidonova A.A., Naumova E.L. i dr. External pancreatic insufficiency of the pancreas with ulcerative colitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 4: 22–4. (in Russian)
14. Pugachev K.K., Belousova E.A., Nikitina N.V., Shimbireva I.B. Possibilities of using tumor markers to clarify the severity of ulcerative colitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1997; 10: 40–1. (in Russian)
15. Pavlenko V.V. Clinico-pathogenetic significance of prostanoids in ulcerative colitis. *Rossiyskiy zhurnal GKG*. 2002; 5: 45–49. (in Russian)
16. Lazebnik L.B., Baryshnikov E.N., Drozdov V.N. i dr. Nitric oxide as an inflammatory marker for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ekspierimetal'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2006; 3: 4–8. (in Russian)
17. Wiercinska-Drapalo A., Flisiak R., Jaroszewicz J., Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol*. 2005; 11(4): 605–8.
18. Stepina E.A., Khlynova O.V., Tuev A.V. Diagnostic and prognostic significance of markers of endothelial dysfunction in patients with ulcerative colitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 97 (2): 187–91. (in Russian)
19. Shelud'ko V.S., Podluzhnaya M.Ya. Theoretical bases of medical statistics: method. recommendations. [Teoreticheskie osnovy meditsinskoy statistiki: metod. rekomendatsii]. Perm'; 2001. (in Russian)
20. Власов В.В. *The effectiveness of diagnostic studies*. [Effektivnost' diagnosticheskikh issledovaniy]. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
21. Tretyakova Yu.I., Shchekotova A.P., Bulatova I.A., Shelud'ko V.S. A method for diagnosing the severity of an attack in patients with ulcerative colitis. Decision on the grant of a patent from January 24, 2018 on the application № 2017109528/15; 2018. (in Russian)

Поступила 24.03.18

Принята в печати 31.03.18

© БЕЛЬСКАЯ Л.В., САРФ Е.А., 2018

УДК 618.19-006.04-07:616.316-008.834.262.23-074

Бельская Л. В.<sup>1,2</sup>, Сарф Е.А.<sup>2</sup>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СЛЮНЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

<sup>1</sup> Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск;

<sup>2</sup> ООО «ХимСервис», 143026, Москва

*Разработана методика количественного определения низкомолекулярных органических кислот в слюне методом капиллярного электрофореза. Методика апробирована на добровольцах, разделённых на 3 группы: основная (рак молочной железы, n = 21), группа сравнения (фиброаденомы, n = 29) и контрольная (условно здоровые, n = 26). Показано, что концентрация молочной, уксусной и пропионовой кислот равномерно повышается в группе сравнения и в основной группе по сравнению с таковой в контрольной группе. На фоне рака молочной железы концентрация щавелевой и муравьиной кислот снижается по сравнению с таковой в контроле, тогда как при фиброаденомах концентрация щавелевой кислоты снижается, а муравьиной повышается. В целом предложенный метод может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями.*

**Ключевые слова:** слюна; капиллярный электрофорез; органические кислоты; рак молочной железы.

**Для цитирования:** Бельская Л.В., Сарф Е.А. Определение содержания органических кислот в слюне больных раком молочной железы методом капиллярного электрофореза. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 419-422. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-419-422>

Bel'skaya L.V.<sup>1,2</sup>, Sarf E.A.<sup>2</sup>

### DETERMINATION OF THE CONTENT OF ORGANIC ACIDS IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH BREAST CANCER BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

<sup>1</sup> Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation;

<sup>2</sup> LLC "ChemService", Moscow, 143026, Russian Federation

*A technique for quantitative determination of low molecular weight organic acids in saliva by the method of capillary electrophoresis has been developed. The method was tested on volunteers, divided into 3 groups: the main one (breast cancer, n=21), the comparison group (fibroadenomas, n=29) and the control group (conditionally healthy, n=26). It is shown that the concentration of lactic, acetic and propionic acids increases uniformly when passing from the control group to the comparison group, and then to the main group. Against the background of breast cancer, the concentration of oxalic and formic acids decreases in comparison with the control, whereas in fibroadenomas the concentration of oxalic acid decreases, and the formic acid grows. In general, the proposed method can be a valuable tool in the study of metabolic changes associated with cancer.*

**Key words:** saliva; capillary electrophoresis; organic acids; breast cancer.

**For citation:** Bel'skaya L.V., Sarf E.A. Determination of the content of organic acids in the saliva of patients with breast cancer by capillary electrophoresis. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 419-422 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-419-422>

**For correspondence:** Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

#### Information about authors:

Bel'skaya L.V., <http://orcid.org/0000-0002-6147-4854>

Sarf E.A., <http://orcid.org/0000-0003-4918-6937>

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

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

Received 09.01. 2018

Accepted 14.03.2018

На сегодняшний день капиллярный электрофорез является перспективным методом анализа, он динамично развивается и всё чаще применяется в различных областях аналитической химии [1–3]. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он даёт при выполнении измерений, позволяют использовать его в повседневной лабораторной практике.

В качестве перспективной биологической жидкости, отражающей общее состояние организма, в последнее

время используют слюну [4–8]. Преимущества слюны по сравнению с венозной или капиллярной кровью обуславливаются неинвазивностью сбора и отсутствием риска инфицирования при получении биоматериала [9–11]. При этом слюна адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека [12–14]. Ряд исследований посвящён применению слюны для диагностики онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы [15–21]. Однако, несмотря на важную роль органических кислот в метаболизме раковых клеток, определение органических кислот при раке молочной железы не проводилось [22]. Тем не менее возможность их определения в слюне показана в ряде

**Для корреспонденции:** Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук; e-mail: ludab2005@mail.ru

Таблица 1

Уравнения градуировочных графиков для определяемых компонентов

Компонент	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции ( $R^2$ )
Хлориды	$y=0,4985x$	1,0000
Щавелевая кислота	$y=0,8283x$	0,9980
Муравьиная кислота	$y=0,5914x$	0,9973
Яблочная кислота	$y=1,0229x$	0,9977
Лимонная кислота	$y=1,2009x$	0,9971
Янтарная кислота	$y=0,9089x$	0,9965
Молочная кислота	$y=0,5330x$	0,9974
Фосфаты	$y=0,2934x$	0,9992
Уксусная кислота	$y=1,3578x$	0,9953
Пропионовая кислота	$y=0,5494x$	0,9967

Примечание.  $y$  – площадь пика,  $x$  – концентрация компонента, мг/л.

работ [23, 24], но применение для этих целей капиллярного электрофореза в литературе также не обсуждается.

Цель данного исследования – разработка методики количественного определения органических кислот в слюне методом капиллярного электрофореза для оценки потенциальной возможности их применения в диагностике рака молочной железы.

**Материал и методы.** В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 3 группы: основную (рак молочной железы,  $n = 21$ ), группу сравнения (фиброаденомы,  $n = 29$ ) и контрольную (условно здоровые,  $n = 26$ ). Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–60 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 1 мл. Образцы слюны собирали утром натощак путём сплевывания в стерильные пробирки, центрифугировали при 7000 об/мин. Эксперимент проводили с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М («Люмэкс», Санкт-Петербург). Метод измерений основан на фильтрации, разбавлении отобранной пробы, дальнейшем разделении и количественном определении компонентов с косвенным детектированием при длине волны 254 нм [25]. Объём аликвоты исследуемого образца 100 мкл, предварительно проведено осаждение белков слюны 10% раствором трихлоруксусной кислоты, разбавление в 20 раз бидистиллированной водой. Ведущий электролит – 10 мМ бензойная кислота, 9 мМ диэтаноламин,

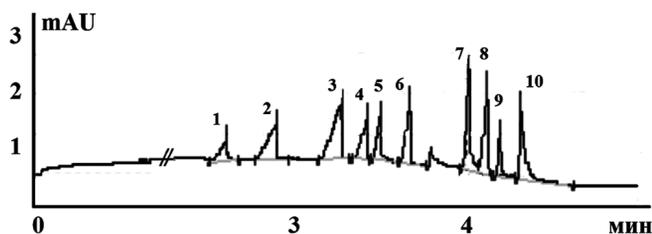


Рис.1. Электрофореграмма градуировочной смеси.

1 – хлориды 12,0 мг/л; 2 – щавелевая кислота 24,4 мг/л; 3 – муравьиная кислота 31,6 мг/л; 4 – яблочная кислота 24,6 мг/л; 5 – лимонная кислота 23,7 мг/л; 6 – янтарная кислота 25,0 мг/л; 7 – молочная кислота 24,9 мг/л; 8 – фосфаты 11,5 мг/л; 9 – уксусная кислота 24,0 мг/л; 10 – пропионовая кислота 23,7 мг/л.

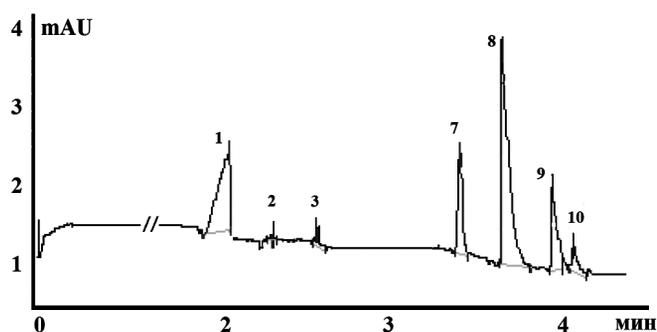


Рис.2. Электрофореграмма образца слюны.

0,5 мМ цетилтриметиламмония бромид, 0,1 мМЭДТА («Флука», Швейцария). Для проведения исследований использован кварцевый капилляр  $L_{эф}/L_{общ} = 50/60$  см, внутренний диаметр 75 мкм. Ввод пробы в капилляр пневматический (30 мбар, 10 с), постоянное напряжение 20 кВ, температура 20°C, время анализа 4–5 мин.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах – U-критерия Манна–Уитни. Для описания выборки проводили подсчёт медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Количественное опреде-

Таблица 2

Концентрация (в ммоль/л) определяемых параметров в слюне

Параметр	Контрольная группа	Группа сравнения	Основная группа
Хлориды	8,49 [6,94; 9,54]	10,74 [9,28; 14,11]	12,21 [8,55; 14,85]
Щавелевая кислота	0,477 [0,275; 0,552]	0,383 [0,315; 0,552]	0,398 [0,270; 0,821]
Муравьиная кислота	0,561 [0,248; 0,772]	0,613 [0,441; 1,146]	0,383 [0,303; 0,626]
Молочная кислота	0,95 [0,81; 1,05]	2,03 [1,19; 3,12]	3,16 [2,00; 3,85]
$p$	-	0,0225	0,0089
Фосфаты	1,31 [1,11; 1,50]	2,41 [0,92; 3,12]	4,06 [1,17; 8,10]
$p$	-	0,0310	0,0253
Уксусная кислота	10,20 [8,89; 13,51]	14,16 [10,11; 19,70]	16,05 [14,61; 18,82]
Пропионовая кислота	0,89 [0,64; 1,14]	1,80 [1,07; 2,19]	2,30 [1,54; 2,97]

Примечание.  $p$  – статистически значимые различия показателей по сравнению с таковыми в контрольной группе.

ление органических кислот проводили по предварительно построенному градуировочному графику, используя линейную зависимость между концентрацией аналитов и площадью хроматографического пика (рис. 1).

Поскольку в слюне в достаточно высоких концентрациях присутствуют хлорид- и фосфат-ионы, которые в условиях определения также фиксируются на электрофореграммах [26], данные компоненты были введены в градуировочные смеси. Уравнения градуировочных графиков для каждого компонента найдены методом линейного регрессионного анализа (табл. 1). Правильность и воспроизводимость результатов определения органических кислот подтверждены методом «введено-найден».

Типичная электрофореграмма слюны приведена на рис. 2. Показано, что в составе слюны не определяются яблочная, лимонная и янтарная кислоты.

Результаты определения остальных компонентов в изучаемых группах пациентов показаны в табл. 2. Видно, что концентрация хлорид- и фосфат-ионов, молочной, уксусной и пропионовой кислот равномерно повышается в группе сравнения и в основной группе по сравнению таковой в контрольной группе. При этом увеличение концентрации фосфат-ионов и молочной кислоты статистически достоверно. На фоне рака молочной железы концентрация щавелевой и муравьиной кислот снижается по сравнению с контролем, тогда как при фиброаденомах концентрация щавелевой кислоты снижается, а муравьиной повышается.

Известно, что накопление органических кислот может являться результатом более высокого метаболизма раковых клеток [27, 28]. Ранее показано, что концентрации в сыворотке крови свободных жирных кислот у больных раком молочной железы были значительно снижены по сравнению с показателями в контрольной группе [29]. Панель C16:1, C18:3, C18:2, C20:4 и C22:6 показала отличную диагностическую способность дифференцировать пациентов с ранней стадией рака молочной железы с чувствительностью 83,3% и специфичностью 87,1%. По сравнению с другими классами метаболитов определение органических кислот с низкой молекулярной массой при онкологических заболеваниях является недостаточно изученным, и до сих пор не было адекватной аналитической процедуры для определения уровня органических кислот, потенциально связанных с развитием рака, как в сыворотке крови, так и в других биологических жидкостях. Циркулирующие в крови органические кислоты с низкой молекулярной массой обеспечивают кумулятивную картину метаболизма [30]. Так, установлено, что среди низкомолекулярных органических кислот пироглутаминовая кислота имеет лучший дискриминационный потенциал для немелкоклеточного рака лёгкого и позволяет точно идентифицировать пациентов и контрольных субъектов независимо от стадии рака [30].

Дальнейшие измерения содержания органических кислот в биологических жидкостях, в частности в слюне, могут позволить лучше понять основные механизмы канцерогенеза и разработать новые способы диагностики онкологических заболеваний. Предложенный метод может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 6-24, 27-30  
см. REFERENCES)

4. Носков В.Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7.
5. Каминская Л.А. Перспективы изучения биохимических показателей ротовой жидкости в лабораторной диагностике. *Российская стоматология*. 2010; 3: 36–42.
25. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда»; 2006.
26. Бельская Л.В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека. *Бюллетень науки и практики. Электронный журнал*. 2017; 2(15): 132–40.

REFERENCES

1. Vitali L., Fàvere V.T., Micke G.A. A new method to determine biological sample volume by short and multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 2327–33.
2. Mori M., Ishikawara F., Tomoda T., Yamada S., Okamoto M., Itabashi H., Seki Y., Matsumoto R., Shoho Y., Martha L., Sumino H., Murakami M. Use of capillary electrophoresis with dual-opposite end injection for simultaneous analysis of small ions in saliva samples from wrestlers undergoing a weight training program. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1012: 178–85.
3. Guo L., Wang Y., Zheng Y., Huang Z., Cheng Y., Ye J., Chu Q., Huang D. Study on the potential application of salivary inorganic anions in clinical diagnosis by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1014: 70–4.
4. Носков В.Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7. (in Russian)
5. Kaminskaya L.A. Prospects for studying the biochemical parameters of oral fluid in laboratory diagnostics. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2010; 3: 36–42. (in Russian)
6. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., DePalo E.F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 383: 30–40.
7. Martí-Álamo S., Mancheño-Franch A., Marzal-Gamarra C., Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent*. 2012; 4(4): 237–43.
8. Chojnowska S., Baran T., Wilińska I., Sienicka P., Cabaj-Wiater I., Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences*. 2018; 63: 185–91.
9. Malathi N., Mythili S., Vasanthi H.R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*. 2014; 2014: 158786.
10. Miller C.S., Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N., Floriano P.N. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med*. 2010; 4(1): 171–89.
11. Nunes L.A., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015; 25(2): 177–92.
12. Arunkumar S., Arunkumar J.S., Krishna N.B., Shakunthala G.K. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases - A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2014; 3(3): 372–87.
13. Liu J., Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*. 2012; 48: 569–77.
14. Shipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology*. 2007; 52: 1114–35.
15. Mockus M., Prebil L.A., Eremab R., Dollbaum C., Powell M., Yaud C., Benz C.C. First pregnancy characteristics, postmenopausal breast density, and salivary sex hormone levels

- in a population at high risk for breast cancer. *BBA Clinical*. 2015; 3:189–95.
16. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., Guerra E.N.S. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: a review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 110: 62–73.
17. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y., Wang X. Untargeted saliva metabolomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*. 2016; 158: 351–60.
18. Takayama T., Tsutsui H., Shimizu I., Toyama T., Yoshimoto N., Endo Y., Inoue K., Todoroki K., Min J.Z., Mizuno H., Toyooka T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 452: 18–26.
19. Cheng F., Wang Z., Huang Y., Duan Y., Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 447: 23–31.
20. Jinno H., Murata T., Sunamura M., Sugimoto M., Kitagawa Y. Breast cancer-specific signatures in saliva metabolites for early diagnosis. *The Breast*. 2015; 24S1: S26–S86.
21. Schapher M., Wendler O., Gröschl M. Salivary cytokines in cell proliferation and cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412: 1740–8.
22. Lubes G., Goodarzi M. GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 147: 312–22.
23. Park Y-D., Jang J-H., Oh Y-J., Kwon H-J. Analyses of organic acids, inorganic anions, and their relationship in human saliva before and after glucose intake. *Archives of oral biology*. 2014; 59: 1–11.
24. Chen Z., Feng S., Pow E.H.N., Lam O.L.T., Mai S., Wang H. Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 438: 231–5.
25. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems “Kapel” [Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza “Kapel”]. St.Peterburg: OOO «Veda»; 2006. (in Russian)
26. Bel'skaya L.V. The use of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Byulleten' nauki i praktiki. Elektronnyi zhurnal*. 2017; 2(15): 132–40. (in Russian)
27. Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., McKnight S.L., Tu B.P. Acetate Dependence of Tumors. *Cell*. 2014; 159: 1591–602.
28. Tekade R.K., Sun X. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discovery Today*. 2017; 22(11): 1637–53.
29. Zhang Y., Song L., Liu N., He C., Li Z. Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2014; 437: 31–7.
30. Klupczynska A., Plewa S., Dyszkiewicz W., Kasprzyk M., Sytek N., Kokot Z.J. Determination of low-molecular-weight organic acids in non-small cell lung cancer with a new liquid chromatography–tandem mass-spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; 129: 299–309.

Поступила 09.01.18

Принята к печати 14.03.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.276.2/4.015.4

Яковлев А.К.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Меркулов В.А.<sup>1</sup>, Бондарев В.П.<sup>1</sup>

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА

<sup>1</sup>ФГБУ НЦЭСМП «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, 127051, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и необходимость гармонизации отечественных требований с международными обуславливает актуальность стандартизации методики определения специфической активности. Исследования прецизионности проводили в шести экспериментах на мышах линии Balb/c. В ходе экспериментов варьировали факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал три уровня: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по восемь повторов стандартного и испытуемого образца. Правильность оценивали по смещению относительно опорного значения на пяти уровнях: 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом – по четыре повтора стандартного и испытуемого образца. Испытуемые образцы получали путём серии независимых разведений стандартного образца. Подсчёт ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре. В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого. На основании экспериментального исследования точности и оптимизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены две её валидационные характеристики (правильность и прецизионность). Доказана обоснованность использования логарифмов зарегистрированных величин эритропоэза при статистических расчётах специфической активности эритропоэтина и исследовании валидационных параметров методики. Теоретически и экспериментально обоснованная схема методики включает три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл по 8 животных на каждом и соответствует международным требованиям точности. По результатам экспериментальных исследований правильность характеризуется смещением не более 9% и не превышает диапазон рассчитанной активности (80–125%). Статистическая обработка результатов испытания методом параллельных линий, позволяет про- верить предположение об эквивалентности испытуемого образца стандартному препарату и рассчитать его активность. Доверительный интервал рассчитанной активности при величине внутрилабораторной прецизионности 5,6% составляет от 76 до 131%, что соответствует предложенному диапазону (64–156%, при P = 0,95).

Для корреспонденции: Яковлев Алексей Константинович, вед. микробиолог лаб. иммунологии ; e-mail: yak.Aleksey@gmail.com

**Ключевые слова:** эритропоэтин; методика определения специфической активности; прецизионность; правильность; доверительный интервал рассчитанной активности.

**Для цитирования:** Яковлев А.К., Аleshкин А.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (7): 422-428. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-422-428>

Yakovlev A.K.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Merkulov V.A.<sup>1</sup>, Bondarev V.P.<sup>1</sup>

#### IMPROVEMENT OF ERYTHROPOIETIN BIOASSAY

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, 125212, Moscow, Russia

*The relevance of bioassay standardization results from the lack of consistent national regulatory requirements for evaluation of recombinant human erythropoietin quality and the need to harmonize these requirements with international ones. Precision studies were carried out in 6 experiments on Balb/C mice. The factors that can influence the accuracy of the method were altered during the experiments. Each experiment included three levels: 20, 40 and 80 IU/ml, and 8 replicates for the reference and test samples. The trueness was estimated by bias relative to the reference value at 5 levels: 10, 20, 40, 80 and 160 IU/ml, and 4 replicates for the reference and test samples at each level. The test samples were prepared by a series of independent dilutions of the reference standard. Reticulocyte count was performed using a flow cytometer. 5 µmol acridine orange solution was used as a dye. Experimental study of accuracy and optimization of erythropoietin bioassay procedure helped to obtain two validation characteristics (trueness and precision). It was shown that logarithms of erythropoiesis registered values could reasonably be used in statistical calculations of erythropoietin specific activity and evaluation of the method's validation parameters. The theoretically and experimentally justified test procedure includes three levels of doses: 20, 40 and 80 IU/ml, and 8 animals for each level, which is consistent with the international requirements for accuracy. According to the results of experimental studies, the trueness is characterized by a bias of no more than 9 % and does not exceed the range of the calculated activity (80-125 %). Statistical processing of the test results by the parallel-line method makes it possible to check the assumption of equivalence of the test and reference samples and to calculate the test sample activity. The confidence limit of the calculated activity for intra-laboratory precision of 5.6 % is equal to 76-131 % which complies with the proposed range (64-156 %, P=0.95).*

**Key words:** erythropoietin, bioassay, precision, trueness, confidence limit of the calculated activity.

**For citation:** Yakovlev A.K., Aleshkin A.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Improvement of erythropoietin bioassay. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*, 2018; 63 (7): 422-428. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-422-428>

**For correspondence:** Yakovlev A. K., Leading microbiologist of the Laboratory of Immunology of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: yak.aleksey@gmail.com

#### Information about author:

Yakovlev A.K., <http://orcid.org/0000-0002-2809-1819>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 15.03.2018  
Accepted 13.04.2018

**Введение.** Методика определения специфической активности (СА) эритропоэтина служит неотъемлемой частью оценки качества при производстве и реализации лекарственных препаратов эритропоэтина. Наличие в препаратах эритропоэтина нескольких изоформ [1] с разной активностью обуславливает их дозирование не по количеству вещества, а по активности, которая проявляется ответной реакцией организма на количество введённого препарата в виде стимуляции эритропоэза, в результате получают безразмерный показатель. В связи с этим ВОЗ рекомендует определять активность эритропоэтина в относительных – международных единицах (МЕ) [2], отражающих биологическую активность. Комитет биологической стандартизации разработал эталон МЕ эритропоэтина – международный стандартный образец [3, 4] и установил процедуру определения специфической активности.

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований (ОФС) к оценке качества препаратов эритропоэтина привело к различиям в методике и точности определения их СА (табл. 1). В соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 для оценки точности результатов измерений используют две характеристики: правильность и прецизионность.

Согласно данным, представленным в табл. 1, различия в требованиях к параметрам проведения методики и расчёту результата у разных отечественных производителей лекарственных препаратов эритропоэтина заключаются в использовании мышей разных линий, количестве животных в группе, вводимых дозах, способе подсчёта ретикулоцитов, выборе статистического метода обработки и диапазоне рассчитанной активности.

Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и необходимость гармонизации отечественных требований с международными обуславливают актуальность стандартизации методики определения специфической активности. Введение в Государственную фармакопею РФ ОФС на упомянутую методику регламентирует контроль основного качества данных препаратов в соответствии с международными требованиями, что обеспечит их эффективность и повысит безопасность клинического применения.

Способ подсчёта ретикулоцитов – один из значимых факторов, определяющих вариабельность результатов. Исследование точности способов подсчёта ретикулоцитов, проведённое ранее [5], показало, что результаты

Схема методики определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина отечественных производителей

Параметр	Требования					
	Нормативной документации отечественных производителей					Европейской фармакопеи
	1	2	3	4	5	
Линия мышей	Беспородные	F1(CBA*С57BL) Balb/c	Balb/c	F1(CBA*С57BL)	B6D2F1	
Количество	Не менее 7	5	8	6	Не менее 8	
Дозы, МЕ/мл	10,20,40,80	0, 10, 20, 40, 80	0, 20, 40, 80	20, 40, 80	20, 40, 80	
Способ подсчёта ретикулоцитов	Визуальный		Визуальный/ геманализатор	Микрофлуориметрический	Микрофлуориметрический	
Статистический метод	Регрессионный	Параллельных линий		Регрессионный	Параллельных линий	
Критерий приемлемости испытания	–	Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)		–	Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)	
Диапазон рассчитанной активности, %	80–120		80–125	80–120	80–125	
Доверительный интервал рассчитанной активности, (P=0,95), %	–		–	–	64–156	

Примечание. Данный параметр не используют в схеме методики.

проточной цитометрии по прецизионности в 2 раза выше визуального способа, что указывает на возможность введения дополнительного, установленного ведущими фармакопеями, критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности.

Цель данной работы – исследование точности и совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина.

**Задачи исследования.** 1. Оценка типа распределения регистрируемых показателей эритропоэза. 2. Обоснование оптимальной схемы методики. 3. Исследование прецизионности и правильности методики.

**Материал и методы.** Исследование прецизионности методики определения специфической активности эритропоэтина проводили на нормоцитемических мышцах линии *Balb/C* ( $n = 288$ ), которая была выбрана по результатам предварительно проведённого нами изучения условий стандартизации методики [6]. Животных получали из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, содержание и уход осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 и Европейской конвенцией [7]. Исследование проводили в шести экспериментах по схеме, изменяющей факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал 3 уровня: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по 8 повторов стандартного образца эритропоэтина Европейской Фармакопеи (European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3) и испытуемого образца (испытываемые образцы получены путём серии разведений стан-

дартного образца), что составило набор для проведения серии параллельных испытаний. Правильность оценивали на пяти уровнях: 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом по 4 повтора стандартного и испытуемого образца (мышь линии *Balb/C*,  $n = 40$ ).

Обязательным условием проведения всех испытаний была рандомизация животных по массе тела, назначение которой заключалось в том, чтобы, распределённые объекты в подгруппах не оказались более однородными, чем вся совокупность в целом, что позволило исключить дополнительные источники вариации. Каждому животному подкожно вводили по 0,5 мл одной дозы, затем помещали в новую клетку. Распределение по клеткам было выполнено таким образом, чтобы в каждой содержались мыши, получившие одну из доз.

Схема исследования прецизионности включала в себя определение влияния факторов в рамках одного уровня дозы и между уровнями, что позволило получить оценки вариабельности методики, которые использовали для проверки и прогнозирования внутрилабораторной прецизионности. Через 4 сут после введения растворов у животных из ретроорбитального синуса глаза отбирали образцы крови (200–300 мкл) в пробирки с  $K_2EDTA$ . Каждому образцу крови присваивали определённый номер, который соответствовал дозе, полученной животным. Подсчёт ретикулоцитов проводили на проточном цитоф-

Таблица 2  
Результаты дисперсионного анализа на примере уровня 20 МЕ/мл

Источник изменчивости	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	Оценки компонент дисперсии
Между параллельными испытаниями	7	0,196	0,028	0,0083
Остаточная дисперсия внутри уровня	8	0,091	0,011	0,0114
Сумма	15	0,287	-	-



Рис. 1. Гистограмма распределения количества ретикулоцитов.

Таблица 3

**Компоненты дисперсии и общая вариабельность уровней испытаний**

Компонента	Уровень, МЕ/мл			Среднее
	20	40	80	
Дисперсия между	0,0083	0,0078	0,0060	0,0074
Дисперсия внутри	0,0114	0,0176	0,0107	0,0132
ПП, %	15,1	17,3	13,8	15,4

Таблица 4

**Дисперсия и общая вариабельность испытаний (6 экспериментов)**

Компонента	Номер испытания					
	1	2	3	4	5	6
Дисперсия между	0,0024	0,0005	0,0074	0,0001	0,0016	0,0051
Дисперсия ошибки	0,0159	0,0085	0,0132	0,0064	0,0089	0,0062
ПП, %	14,5	9,9	15,4	8,2	10,7	11,2

луориметре (Navios, Beckman Coulter, США). В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого (Sigma-Aldrich, США). Результаты выражали в процентах количества ретикулоцитов на 1000 эритроцитов. Проверку первичных данных на нормальность распределения проводили в соответствии с общепринятой методикой [8]. Анализ компонент дисперсии и исследования по оценке правильности и прецизионности методики проводили в соответствии с Американской фармакопеей, раздел «Валидация биологических методов» [9]. Промежуточную прецизионность (ПП) выражали как процент геометрического коэффициента вариации (%GCV) и определяли по формуле:

$$ПП = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}} + \sigma^2_{\text{внутри}}}} - 1) \% \quad (1)$$

Прогнозируемая вариабельность (ПВ) для независимых уровней ( $k$ ) с серией разведений ( $n$ ) испытуемого препарата в рамках одного эксперимента рассчитывали по формуле:

$$ПВ = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}}/k + \sigma^2_{\text{внутри}}/(nk)}} - 1) \% \quad (2)$$

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 правильность – это степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению. Правильность оценивали по смещению и рассчитывали по формуле:

$$\text{Смещение} = 100 \times \left( \frac{\text{измеренная активность}}{\text{опорное значение}} - 1 \right) \% \quad (3)$$

**Результаты и обсуждение.** Стимуляцию эритропоэза оценивали в процентах ретикулоцитов на 1000 эритроцитов, полученные результаты характеризовались вариабельностью (рис. 1). Величина коэффициента асимметрии ( $As = 0,09$ ) близка к нулю, коэффициент эксцесса ( $Ex$ ) заметно выражен и равен  $-1,03$ , что превышает табличное критическое значение  $Ex_{\text{крит}} = 0,867$  при уровне значимости  $\alpha = 1\%$ , поэтому гипотеза о нормальности распределения отвергается. Поскольку статистические методы, используемые в исследовании, требуют, чтобы данные были близки к нормальному распределению, результаты были подвергнуты логарифмическому преобразованию по основанию натурального логарифма ( $e$ ) (рис. 2). Полученные величины коэффициента асимметрии и эксцесса ниже табличных



Рис. 2. Гистограмма распределения количества ретикулоцитов (Ln).

Примечание. Данные после логарифмического преобразования.

( $As_{\text{крит}} = 0,802$ ;  $Ex_{\text{крит}} = 0,867$ , при  $n = 48$  и уровне значимости  $\alpha = 1\%$ ), что указывает на близость к нормальному распределению [8].

Прецизионность методики исследовали в рамках независимых экспериментов, в ходе проведения её оценки использовали первичные регистрируемые результаты подсчёта ретикулоцитов методом проточной цитометрии после логарифмического преобразования. Стратегия параллельных испытаний на всех уровнях была одинаковой, поэтому компоненты дисперсии определены на основании стандартного однофакторного дисперсионного анализа. Результаты дисперсионного анализа для модели компонент дисперсии приведены в табл. 2.

Оценки компонент дисперсии рассчитали на каждом уровне испытания по прецизионности. ПП выражали как процент геометрического коэффициента вариации (%GCV) и определяли по формуле (1), результаты представлены в табл.3.

Соотношение максимальной и минимальной дисперсий между параллельными испытаниями составляет 1,4, внутри уровня 1,6 предельным значением по схеме исследования является 6. При превышении этой величины за счёт избыточной вариабельности данный уровень следовало бы исключить из дальнейшего анализа и ограничить диапазон применения методики. Валидационные испытания имели сбалансированный дизайн, поэтому дисперсии между уровнями усреднили, геометрический коэффициент прецизионности методики составил 15,4%.

Результаты средних оценок дисперсий и ПП по шести экспериментам представлены в табл. 4.

Таблица 5

**Прогнозируемая вариабельность методики (в %) для комбинаций уровней и параллельных испытаний**

Количество испытаний ( $n$ )	Вариабельность методики для уровней ( $k$ )							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	15,4	10,7	8,6	7,4	6,6	6,0	5,6	5,2
2	12,6	8,7	7,1	6,1	5,4	4,9	4,6	4,3
3	11,5	8,0	6,5	5,6	5,0	4,5	4,2	3,9
4	10,9	7,6	6,2	5,3	4,7	4,3	4,0	3,7
5	10,5	7,3	6,0	5,1	4,6	4,2	3,9	3,6
6	10,3	7,2	5,8	5,0	4,5	4,1	3,8	3,5
7	10,1	7,0	5,7	4,9	4,4	4,0	3,7	3,5
8	10,0	7,0	5,6	4,9	4,3	4,0	3,7	3,4

Оценки дисперсии использовали для определения схемы методики с желаемым уровнем прецизионности. Ожидаемую вариабельность для независимых уровней ( $k$ ) с серией разведений ( $n$ ) испытуемого препарата в рамках эксперимента №3 рассчитывали по формуле (2). В табл. 5 представлен прогноз внутрилабораторной прецизионности при различных комбинациях количества уровней и параллельных испытаний по результатам эксперимента №3, выбранного по максимальной величине среднего геометрического коэффициента вариации по трём уровням.

Расчёт расширили путём включения различных комбинаций уровней и количества параллельных испытаний. Наиболее эффективным способом сокращения вариабельности окончательного значения по результатам, представленным в табл. 5, является увеличение количества независимых уровней.

Следующим этапом было определение правильности и её доверительных интервалов. Исходными данными служила рассчитанная активность единичного измерения. Активность рассчитывали путём сопоставления эффекта стандартного и испытуемого образцов, проявляемого в виде количества ретикулоцитов, и выражали в МЕ. С учётом полученных при исследовании прецизионности результатов для оценки правильности выбрали 5 уровней доз 10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл, в каждом – по 4 повтора стандартного и испытуемого образца (рис. 3).

Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о значительной вариабельности результатов активности внутри уровней 10 и 160 МЕ/мл. Для выбора схемы методики принципиально важным является степень корреляции между эталоном и рассчитанной по нему активности. Этому условию соответствует участок прямой в диапазоне 20–80 МЕ/мл (уравнение регрессии  $y = 1,0069x$  с коэффициентом детерминации  $R^2 = 0,97$ ). Правильность оценивали по смещению на отдельных уровнях, а также путём отслеживания зависимости на всех уровнях. Смещение на отдельных уровнях рассчитывали по формуле (3).

В табл. 6 приведены среднее значение и 90% доверительный интервал на логарифмической шкале, а также соответствующие активность и смещение.

Изменения величины смещения на разных уровнях и его 90% доверительные интервалы (рис. 4) согласуются с графиком линейной зависимости (см. рис. 3).

Диапазон рассчитанной активности определили от 80 до 125 %, по результатам анализа требований нормативной документации отечественных производителей (у большинства из них его границы от 80 до 120%). Следуя рекомен-

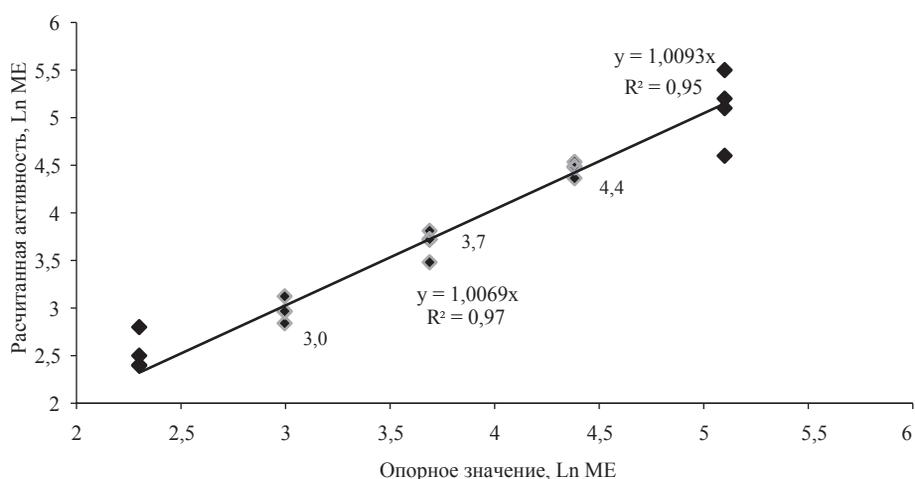


Рис. 3. Результаты исследования правильности по уровням.

Примечание. Крайние уровни 2,3 и 5,1 – это результаты, имеющие значительную вариабельность при визуальной оценке, уровни 3,0, 3,7, 4,4 – участок линейной зависимости (уравнение регрессии  $y = 1,0069x$  с коэффициентом детерминации  $R^2 = 0,97$ ).

дациям (USP раздел <1033>) верхнюю границу доверительного интервала при логнормальном распределении рассчитывают по формуле  $1,00/0,80 * 100\% = 125\%$ .

На рис. 4 между уровнями не прослеживается зависимость смещения. Её наличие указывало бы на систематическое отклонение при сравнении образцов с разными показателями относительной активности. После установления отсутствия зависимости смещения между уровнями провели оценку правильности на каждом уровне. В нашем случае 90% доверительные интервалы смещения на уровнях 10 и 160 МЕ/мл выходят за пределы диапазона приемлемости, что, возможно, связано с вариабельностью определения, полученного вследствие небольшой выборки данных.

Исходя из полученных результатов оценки внутрилабораторной прецизионности и правильности, можно сделать заключение о целесообразности схемы методики с тремя уровнями доз – 20, 40 и 80 МЕ/мл. В данном диапазоне применения методики сохраняется удовлетворительная точность (см. рис. 3 и 4).

Прецизионность в целом характеризуется доверительным интервалом, поэтому результат испытания лучше представлять вместе с доверительным интервалом рассчитанной активности. Однако в спецификациях отечественных производителей данный критерий приемлемости результатов отсутствует. В целях гармонизации отечественных требований определения СА эритропоетина с международными целесообразно ввести в ОФС «Определение специфической активности

Таблица 6

Средняя активность и относительные систематические ошибки на разных уровнях

Уровень доз, МЕ/мл	Активность						Стандартное отклонение	GCV,%	Смещение	90 % (ДИ)	
	Среднее геом.	90 % (ДИ)		Среднее Ln	90 % (ДИ)					min	max
		min	max		min	max					
10	12,4	9,9	15,6	2,52	2,29	2,75	0,19	21,4	24	-0,99	56,1
20	19,6	17,1	22,4	2,97	2,84	3,11	0,12	12,3	-2	-14,7	12,0
40	39,8	33,7	47,0	3,68	3,52	3,85	0,14	15,2	-1	-15,8	17,5
80	87,1	80,0	94,9	4,47	4,38	4,55	0,07	7,5	9	-0,04	18,6
160	166	107,7	257	5,11	4,68	5,55	0,37	44,8	4	-32,7	60,7

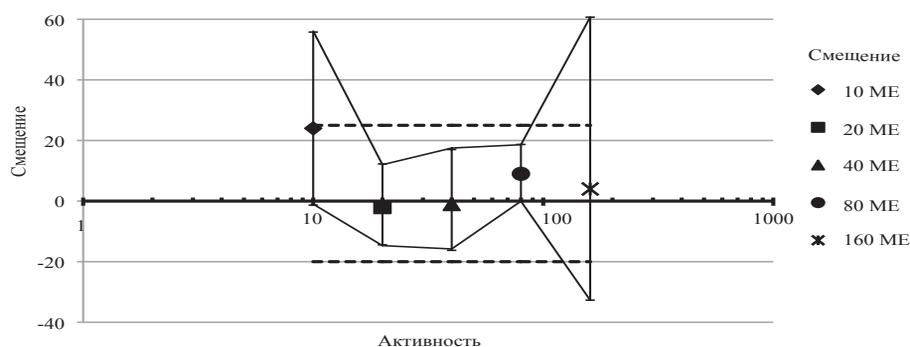


Рис. 4. График 90% доверительных интервалов для смещения.

Примечание. Сплошная горизонтальная линия - целевое значение смещения, пунктирные линии – диапазон рассчитанной активности.

препаратов эритропоэтина» критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности и требования (от 64 до 156%). Границы доверительного интервала рассчитывали исходя из диапазона активности (80–125%) и правильности методики (смещение не более 9%)  $80\%/125\%*100\% = 64\%$  – нижний доверительный интервал рассчитанной активности и  $125\%/80\%*100\% = 156\%$  – верхний доверительный интервал рассчитанной активности.

Доверительный интервал рассчитанной активности при величине внутрилабораторной прецизионности 5,6% составляет 76 – 131%, рассчитан нами ранее [5] методом параллельных линий и соответствует международным требованиям (64 – 156%, при  $P = 0,95$ ) (см. табл. 1). Согласно общепринятой международной и отечественной практике определение СА препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека проводят относительно стандартного образца, поэтому в методике должен быть реализован подход, основанный на эквивалентности для изучения подобия (критерий параллельности) [10]. Для экспериментально обоснованного формата методики, ограниченного тремя уровнями доз, применима статистическая обработка результатов методом параллельных линий. В основе данного метода лежит дисперсионный анализ, который позволяет достоверно проверить предположение об эквивалентности сравнением двух линий на графике, построенных по средним величинам в серии разведений. Параллельность – фундаментальный принцип сравнения двух биологических препаратов. Наличие параллельности линий означает, что стандартный образец и испытуемый препарат имеют одинаковую природу [11], содержат одно и то же активное начало, но в разном соотношении активного и неактивного компонентов, её отсутствие указывает на несопоставимость препаратов.

Следовательно, теоретически и экспериментально обоснованный формат методики, ограниченный тремя уровнями доз, и статистическая обработка результатов методом параллельных линий в целом обеспечивают корректное определение специфической активности в МЕ и оценку качества лекарственного препарата эритропоэтина.

**Заключение.** На основании экспериментального исследования точности и оптимизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены две её валидационные характеристики (правильность и прецизионность) и сделаны выводы:

1. Доказана обоснованность использования логариф-

мов зарегистрированных величин эритропоэза при статистических расчётах специфической активности эритропоэтина и исследовании валидационных параметров методики. Статистическая обработка результатов методом параллельных линий обеспечивает проверку фундаментального принципа сравнения двух препаратов – подобие (параллельность).

2. Теоретически и экспериментально обоснованная схема (формат) методики включает три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл по 8 животных на каждом и наиболее пригодна для достижения между-

народных требований точности к методике определения специфической активности эритропоэтина.

3. По результатам исследований правильность характеризуется смещением не более 9% и не превышает диапазон рассчитанной активности от 80 до 125%; геометрический коэффициент внутрилабораторной прецизионности равен 5,6%, что соответствует рекомендованному международными требованиями диапазону (от 64 до 156%, при  $P = 0,95$ ) доверительного интервала рассчитанной активности. Для обоснованной оптимальной схемы методики допустимо использование рекомендованного показателя – доверительного интервала рассчитанной активности с гармонизированным нормативом от 64 до 156%.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 7, 9, 10 см. REFERENCES)

1. Яковлев А.К., Гайдерова Л.А., Подкуйко В.Н., Волкова Р.А., Алпатова Н.А., Олефир Ю.В. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи. *Стандартные образцы*. 2016; 3: 4-11.
2. Яковлев А.К., Алпатова Н.А., Постнова Е.Л., Симутенко Л.В., Батушвили Т.А. Исследование стандартности методики определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитических мышах. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(S): 77-8.
3. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. Учебное пособие. 4-е изд. М.: Высшая школа; 1990.
4. Петухов В.Г. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других медицинских иммунобиологических препаратов в иммуноферментном анализе. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2004; 13 (1): 19-23.

## REFERENCES

1. Storing P.L., Tiplady R.J., Gaines Das R.E., Rafferty B., Mistry Y.G. Lectin binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J. Endocrinol.* 1996; 150(3): 401-12.
2. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series, Annex 2. *Expert Committee on biological standardization*. Geneva. 2006; 932: 73-131.
3. Cotes P.M., Bangham D.R. The International Reference Preparation

- of Erythropoietin. *Bull. World Health Organ.* 1966; 35(5): 751-60.
4. Burns Chr., Tiplady R., Hockley J. WHO International Collaborative study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay. *Expert Committee on biological standardization.* Geneva. 2012: 1-23.
  5. Yakovlev A.K., Gayderova L.A., Podkuyko V.N., Volkova R.A., Alpatova N.A., Olefir Yu.V. The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European pharmacopeia. *Standartnye obraztsy.* 2016; 3: 4-11. (in Russian)
  6. Yakovlev A.K., Alpatova N.A., Postnova E.L., Simutenko L.V., Batuashvili T.A. Study standard methodology for determining the specific activity of erythropoietin on normocytemic mice. *Meditinskaya immunologiya.* 2017; 19(S): 77-8. (in Russian)
  7. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986.
  8. Lakin G.F. *Biometry [Biometriya. Uchebnoe posobie]*. 4<sup>th</sup> ed. Moscow : Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)
  9. USP<1033>BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION. Available at: [https://dlscrib.com/queue/usp-1033-biological-assay-validation-pdf\\_58bf8c24e12e899a02add37d\\_pdf?queue\\_id=59a52e4ddc0d60f87c568edc](https://dlscrib.com/queue/usp-1033-biological-assay-validation-pdf_58bf8c24e12e899a02add37d_pdf?queue_id=59a52e4ddc0d60f87c568edc)[accessed 21.02.2018].
  10. USP<1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS. Available at: [https://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP\\_1032.pdf](https://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1032.pdf)[accessed 21.02.2018].
  11. Petukhov V.G. The method of parallel lines for the quantitative evaluation of the quality of standards and other medical immunobiological preparations in the enzyme immunoassay. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2004; 13(1): 19-23. (in Russian)

Поступила 15.03.18

Принята к печати 13.04.18

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.828.6]-092:612/017.1]-078.33

Селимова Л.М.<sup>1</sup>, Калнина Л.Б.<sup>1</sup>, Серебровская Л.В.<sup>2</sup>, Иванова Л.А.<sup>2</sup>, Носик Д.Н.<sup>1</sup>

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МТ-4 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва;

<sup>2</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва

*В системе in vitro на модели неопластической клеточной линии МТ-4 было изучено влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркеров активации. Проведённые исследования показали изменение экспрессии таких маркеров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и CD69<sup>+</sup>. Динамика этих показателей при использовании плазм пациентов без лечения и пациентов, принимающих антиретровирусную терапию (АРТ), показала, что перечисленные белки могут рассматриваться как маркеры для оценки уровня активации иммунной системы пациентов. Исследования показали снижение активационного потенциала клеток при использовании плазм пациентов с АРТ и повышение без лечения. Изучение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69 при использовании МТ-4 клеток и плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией может иметь прогностическое значение для мониторинга инфекции и эффективности различных терапевтических схем.*

Ключевые слова: МТ-4 клетки; фенотипические маркеры CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>.

**Для цитирования:** Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Использование неопластической клеточной линии МТ-4 для изучения иммуномодулирующей активности плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63(7): 428-433. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-428-433>

*Selimova L.M.<sup>1</sup>, Kalnina L.B.<sup>1</sup>, Serebrovskaya L.V.<sup>2</sup>, Ivanova L.A.<sup>2</sup>, Nosik D.N.<sup>1</sup>*

APPLICATION OF MT-4 NEOPLASMIC CELL LINE FOR THE STUDY IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF PATIENT PLASMA WITH HIV-INFECTION

<sup>1</sup>«The D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology» of «N.F. Gamaleya NRCM», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow;

<sup>2</sup>«Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumer Rights Protection and People's Welfare», 111123, Moscow

*It was studied in vitro the immunomodulatory effect of plasma HIV-infected individuals on expression of activation markers when used as a model neoplastic cell line MT-4. Carrying out researches indicated the variation in expression of the activation markers CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup>. Change dynamics of these indices showed that these proteins can to consider as markers for*

*level evaluation of patients immune system during used of plasma HIV-infected individuals with and without antiretroviral treatment (ART). Analysis revealed reduction of cells activation potential in plasma of patients with ART presence and rise without treatment. Examinations of the expression proteins CD28, CD38, HLA-DR u CD69 MT-4 cells and plasma of patients with HIV-infection application can have prognostic value for infection monitoring and efficacy of different therapeutic approaches.*

**Key words:** *MT-4 cells; phenotyping markers CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>.*

**For citation:** *Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Nosik D.N. Application of MT-4 neoplasm cell line for the immunomodulating activity study of patients plasma with HIV-infection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018;63(7): 428-433 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-428-433>*

**For correspondence:** *Selimova L.M., doctor of biological sciences, leading researcher; e-mail: [lselim@mail.ru](mailto:lselim@mail.ru)*

**Information about authors:**

*Selimova L.M., <http://orcid.org/0000-0003-3709-770X>*

*Kalnina L.B., <http://orcid.org/0000-0002-2702-8578>*

*Serebrovskaya L.V., <http://orcid.org/0000-0003-1679-3300>*

*Ivanova L.A., <http://orcid.org/0000-0002-7397-0652>*

*Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>*

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

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

Received 12.03.2018

Accepted 10.04.2018

**Введение.** Одним из главных иммунологических критериев течения ВИЧ-инфекции служит уменьшение в крови пациентов количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые к тому же служат биологической мишенью для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Этому компоненту клеточного звена иммунитета отводится важная роль в регуляции нормального функционирования всех звеньев системы. Снижение количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов происходит не только из-за непосредственной цитопатической активности вируса, но и гибели компонентов этого клеточного звена благодаря развитию иммунопатологических процессов, обусловленных биогенетическими особенностями ВИЧ-1. В результате взаимодействия вируса и иммунной системы в организме пациента развивается хроническая гиперактивация всех её звеньев и как следствие возникает иммунодефицит, течение ВИЧ-инфекции осложняется появлением оппортунистических инфекций различной этиологии. Все перечисленные факторы приводят к критическому падению функциональной активности иммунной системы и смерти пациента [1, 2]. Применяемые в настоящее время различные схемы высокоактивной антиретровирусной терапии (АРТ) позволяют добиться существенного подавления репликации вируса и повышения уровня клеток CD4<sup>+</sup> у пациентов даже с высоким уровнем вирусной нагрузки и низким числом клеток CD4<sup>+</sup>. Но полное восстановления функциональной активности компонентов иммунной системы не происходит даже на фоне успешной АРТ [3, 4].

Поэтому понимание всех механизмов организации и поддержания эффективного иммунного ответа при ВИЧ-инфекции представляется важной задачей, необходимой для создания вакцинных препаратов, поиска эффективных иммунотерапевтических подходов и дополнительных методов оценки функциональной активности иммунной системы. Сложность регуляции работы всех многокомпонентных звеньев иммунитета, а также полифункциональность факторов гуморального иммунного ответа существенно усложняют изучение особенностей патогенеза ВИЧ-инфекции. Несмотря на более чем 30-летний период интенсивных исследований, проблема взаимоотношения вируса с иммунной системой хозяина остаётся изученной недостаточно. Высокий уровень активации Т-клеточного звена иммунитета является ключевым в развитии патогенеза ВИЧ-инфекции, а механизмы, вызывающие различные уровни активации Т-клеток, неизвестны. Иммунная

активация оценивается путём анализа маркёров активации, экспрессируемые клеточной мембраной и растворимыми молекулами, секретлируемыми активированными клетками. Маркёры иммунной активации имеют важное прогностическое значение для оценки развития инфекции и мониторинга антиретровирусной терапии. В связи с этим использование различных подходов к созданию экспериментальных моделей изучения особенностей патогенеза ВИЧ-инфекции представляется очень важным.

Одним из подходов при изучении особенностей регуляции клеток иммунной системы может служить анализ влияния плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию основных иммунологических маркёров и маркёров активации клетками периферической крови [5]. В продолжение этого исследования мы изучили влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркёров активации неопластическими клетками MT-4. Эти клетки являются Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>, трансформированными ретровирусом дельта, называемым Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа (ТЛВЧ-1). По фенотипическим характеристикам они относятся к активированным Т-лимфоцитам CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> [6, 7]. Ранее нами был показан высокий уровень экспрессии ими таких маркёров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> [8]. Все эти белки играют важную роль в регуляции механизмов функционирования иммунной системы человека [9]. При использовании этой клеточной линии не нужен этап получения донорских клеток, их культивирование не требует факторов роста. Активированный статус и фенотип CD4<sup>+</sup> делают клетки MT-4 подходящей моделью для изучения различных веществ, влияющих на экспрессию маркёров активации Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> [10]. В связи с этим нами было изучено влияние плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией, получающих и не получающих АРТ, на экспрессию фенотипических маркёров CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> клетками MT-4.

**Материал и методы.** В работе использовали образцы плазмы периферической крови пациентов с хронической инфекцией, находящихся на диспансерном наблюдении в Специализированном научно-исследовательском отделе эпидемиологии и профилактики СПИД (СНИО ЭП СПИД). 14 образцов (4 женщины, 10 мужчин) бы-

ли получены от пациентов без терапии и 21 образец (7 женщин, 14 мужчин) – от пациентов, принимающих АРТ, 10 образцов (5 женщин и 5 мужчин) – от условно здоровых лиц (группа норма). АРТ проводили в соответствии с рекомендациями, принятыми в Российской Федерации [11]. Возраст пациентов без терапии был от 27 до 68 лет ( $\mu 39,1 \pm 13,4$ ), с терапией – от 17 до 63 лет ( $\mu 36,7 \pm 10,7$ ), условно здоровых лиц – от 19 до 64 лет ( $\mu 31,7 \pm 13,8$ ). Кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие К2ЭДТА (BD Vacutainer, Великобритания). Осаждали при 2000 об/мин в течение 20 мин при 20°C и отбирали плазму для инкубации с клетками МТ-4. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона коровы, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Клетки пересевали через 3–4 дня, плотность при пересеве составляла 2,5x10<sup>5</sup> клеток/мл. Для изучения влияния плазмы пациентов на экспрессию маркёров активации через 1 день после пересева клетки в концентрации 1x10<sup>6</sup> клеток/мл культивировали в присутствии плазмы пациентов или доноров, или стандартной культуральной среде в течение 48 ч (контроль). Для анализа наружных фенотипических маркёров клетки окрашивали следующими моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США): CD4 (PE или PC5), CD25 (PE), CD28 (PC5), CD38 (PC5), CD62L (PE), CD69 (PC5), CD95 (PE), HLA-DR (PE). Суспензию клеток предварительно отмывали 3 раза в 0,01М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,2) путём центрифугирования (800 об/мин, 6 мин) и суспендировали в том же растворе при концентрации 2x10<sup>6</sup> клеток/мл. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter, США).

Индекс изменения экспрессии (ИИЭ) для каждого маркёра активации определяли по следующей формуле:

$$\frac{\% \text{ количества клеток в контроле}}{\% \text{ количества клеток в присутствии плазмы}}$$

В числителе – значения медианы, полученные при анализе клеток, культивируемых в культуральной среде, в знаменателе – значения медианы, полученные при анализе клеток, культивируемых в плазме пациентов, не получающих и получающих АРТ, и плазме условно здоровых лиц (норма).

Статистический анализ данных проводили с использованием программы BioStat 2009 (AnalystSoft). Уровень значимости ( $\alpha$ ) был равен 0,05.

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 и 2 представлены результаты изучения влияния плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов и условно здоровых лиц (норма) на экспрессию маркёров активации.

В табл. 2 использованы показатели ИИЭ. Значение 1 свидетельствует о том, что экспрессия маркёра не изменяется, значение больше 1 – о том, что экспрессия снижается, меньше 1 – экспрессия повышается. Неопластические клетки в отличие от нормальных, имеют свой баланс между активностью генов, регулирующих пролиферацию [12]. Эти клетки представляют аутокринную систему, в которой функционируют внутренние конститутивные нерегулируемые сигналы роста и для них характерна генетическая нестабильность в экспрессии генов, управляющих их жизнеспособностью. В них изменены механизмы, отвечающие за апоптоз. При культивировании *in vitro* баланс между экспрессией различных генов и их белковых продуктов может меняться, но оставаться в рамках, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток. Существенное изменение

уровня экспрессии некоторых белков в процессе культивирования можно считать одним из недостатков при использовании линии МТ-4 в качестве модельной системы, так как это может ограничивать набор экспериментальных мишеней в случае их низкой экспрессии.

Из полученных результатов видно (см. табл. 1 и 2), что при использовании всех групп плазм экспрессия белков CD25 и CD95 не изменяется. Ранее нами было показано, что в популяции линии МТ-4 практически все клетки, кроме основного фенотипического маркёра CD4<sup>+</sup>, экспрессируют такие белки активации, как CD25 и CD95. Это, очевидно, необходимо для поддержания их неопластических свойств. Маркёр CD25<sup>+</sup> служит  $\alpha$ -цепью рецептора Т-клеточного фактора роста IL-2 [7]. Этот белок экспрессируется трансформированными ТЛВЧ-1 клетками в больших количествах [13], и клетки МТ-4 принято обозначать как популяцию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Считается, что CD95 играет большую роль в регуляции иммунной системы, управляя гомеостазом, периодом полужизни клеток и скоростью обновления клеточной популяции. Его активация может служить ко-стимулирующим сигналом для пролиферации клеток и продукции цитокинов либо сигналом развития апоптоза. Показано, что проапоптотическая активность этого белка может подавляться различными механизмами с участием протеинкиназ [14]. Клетки МТ-4 имеют свои особенности регуляции на молекулярно-биологическом уровне, и проапоптотическая активность этого белка в них, вероятно, подавлена. Экспрессия же таких маркёров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> может существенно изменяться в процессе культивирования клеток [8].

В случае с белком CD28 наблюдаются незначительные колебания в сторону как увеличения, так и уменьшения. Экспрессия его падает на ~22% в присутствии плазм от пациентов с АРТ и усиливается на ~12% в пробе норма по сравнению с контролем. Уровень белка CD69 во всех случаях высокий даже в контроле, а в присутствии плазм пациентов и нормы незначительно увеличивается в ~1,12–1,16 раз. Такая высокая экспрессия этого белка, очевидно, является следствием особенностей регуляции его синтеза в активированных клетках. Экспрессия белка CD38 существенно падает для всех групп плазм, причём в случае АРТ в наибольшей степени (~90%). Экспрессия маркёра CD62L<sup>+</sup> падает в группе АРТ и усиливается в группах норма и без лечения. Однако данные об изменении этого маркёра нельзя считать достоверными, так как экспрессия этого белка была очень низкая (см. табл. 1). Экспрессия белка HLA-DR для всех категорий плазм существенно усиливалась. Это связано, скорее всего, с тем, что маркёр HLA-DR<sup>+</sup> относится к группе белков главного комплекса гистосовместимости. Тем не менее в случае плазм с АРТ это усиление было наименьшим (~44%), а без терапии – наибольшим (~56%). В целом, можно сказать, что при культивировании клеток МТ-4 с плазмами пациентов с АРТ наблюдалось явное снижение активационного потенциала клеток по маркёрам CD28<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup>.

Для более детального анализа этих данных был определён уровень взаимосвязи отдельных пар белков для каждой группы плазм с использованием коэффициента корреляции Пирсона. Эти результаты представлены в табл. 3.

Как видно, взаимосвязь белков для каждой группы плазм различна. Исключение составляет пара белков CD38-CD28. Во всех группах плазм она была высокой и прибли-

Таблица 1

**Экспрессия фенотипических маркёров активации клетками МТ-4 в присутствии плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов\***

Фенотипический маркёр	Контроль медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Без терапии медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	АРТ медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Норма медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	97,9 (97,8-8,1)	98,1(97,5-98,4)	98,1(97,6-98,3)	98(97,9-98,5)
CD4 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	98,6(98,1-98,9)	98(98-98,3)	98,4(98,2-98,5)	98(97,8-98,5)
CD4 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>	39,2(23,3-61)	39(21,2-55,2)	30,5(13,3-57,8)	44,4(20,6-53,6)
CD4 <sup>+</sup> /CD38 <sup>+</sup>	10,7(2,7-19,2)	5,6(0,43-11,4)	1,1(0,03-15,1)	4,5(1,2-18,7)
CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup>	0,48(0,26-0,85)	1,02(0,62-1,9)	0,4(0,3-1,2)	0,9(0,2-1,1)
CD4 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	38,5(31-62,3)	87,5(56-93)	68,1(40,8-88,6)	76,4(47,2-91)
CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	80,5(58,3-86,5)	92,7(87-96)	90(62,3-95,3)	92,4(90-95)

Примечание. \* – количество клеток, содержащих фенотипический маркёр, в %.

жалась к группе норма, где корреляция была полная. Это свидетельствует о том, что высокий уровень корреляции биосинтеза этих белков служит необходимым условием нормального функционирования клеток МТ-4. При сравнении показателей в группах плазм пациентов без лечения и с лечением видно, что по некоторым парам белков корреляция повышается для последней группы и приближается к соответствующим показателям нормы. А по парам CD28-HLA-DR, CD28-CD69 и HLA-DR-CD69 существенно отличается от неё. На основании представленных данных о коэффициентах корреляции Пирсона для изученных групп плазм можно предположить, что эти биологические жидкости содержат свой специфический набор факторов, регулирующих экспрессию маркёров активации. И они в большинстве случаев отличаются от механизмов регуляции, действующих в клетках (контроль) и плазмах нормы от плазм ВИЧ-инфицированных пациентов. Эти данные позволили нам провести дополнительный дифференцированный анализ плазм пациентов по количеству CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови и времени инфицирования или срокам терапии. Результаты представлены на рисунке, а. Как видно на рисунке, б, при делении плазм пациентов по количеству клеток CD4<sup>+</sup> в крови в выделенных категориях пациентов без терапии увеличение количества клеток CD4<sup>+</sup> в крови сопровождалось снижением экспрессии белка CD38 (от ~34% до ~40%) относительно контроля. Относительно нормы количество этого белка было выше в обеих категориях, но при CD4<sup>+</sup> ≥ 500 кл/мкл увеличение было на ~7% ниже. Экспрессия белка HLA-DR увеличена относительно контроля и нормы и, как уже говорилось выше, это связано, скорее всего, с его свойствами как антигена главного комплекса гистосовместимости. Количество белка CD69 было незначительно выше, чем в контроле (~11%), а относительно нормы во всех изученных группах практически не изменялось.

При использовании плазм пациентов с АРТ наблюдалось снижение экспрессии белков CD28 и CD38 и при

CD4<sup>+</sup> > 600 клеток/мкл относительно нормы на ~51 и ~90%, соответственно. Существенное увеличение уровня белка CD28 при CD4<sup>+</sup> >300 –≤600 клеток/мкл может быть связано с присутствием большого количества проб с сопутствующей микробной инфекцией в этой категории пациентов и соответственно с присутствием в плазмах повышенного количества активирующих факторов [15]. К сожалению, данных об этих инфекциях у нас нет. Несмотря на то, что белку CD28 в настоящее время уделяется большое внимание в регуляции иммунной системы [16], его биологические свойства и особенности функциональной активности остаются плохо изученными. Следует отметить, что в группе плазм, составляющих норму, его количество немного превышает контроль и сравнимо с категориями плазм без терапии. Что же касается белков HLA-DR и CD69, то экспрессия их относительно нормы, в основном снижена и повышена относительно контроля.

Анализ плазм по срокам инфицирования или срокам терапии (см. рисунок, б) показал следующее. В выделенных категориях пациентов без терапии при увеличении срока инфицирования экспрессия маркёра CD28<sup>+</sup> постепенно увеличивалась на ~13% и была сравнима с нормой. Количество маркёра CD38<sup>+</sup> было всегда ниже, чем в контроле, но выше, чем в норме, и внутри группы увеличивалось с увеличением срока инфицирования. Количество белка HLA-DR было выше, чем в контроле. Увеличение наблюдалось и относительно нормы. Количество белка CD69 было незначительно выше относительно контроля и сравнимо с нормой. В группе пациентов с АРТ увеличение срока терапии сопровождалось существенным снижением экспрессии маркёров CD28<sup>+</sup> (~73%) и CD38<sup>+</sup> (~90%) относительно нормы. Количество маркёра HLA-DR<sup>+</sup> во всех категориях было выше, чем в контроле, но

Таблица 3

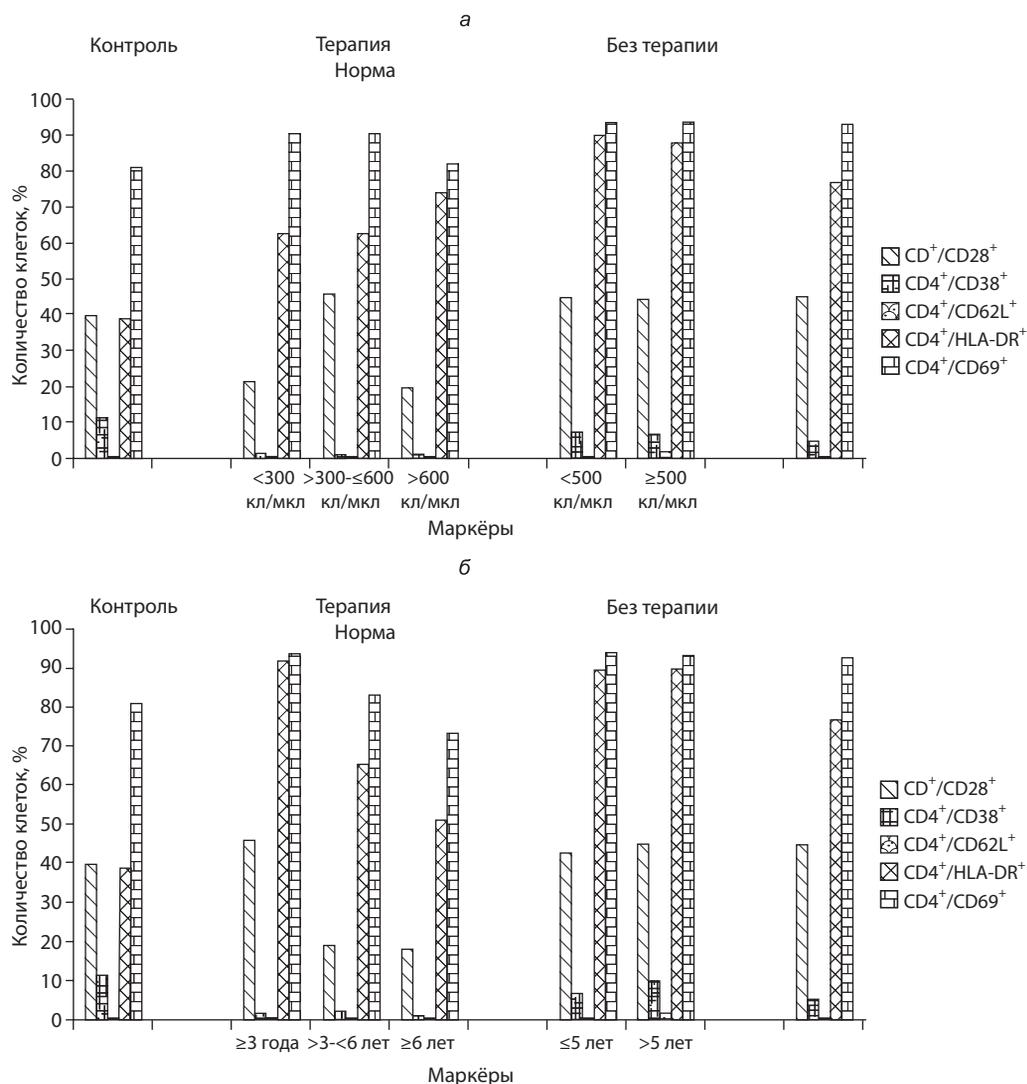
**Коэффициент корреляции Пирсона**

Маркёры	Контроль	Без терапии	АРТ	Норма
CD28 –CD38	0,8952	0,804	0,8561	1
CD28-CD62L	0,5152	0,2030	0,5731	1
CD28-HLA-DR	0,1840	0,5971	0,6918	0,3531
CD28-CD69	0,1416	0,6564	0,7735	0,4215
CD38-CD62L	0,3074	0,0575	0,6797	1
CD38-HLA-DR	-0,2407	0,2904	0,4063	0,3531
CD38-CD69	0,0962	0,4372	0,5738	0,4215
CD62L-HLA-DR	0,1732	0,3226	0,2395	0,3531
CD62L-CD69	0,1493	0,0106	0,3442	0,4215
HLA-DR-CD69	0,5882	0,5443	0,7166	0,2949

Таблица 2

**ИИЭ маркёров активации клетками МТ-4 в присутствии плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов**

Фенотипический маркёр	Без терапии	АРТ	Норма
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	1	1	1
CD4 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	1	1	1
CD4 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>	1	1,3	0,9
CD4 <sup>+</sup> /CD38 <sup>+</sup>	1,9	10	2,4
CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup>	0,5	1,3	0,5
CD4 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	0,4	0,6	0,5
CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	0,9	1,1	0,9



Влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркёров активации клетками МТ-4 в зависимости от количества CD4<sup>+</sup> – клеток в крови (а) и времени инфицирования или химиотерапии (б).

при увеличении периода терапии этот показатель постепенно снижался и в категории  $\geq 6$  лет снизился на ~22% относительно категории  $\leq 3$  года. Сходная динамика наблюдалась относительно нормы. Маркёр CD69<sup>+</sup> был в начале наблюдения выше контроля (на ~14%) и нормы (на ~10%), а при увеличении периода терапии этот показатель постепенно снизился и составил ~10% и ~21% от нормы и контроля соответственно. Особенности экспрессии этого белка в представленных результатах указывают на то, что он играет более существенную роль в регуляции иммунной системы, чем представлялось ранее. В последние годы сведения о роли этого белка в регуляции иммунной системы человека существенно расширились [17]. Что же касается белка CD62L, то относительно этого компонента сложно делать выводы, так как в представленных результатах его экспрессия была очень низкой. Но можно отметить, что в случае плазм от пациентов с АРТ наблюдалась тенденция к снижению его экспрессии с увеличением периода лечения.

Полученные результаты указывают на то, что в

группе пациентов с АРТ наблюдалось выраженное снижение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69. Иными словами, в плазме этой группы пациентов присутствуют биологически активные факторы, приводящие к снижению активационного потенциала клеток МТ-4. Напротив, в группе пациентов без лечения присутствуют факторы, повышающие активационный потенциал клеток. В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изменение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69 в клетках МТ-4 в присутствии плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией может рассматриваться как показатель оценки уровня активации их иммунной системы. Кроме того, эта биологическая модель может быть использована для разработки различных химиотерапевтических подходов лечения ВИЧ-инфекции, где перечисленные выше маркёры активации могут рассматриваться как терапевтические мишени.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 12-17 см. REFERENCES)

5. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Гуляева А.А., Носик Д.Н. Иммуномодулирующая активность плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;10: 45-9.
8. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркёры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы её использования в качестве модели при изучении активности иммуномодулирующих препаратов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 12: 822-5.
9. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г. Шуплецова В.В. и др. Основные поверхностные маркёры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014; 16(1):7-26.
10. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э. Н., Носик Д.Н. Влияние ферровируса на экспрессию поверхностных маркёров активации клетками неопластической линии МТ-4. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 6: 335-8.
11. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция и СПИД: Клинические рекомендации. 2-е изд.* М.: Медицина; 2009.

REFERENCES

1. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* 2008; 214: 231–41.
2. Douek D. C., Roederer M. and Koup R. A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annual Review of Medicine*. 2009; 60: 471–84.
3. Robbins G.K., Spritzler J.G., Chan E.S., Asmuth D.M., Gandhi R.T., Rodriguez B.A. et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 350–61.
4. Kelley C.F., Kitchen C.M., Hunt P.W., Rodriguez B., Hecht F.M., Kitahata M. et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 787–94.
5. Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Gulyaeva A.A., Nosik D.N. The immunomodulatory activity of

- plasma of patients infected with human HIV virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 10:45-9. (in Russian)
6. Manns A., Hisada M., La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. 1999; 353:1951- 8.
  7. Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K., Uchino H. Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood*. 1981; 58: 645– 7.
  8. Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N. The superficial markers of neoplastic cell line MT-4 and perspectives of its application as a model for studying activity of immune modulating preparations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 12:822-5. (in Russian)
  9. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditinskaya immunologiya*. 2014; 16(1): 7-26. (in Russian)
  10. Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N., Nosik D.N. The effect of ferrovir on to expression of surface markers of activation by cells neoplastic line MT-4. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 6: 355-8. (in Russian)
  11. Pokrovskiy V.V., ed. *HIV infection and AIDS: Clinical Guidelines [ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации]*. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Meditsina; 2009. (in Russian)
  12. Kogure Y., Kataoka K. Genetic alteration in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2017; 108: 1719-25.
  13. Waldmann T.A. The role of the multichain IL-2 receptor complex in the control of normal and malignant T-cell proliferation. *Environ Health Perspect*. 1987; 75:11-5.
  14. Brint E., O'Callaghan G., Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol. Life Sci*. 2013; 70(21): 4085-99.
  15. Riley J.L., June C. H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*. 2005; 105(10): 13-21.
  16. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., Weiss A., Bluestone J.A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016; 44(5): 973-88.
  17. González-Amaro R., Cortes J. R., Sanchez-Madrid F. and Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol. Med*. 2013; 19(10): 625–32.

Поступила 12.03.18  
Принята к печати 10.04.18

Александрова Е.Н.<sup>1</sup>, Верижникова Ж.Г.<sup>2</sup>, Новиков А.А.<sup>1</sup>, Панафилина Т.А.<sup>2</sup>, Попкова Т.В.<sup>2</sup>, Лукина Г.В.<sup>1,2</sup>

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУННОГО АНАЛИЗА АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

<sup>1</sup>ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова» Департамента здравоохранения г. Москвы, 111123, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», 115522, Москва, Россия

*Перспективным направлением диагностики системных аутоиммунных заболеваний является мультиплексный иммунный анализ (МИА) аутоантител и других лабораторных биомаркеров с использованием микрочипов. Цель работы – изучить диагностическое и прогностическое значение МИА профилей антинуклеарных антител (АНА) при системной красной волчанке (СКВ).*

*Обследованы 94 больных СКВ, 70 больных другими ревматическими заболеваниями и 30 здоровых доноров. АНА (к двухспиральной ДНК – dsДНК, антигенам Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, нуклеосомам, рибосомальному белку Р – RibP и рибонуклеопротеину – РНП-70) в сыворотке крови определяли методом МИА на основе технологии xMAP.*

*При МИА антитела к dsДНК, Sm и RibP имеют высокую диагностическую специфичность (ДС) (95–99%) и отношение правдоподобия положительных результатов исследования (ОППР) (9,67–15,00), то есть являются наиболее «полезными» диагностическими тестами, а антитела к РНП-70, SS-A/Ro и нуклеосомам относятся к категории «полезных» тестов для диагностики СКВ (ДС 84–95%, ОППР > 2,0). Определение профилей из 3 и более антигенспецифических АНА с помощью МИА повышает ДС метода до 98–100%, а ОППР – до максимальных значений. Профили из 7 субпопуляций АНА (к dsДНК, Sm, RibP, SS-A/Ro, SS-B/La, нуклеосомам и РНП-70, с частотой соответственно 57,9; 71,9; 82,5; 61,4; 84,2; 50,9 и 84,2%) обнаружены при хроническом варианте течения СКВ. При остром течении заболевания одновременно выявляли 4 субпопуляции АНА (к dsДНК, Sm, SS-A/Ro и нуклеосомам, с частотой соответственно 77,3; 45,5; 40,9 и 72,7%); при подостром течении – 2 субпопуляции АНА (к dsДНК и нуклеосомам, с частотой соответственно 53,3 и 46,7%). Индекс активности заболевания SLEDAI-2K положительно коррелировал с концентрацией антител к dsДНК ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ), нуклеосомам ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ), RibP ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ) и Sm ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ) в крови. Не обнаружено достоверной взаимосвязи между продукцией разновидностей АНА и индексом органного повреждения. Поражение кожи и слизистых оболочек, почек, ЦНС наиболее часто ассоциировалось с обнаружением антител к dsДНК (53,2–64%), нуклеосомам (55,3–66%), SS-A/Ro (38–40,4%) и Sm (27,8–36,2%).*

*МИА профилей АНА является важным инструментом для реализации персонализированного подхода к диагностике, оценке активности, характера течения и клинико-иммунологических субтипов СКВ.*

**Ключевые слова:** системная красная волчанка; антинуклеарные антитела; мультиплексный иммунный анализ; клиническое значение.

**Для цитирования:** Александрова Е.Н., Верижникова Ж.Г., Новиков А.А., Панафилина Т.А., Попкова Т.В., Лукина Г.В. Клиническое значение мультиплексного иммунного анализа антинуклеарных антител при системной красной волчанке. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 434-438. DOI :<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-434-438>

Aleksandrova E.N.<sup>1</sup>, Verizhnikova Zh.G.<sup>1</sup>, Novikov A.A.<sup>1</sup>, Panafidina T.A.<sup>2</sup>, Popkova T.V.<sup>2</sup>, Lukina G.V.<sup>1,2</sup>

### CLINICAL VALUE OF MULTIPLEX IMMUNE ASSAY OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

<sup>1</sup>A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, 111123, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, 115522, Moscow, Russia

*A promising trend in the diagnosis of systemic autoimmune diseases is the multiplex immune assay (MIA) of autoantibodies and other laboratory biomarkers using microchips.*

*The aim of the work was to study the diagnostic and prognostic significance of MIA antinuclear antibody (ANA) profiles in systemic lupus erythematosus (SLE).*

*94 patients with SLE, 70 patients with other rheumatic diseases and 30 healthy donors were examined. ANA (antibodies to double-stranded - dsDNA, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La antigens, nucleosomes, ribosomal protein P-RibP and ribonucleoprotein - RNP-70) were determined in the serum by MIA using the xMAP technology.*

*In MIA, antibodies to dsDNA, Sm and RibP have a high diagnostic specificity (Sp) (95.0-99.0%) and a likelihood ratio of positive results (LR+) (9.67-15.0), i.e. are the most "useful" diagnostic tests, and antibodies to RNP-70, SS-A/Ro and nucleosomes are classified as "useful" tests for the diagnosis of SLE (Sp: 84.0-95.0%, LR+ > 2.0). Determination of profiles from 3 or more antigen-specific ANA by MIA increases the Sp method to 98.0-100%, and the LR+ - to the maximum values. Profiles from 7 subpopulations of ANA (antibodies to dsDNA, Sm, RibP, SS-A/Ro, SS-B/La, nucleosomes and RNP-70, 57.9%, 71.9%, 82.5%, 61.4 %, 84.2%, 50.9%, 84.2%) were found in the chronic variant of SLE. In the acute course of the disease, 4 subpopulations of ANA are simultaneously detected (antibodies to dsDNA, Sm, SS-A/Ro and nucleosomes, 77.3%, 45.5%, 40.9% and 72.7%); in subacute course there are 2 subpopulations of ANA (antibodies to dsDNA and nucleosomes, 53.3% and 46.7%). The activity index of SLEDAI-2K positively correlates with the concentration of antibodies to dsDNA ( $r = 0.55$ ,  $p < 0.05$ ), nucleosomes ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.05$ ), RibP ( $r = 0.32$ ;  $p < 0.05$ ) and Sm ( $r = 0.36$ ,  $p < 0.05$ ) in the blood. There was no reliable relationship between the*

*production of varieties of ANA and the index of organ damage. Mucocutaneous disorders, lupus-nephritis and neurolupus were most often associated with the detection of antibodies to dsDNA (53.2-64.0%), nucleosomes (55.3-66.0%), SS-A/Ro (38.0-40.4%) and Sm (27.8-36.2%).*

*MIA of ANA profiles is an important tool for implementing a personalized approach to diagnosis, evaluation of activity, course and clinical and immunologic subtypes of SLE.*

**Key words:** *systemic lupus erythematosus; antinuclear antibodies; multiplex immune assay; clinical significance.*

**For citation:** *Aleksandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Panafidina T.A., Popkova T.V., Lukina G.V. Clinical value of multiplex immune assay of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63(7): 434-438 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-434-438>*

**For correspondence:** *Aleksandrova E.N., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory for the diagnosis of autoimmune diseases; e-mail: [aleksandrovaen2015@yandex.ru](mailto:aleksandrovaen2015@yandex.ru)*

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

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

Received 11.04.2018  
Accepted 24.04.2018

**Введение.** Антиядерные антитела (АНА) – гетерогенная группа аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и цитоплазмы [1]. АНА служат основным лабораторным критерием диагностики системных аутоиммунных заболеваний, в том числе системной красной волчанки (СКВ) [2–10]. В сыворотках больных СКВ идентифицируют широкий спектр АНА: антитела к двухспиральной ДНК (дсДНК), гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (ЭЯА) (Sm, U1-рибонуклеопротеину – РНП, Ro/SS-A, La/SS-B, рибосомальному белку Р – RibP), ядрышковым антигенам и другим клеточным структурам [1, 2]. Перспективным направлением лабораторной диагностики СКВ является мультиплексный иммунный анализ (МИА) профилей АНА с использованием планарных и суспензионных биочипов [9, 11–13]. МИА АНА обладает высокой аналитической чувствительностью и возможностью одновременного определения большого количества различных антител к ядерным/цитоплазматическим антигенам в сыворотках крови больных СКВ, что создаёт предпосылки для реализации персонализированного подхода к ранней диагностике, оценке активности, субтипов, прогноза и эффективности терапии данного многофакторного и клинически гетерогенного заболевания [12–16]. Вместе с тем клиническая информативность МИА антиген-специфических АНА при СКВ менее изучена по сравнению с классическими моноплексными методами их исследования (иммуоферментным анализом – ИФА, иммуноблотом – ИБ, хемилюминесцентным иммунным анализом – ХЛИА) и нуждается в уточнении [9, 11–13, 16].

Цель работы – изучить диагностическое и прогностическое значение МИА профилей АНА при СКВ.

**Материал и методы.** Обследованы 94 пациента с достоверным диагнозом СКВ (критерии SLICC 2012 г.) [6] (в том числе 80 женщин и 14 мужчин) в возрасте 35,9 (16,0–65,0) года с длительностью заболевания 113,5 (2,0–576,0) мес, наблюдавшихся в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в 2014–2016 гг. У большинства (61%) пациентов отмечался хронический вариант течения СКВ. Активность заболевания по шкале SLEDAI-2K составляла 9,7 (0–40) балла, индекс повреждения SLICC/ACR Damage Index соответствовал 1,6 (0–18) балла. Большая часть (97%) больных СКВ были серопозитивными по антиядерному фактору в непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ) с

использованием клеток линии HEp-2 (НРИФ-HEp-2). В группу сравнения вошли 70 больных: 10 – с синдромом Шегрена, 16 – с системной склеродермией, 10 – с ревматоидным артритом, 14 – с полимиозитом и дерматомиозитом, 10 – с анкилозирующим спондилитом, 10 – с остеоартритом. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Образцы сывороток крови хранились при температуре -70°C.

Одновременное определение профилей АНА (антител к дсДНК, антигенам Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, нуклеосомам, RibP и РНП-70) в сыворотке крови осуществляли методом МИА на биочипах с использованием полистироловых микросфер (технология xMAP) («BioPlex® 2200 ANA Screen, Laboratories Inc. Hercules», США). Позитивные результаты измерения антител к дсДНК соответствовали значениям  $\geq 10,0$  МЕ/мл, других разновидностей АНА  $\geq 1,0$  ЕД.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft», США). Результаты представлены в виде медианы (*Me*) с интерквартильным размахом между 25–75 процентилями. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Оценку диагностического значения исследования АНА методом МИА осуществляли путём расчёта диагностической чувствительности и специфичности (ДЧ и ДС), отношения правдоподобия специфического и отрицательного результата теста (ОППР и ОПОР). Согласно рекомендациям Американской коллегии ревматологов (ACR), наиболее полезными для диагностики заболевания считались лабораторные тесты с ОППР  $> 5,0$  и ОПОР  $< 0,2$ ; полезными - с ОППР  $> 2,0$  и  $\leq 5,0$  и ОПОР  $> 0,2$  и  $\leq 0,5$ ; не имеющими пользы - с ОППР  $\leq 2,0$  и ОПОР  $> 0,5$  [17].

**Результаты.** МИА антигенспецифических АНА показал, что антитела к дсДНК, Sm и RibP имеют высокую ДС (95-99%) и ОППР ( $> 5,0$ ), то есть являются наиболее полезными диагностическими тестами, а антитела к РНП-70, SS-A/Ro и нуклеосомам относятся к категории полезных тестов для диагностики СКВ (ДС 84-95%, ОППР  $> 2,0$ ) (табл. 1). МИА антител к SS-B/La не имел пользы в диагностике СКВ (ОППР  $< 2,0$ ).

У 79,8% больных СКВ выявлена какая-либо одна из субпопуляций АНА, у 28,7% – 2, у 15,9% – 3, у 10,6% – 4, у 5,3% – 5, у 1,1% – 6. Исследование одновременно 3-х и более субпопуляций АНА с помощью МИА повыша-

Таблица 1

**Диагностическое значение мультиплексного иммунного анализа субпопуляций антинуклеарных антител при СКВ**

АНА	ДЧ, %	ДС, %	ОППР	ОПОР
Антитела к дсДНК	52,0	95,0	10,40	0,51
Антитела к Sm	29,0	97,0	9,67	0,73
Антитела к нуклеосомам	54,0	87,0	4,15	0,52
Антитела к SS-A/Ro	37,0	84,0	2,31	0,75
Антитела к SS-B/La	12,0	90,0	1,20	0,98
Антитела к РНП-70	14,0	95,0	2,80	0,91
Антитела к RibP	15,0	99,0	15,00	0,86

Таблица 2

**Диагностическое значение мультиплексного иммунного анализа профилей антинуклеарных антител при СКВ**

Количество АНА	ДЧ, %	ДС, %	ОППР	ОПОР
1 АНА	79,8	70,0	2,66	0,29
2 АНА	28,7	90,0	2,87	0,79
3 АНА	15,9	98,0	7,95	0,86
4 АНА	10,6	100,0	∞	0,89
5 АНА	5,3	99,0	5,3	0,96
6 АНА	1,1	100,0	∞	0,99

ло ДС метода до 98–100%, а ОППР - до максимальных значений (табл. 2). Оценка прогностического значения МИА антиген-специфических АНА при СКВ включала исследование взаимосвязи профилей АНА с течением, активностью, тяжестью органного повреждения и клиническими субтипами заболевания. Наибольшее количество АНА (7 субпопуляций) обнаружено у больных с хроническим вариантом течения СКВ: антитела к дсДНК, Sm, нуклеосомам, SS-A/Ro, SS-B/La, РНП-70, RibP (табл. 3). При остром течении заболевания одновременно выявляли 4 субпопуляции АНА (антитела к дсДНК, Sm, нуклеосомам, SS-A/Ro), при подостром течении - 2 субпопуляции АНА (антитела к дсДНК и нуклеосомам).

Индекс активности заболевания SLEDAI-2K положительно коррелировал с концентрацией антител к дсДНК ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ), нуклеосомам ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ), RibP ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ) и Sm ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ). Не обнаружено достоверной взаимосвязи между продукцией АНА и индексом органного повреждения SLICC. Признаки поражения кожи и слизистых оболочек,

Таблица 3

**Частота обнаружения субпопуляций АНА в сыворотках больных СКВ (n = 94) методом мультиплексного иммунного анализа в зависимости от течения заболевания, %**

АНА	Течение заболевания		
	острое (n = 22)	подострое (n = 15)	хроническое (n = 57)
Антитела к дсДНК	77,3	53,3	57,9
Антитела к Sm	45,5	–	71,9
Антитела к нуклеосомам	72,7	46,7	50,9
Антитела к SS-A/Ro	40,9	–	61,4
Антитела к SS-B/La	–	–	84,2
Антитела к РНП-70	–	–	84,2
Антитела к RibP	–	–	82,5

чек, почек, ЦНС наиболее часто ассоциировались с обнаружением антител к дсДНК (53,2–64%), нуклеосомам (55,3–66%), SS-A/Ro (38,0–40,4%) и Sm (27,8–36,2%) (табл. 4).

**Обсуждение.** В настоящее время наиболее распространённым методом МИА АНА является суспензионная микрочиповая технология xMAP («Luminex», США) с использованием набора полистироловых микросфер, содержащих флуорофоры и покрытых различными ядерными антигенами [12, 13]. Международными рекомендациями 2013 г. допускается применение МИА как для скринингового, так и для подтверждающего исследования АНА [1]. Однако при скрининговом определении совокупности АНА суспензионные мультиплексные технологии в большинстве случаев демонстрируют более низкую ДЧ по сравнению с НРИФ-Нер-2, поскольку идентифицируют антитела к ограниченному количеству антигенов, что может приводить к появлению ложноотрицательных результатов в 10–20% случаев [9, 12, 18]. МИА и другие методы твёрдофазного анализа (ИФА, ИБ, ХЛИА) рекомендуется использовать в качестве подтверждающих рефлекс-тестов, позволяющих определять разновидности антигенспецифических АНА (антитела к дсДНК, Sm, нуклеосомам, SS-A/Ro, SS-B/La, РНП-70, RibP) у больных СКВ с положительными результатами НРИФ-Нер-2 [1, 2, 8, 11, 19]. Имеющиеся в литературе результаты оценки диагностического значения суспензионных технологий МИА субпопуляций АНА при СКВ варьируют в зависимости от особенностей тест-систем (биочипов, антигенов), верхнего предела референтного интервала и подбора групп больных (табл. 5) [12, 20–25].

Исходя из средних рангов ОППР, наиболее полезным для диагностики СКВ был МИА антител к дсДНК, Sm, нуклеосомам и RibP (ОППР > 5,0), полезным - МИА антител к SS-A/Ro, SS-B/La и РНП-70 (ОППР > 2,0 и ≤ 5,0). По нашим данным, ранг ОППР МИА антител к нуклеосомам был ниже, чем таковой у зарубежных авторов [24], а МИА антител к SS-B/La оказался неэффективным тестом при диагностировании СКВ. Одновременное определение профиля из 3 и более АНА методом МИА с использованием суспензионных биочипов показало высокую ДС и ОППР для диагностики СКВ, что совпадает с результатами К. Ор де Вееск и соавт. [24]. В литературе отсутствуют

Таблица 4

**Частота обнаружения субпопуляций АНА в сыворотках больных СКВ (n = 94) методом МИА в зависимости от клинических признаков заболевания, %**

АНА	Клинические проявления		
	поражение кожи и слизистых (n = 44)	поражение почек (n = 50)	поражение ЦНС (n = 18)
Антитела к дсДНК	59,1	64,0	61,1
Антитела к Sm	31,8	36,0	27,8
Антитела к нуклеосомам	56,8	66,0	61,1
Антитела к SS-A/Ro	43,2	38,0	38,9
Антитела к SS-B/La	13,6	4,0	11,1
Антитела к РНП-70	13,6	18,0	11,1
Антитела к RibP	15,9	14,0	11,1

Таблица 5

Сравнение диагностического значения коммерческих тест-систем для МИА субпопуляций АНА на основе суспензионных микрочипов при СКВ (данные литературы)

АНА	Номер ссылки	n	Тест-система	ДЧ, %	ДС, %	ОППР	ОПОР	
Антитела к дсДНК	[20]	332	B	25,3	нд	нд	нд	
	[21]	185	A	18,0	93,6	2,84	0,88	
	[22]	192	B	31,8	нд	нд	нд	
	[23]	64	BMD	23,0	нд	нд	нд	
			I	15,0	нд	нд	нд	
			A	34,0	нд	нд	нд	
	[24]	80	B	40,0	97,4	15,4	0,62	
	[25]	174	CB	58,0	89,8	5,69	0,47	
	Антитела к Sm	[20]	332	B	14,8	нд	нд	нд
		[21]	185	A	9,0	93,2	1,32	0,98
[22]		192	B	16,7	нд	нд	нд	
			I	26,6	нд	нд	нд	
[23]		64	BMD	9,0	нд	нд	нд	
			I	11,0	нд	нд	нд	
			A	23,0	нд	нд	нд	
[24]		80	B	11,0	97,7	4,78	0,91	
[25]		174	CB	20,1	96,4	5,58	0,83	
Антитела к нуклеосомам		[20]	332	B	36,7	нд	нд	нд
	[24]	80	B	43,0	96,1	11,03	0,59	
Антитела к SS-A/Ro	[21]	185	A	51,0	68,0	1,59	0,72	
	[22]	192	B	38,0	нд	нд	нд	
			I	37,5	нд	нд	нд	
	[23]	64	BMD	22,0	нд	нд	нд	
			I	22,0	нд	нд	нд	
			A	18,0	нд	нд	нд	
	[24]	80	B	51,0	91,8	6,21	0,53	
[25]	174	CB	45,4	78,0	2,06	0,7		
Антитела к SS-B/La	[21]	185	A	10,0	81,8	0,55	1,10	
	[22]	192	B	23,4	нд	нд	нд	
			I	16,1	нд	нд	нд	
	[23]	64	BMD	5,0	нд	нд	нд	
			I	3,0	нд	нд	нд	
			A	11,0	нд	нд	нд	
	[24]	80	B	23,0	94,0	3,83	0,82	
[25]	174	CB	17,2	92,2	2,21	0,9		
Антитела к РНП-70	[21]	185	A	15,0	79,9	0,75	1,06	
	[22]	192	B	24,0	нд	нд	нд	
			I	29,1	нд	нд	нд	
	[23]	64	BMD	30,0	нд	нд	нд	
			I	23,0	нд	нд	нд	
			A	35,0	нд	нд	нд	
[24]	80	B	19,0	95,0	3,8	0,85		
Антитела к RibP	[20]	332	B	9,0	нд	нд	нд	
	[24]	80	B	11,0	99,8	55,0	0,89	

Примечание. B – BioPlex 2200 ANA Screen («Laboratories Inc. Hercules», США); A – Athena Multi-Lyte Anti-Nuclear Antibodies (ANA) («ZEUS», США); BMD – Biomedical Diagnostics, FIDIS Connective 10 («Theradiag», Франция); I – INOVA, QUANTA Plex ENA8 («INOVA Diagnostics, Inc.», США); CB – CytoBead ANA («GA Generic Assays GmbH», Германия); n – число больных СКВ; нд – нет данных.

сведения о связи МИА антигенспецифических АНА с вариантом течения СКВ. Наиболее широкий профиль, включавший 7 субпопуляций АНА (антитела к дсДНК, Sm, нуклеосомам, SS-A/Ro, SS-B/La, РНП-70, RibP), выявлен нами при хроническом течении СКВ. Профили из 4 (антитела к дсДНК, Sm, нуклеосомам, SS-A/Ro) и 2 (антитела к дсДНК и нуклеосомам) субпопуляций АНА ассоциировались с острым и подострым течением СКВ соответственно. При

МИА антигенспецифических АНА наблюдалась положительная корреляция сывороточных уровней антител к дсДНК, нуклеосомам, Sm и RibP с активностью заболевания по индексу SLEDAI-2K; достоверной взаимосвязи между концентрацией различных АНА и кумулятивным индексом органного повреждения SLICC не обнаружено. J.G. Hanly и соавт. [22] провели сравнительное изучение клинической информативности 3 различных методов МИА АНА у больных СКВ и получили сходные с нашими данные о связи уровней антител к дсДНК, нуклеосомам, Sm, РНП-70 с активностью патологического процесса и об отсутствии корреляции профилей АНА с тяжестью органного повреждения. G. Zandman-Goddard и соавт. [26] выявили положительную корреляцию активности СКВ с концентрацией антител к SS-A/Ro и количеством субпопуляций АНА, идентифицированных у пациента методом МИА. Профилирование АНА в сыворотках 1540 больных СКВ с использованием суспензионной микрочиповой технологии позволило В.Ф. Bruner и соавт. [27] выделить 3 основных кластера аутоантител: 1) антитела к 60kDRo, 52kDRo и La; 2) антитела к Sm, Sm/RNP, nRNPA, nRNP 68; 3) антитела к дсДНК, нуклеосомам и RibP. Установлено, что данные кластеры АНА могут различаться в зависимости от расовой принадлежности пациентов, однако их связь с клиническими субтипами СКВ мало изучена. В нашем исследовании поражение кожи и слизистых оболочек, почек и ЦНС у больных СКВ тесно ассоциировалось с профилем АНА, включавшим антитела к дсДНК, нуклеосомам, SS-A/Ro и Sm.

**Заключение.** Таким образом, МИА профилей АНА является важным инструментом для реализации персонализированного подхода к диагностике, оценке активности, характера течения и клинико-иммунологических субтипов СКВ.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–17, 19–27 см. REFERENCES)

- Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Российские клинические рекомендации. Ревматология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017: 300–18.
- Верижникова Ж.Г., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Панафидина Т.А., Середавкина Н.В., Попкова Т.В., Айзина Н.Л., Насонов Е.Л. Клиническая информативность автоматизированных методов скринингового определения антинуклеарных антител с использованием непрямой реакции иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и мультиплексной технологии ХМАР при системной красной волчанке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(3):173-7.

REFERENCES

- Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M. et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73 (1): 17–23.

2. Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases. In Nasonov E.L., ed. *Russian Clinical Guidelines. Rheumatology. [Rossiyskie klinicheskie rekomendatsii. Revmatologiya.]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2017: 300-18. (in Russian)
3. Solomon D.H., Kavanaugh A.J., Schur P.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002; 47 (4): 434-44.
4. Kavanaugh A.F., Solomon D.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 546-55.
5. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124 (1): 71-81.
6. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (8): 2677-86.
7. Tozzoli R., Bizzaro N., Tonutti E., Villalta D., Bassetti D., Manoni F. et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117: 316-24.
8. Meroni P.L., Biggoggero M., Pierangeli S.S., Sheldon J., Zegers I., Borghi M.O. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014;10(1): 35-43.
9. Mahler M., Meroni P.L., Bossuyt X., Fritzler M.J. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 315179.
10. Cozzani E., Drosera M., Gasparini G., Parodi A. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014:321359.
11. Tozzoli R., Bonaguri C., Melegari A., Antico A., Bassetti D., Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51:129-38.
12. Satoh M., Tanaka S., Chan E.K.L. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.* 2015; 6: 181.
13. Olsen N.J., Choi M.Y., Fritzler M.J. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2017; 19(1): 172.
14. Zhu H., Luo H., Yan M., Zuo X., Li Q.Z. Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(4): 210-8.
15. Wang L., Mohan C., Li Q.Z. Arraying autoantibodies in SLE - Lessons Learned. *Curr. Mol. Med.* 2015; 15(5): 456-61.
16. Pisetsky D.S. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(8): 495-502.
17. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 429-33.
18. Verizhnikova Zh.G., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Panafidina T.A., Seredavkina N.V., Popkova T.V. et al. Comparison of indirect immunofluorescence on HEp-2 cells, enzyme-linked immunosorbent assay and multiplex bead-based immunoassay for detection of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2017;62(3):173-7. (in Russian)
19. Tonutti E., Bizzaro N., Morozzi G., Radice A., Cinquanta L., Villalta D. et al. Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. *Auto Immun. Highlights.* 2016 D;7(1):9.
20. Moder K.G., Wener M.H., Weisman M.H., Ishimori M.L., Wallace D.J., Buckeridge D.L. et al. Measurement of antinuclear antibodies by multiplex immunoassay: a prospective, multicenter clinical evaluation. *J. Rheumatol.* 2007; 34 (5): 978-86.
21. Avaniss-Aghajani E., Berzon S., Sarkissian A. Clinical value of multiplexed bead-based immunoassays for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007;14(5): 505-9.
22. Hanly J.G., Su L., Farewell V., Fritzler M.J. Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol Methods.* 2010; 358(1-2):75-80.
23. Copple S.S., Martins T.B., Masterson C., Joly E., Hill H.R. Comparison of three multiplex immunoassays for detection of antibodies to extractable nuclear antibodies using clinically defined sera. *Ann. N. Acad. Sci.* 2007;1109: 464-72.
24. Op De Beeck K., Vermeersch P., Verschuerec P., Westhoven R., Marien G., Blockmans D. et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun. Rev.* 2012; 12 (2): 137-43.
25. Scholz J., Grossmann K., Knütter I., Hiemann R., Sowa M., Röber N. et al. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (12): 1991-2002.
26. Zandman-Goddard G., Gilburd B., Shovman O., Blank M., Berdichevski S., Langevitz P., Shoenfeld Y. The homogeneous multiplexed system-a new method for autoantibody profile in systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* 2005;12(2):107-11.
27. Bruner B.F., Guthridge J.M., Lu R., Vidal G., Kelly J.A., Robertson J.M. et al. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (11): 3677-86.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-008.331.1-055.1:575:576.3.08

Чукаева И.И.<sup>1</sup>, Ганковская Л.В.<sup>1</sup>, Орлова Н.В.<sup>1</sup>, Хавка Н.Н.<sup>2</sup>, Горяйнова С.В.<sup>1</sup>, Хорева М.В.<sup>1</sup>, Спирыкина Я.Г.<sup>1</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У МУЖЧИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Центральная медико-санитарная часть МВД России», 123060, Москва, Россия

Существующие гендерные различия влияния факторов риска на развитие сердечно-сосудистых заболеваний обуславливают необходимость изучения патогенетических причин этих особенностей. Воспалительные реакции являются одним из механизмов участия факторов риска в развитии артериальной гипертензии. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи маркеров системного воспаления с артериальной гипертензией и факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин. В исследование включены 60 мужчин с артериальной гипертензией, которые были разделены на группы в зависимости от риска сердечно-сосудистых событий: 30 мужчин с низким риском и 30 мужчин с высоким риском. Также были обследованы 86 пациентов с артериальной гипертензией и такими факторами риска, как ожирение, нарушение углеводного и липидного обмена. Проводилось исследование биохимических показателей и широкого спектра цитокинов: интерлейкина (IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, трансформирующего ростового фактора бета (TGFβ), фактора некроза опухоли альфа (TNFα), интерферона-γ (IFN-γ). Полученные результаты сопоставлялись с данными эхокардиографии (ЭхоКГ), суточного мониторинга артериального давления (СМАД), дуплексного сканирования сонных артерий. Была выявлена прямая связь наличия факторов риска и поражения органов мишеней – гипертрофии левого желудочка, увеличения комплекса интима-медиа, а также зависимость цитокинового профиля от степени риска сердечно-сосудистых событий у мужчин. Был изучен вклад отдельных факторов риска у мужчин в развитие артериальной гипертензии и выраженность воспаления. Более выраженные изменения цитокинового профиля наблюдались у пациентов с сопутствующей гипергликемией, ожирением и дислипидемией. Также выявлена взаимосвязь цитокинового профиля с длительностью артериальной гипертензии. Корреляционный анализ выявил взаимосвязь показателей СМАД с уровнем интерлейкинов, С-реактивного белка, фибриногена. Показатели маркеров воспаления связаны с выраженностью висцерального ожирения, с индексом массы тела. Анализ результатов также показал наличие взаимосвязи гиперинсулинемии и инсулинорезистентности с воспалительными показателями. У мужчин в группе больных артериальной гипертензией наиболее выражено прослеживались взаимосвязи воспаления с показателями липидного обмена, чем с другими исследуемыми факторами риска.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; факторы риска; риск сердечно-сосудистых событий; гендерные различия; интерлейкины; инсулинорезистентность.

Для цитирования: Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Орлова Н.В., Хавка Н.Н., Горяйнова С.В., Хорева М.В., Спирыкина Я.Г. Изучение цитокинового профиля у мужчин с артериальной гипертензией. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 439-444. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-439-444>

Chukaeva I.I.<sup>1</sup>, Gankovskaya L.V.<sup>1</sup>, Orlova N.V.<sup>1</sup>, Havka N.N.<sup>2</sup>, Goryaynova S.V.<sup>1</sup>, Khoreva M.V.<sup>1</sup>, Spiryakina Ya.G.<sup>1</sup>

### STUDY OF CYTOKINE PROFILE IN MEN WITH HYPERTENSION

<sup>1</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>The central medical unit of the Ministry of internal Affairs of Russia, 123060, Moscow, Russia

Gender differences in the risk factors' influence on the development of cardiovascular diseases determine the study of the pathogenetic causes of these features. Inflammatory is one of the mechanisms for the participation of risk factors in the development of hypertension. The aim of the study was to investigate the relationship between inflammatory biomarkers with hypertension and cardiovascular risk factors in men. The study included 60 men with hypertension who were divided into groups depending on the risk of cardiovascular events: 30 men with low risk and 30 men with high risk. 86 hypertensive patients with risk factors such as obesity, impaired glucose metabolism, impaired lipid metabolism also were examined. Biochemical parameters and a wide range of cytokines: IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, TGF-β, TNF-α, IFN-γ were estimated. The obtained results were compared with echocardiographic (EchoCG), ambulatory blood pressure monitoring (ABPM), duplex scanning of the carotid arteries. A direct correlation between the risk factors and target organs' damage – left ventricular hypertrophy, increased intima-media complex thickness, was revealed. The dependence of cytokine profile from risk of cardiovascular events in men was also revealed. We studied the contribution of individual risk factors in men in the development of hypertension and the severity of inflammation. More significant changes in the cytokine profile observed in patients with concomitant hyperglycemia, obesity and dyslipidemia. A correlation between cytokine profile and duration of hypertension also revealed. Correlation analysis revealed the relationship between ABPM parameters and levels of interleukins, HS-CRP, and fibrinogen. Biomarkers of inflammation associated with the severity of visceral obesity, with a BMI. Analysis of results also showed the relationship between hyperinsulinemia or insulin resistance and inflammatory biomarkers. The relationship of inflammation with lipid metabolism in hypertensive men was more significant than with the other studied risk factors.

Key words: hypertension; risk factors; risk of cardiovascular events; gender differences; interleukins; insulin resistance.

Для корреспонденции: Орлова Наталья Васильевна, д-р мед. наук, проф. кафедры поликлинической терапии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова; e-mail: vrach315@yandex.ru

**For citation:** [Chukaeva I.I.] Gankovskaya L.V., Orlova N.V., Havka N.N., Goryaynova S.V., Khoreva M.V., Spiryakina Ya.G. Study of cytokine profile in men with hypertension. 2018; 63 (7): 439-444 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-439-444>

**For correspondence:** Orlova N.V., Doctor of Medical Sciences, Professor of Outpatient Therapy Department, Pirogov Russian National Research Medical University; e-mail: [vrach315@yandex.ru](mailto:vrach315@yandex.ru)

**Information about authors:**

Gankovskaya L.V., <https://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Havka N.N., <https://orcid.org/0000-0002-6884-2306>

Khoreva M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9305-8679>

Orlova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4293-3285>

Goryaynova S.V., <https://orcid.org/0000-0001-8506-1723>

Spiryakina Ya.G., <https://orcid.org/0000-0002-1006-4118>

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

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

Received 05.03.2018

Accepted 02.04.2018

Высокая распространённость сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) определяет необходимость изучения патогенетических механизмов влияния факторов риска на их развитие. В то же время существуют особенности влияния факторов риска на развитие заболеваний у мужчин и женщин. Гендерные различия в развитии ССЗ связывают с особенностями метаболизма и активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, различиями структурно-функциональных параметров почек и развития гипертрофии миокарда левого желудочка (ЛЖ), а также с наличием у женщин такого фактора риска ССЗ, как менопауза [1]. Для женщин наиболее значимым фактором риска ССЗ является ожирение. Если у мужчин увеличение индекса массы тела (ИМТ) на  $1 \text{ кг/м}^2$  ассоциировано с увеличением риска сердечной недостаточности на 5%, то у женщин по данным Фрамингемского исследования – на 7%. [2]. Кроме того, на фоне артериальной гипертензии (АГ) у женщин, в отличие от мужчин, чаще наблюдается развитие диастолической дисфункции с сохранённой фракцией выброса ЛЖ. Гендерные и возрастные различия выявлены также и в липидном обмене. В период постменопаузы при уменьшении концентрации эстрогенов у женщин наблюдается изменение липидного профиля: снижение липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и повышение уровня холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [3]. С постменопаузальным периодом связывают увеличение встречаемости гиперурикемии, которая также является предиктором развития как АГ, так и других ССЗ [4].

По результатам исследования ЭПОХА-2007 было сделано предположение, что преимущественный риск развития АГ в молодом возрасте у мужчин обусловлен более высоким распространением факторов риска и часто наличием нескольких факторов риска ССЗ у мужчин в сравнении с женщинами. В свою очередь увеличение распространённости АГ среди женщин пожилого возраста связывают с более высокой продолжительностью жизни женского населения и низким риском общей смертности. Другие исследования показали, что с наступлением менопаузы сочетание нескольких факторов риска ССЗ среди женщин встречается чаще, чем среди мужчин [5]. Факторы риска развития ССЗ у мужчин имеют свои отличительные особенности. Это значительные физические и умственные нагрузки, большее распространение курения и употребления алкоголя среди мужчин, гиподинамия, апноэ сна. Имеют место и особенности течения гипертензии. Эректильная дисфункция, встречающаяся у 37% гипертоников, рассматривается как проявление

поражения органов-мишеней. У мужчин гипертензия часто развивается в молодом возрасте, в 30–35 лет, при этом мужчины менее привержены лечению, что приводит как к поздней диагностике, так и к снижению эффективности лечения.

В патогенезе гипертензии и других ССЗ значимая роль отводится иммунопатогенетическим механизмам. Изменения функций иммунной системы на уровне как гуморального, так и клеточного иммунитета, а также сдвиг воспалительных медиаторов в сторону воспаления являются ответственными за развитие гипертензии [6]. В то же время гендерные различия преобладания факторов риска и связанной с ними регуляции артериального давления (АД) предполагают особенности цитокиновых реакций при данной нозологии, что подтверждается рядом исследований [7].

Цель исследования – изучить взаимосвязь маркёров системного воспаления с АГ и факторами риска ССЗ у мужчин.

**Материал и методы.** Было обследовано 60 мужчин с АГ в поликлинике ГКБ №13 г. Москвы. Их разделили на две равные группы: в 1-ю включены пациенты с АГ с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений (ССО), во 2-ю – с низким сердечно-сосудистым риском. 15 здоровых мужчин составили группу контроля. Также было обследовано 86 мужчин с АГ на базе Медицинского центра при Спецстрое России. Пациенты были разделены на две группы: в 3-ю группу включён 31 мужчина с сахарным диабетом (СД) и нарушениями толерантности к углеводам (НТУ), в 4-ю – 55 мужчин без нарушений углеводного обмена. Стратификация сердечно-сосудистого риска проводилась на основании шкалы, представленной в рекомендациях, утверждённых Российским медицинским обществом по артериальной гипертензии.

В исследование не включались пациенты, перенёсшие острые нарушения коронарного и/или мозгового кровообращения, пациенты с положительным нагрузочным тестом, с симптоматической АГ, злокачественными новообразованиями, системными заболеваниями, заболеваниями почек, вторичным ожирением (эндокринное, гипоталамическое, ятрогенное), с обострением хронических заболеваний на момент обследования.

Исследования проводились в лаборатории ГКБ №13, лаборатории Медицинского центра при Спецстрое России, на кафедре иммунологии Медико-биологического факультета РНИМУ им Н.И. Пирогова.

Всем пациентам проводились: клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (общий белок, мочевины, креатинин, мочевины

Таблица 1

**Показатели ЭхоКГ в группах больных АГ с высоким и низким риском ССО**

Показатель	1-я группа, высокий риск (n = 30)	2-я группа, низкий риск (n = 30)	p
ФВ, %	61,5 (58,0–68,0)	66,0 (59,0–70,0)	0,14
ММЛЖ, г	220 (178–256)	191 (169–205)	< 0,05
Правая ОСА, мм	0,90 (0,80–0,97)	0,73 (0,70–0,80)	< 0,01
Левая ОСА, мм	0,90 (0,80–0,96)	0,75 (0,70–0,80)	< 0,01

Примечание. ФВ – фракция выброса; ОСА – общая сонная артерия.

кислота, глюкоза, билирубин общий и прямой, гамма-глутамилтранспептидаза, креатинфосфокиназа, лактатдегидрогеназа, калий, натрий, хлор, холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, липопротеиды очень низкой плотности, С-реактивный белок (СРБ). Биохимические исследования проводились на автоматических биохимических анализаторах Hitachi-902, 912 (Roche Diagnostics, Япония). Для выявления нарушений углеводного обмена определяли гликемию натощак, уровень гликированного гемоглобина. В случаях обнаружения (или наличия в анамнезе) пограничных значений гликемии натощак, проводился глюкозотолерантный тест. Для оценки действия инсулина рассчитывали индекс Саго – концентрация глюкозы в крови (в моль/л)/концентрация инсулина (в мкМЕ/мл) натощак. Значение индекса менее 0,33 считали косвенным признаком наличия инсулинорезистентности (ИР).

Определение цитокинов (IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, TGFβ, TNFα, IFN-γ) проводилось методом твёрдофазного иммуноферментного анализа. Использовались наборы реактивов для иммуноферментного анализа цитокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, IFN-γ) человека фирмы «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). Для определения IL-6, IL-18 использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа фирмы «Вектор-Бест» (Россия), для определения концентрации IL-17 – наборы фирмы «e-Biosciences» (США).

Принцип работы набора: в наборах использовались «сэндвич»-варианты твёрдофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта используются два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к исследуемому IL. Одно из них иммобилизовано на твёрдой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с биотином. На первой стадии анализа IL, содержащийся в калибровочных и исследуемых пробах, связывается с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованный IL взаимодействует с конъюгатом вторых антител – биотином. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству IL в исследуемом образце. На последней стадии анализа в лунки вносят авидин-пероксидазу. Во время инкубации с субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся меченых антител. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация IL в определяемых образцах.

Клиническое обследование пациентов включало сбор анамнеза, физикальный осмотр (общий осмотр пациента), антропометрическое исследование, измерение АД. Обследование пациентов проводилось двукратно с перерывом 6 мес.

Антропометрическое исследование включало определение роста (в м), массы тела (в кг), измерение окружности талии (в см), вычисление ИМТ (в кг/м<sup>2</sup>). Массу тела определяли натощак без обуви, в нижнем белье, на стандартизированных весах. ИМТ рассчитывался как частное от деления массы тела (в кг) на рост в квадрате (в м<sup>2</sup>). Окружность талии измеряли в положении

стоя, на пациенте только нижнее бельё. Мерная лента держалась горизонтально, на середине расстояния между вершиной гребня подвздошной кости и нижним боковым краем ребёр.

АГ диагностировали при измерении офисного и клинического АД по методу Короткова. АД измеряли в положении сидя, рука на столе, манжета накладывалась на плечо на уровне сердца. АД исследовалось в покое после 10-минутного отдыха, двукратно, с интервалом 2 мин. За регистрируемое значение принималось среднее из двух измерений.

Для более объективной оценки АД проводилось суточное мониторирование АД (СМАД), позволяющее учитывать суточную вариабельность АД. Исследование проводилось на амбулаторном рекодере кровяного давления RZ-250. Измерения проводились с интервалом 15 мин днём и 30 мин ночью в течение 24–25 ч. Нами оценивались следующие показатели: средние значения АД систолического и диастолического (САД и ДАД), показатели нагрузки давлением (индекс времени); индекс измерений и индекс площадей использовались для количественной оценки эпизодов повышения АД. Учитывались максимальные и минимальные значения САД и ДАД. Для определения периодов сна и бодрствования пациенты заполняли дневник.

В процессе исследования использовался наиболее распространённый и высокоточный метод неинвазивной диагностики ССЗ – эхокардиография (ЭхоКГ). Данное исследование проводилось для оценки как анатомии, так и функции ЛЖ. ЭхоКГ проводилась на аппарате

Таблица 2

**Уровень цитокинов у больных АГ с высоким и низким уровнем риска ССО**

IL, пг/мл	1-я группа, высокий риск ССО (n = 31)	2-я группа, низкий риск ССО (n = 55)	Контроль (n = 15)	p
IL-6	1,16 (0,48–2,51)	1,55 (0,68–2,70)	0,0 (0,0–10,41)	$p_{1-2} = 0,46$ $p_{1-к} = 0,32$ $p_{2-к} = 0,39$
IL-10	4,92* (2,95–6,45)	5,18* (3,64–7,35)	6,63 (5,72–9,52)	$p_{1-2} = 0,31$ $p_{1-к} = 0,046$ $p_{2-к} = 0,005$
IL-17	0	0	0	
IL-18	211,11 (71,45–334,89)	205,13 (74,0–299,71)	167,35 (147,62–290,74)	$p_{1-2} = 0,89$ $p_{1-к} > 0,06$ $p_{2-к} = 0,99$
TNFα	4,45 (1,39–9,72)	3,33 (1,67–10,28)	1,67 (0,56–3,05)	$p_{1-2} = 0,96$ $p_{1-к} = 0,12$ $p_{2-к} = 0,07$

Примечание. \* –  $p < 0,05$  для различий с группой контроля(к).

Таблица 3

**Размеры ЛП и ММЛЖ у больных АГ с нарушением углеводного обмена**

Показатель	3-я группа (n = 31)	4-я группа (n = 55)	p
ЛП, см	4,1 (3,85–4,25)	4,01 (3,8–4,22)	> 0,05
ММЛЖ, г	245 (223–264)	237,8 (208–245)	< 0,05

Таблица 4

**Уровень провоспалительных цитокинов у больных АГ с нарушением углеводного обмена**

Цитокины, пг/мл	3-я группа	4-я группа	p
IL-6	1,6 (1,4–1,8)	1,3 (1,1–1,53)	> 0,05
IL-8	25,9 (21,2–32,4)	49,3(39,2–58,2)	< 0,05
TNF $\alpha$	3,9 (3,1–4,7)	2,06 (1,7–2,3)	< 0,05

Таблица 5

**Уровень противовоспалительных цитокинов у больных АГ с нарушением углеводного обмена**

Цитокины, пг/мл	3-я группа	4-я группа	p
IL-4	6,0 (4,5–7,2)	9,4 (6,8–11,6)	0,05
IL-10	3,74 (2,65–4,68)	10,8 (8,14–13,56)	< 0,05
TGF $\beta$	13,2 (12,1–14,4)	14,97 (14,4–15,2)	0,05

«LOGIQTM-400» (США), датчик 3,25 мГц по стандартной методике с использованием рекомендаций Американского эхокардиографического общества.

Для выявления субклинического атеросклеротического поражения сосудистой стенки пациентам проводилось дуплексное сканирование сонных артерий (СА) на ультразвуковой системе «LOGIQTM-400» (США) линейным датчиком с частотой излучения 7 МГц. Определялась толщина комплекса интима–медиа (КИМ) СА в трёх точках: 10 мм до луковички СА, 10 мм от входа в луковичку и 10 мм после бифуркации – на уровне внутренней СА.

Электронная база данных обследуемых пациентов составлена в формате Microsoft Excel 2003. Результаты исследования обработаны с использованием комплексной системы анализа данных (пакета прикладных программ для научно-технических расчётов) STATISTICA 8.0. Данные представлены в виде М (медиана), 25% процентиль – 75% процентиль. Для оценки достоверности различий между двумя группами использовались критерии Манна – Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Зависимость между разными показателями определяли путём регрессионного и корреляционного анализа. Сила связей оценивалась по критерию ранговой корреляции Спирмена: сильная при  $r = 0,7$  и более, средняя при  $r = 0,3–0,7$ , слабая при  $r = 0,3$  и менее. Направленность связей оценивалась по знаку коэффициентов корреляций.

**Результаты.** Сравнение показателей ЭхоКГ больных АГ с различным сердечно-сосудистым риском выявило достоверно значимое увеличение массы миокарда левого желудочка (ММЛЖ) у пациентов с высоким риском ССО. КИМ, измеренный на общих СА, достоверно выше у пациентов высокого риска ССО. Таким образом, выявлена прямая связь наличия факторов риска и поражения органов-мишеней в виде гипертрофии ЛЖ и ремоделирования сосудов (табл. 1).

При изучении показателей воспаления было выявлено,

что уровень IL-6 у пациентов с АГ низкого и высокого риска достоверно выше показателей контрольной группы. Уровень IL-10 составил 5,18 (3,64 – 7,35) пг/мл в группе пациентов низкого риска, 4,92 (2,95 – 6,45) пг/мл в группе пациентов высокого риска и 6,63 (5,72 – 9,52) пг/мл в контрольной группе; при этом концентрация IL-10 у пациентов с АГ независимо от степени риска была достоверно ниже, чем в контрольной группе. Уровень IL-18 у пациентов с АГ был выше, чем у здоровых, однако различия были статистически недостоверными. Разница уровня TNF $\alpha$  также не была достоверна (табл. 2).

Таким образом, у мужчин с АГ как низкого, так и высокого риска ССО уровень противовоспалительного IL-10 оказался достоверно ниже, чем в контрольной группе. Достоверных различий в уровнях воспалительных маркеров у мужчин с АГ и разным сердечно - сосудистым риском не получено.

Для оценки вклада углеводных нарушений в развитие АГ было проведено изучение поражения сердца по данным ЭхоКГ и показателей воспаления у пациентов с СД и нарушениями толерантности к углеводам.

При анализе данных ЭхоКГ пациентов с нарушенным углеводным обменом (3-я группа) гипертрофия миокарда ЛЖ была выявлена у 52% пациентов: 37% – концентрическая гипертрофия, 11% – эксцентрическая гипертрофия, 4% – асимметрическая гипертрофия миокарда ЛЖ. Нарушений систолической функции ЛЖ выявлено не было. Нарушения диастолической функции ЛЖ определялись у 39% пациентов. Дилатация левого предсердия (ЛП) имела у 43% пациентов (табл. 3).

При изучении показателей воспаления у больных с нарушениями углеводного обмена в сравнении с показателями пациентов без таковых в 3-й группе выявлен более высокий уровень СРБ 4,2 (2,2–6,5) мг/л и фибриногена 3,4 (2,4–4,2) ммоль/л. В 4-й группе (без нарушений углеводного обмена) соответственно 3,0 (1,8–5,8) мг/л и 3,1 (2,7–3,87) ммоль/л, однако различия не были статистически достоверными. При сопоставлении риска возможных ССО с уровнем СРБ [8] было выявлено преобладание пациентов 3-й группы (с углеводными нарушениями) среди больных с высоким риском ССО.

Уровень провоспалительного IL-6 у больных АГ без нарушений углеводного обмена не отличался достоверно от уровня IL-6 у пациентов с СД и НТУ. При анализе активности противовоспалительного IL-8 отмечались достоверно более низкие показатели цитокина в группе пациентов с сопутствующими СД 2-го типа и НТУ, достоверной разницы между уровнями IL-8 в подгруппах с СД 2-го типа и НТУ выявлено не было. В группе больных с нарушениями углеводного обмена отмечался достоверно более высокий уровень TNF $\alpha$ , при этом достоверной разницы между подгруппами с СД 2-го типа и НТУ по TNF $\alpha$  не выявлено (табл. 4).

При анализе уровня цитокинов выявлено, что у больных АГ с СД и НТУ уровень IL-4, IL-10, TGF $\beta$  ниже, чем в группе больных без нарушений углеводного обмена (достоверные отличия выявлены для IL-10 (табл. 5)).

Нами был проведён анализ влияния длительности АГ на маркеры воспаления. По длительности заболевания каждая из групп (с нарушением и без нарушения углеводного обмена) была разделена по анамнезу заболевания: до 5 лет и более 5 лет. У пациентов без нарушений углеводного обмена при длительности АГ менее 5 лет отмечались достоверно более низкие зна-

чения СРБ 2,9 (2,2–3,5) мг/мл в сравнении с больными АГ длительностью более 5 лет 5,35 (4,8–6,5) мг/мл. У больных с нарушениями углеводного обмена длительное течение АГ приводило к статистически более высокому показателю фибриногена 3,87 (3,4–4,2) ммоль/л в сравнении с АГ < 5 лет – 2,9 (2,4–3,2) ммоль/л. По другим показателям воспаления между группами больных с разной длительностью АГ достоверных различий не выявлено.

Для определения корреляционных связей с изучаемыми биохимическими и воспалительными показателями мы использовали результаты СМАД как наиболее тесно коррелирующие с поражением органов-мишеней [9]. Нами были выявлены следующие корреляции:

1. САД и висцеральная жировая ткань (ВЖТ) ( $r = 0,46, p < 0,07$ ),
2. САД и уровень глюкозы натощак ( $r = 0,48, p < 0,05$ ),
3. САД и С-пептид ( $r = 0,4, p < 0,06$ ),
4. САД и TNF $\alpha$  ( $r = 0,76, p < 0,02$ ) во 2-й группе,
5. САД и СРБ ( $r = 0,31, p < 0,02$ ),
6. ВУП (величина утреннего подъёма АД) и TNF $\alpha$  ( $r = 0,4, p < 0,05$ ).

Для оценки влияния степени ожирения на показатели воспаления пациенты были разделены на две группы с учётом ИМТ: группа с ИМТ < 34,9, группа с ИМТ  $\geq 35$ . Проведённый анализ выявил, что при увеличении степени ожирения в плазме крови повышается уровень фибриногена, СРБ и TNF $\alpha$ . Уровень провоспалительных IL-8 и IL-10 при увеличении массы тела снижается. Однако выявленные изменения не были статистически достоверными.

При проведении корреляционного анализа между изучаемыми показателями, отражающими жировой обмен и воспалительные показатели, были получены следующие данные:

1. ВЖТ и фибриноген ( $r = 0,4, p < 0,05$ ),
2. ВЖТ и IL-10 ( $r = -0,3, p < 0,09$ ).

У больных с АГ без нарушений углеводного обмена корреляционные взаимосвязи выявляются в меньшей степени, чем в общей группе пациентов и в основном связаны с массой тела пациентов:

1. ИМТ и TNF $\alpha$  ( $r = 0,4, p < 0,06$ ),
2. ИМТ и IL-4 ( $r = 0,4, p < 0,05$ ),
3. Общая жировая ткань и TNF $\alpha$  ( $r = 0,46, p < 0,06$ ),

При анализе взаимосвязи гиперинсулинемии и ИР с воспалительными показателями были получены следующие данные:

1. Инсулин натощак и СРБ ( $r = 0,44, p < 0,05$ ),
2. Индекс Саго и фибриноген ( $r = -0,6, p < 0,01$ ),
3. Индекс Саго и СРБ ( $r = -0,31, p < 0,17$ ),
4. Индекс Саго и IL-6 ( $r = -0,34, p < 0,17$ ),
5. Индекс Саго и TNF $\alpha$  ( $r = -0,33, p < 0,18$ ).

В группе больных АГ с нарушениями углеводного обмена взаимосвязи воспаления с показателями липидного обмена прослеживались наиболее выражено:

1. ЛПНП и IL-4 ( $r = 0,47, p < 0,05$ ),
2. ЛПНП и IL-8 ( $r = 0,45, p < 0,05$ ),
3. ЛПНП и TNF $\alpha$  ( $r = 0,39, p < 0,08$ ),
4. Индекс атерогенности и IL-8 ( $r = 0,48, p < 0,05$ ),
5. Индекс атерогенности и СРБ ( $r = 0,56, p < 0,01$ )

**Обсуждение.** Изучаемые нами факторы риска ССЗ – абдоминальное ожирение и нарушения углеводного обмена являются составляющими метаболического

синдрома, в основе развития которого значительная роль отводится ИР. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о влиянии ИР на активность показателей воспаления [10]. В связи с этим можно предположить, что полученные нами изменения исследуемых цитокинов напрямую связаны с ИР. Исследователями выявлена взаимосвязь ИР с ожирением и воспалительными реакциями [11]. Корреляционные связи ИР с IL у больных АГ, выявленные в нашем исследовании, подтверждают опосредованный механизм влияния факторов риска ожирения и нарушения толерантности к глюкозе на участие цитокиновых реакций в развитии АГ. В исследовании подтверждена взаимосвязь висцерального ожирения и воспаления у больных с АГ, что отражает корреляция уровня IL с ВЖТ. Таким образом, центральный тип ожирения, который характерен для мужчин, является существенным фактором риска развития АГ с участием системы воспаления [12]. Наиболее выраженная связь установлена на основании корреляции между показателями воспаления и нарушениями липидного обмена. Были выявлены положительные корреляционные связи индекса атерогенности и холестерина с ИР и тощачным инсулином и обратная корреляция с ЛПВП. Эти данные подтверждают закономерное развитие нарушений липидного обмена у мужчин с СД 2-го типа и другими нарушениями углеводного обмена. Полученные нами данные совпадали с результатами других исследователей, выявивших взаимосвязь нарушений углеводного и липидного обмена с развитием воспалительных реакций у больных ИБС и также подчеркивающих значительную роль ИР в данных процессах [13]. Роль ИР в развитии других ССЗ также активно изучается. С нарушениями углеводного обмена и ИР связывают фибрилляцию предсердий, причём отмечают гендерные различия в развитии ремоделирования миокарда [14]. Китайскими исследователями выявлена связь повышения уровня провоспалительных IL с развитием андрогенного дефицита, следствием чего являются метаболические нарушения и ранняя сердечно-сосудистая патология [15]. Аналогичные результаты получены и российскими учеными о связи ожирения со снижением уровня тестостерона и развитием ИБС [16].

Нами была выявлена достоверно более выраженная гипертрофия ЛЖ у мужчин с высоким сердечно-сосудистым риском. Безусловно, сочетание нескольких факторов риска, что характерно для мужчин, сопровождается повышенной активностью воспалительных реакций, развитием АГ с ранним поражением органов-мишеней, в том числе и функционально-анатомическим изменением сердца. Наличие нескольких факторов риска у мужчин приводит к раннему развитию АГ, которая может наблюдаться уже с 18 лет [17].

**Заключение.** Наличие множественных факторов риска сердечно-сосудистых событий у мужчин оказывает более значимое влияние на эндотелиальную дисфункцию и гипертрофию миокарда ЛЖ, чем единичные факторы риска. Степень подъёма АД и длительность АГ взаимосвязаны с выраженностью цитокиновых реакций. Выявлены корреляционные связи факторов риска с показателями АД, уровнем IL и ИР. У мужчин выявлено наибольшее число корреляционных связей уровня IL с показателями липидного профиля.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6, 8, 10-13, 15  
см. REFERENCES)

1. Нейфельд И.В., Бобылева И.В., Скупова И.Н. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у постменопаузальных женщин в зависимости от индекса массы тела. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2012; 2(12): 1001–3.
5. Скибицкий В.В. Факторы риска и структура кардиоваскулярной патологии у женщин в климаксе различного генеза. *Проблема женского здоровья*. 2007; 3(2): 21–8.
7. Радаева О.А., Симбирцев А.С. Гендерные особенности системы интерлейкина 1 у женщин с эссенциальной артериальной гипертензией. *Цитокины и воспаление*. 2014; 3(13): 31–7.
9. Чазова И.Е., Ощепкова Е.В., Жернакова Ю.В. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Клинические рекомендации. *Кардиологический вестник*. 2015; 1(X): 3–30.
14. Онучина Е.Л., Соловьев О.В., Онучин С.Г., Мочалова О.В., Поздняк А.О. Гендерные особенности развития фибрилляции предсердий у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. *Практическая медицина*. 2012; 65: 92–6.
16. Донцов А.В. Связь ожирения и андрогенного статуса у больных ишемической болезнью сердца. IX Международная (XVIII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2014; 2: 138.
17. Кривенко В.И., Пахомова С.П., Гриненко Т.Ю., Федорова Е.П., Непрядкина И.В., и др. Особенности артериальной гипертензии у мужчин призывного возраста. *Медицина неотложных состояний*. 2013; 2(49): 95–6.

#### REFERENCES

1. Neyfel'd I.V., Bobileva I.V., Skupova I.N. Risk factors for cardiovascular disease in postmenopausal women, depending on the body mass index. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2012; 2(12): 1001–3.
2. Castelli W.P., Anderson K., Wilson P.W., Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann. Epidemiol.* 1992; 2: 23–8.
3. Sharma A. M. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26(Suppl 4): 5–7.
4. Krishnan E. Hyperuricemia and incident heart failure. *Circ. Heart-Fail.* 2009; 2(6): 556–562.

5. Skibitskiy V.V. Risk factors and structure of cardiovascular pathology in women in menopause of various genesis. *Problemy zhenskogo zdorov'ya*. 2007; 3 (2): 21–8.
6. Bautista L.E., Veram L.M., Arenas I.A., Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-a) and essential hypertension. *J. Hum. Hypertension*. 2005; 19: 149–54.
7. Radaeva O.A., Simbirtsev A.S. Gender peculiarities of interleukin 1 system in women with essential hypertension. *Tsitokiny i vospalenie*. 2014; 3 (13): 31–7.
8. Ledue T., Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in CRP measurement implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin. Chem.* 2003; 49 (8): 1258–71.
9. Chazova I.E., Oshchepkova E.V., Zhernakova Yu.V. Diagnosis and treatment of hypertension. Clinical recommendations. *Kardiologicheskiy vestnik*. 2015; 1 (X): 3–30.
10. Cseh K., Winkler G., Melczer Z., Baranyi E. The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha resistance in obesity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2000; 43 (4): 525.
11. Hotamasligil G.S. Molecular mechanism of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int. J. Obes.* 2000; 24 (Suppl. 4): 23–7.
12. Regitz-Zagrosek V., Lehmkuhl E., Weickert M.O. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin. Res. Cardiol.* 2006; 95(3):136–47.
13. Wannamethee S.G., Lowe G.D., Shaper A.G., Rumley A., Lennon L., et al. The metabolic syndrome and insulin resistance: relationship to haemostatic and inflammatory markers in older non-diabetic men. *Atherosclerosis*. 2005; 181(1): 101–8.
14. Onuchina E.L., Solov'ev O.V., Onuchin S.G., Mochalova O.V., Pozdnyak A.O. Gender features of the development of atrial fibrillation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Prakticheskaya medicina*. 2012; 65: 92–6.
15. Yun-mei Yang, Xue-ying Lv, Wei-dong Huang, Zhe-rong Xu, Ling-jiao Wu. Study of androgen and atherosclerosis in old-aged male. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2005; 6(9): 931–5.
16. Dontsov A.V. The relationship between obesity and androgen status in patients with coronary heart disease. IX International (XVIII All-Russian) Pirogov Scientific Medical Conference of Students and Young Scientists. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 2: 138.
17. Krivenko V.I., Pakhomova S.P., Grinenko T.Yu., Fedorova E.P., Nepryadkina I.V., et al. Features of hypertension in men of draft age. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2013; 2 (49): 95–6.

Поступила 05.03.18  
Принята к печати 02.04.18

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.932-074:543.42.062

Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М.

### МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МАРКЁР ВИРУЛЕНТНОСТИ *VIBRIO CHOLERAE*

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра общей и клинической биохимии № 1, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

*Цель исследования – выявление масс-спектрометрических протеомных маркёров токсигенности V. cholerae для разработки экспресс-диагностики возбудителя в формате MALDI-ToF. Компьютерному анализу подвергли масс-спектрометрические электронные паспорта 140 штаммов V. cholerae с заведомо известной характеристикой штаммов, которые были разделены на две основные группы по параметру наличия или отсутствия гена холерного токсина (ctx- и ctx+). Впервые выявлен таксон – специфический маркёрный белковый пик, имеющий мол. массу 3202 Da, характерный для штаммов V.cholerae ctx+ и нехарактерный для V.cholerae ctx-.*

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*; MALDI-TOF масс-спектрометрия; протеомный анализ; токсигенность; холера.

**Для цитирования:** Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический маркёр вирулентности *Vibrio cholerae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(7): 445-449. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-445-449>

Chaika S.O., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M.

#### MASS SPECTROMETRY VIRULENCE MARKER *VIBRIO CHOLERAE*

Rostov-on-Don State Medical University, chair of biochemistry №1, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation

*Identification mass-spectrometry of marker proteins of toxicity of V. cholerae for development the express of diagnostics of the causative agent of cholera on the basis of the computer analysis in the MALDI-ToF format of electronic profiles became the purpose of our research. Subjected to the computer analysis mass and spectrometer electronic passports 140 of strains of V. cholerae with obviously known characteristic of strains which were divided into 2 basic groups in the parameter of existence or lack of a gene of cholera toxin (ctx-and ctx+). We for the first time revealed a taxon - the specific marker protein ceous peak having a molecular mass of 3202 Da characteristic of strains of V.cholerae ctx + and unrepresentative for V.cholerae ctx-.*

**Key words:** *Vibrio cholerae*; MALDI-TOF mass-spectrometry; proteomic analysis, toxicity cholerae

**For citation:** Chaika S.O., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M. Mass spectrometry virulence marker *Vibrio cholerae*. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 445-449 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-445-449>

**For correspondence:** Chaika S. O., graduate student ; e-mail: [sofik1988@yandex.ru](mailto:sofik1988@yandex.ru)

#### Information about authors:

Chaika Sofya Olegovna <http://orcid.org/0000-0002-0270-3143>

Telesmanich Natalya Robertovna <http://orcid.org/0000-0002-1906-6312>

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

Received 22.02.2018

Accepted 03.04.2018

**Введение.** Из масс-спектрометрических методов для изучения протеома микроорганизмов широко используется метод времяпролётной масс-спектрометрии на базе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – MALDI) с времяпролётным разделением (англ. Time of Flight – ToF) ионов (MALDI-ToF-MS). Можно выделить два основных технологических приёма, основанных на времяпролётной спектрометрии. В основе одного из них лежит предварительное разделение белков путём двумерного электрофореза с последующей тандемной масс-спектрометрией (MS-TOF-TOF). Такой анализ позволяет идентифицировать белки не только клеток, но и

тканей путём фингерпринта [1–5]. В основе второго подхода лежит прямое белковое профилирование клеток микроорганизмов и получение виртуального «облика» клетки, её протеомного спектра, минуя отдельный этап разделения белков. Диапазон изучаемых масс рибосомальных белков лимитирован 2000–18000 Da, что достигается использованием в качестве матрицы  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, этот подход лежит в основе идентификации микроорганизмов [2]. Данный масс-спектрометрический метод ограничивается коммерческой базой данных, в которую не входит вид *Vibrio cholerae* [6, 7] Все штаммы холерных вибрионов, исследуемые на масс-спектрометре, определялись как *Vibrio albensis* с высокой степенью достоверности [8]. Точная идентификация холерных вибрионов становится возможной только после внесения протеомных профилей одного или двух представителей в базу данных Biotyper. Достоверные результаты идентифика-

**Для корреспонденции:** Чайка Софья Олеговна, аспирант кафедры общей и клинической биохимии № 1; e-mail: [sofik1988@yandex.ru](mailto:sofik1988@yandex.ru)

ции вибрионов описаны в ряде работ [2, 8–11]. Линейная масс-спектрометрия микроорганизмов – экспресс-метод идентификации до вида на основе константных рибосомальных белков клетки. Наличие же в спектре и варибельных белков может дать возможность характеризовать такие признаки бактерий внутри вида, как токсигенность, наличие или отсутствие других признаков вирулентности, характеризующих возможную тяжесть течения инфекционного процесса. Эти характеристики обычно конкретизируются с помощью бактериологических методов или ПЦР-анализа [12–14]. Перспективы внутривидовой масс-спектрометрической дифференциации становятся возможными при создании виртуальных музеев – коллекций микроорганизмов [8, 15, 16]. Они должны содержать информацию не только о комплексе молекулярных масс белков, большого количества штаммов представителей отдельных групп вида, но и их гено-фенотипическую характеристику [8, 15]. Такой комплекс информации даёт возможность определить не только маркёрные белки вирулентности, но и происхождение штаммов и их филогенетическое родство на основе построения дендрограмм. Протеомные MALDI-ToF-MS зеркально отображают дендрограммы на основе VNTR-типирования [2, 8]. Информация, включающая конечный результат в виде таксономической идентификации микроорганизмов и их происхождение, базируется на детальной характеристике графических спектров и таблиц (MSP - Peak List). Биохимический профиль клетки в виде протеомного спектра и его числовых характеристик интересен с научной точки зрения, он является метаболическим «отпечатком пальцев» представителя. На основе визуального или компьютерного анализа можно установить сходство и отличия клеток штаммов внутри вида. При этом исследователями делается попытка выявить маркёрный белок или комплекс белков, характерных для определённой группы штаммов, объединённых общим признаком [9, 11, 12, 17]. Таким маркёром для *V. cholerae* мог бы стать белок OmpU, обнаруживаемый масс-спектрометрическим путём, при использовании другой матрицы и перенастройки параметров прибора. Нестандартная пробоподготовка и несоответствие массы белка OmpU ( $m/z = 34565$  Da) и диапазона масс для идентификации (2000–18000 Da) значительно усложняют методику [18]. На данный момент не описан подход к выявлению токсигенных холерных вибрионов в процессе идентификации или на основе уже идентифицированных микроорганизмов при помощи линейной масс-спектрометрии в диапазоне мол. масс 2000–18000 Da при использовании  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, что является стандартной пробоподготовкой. Встречаются работы, в которых описаны попытки сделать это, но осуществить внутривидовую дифференциацию по эпидемиологической значимости штаммов *V. cholerae* не удалось [19].

Для возможного выявления белка или комплекса белков, характерных для токсигенных штаммов *V. cholerae*, все электронные протеомные паспорта возбудителей холеры были разделены на две группы по параметру – наличия или отсутствия гена холерного токсина.

Цель исследования – выявление масс-спектрометрических протеомных маркёров токсигенности *V. cholerae* для разработки экспресс-диагностики возбудителя в формате MALDI-ToF.

**Материал и методы.** Работа проведена на масс-спектрометре MALDI-ToF Bruker Daltonics. Профили получали с помощью программ Flex control и Biotyper 3.0. В качестве матрицы использована  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота, позволяющая получить спектр в диапазоне мол. масс 2000–18000 Da, которые лежат в основе биотипирования. Масс-спектрометрический профиль микроорганизма представляет собой график, на котором по оси абсцисс отложены масс-заряды ( $m/z$ ) (молекулярные массы), а по оси ординат – интенсивность пика (т. е. количество белка с конкретной молекулярной массой, выражающейся в процентах).

Интенсивность (количество белка) оценивается относительно самого высокого 100% пика (наибольшего количества какого-то конкретного белка). Значение масс-заряда ( $m/z$ ) можно приравнять к значению массы, так как заряд равен 1 ( $z = 1$ ;  $m/1 = m$ ). Ограничение диапазона масс 2000–18000 Da.

Масс-спектр, состоящий из пиков разной интенсивности, является графическим отображением масс-пик листа (MSP - Peak List), который представляет собой таблицу всех молекулярных масс полученных профилей каждого штамма. Этот электронный паспорт отражает числовую характеристику протеомного спектра микроорганизма, около 70 наиболее значимых для каждого штамма белков в графике. Паспорт имеет вид таблицы, в первом столбце которой показана масса белков (Da) ( $m=m/z$ ), во втором – интенсивность пика (%). Интенсивность пика отражает процентное соотношение количества белков с конкретной массой относительно максимального. Например 100% пик указывает на то, что белок с конкретной массой присутствует в данном образце в максимальном количестве, остальные соотносятся в сравнении с данной величиной.

Анализ производился при помощи программы Microsoft Excel.

Компьютерному анализу подвергали масс-спектрометрические паспорта штаммов *V. cholerae* ( $n = 140$ ), с заведомо известной характеристикой (биовар, серогруппа, серотип, год, место и объект выделения, наличие генов токсигенности). Нас интересовала ПЦР-характеристика вибрионов на наличие или отсутствие гена холерного токсина (ctx+/ctx-). Из 140 охарактеризованных в ПЦР штаммов: *V. cholerae* O<sub>1</sub> *classica* ( $n = 2$ ) (ctx+ 2 штамма), *V. cholerae* O<sub>1</sub> *El Tor* ( $n = 69$ ) (ctx+ 23 штамма/ ctx- 46 штаммов), *V. cholerae* O<sub>139</sub> ( $n = 32$ ) (ctx+ 17 штаммов/ctx- 15 штаммов), *V. cholerae* non O<sub>1/O<sub>139</sub> ( $n = 37$ ) (ctx+ 17 штаммов/ ctx- 20 штаммов) (см. таблицу).</sub>

Масс-спектрометрические паспорта MSP-Peak List переносились в ручном режиме в таблицу Microsoft Excel. Каждый столбец соответствовал характеристике одного штамма. В верхних ячейках столбца отражались сведения о фенотипической и таксономической характеристике штамма. В остальных ячейках столбца, расположенных ниже, – значения масс, характерных для данного штамма, от 3000 до 18 000 Da. Все столбцы (штаммы) разделены на две основные группы по параметру наличия или отсутствия гена холерного токсина (ctx+ и ctx-). В левой части таблицы – столбцы с параметром наличия гена, в правой – отсутствия. Проводился поиск одинаковых значений масс (+/- 2 Da) среди штаммов визуальным способом, каждому значению масс присваивался определённый цвет ячейки.

**Результаты.** Методика поиска одинаковых значений масс в программе Microsoft Excel позволила обратить внимание на белок с мол. массой 3202 (+/-2) Da, который присутствовал у большинства штаммов вида *V. cholerae*, охарактеризованных методом ПЦР как токсигенные. Данный белок отсутствовал практически у всех атоксигенных вариантов штаммов.

В группу токсигенных штаммов ( $n = 59$ ) входило: 2 штамма *V. cholerae* O<sub>1</sub> *classica*, 23 штамма *V. cholerae* O<sub>1</sub> *El Tor*, 17 – *V. cholerae* O<sub>139</sub> и 17 – *V. cholerae* non O<sub>1/O<sub>139</sub>. Среди 59 штаммов белок с массой 3202 Da встречался у 51 (86,4%) штамма, и только 8 (13,6%) штаммов не имели этого белка. Процентное соотношение наличия белка 3202 Da внутри групп (серогруппы и биовары) выглядит следующим образом: оба токсигенных штамма (100%) *V. cholerae* O<sub>1</sub> *classica* имели данный пик, пик присутствовал у 19 штаммов *V. cholerae* O<sub>1</sub> *El Tor* (82,6%), 14 штаммов *V. cholerae* O<sub>139</sub> (82,4%), 16 штаммов *V. cholerae* non O<sub>1/O<sub>139</sub> (94,1%) (рис. 1; см. таблицу).</sub></sub>

Группа атоксигенных штаммов ( $n = 81$ ) состояла из 46 штаммов *V. cholerae* O<sub>1</sub> *El Tor*, 15 – *V. cholerae* O<sub>139</sub> и 20 – *V. cholerae* non O<sub>1/O<sub>139</sub>. Среди 81 штамма белок с массой</sub>

**Диагностическая эффективность, отражающая специфичность белка с мол. массой 3202 Da, характерного для токсигенных штаммов**

Показатели		<i>V.cholerae</i> <i>O<sub>i</sub>classica</i>	<i>V.cholerae</i> <i>O<sub>i</sub>El Tor</i>	<i>V.cholerae</i> <i>O<sub>139</sub></i>	<i>V.cholerae</i> <i>non O<sub>i</sub>/O<sub>139</sub></i>	Всего	
n=140	ctx+ штаммов (n = 59)	Количество / % токсигенных штаммов с наличием белка массой 3202Da +	2 / 100	23 / 82,6	14 / 82,4	17 / 94,1	51 / 86,4
		Количество / % токсигенных штаммов, у которых отсутствует белок массой 3202Da -	0 / 0	4 / 17,4	3 / 17,6	1 / 5,9	8 / 13,6
	ctx- штаммов (n = 81)	Количество / % атоксигенных штаммов, у которых отсутствует белок массой 3202Da -	0 / 0	42/91,3	15 / 100	15 / 75	72 / 88,9
		Количество / % атоксигенных штаммов с наличием белка массой 3202Da +	0 / 0	4 / 8,7	0 / 0	5 / 25	9 / 11,1

3202 Da отсутствовал у 72(88,9%) штаммов из 81, и только 9(11,1%) штаммов имели этот белок. Отсутствие белка с массой 3202 Da в группах атоксигенных штаммов представляет следующее распределение: 42 (91,3%) штамма из 46 *V. cholerae O<sub>i</sub>ElTor* не имели данного белка. Все штаммы *V. cholerae O<sub>139</sub>ctx-* (100%) не имели пик 3202 Da. Среди *V. cholerae non O<sub>i</sub>/O<sub>139</sub>* данный пик отсутствовал у 15(75%) из 20 штаммов (рис. 2; см. таблицу).

Высокие показатели достоверности ( $p = 0,021$ ) принадлежности белка с мол. массой 3202 Da к токсигенным вариантам свидетельствуют о том, что наличие данного белка действительно является таксон-специфическим маркёрным белком, характеризующим штамм *Vibrio cholerae* как токсигенный. Соответственно отсутствие белка указывает на атоксигенность штамма.

Следующей числовой позицией, характеризующей массу заряд клетки, является количество данного белка, измеряемого

интенсивностью. Оценка интенсивности пиков с массой 3202 Da среди штаммов, имеющих *ctx+* ген (59 штаммов), показала, что средний показатель интенсивности пика 65%, из них с показателем интенсивности 100% встречался в 19 случаях из 59. Если рассматривать средний показатель интенсивности пика среди токсигенных вариантов по группам, то он составлял: *V. cholerae O<sub>i</sub>classica* – 78%, *V. cholerae O<sub>i</sub>ElTor* – 70%, *V. cholerae O<sub>139</sub>* – 46%, *V. cholerae non O<sub>i</sub>/O<sub>139</sub>* – 75% (рис. 3).

У некоторых ( $n=9$ ) атоксигенных штаммов, при отсутствии гена холерного токсина (*ctx*), присутствовал пик 3202 Da, которого не должно было быть. Анализ интенсивности пиков данных штаммов, показал среднее значение 22,4% (среднее значение в группах (биовары, серогруппы) *V. cholerae O<sub>i</sub>classica* – 0%, *V. cholerae O<sub>i</sub>ElTor* – 10%, *V. cholerae O<sub>139</sub>* – 0%, *V. cholerae non O<sub>i</sub>/O<sub>139</sub>* – 33%). Высокая степень достоверности различий ( $p = 0,03$ ) между значениями интенсивности пика в группах токсигенных и атоксигенных штаммов позволяет судить о влиянии интенсивности пика на характеристику токсигенности штамма (см. рис. 3).

Наличие белка с массой 3202 Da является таксонспецифическим маркёром наличия *ctx* гена, что подтверждается в

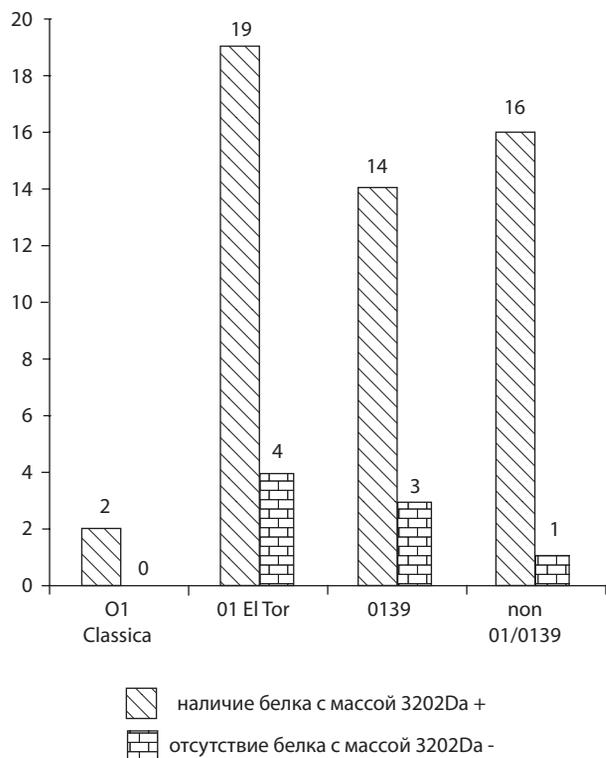


Рис. 1. Количественное соотношение среди токсигенных штаммов *V.cholerae* с наличием и отсутствием белка массой 3202 Da ctx+ (n = 59).

По оси абсцисс – биовары, серогруппы *V.cholerae* ctx+, столбцы собраны в пары по признаку наличия и отсутствия маркёрного белка; по оси ординат – количество штаммов.

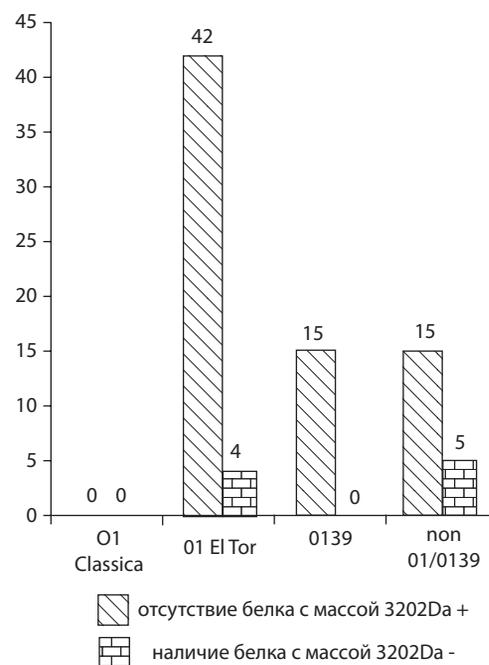


Рис. 2. Количественное соотношение среди атоксигенных штаммов *V.cholerae* с отсутствием и наличием белка массой 3202 Da ctx- (n = 81).

По оси абсцисс – биовары, серогруппы *V.cholerae* ctx-, столбцы собраны в пары по признаку наличия и отсутствия маркёрного белка; по оси ординат – количество штаммов.

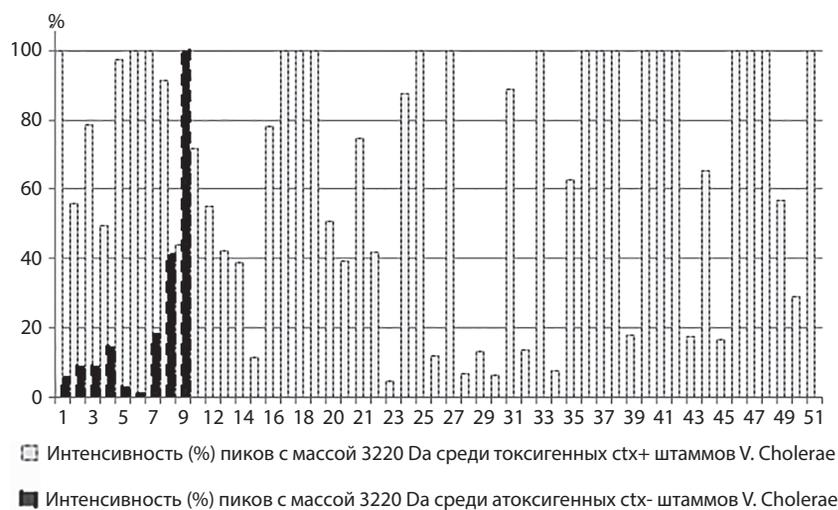


Рис. 3. Интенсивность (в %) пиков с массой 3202 Da среди токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae*.

По оси абсцисс – порядковые номера штаммов, имеющих белок массой 3202 Da; по оси ординат – интенсивность (в %) пиков

123 (88%) случаях из 140 среди токсигенных и атоксигенных штаммов вместе взятых, это свидетельствует о высокой диагностической эффективности метода. За пределы нашей теории выходит 17(12%) штаммов из 140, все эти штаммы относятся к разным годам и местам выделения. Среди них 8 штаммов *V. cholerae* *O*<sub>1</sub>ElTor (4 ctx<sup>+</sup>/4 ctx<sup>-</sup>), 3 штамма *V. cholerae* *O*<sub>139</sub> (3 ctx<sup>+</sup>), 6 штаммов *V. cholerae* non *O*<sub>1</sub>/*O*<sub>139</sub> (1 ctx<sup>+</sup>/5 ctx<sup>-</sup>).

**Обсуждение.** Выявление маркерных белков внутри вида и их принадлежность к определённой таксономической группе становится возможным благодаря созданию баз данных, в которые закладываются автором персонализированные таксономические параметры, генетические характеристики токсигенности, что поможет сориентироваться в определении эпидемической значимости [9, 11, 12, 17]. Наличие масс-спектрометрических электронных паспортов штаммов даёт уникальную возможность – изучать молекулярно-биохимические параметры микроорганизма в виртуальном формате. Сравнивая масс-спектры между собой, можно производить внутривидовые исследования, выявлять маркерные белки патологического процесса. Это в последние годы стало отражаться в публикациях, посвящённых изучению отдельных белков на масс-спектрометре в линейном режиме. Благодаря созданию таких баз данных получены масс-спектрометрические белковые профили штаммов возбудителей бруцеллёза, что позволило выявить 12 возможных родоспецифических фрагментов белков [20]. Коллекция масс-спектров *E. coli* позволила установить маркерные белки, отличающие гемолитическую вирулентную популяцию, вызывающую дискинезию желчевыводящих путей, от негемолитической по наличию пика *m/z* 9000 Da и идентифицировать эшерихии, вызывающие дисфункциональные нарушения желчевыводительной системы. При восстановлении функционирования желчевыводительной системы гемолитический признак у эшерихий исчезает, что соответствует исчезновению пика с *m/z* 9000 Da и появлению негемолитических форм с доминирующим комплексом белков, имеющих *m/z* 5700 Da [12]. Проведён масс-спектрометрический анализ представителей рода *Yersinia*. Обнаружены два специфических пика, характерных для подвида *pestis* (*m/z* 3064 и *m/z* 5796), один – для подвида *caucasica* (*m/z* 3237). Маркер *m/z* 3064 регистрировался только у вирулентных штаммов *Y.pestis* [19]. Что касается *V. cholerae*, то все исследуемые на масс-спектрометре штаммы опреде-

лялись как *V. albensis* с высокой степенью достоверности. Компьютерный анализ в формате MALDY-ToF данного штамма показал, что протеом спектра демонстрирует существенные отличия, при том что не отличается по таксономическим признакам от представителей *V. cholerae* [21]. Внесение в коммерческую базу нескольких штаммов *Vibrio cholerae*, позволяет проводить идентификацию возбудителей холеры. Внутривидовое типирование, установление филогенетического родства и происхождения штаммов холерных вибрионов, появления которых на территории Российской Федерации носит заносной характер, невозможны без расширенной библиотеки спектров рибосомальных белков представителей вида *V. cholerae*. [8]. По данным литературы осуществить внутривидовую дифференциацию по эпидемической значимости, серогруппе, биовару не удалось [19]. В нашей работе такую закономерность удалось найти.

Ранее опубликованы данные о выявлении маркерного белка OmpU (*m/z* = 34565 Da) масс-спектрометрическим методом, в работе использовалась матрица – феруловая кислота (3-метокси-4-гидроксикоричная кислота, Ferulic Acid), позволяющая расширить диапазон изучаемых масс до 80 000 Da. Принадлежность найденной авторами массы 34 565 Da к белку наружной мембраны OmpU доказана методом масс-спектрометрии с выделением чистого белка путём двухмерного электрофореза. Нами использована матрица  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота, предназначенная для стандартной методики масс-спектрометрии микроорганизмов и идентификации в диапазоне 2000–1800 Da. При этом коммерческие базы данных протеомов микроорганизмов созданы с применением матрицы на основе  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, следовательно, идентификация с использованием другой матрицы станет невозможной, так как разные диапазоны масс не смогут соотноситься друг с другом. Минусом данной методики является то, что для выявления белка OmpU (*m/z* = 34 565 Da) необходимо два этапа исследования. Первый этап – определение вида микроорганизма стандартным методом с матрицей, предназначенной для идентификации при определённых настройках прибора. Второй этап – это повторное нанесение образца на мишень с другой матрицей и перенастройка параметров прибора, что усложняет процесс. Теряются основные преимущества метода линейной масс-спектрометрии – быстрота и простота процесса [18]. В нашем случае невозможно говорить о каком-то конкретном белке. Выявлен специфический маркерный белковый пик с мол. массой 3202 Da, характерный для штаммов *V. cholerae* ctx<sup>+</sup> и нехарактерный для *V. cholerae* ctx<sup>-</sup>, что подтверждается в 88% выборки. Обнаружение данного маркерного белка в MALDI масс-спектре может стать поводом для проведения генетической оценки токсигенности штаммов.

Показатель интенсивности обнаруженного пика отражает характеристику токсигенности штамма; так, средний показатель среди ctx<sup>+</sup> штаммов составляет 65% против 22,4% у атоксигенных вариантов, где пика не должно быть. В группе токсигенных штаммов 19 из 59 имеют пик со 100% интенсивностью, в редких случаях встречаются низкие показатели. Среди всех атоксигенных штаммов, у которых белок все же присутствует, только у одного встречается максимальный показатель интенсивности пика (100%) (см.рис. 3).

Обнаружение пика с массой 3202 Da при помощи созданной базы данных и компьютерного анализа спектра протеома поможет определить эпидемическую значимость штаммов.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–5, 10, 11, 18  
см. REFERENCES)

1. Кульшань Т.А., Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (3):11-7.
2. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 249-56
6. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2014; (3): 22-9.
7. Дегушев К.В., Хомяков А.Е., Тюрин Е.А. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Microflex (Bruker Daltonik) для идентификации белковых спектров ПБА I-II групп. *Молекулярная диагностика*. 2014; 1: 444.
8. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Гончаренко Е.В., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (6): 375-9.
9. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ с молекулярно-генетической идентификацией *Vibrio* spp. в системе мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19 (6): 27-36.
12. Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И., Твердохлебова Т.И. Времяпрелетная масс-спектрометрическая внутривидовая диагностика штаммов эшерихий, выделенных от человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (6): 371-4.
13. Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И. Протеомный масс-спектрометрический анализ свежее выделенных штаммов патогенных эшерихий. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 2015; 3: 83-8.
14. Телесманич Н.Р., Гончаренко Е.В., Чайка С.О., Чайка И.А., Теличева В.О. Возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения углевод - специфических рецепторов диагностического бактериофага эльтор. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; (2): 85-90.
15. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А. Расширение возможностей линейной MALDI масс-спектрометрии для анализа протеома микроорганизмов на основе создания референс - библиотеки виртуальных профилей. *Актуальные вопросы современной медицины. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции*. Екатеринбург. Инновационный центр развития образования и науки. 2015; 2: 34-7.
16. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревиц Н.К. Применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для контроля коллекции штаммов *Leptospira*, используемых в серодиагностике лептоспироза. *Молекулярная диагностика*. 2014; 1: 510-1.
17. Осипов Г.А., Родионов Г.Г. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике. *Лабораторная диагностика*. 2013; (2): 68-73.
19. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Вдовиченко Г.В., Климов В.Т., Богумильчик Е.А., Балахнов С.В. Масс-спектрометрический анализ межвидовой и внутривидовой дифференциации микроорганизмов *Yersinia* spp. И *Vibrio* spp. *Молекулярная диагностика*. 2014; (1): 477-8.
20. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Чеботарева Е.В. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации *Brucella* spp. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; (25): 111-3.
21. Воляницкая С.Ю., Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Иванова Н.Г. MALDI-TOF протеомный анализ в исследовании судовых балластных вод в портах Ростовской области. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2014; 4 (9) : 82-9.

REFERENCES

1. Kulshan T.A., Zadnova S.P., Cheldyishova N.B., Smirnova N.I. Evaluation of functional features and stress resistance of isogenic toxigenic and non-toxicogenic biovar *El Tor Vibrio cholerae* strains. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2015; (3):11-7. (in Russian)
2. Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology:

publications review. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (4): 249-56. (in Russian)

3. Zou Q., Yan X., Li B., Zeng X., Zhou J., Zhang J. Proteome analysis of sorbitol fermentation specific protein in *Vibrio cholerae* by 2-DE and MS. *Proteomics*. 2006; Mar;6(6):1848-55.
4. Yan X., Xiao D., Zhao F., Gu Y., Meng F., Zhang J. Analysis of exoproteins of El Tor *Vibrio cholerae* by 2DE and MALDI-TOF-MS/MS. *Acta microbiologica Sinica*. 2009; Jun;49(6):746-58.
5. Ruibai Wang, Hongzhi Zhang, Haiyan Qiu, Shouyi Gao, Biao Kan. Proteins involved in difference of sorbitol fermentation rates of the toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strains revealed by comparative proteome analysis. *BMC Microbiology*. 2009; 9: 135-44.
6. Afanasev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Balahnov S.V. MALDI-TOF mass spectrometry in the accelerated identification of microorganisms of the *Vibrio* genus. *Moлекулярная генетика, микробиология i вирусология*. 2014; (3): 22-9. (in Russian)
7. Detushev K.V., Homyakov A.E., Tyurin E.A. Application of MALDI – TOF of a mass spectrometry on the Microflex device (Bruker Daltonik) for identification of proteinaceous ranges of PBA I-II of groups. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 444. (in Russian)
8. Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A., Goncharenko E.V., Lomov Yu.M. The mass-spectrometric analysis of MALDI-TOF in identification and typing of strains of comma bacillus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (6): 375-9 (in Russian)
9. Mironova L.V., Basov E.A., Afanasev M.V., Hunheeva Zh.Yu. MALDI-ToF mass spectrometry analysis with molecular genetics identification of *Vibrio* spp. in the system of the monitoring of vibrio flora of surface water reservoirs. *Epidemiologiya i infektzionnyie bolezni*. 2014; 19 (6): 27-36. (in Russian)
10. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibri* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of applied microbiology*. 2010; Jul;109(1):199-211.
11. Kaveh Emami, Vahid Askari, Matthias Ullrich, Khwajah Mohinudeen, Arga Chandrashekar Anil, Lidita Khandeparker, J. Grant Burgess, Ehsan Mesbahi. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e38515.
12. Gapon M.N., Telesmanich N.R., Ternovskaya L.N., Chaika S.O., Chaika I.A., Mikashinovich Z.I., Tverдохлебова T.I. The time-of-flight mass spectrometer intra-specific diagnostic of strains of *Escherichia* isolated from patient. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (6): 371-4. (in Russian)
13. Gapon M.N., Telesmanich N.R., Ternovskaya L.N., Chaika S.O., Chaika I.A., Mikashinovich Z.I. Proteomic Mass-Spectrometric analysis of freshly isolated *Escherichia coli* strains. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2015; 3: 83-8. (in Russian)
14. Telesmanich N.R., Goncharenko E.V., Chaika S.O., Chaika I.A., Teli-cheva V.O. The possibilities of application of MALDI-TOF mass-spectrometry for investigation of carbohydrate-specific receptors of diagnostic bacteriophage El Tor. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2016; 2: 85-90. (in Russian)
15. Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A. Expansion of opportunities of the linear MALDI of a mass spectrometry for the analysis of a proteom of microorganisms on the basis of creation the reference - libraries of the virtual profiles. *Aktualnyie voprosy i sovremennoy meditsiny. Sbornik nauchnyih trudov po itogam mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. Yekaterinburg, Innovatsionnyy tsentr razvitiya obrazovaniya i nauki. 2015; 2: 34-7. (in Russian)
16. Zueva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Application of the MALDI-TOF method of a mass spectrometry for monitoring of a collection of strains of *Leptospira* in se-rodiaagnostics of leptospirosis. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 510-1. (in Russian)
17. Osipov G.A., Rodionov G.G. Use of a method of a mass spectrometry of microbial markers in clinical practice. *Laboratornaya diagnostika*. 2013; (2): 68-73. (in Russian)
18. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M., Sellek R., Heng J.M., Mars-Groenendijk R.H. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and nonepidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 158.
19. Afanasev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Vdovichenko G.V., Klimov V.T., Bogumilchik E.A., Balahnov S.V. Mass-spectrometry analysis of trans-species and intraspecific differentiation of microorganisms of *Yersinia* spp. and *Vibrio* spp. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 477-8. (in Russian)
20. Ulshina D.V., Kovalev D.A., Golovneva S.I., Chebotareva E.V. Application of MALDI-TOF mass spectrometry to *Brucella* spp. identification. *Dalnevostochny zhurnal infektzionnoy patologii*. 2014; (25): 111-3. (in Russian)
21. Vodyanitskaya S. Yu., Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A., Ivanova N.G. MALDI-TOF proteomic analysis in the study of shipping ballast waters in sea ports of Rostov regions. *Zhizn' Bez Opasnostey. Zdorov'e. Profilaktika. Dolgoletie*. 2014; 4 (9) :82 -9. (in Russian)

Поступила 22.02.18

Принята к печати 03.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.266.61.083

Панфёрцев Е. А., Баранова Е. В., Мочалов В. В., Соловьёв П. В., Горбатов А. А., Бикетов С. Ф.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BREVIBACILLUS CHOSHINENSIS*, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМЕРНЫЙ БОРРЕЛИОЗНЫЙ АНТИГЕН

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 142279, пос. Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, Российская Федерация

Целью работы являлось создание рекомбинантного химерного белка с использованием системы вектор – хозяин *Brevibacillus choshinensis* (ТАКАРА, Япония) со встроенным слитным геном *dbpAG*, состоящим из частей генов *dbpA* и *dbpG*, которые кодируют главные антигенные детерминанты декорин-связывающих белков А (*DbpA*) двух видов возбудителей клещевых боррелиозов – *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. Такая плазмида должна обеспечить синтез и секрецию в культуральную жидкость стабильного рекомбинантного антигена, состоящего из двух доменов – *DbpA B. afzelii* (*DbpAA*) и *B. garinii* (*DbpAAG*) – в нативной конформации и растворимой форме, что важно для его эффективного применения в серодиагностике боррелиозов. Выбор экспрессионной системы ТАКАРА на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* и плазмиды *pNCMO2* обусловлен возможностью получения секретируемых целевых белков в растворимом виде в нативной конформации и с сохранёнными антигенными детерминантами.

Сконструирована плазмида *pNCMO2* со слитным геном *dbpAAG*, которой был трансформирован штамм *Brevibacillus choshinensis*. Полученный рекомбинантный клон *Brevibacillus choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* при культивировании в жидкой питательной среде продуцирует секретируемый белок, который имеет мол. массу около 30 кД и обладает высокой иммунореактивностью с сыворотками от больных с подтверждённым диагнозом «боррелиоз».

Ключевые слова: боррелиоз; *Brevibacillus choshinensis*; декорин-связывающий белок А; ДНК.

Для цитирования: Панфёрцев Е.А., Баранова Е.В., Мочалов В.В., Соловьёв П.В.,

Горбатов А.А., Бикетов С.Ф. Конструирование рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis*, продуцирующего рекомбинантный химерный боррелиозный антиген. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 450-454. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-450-454>

Panfertsev E. A., Baranova E. V., Mochalov V. V., Soloviev P. V., Gorbatov A. A., Biketov S. F.

### CONSTRUCTION OF RECOMBINANT STRAIN *BREVIBACILLUS CHOSHINENSIS* FOR CHIMERIC *BORRELLIA DBPA* ANTIGEN PRODUCTION

142279, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The aim of this work was creation of recombinant chimeric protein using TAKARA expression system *Brevibacillus choshinensis* with fused gene *dbpAAG*, which include the parts of *dbpAA* and *dbpAG* genes coding the major antigenic determinants of decorin-binding proteins A (*DbpA*) from two species of borreliosis agents - *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. Such plasmid should be able to support the synthesis of recombinant chimeric polypeptide consisting immunogenic domains of *DbpA* *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* in the stable and soluble forms, that important for effective using in Lyme diseases serodiagnosis. We chose the TAKARA expression system based on the strain *Brevibacillus choshinensis* and plasmid *pNCMO2*. It give us possibilities to obtain the scale quantity of the secreted soluble target proteins with native conformation in particular with conserve antigenic determinants. As results, the plasmid *pNCMO2* with a fusion gene *dbpAAG* was constructed. Recombinante plasmide DNA *pNCMO2/dbpAAG* was used for *Brevibacillus choshinensis* transformation. We were able to show that during cultivation in a liquid medium recombinant cells of *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* produced secreted chimeric 30kD protein with high immunoreactivity to Lyme borreliosis patient's serum.

Key words: borreliosis; plasmid *pNCMO2*; *Brevibacillus choshinensis*; decorin-binding protein A; *Borrelia afzelii*; *Borrelia garinii*.

For citation: Panfertsev E. A., Baranova E. V., Mochalov V. V., Soloviev P. V., Gorbatov A. A., Biketov S. F. Construction of recombinant strain *Brevibacillus choshinensis* for chimeric borrelia *Dbpa* antigen production. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 450-454. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-450-454>

For correspondence: Panfertsev E.A., Ph.D. Sci. Med., senior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms ; e-mail: [panfera62@mail.ru](mailto:panfera62@mail.ru)

#### Information about authors:

Panfertsev E.A., <http://orcid.org/0000-0001-6778-934X>

Mochalov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9871-8154>

Gorbatov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0799-893X>

Baranova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Soloviev P.V., <http://orcid.org/0000-0001-7355-8396>

Biketov S.F., <http://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Acknowledgment. The work is performed within research No. 050 of Rospotrebnadzor “Monitoring of circulation of causative agents of borreliosis in certain regions of the Russian Federation and perfecting of diagnostic of borreliosis”.

Conflict of interest. The authors declare the absence of conflict of interests.

Received 27.03.2018  
Accepted 13.04.2018

**Введение.** Согласно статистическим данным, заболеваемость клещевыми боррелиозами (КБ) за последние 5 лет устойчиво регистрируется практически во всех субъектах РФ за исключением территорий, где иксодовые клещи отсутствуют в силу климатических условий (в частности, Ненецкий и Чукотский автономные округа). Порядковое различие по заболеваемости КБ между некоторыми европейскими странами и РФ (например, в Германии более 200 случаев на 100 тыс. населения, в Калининградской области и Северо-Западном регионе РФ данный показатель составляет около 20) свидетельствует о гиподиагностике боррелиоза в нашей стране. Причинами этого могут быть как низкая обращаемость покусанных и профилактическое применение антибиотиков, так и недостаточная чувствительность применяемых диагностических тестов. Поскольку вызываемые боррелиями инфекции эффективно лечатся антибиотиками, а запоздалый диагноз может привести к серьёзным осложнениям, трудно переоценить роль своевременной и точной диагностики в контроле над этим заболеванием [1–3]. Совершенствование диагностики КБ, в частности разработка более чувствительных и специфичных тест-систем, представляется актуальной задачей здравоохранения РФ.

Постановка диагноза Лайм-боррелиоза основана на выявлении специфических антител, направленных против диагностически значимых антигенов патогенных видов рода *Borrelia*. Серологическую лабораторную диагностику проводят в два этапа, используя на первом иммуноферментный анализ (ИФА), на втором – иммуноблот с разрушенными клетками боррелий, выращенных на искусственных питательных средах [4–8]. Отсутствие в клетках некоторых диагностически важных антигенов, таких как «*in vivo* экспрессирующиеся» (VlsE, DbpA), «ранние» (OspC), «поздние» (P83), «иммуногенные липиды», обусловило появление другого варианта иммуноблота, названного «line blot», который представляет собой стрипы из мембраны, на который нанесены линии с индивидуальными природными и рекомбинантными антигенами [9]. Также множество (до 15) индивидуальных специфических антигенов боррелий применено в мультиплексных форматах, основанных на биочиповых и X-MAP-технологиях [10, 11].

Помимо разработки новых форматов тестов для серодиагностики проводятся исследования по молекулярному дизайну диагностически важных антигенов. Получены химерные антигены, состоящие из различных сочетаний антигенных детерминант белков боррелий OspA, OspB, VmpA, p83, FlaA, FlaB, DbpB, VlsE, OspC, DbpA [12–14]. В рамках разработки усовершенствованного серологического теста для диагностики боррелиоза в РФ мы поставили задачу получить новые, более эффективные антигены. Одним из перспективных для серодиагностики Лайм-боррелиоза антигенов боррелий, в силу поверхностной локализации и наличия высоко иммуногенных видоспецифичных эпитопов, признан декорин-связывающий белок A (DbpA) [15]. Поскольку в Европе и РФ [16] боррелиоз обычно вызывают *B. afzelii* и *B. garinii*, одним из подходов для повышения иммунологической чувствительности серологических тестов на основе DbpA является объединение иммунологически значимых эпитопов этих видов боррелий.

Ранее нами сконструирован гибридный ген *dbpAG*, при экспрессии которого в *E. coli* получен слитный рекомбинантный белок «DbpA A+G», несущий эпитопы DbpA *B. afzelii* и *B. garinii*. Этот антиген в формате ИФА обеспечил высокую иммунологическую чувствительность при анализе сыроворотка от больных боррелиозом из Центрального региона РФ [17]. Из-за особенностей экспрессирующей системы *E. coli* синтезированный рекомбинантный антиген находится в нерастворимом виде в «тельцах включения», что ведёт к

необходимости проведения цикла денатурация–ренатурация для получения его в растворимом состоянии. Как следствие антиген проявляет склонность к агрегации при хранении, мечении, при посадке на твёрдую фазу, что отрицательно сказывается на возможности его использования в различных иммунохимических тест-системах, в частности в иммунохроматографических тестах.

Поставлена задача создать генетическую конструкцию со слитным геном *dbpAAG*, которая обеспечивала бы синтез растворимого и стабильного рекомбинантного полипептида, состоящего из иммуногенных доменов двух антигенов – DbpA *B. afzelii* и DbpA *B. garinii*. Для получения полипептида выбрана система вектор–хозяин на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* и плазмиды *pNCMO2* производства компании TAKARA (Япония), с помощью которой возможно получение значительных количеств целевых белков (до 3 г/л), секретируемых в жидкую питательную среду в нативной конформации и растворимой форме [18]. Сконструирована плазида *pNCMO2-dbpAAG*, в которой гибридный ген слит с последовательностью, кодирующей универсальный лидерный пептид и находится под контролем сильного P2 промотора, что обеспечивает синтез и секрецию целевого белка в жидкую питательную среду при культивировании рекомбинантного штамма *Brevibacillus choshinensis/pNCMO2-dbpAAG*.

**Материал и методы.** В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, лигазу T<sub>4</sub> и наборы реактивов (Thermo Fisher Scientific Inc., США), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), твин-20, борную кислоту, антивидовые антитела козы против иммуноглобулинов (IgG) человека (Sigma-Aldrich, США), трис(гидроксиэтил)аминометан и 6% перекись водорода («РеаХим», Россия), фосфатно-солевой буфер («ПанЭко», Россия), обезжиренное молоко (BIO-RAD, США), Кумасси ярко-голубой R-250 («ДиаМ», Россия), пероксидазный субстрат 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид (AppliChem, Германия).

Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щёлочи, органические растворители) имели аналитическую или химическую чистоту.

Для проведения иммуноблоттинга использована нитроцеллюзная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм (Amersham™, Protran™, Германия).

**Дизайн праймеров, ПЦР-амплификация.** Использованы олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации гена *dbpAAG*, синтезированные в компании «Синтол» (Москва). Структуру праймеров разрабатывали с применением пакета программ DNASTAR LASERGENE.

Прямой праймер AZ BamHI: 5'- aa gga tcc tgt agt tta aca gga aaa gct ag -3'

Обратный праймер GOR EcoRI: 5'- aa gaa ttc tgt agt agc agc agt gtt ggc -3'

ПЦР-амплификацию гена *dbpAG* (996 п.о.) проводили в термоциклере MJ Mini (BIO-RAD, США), используя следующий режим амплификации: 95 °С – 2 мин, затем 30 циклов (95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 90 с), дополнительно 10 мин при 72 °С. В качестве матрицы использованы 100 нг плазмидной ДНК *pETdbpAG*.

Для ПЦР-амплификации ДНК использован набор High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Лигирование фрагмента ДНК 996 п.о. и плазмидного вектора *pNCMO2* («Такара», Япония), рестрицированных BamHI и EcoRI эндонуклеазами проводили, используя набор Rapid DNA Ligation Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», США). Трансформацию клеток *E. coli* DH5α осуществляли с использованием набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher

Scientific Inc., США). Для скрининга клонов при клонировании использована обычная термостабильная ДНК-полимераза (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Электрофорез в агарозном геле проводили в Трис-Борат-ЭДТА -буфере (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 10).

**Конструирование экспрессирующей плазмиды.** Конструирование экспрессирующей плазмиды проведено путём клонирования гена *dbpAAG*, полученного в результате ПЦР-амплификации в составе вектора pNCMO2. В качестве матрицы для ПЦР использована ранее созданная плазмидная ДНК *pETdbpAAG* [17].

В состав праймеров для ПЦР вводили сайты рестрикции *VamHI* (прямой праймер) и *EcoRI* (обратный праймер) для клонирования ПЦР-фрагмента в составе вектора pNCMO2 таким образом, чтобы создать единую ORF для гена *dbpAAG* и структуры, кодирующей сигнальный пептид. Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК размером 996 п.о. очищен, обработан ферментами *VamHI*+*EcoRI*, лигирован с предварительно рестрицированным плазмидным вектором pNCMO2/*VamHI*+*EcoRI*.

Лигазной смесью трансформированы компетентные клетки *E. coli DH5α*. Выросшие на плотной среде LA (содержащей ампициллин 50 мкг/мл) клоны анализировали при помощи ПЦР с использованием праймеров, комплементарных промоторной и терминаторной областям вектора pNCMO2. Из положительных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному картированию с последующим секвенированием клонированного гена размером 996 п.о.

**Анализ нуклеотидной последовательности.** Анализ нуклеотидной последовательности (трансляцию последовательности гена в аминокислотную последовательность) гибридного гена *dbpAAG* проводили с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE.

**Получение рекомбинантных клонов *Brevibacillus choshinensis* и экспрессия рекомбинантного белка DBPAG.** Использована система вектор-хозяин *Brevibacillus choshinensis* (TAKARA, Япония) включающая: компетентные клетки *Brevibacillus choshinensis*, плазмиду pNCMO2, бульон Мартена (MT) для культивирования рекомбинантных клонов. Трансформация компетентных клеток *B. choshinensis* проводилась по инструкции производителя. Трансформанты высевались на плотную среду MT с 1% глюкозы и 25 мкг/мл неомидина. Выросшие колонии анализировали при помощи ПЦР, используя праймеры, комплементарные промоторной и терминаторной областям плазмидного вектора pNCMO2. Отобрано несколько колоний *B. choshinensis* с плазмидой pNCMO2/*dbpAAG*. Культивирование рекомбинантных клонов проводилось в 3 мл бульона MT, содержащего 1% глюкозы и 25 мкг/мл неомидина, в течение 24ч при 33°C. Выросшую культуру охлаждали до 4°C, разделяли биомассу и культуральную жидкость (КЖ) при помощи низкоскоростного центрифугирования (5000 g, 15мин). КЖ и клетки штамма *B. choshinensis*/pNCMO2/*dbpAAG* тестировали на наличие рекомбинантного белка методом вертикального электрофореза по Laemmly [19] в 13% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих условиях с последующей окраской геля Кумасси ярко-голубым R.

**Сыворотки пациентов больных боррелиозом.** Для иммунохимической характеристики белка DBPAG использованы сыворотки крови людей из рабочей коллекции Референс-Центра по мониторингу за боррелиозом на базе ФБУН Го-

```
TAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAATATATACACAATATCCCCAAGAACAAATTTGT
TTATACTAGAGGAGGAGAACACAAGGTCATGAAAAAGAGGGTCTTAAACAGT
GTATTGCTTCTGCTACTGCTAGCTAGTGCCTCGCTACTGTTGCTCCCATGGCT
TTCGCT
GGATCCTGTAGTTTAAACAGGAAAAGCTAGATTGGAATCATCAGTTAAAGACATTA
CAAATGAAATAGAGAAAGCTATAAAAAGAGCTGAAGACGCTGGTGTAAGACAG
ACGCGTTCACAGATACACAACAGGTGGCAAGGTGGCAGGCCCTAAAAAAGAG
CAGCAAAAATACGCGTCTGCTGACTTAAACAACCAAAATTCCTAGAAGCAACAGAAG
AGGAAACTATTAATTTTAAAGAAAATGGAGCGGGGAAGAAGACTTCTCAGGAA
TATATGATTTAATATACGGAGCCGAGAAGCAGTAGAAAAAATGGGATGAAAG
GTATGGAACAAGAGGTCAAAAGAGGCCACTAAAGAAAAATCCAAAACTACAGCTG
ATGGGATACTGCGATTGTAAAAAGTAATGAAAGCAAAAAGTGGAAAAAATTAAG
AAAAACAACATAAAAAAAGCTTGGATGTGGCTTAAACAGGAGAAACTA
AAATCAGATTAGAATCATCAGCTCAAGAAATTAAGATGAAATAAATAAAATTA
AAGCTAATGCTAAAAAAGAGGGCGTAAAAATTCGAGGCTTTCACAGATAAACAAA
CAGGCAGCAAGGTATCAGAAAAAGCCTGAATTCATCTTAAAGCAAAAAATAAAG
CTATTCAGGTGGCAGAAAAATTTGTAAGCAATAAAAGAGGAAGCAGAAAAAC
TTAAAAAGAGTGGAAAGTGTGGTGCATTCTCAGCAATGTATGACTTAATGCTTGA
TGTCTCAAAACCACTAGAAGAGATTGGAATACAAAAATGACAGGAACAGTTAC
AAAGGAAGCTGAAAAAAGCTCCTCAACTACAGCTGAGGGGATACTTGTATTGC
ACAAGCAATGGAAGAAAAATTTGAACAAATGTTAATAAAAAACACAAGACGCCCT
CAAAAACCTCGAGGAAAAAGCCAACACTGCTGCTACTACAAAAGCTTTCGGGCCG
ACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGAATTC
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pNCMO2/*dbpAAG*.

сударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Пул сывороток крови включал: сыворотки крови пациентов с установленным клиническим диагнозом болезни Лайма в стадии диссеминации ( $n = 6$ ) и поздней стадии ( $n = 6$ ). Все сыворотки охарактеризованы в коммерческих тест-системах (Anti-Borrelia-Euroline-WB и Anti-Borrelia plus VlsE ELISA (IgG), Euroimmun).

**Вестерн-блот.** Постановку иммуноблоттинга проводили следующим образом. Белки из ПААГ с помощью трансблоттера TE70XP (Hoefer, США) переносили на нитроцеллюлозную мембрану при силе тока 200 мА в течение 60 мин. Дальнейшие процедуры отмывки и инкубации мембраны с реагентами проводили при температуре 37°C на ротационном шейкере ST-3L (ELMI Ltd., Латвия) при 150 rpm. Мембрану инкубировали в растворе ФСБ, содержащем 5% обезжиренного молока в течение 40 мин. Далее проводили отмывку мембраны в течение 5 мин раствором ФСБ-Т (ФСБ, содержащий 0,1% твин-20) и инкубировали 1 ч в растворе (1:100) сыворотки крови пациентов. После этапа отмывки (трижды по 5 мин) мембрану инкубировали 40 мин в растворе антител козы к иммуноглобулинам (IgG) человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. После отмывки (трижды по 5 мин) мембрану помещали в раствор субстратной смеси (0,05% 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида, 0,015% перекиси водорода, 0,01М ФБР (pH 7,4)). Результаты регистрировали через 5–10 мин, останавливая реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

**Результаты и обсуждение.** Подтверждение и анализ нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG*. Для подтверждения нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG* проведено секвенирование рекомбинантной плазмидной ДНК pNCMO2/*dbpAAG* с праймера, комплементарного промоторной области векторной плазмиды pNCMO2 (рис. 1).

Анализ нуклеотидной последовательности гибридного гена *dbpAAG*, проведённый с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE, показал, что в составе плазмидной ДНК pNCMO2 клонирован фрагмент ДНК размером 996 п.о., который находится в единой открытой рамке считывания со структурой, кодирующей лидерный пептид (выде-

CSLTGKARLESSVKDITNEIEKAIKEAEDAGVKTDAFTDTQTGGKVAGPKIRAAKIRV  
ADLTTKFLATEEETINFKENGAGEEDFSGIYDLIYGAAEAVEKIGMKGMQEVEVKEAT  
KENSKTADGILAVKVMKAKVKEIKEKQTKNQKLGCGLTGETKIRLESSAQEIKDE  
INKIKANAKKEGVKFEAFDTKQTGSKVSEKPEFILKAKIKAIQVAEKFKAIKEEAELK  
KKS GSSGAFSAMYLMLDVSKPLEEIGIQKMTGTVTKEAEKTPPTTAE GILAIQAAME  
EKLNNVNNKKQQDALKNLEEKANTAATTKLAALAE

Рис. 2. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка DbrAA-G, полученная в результате трансляции нуклеотидной последовательности гена *dbpAAG*.

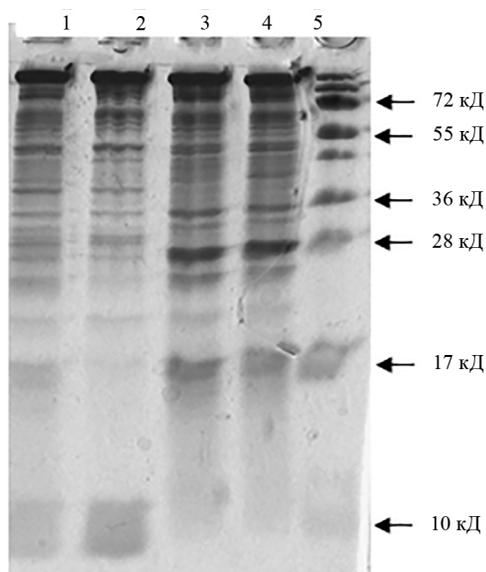


Рис. 3. Электрофоретический анализ культуральной жидкости и клеток полученных после культивирования рекомбинантных клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG*.

Трек 1, 2 – клетки *B. choshinensis/dbpAAG*; 3, 4 – КЖ; 5 – маркёры молекулярных масс.

лен жирным курсивом на рис. 1), необходимый для секреции белка DbrAA-G в среду культивирования.

*Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка DbrAA-G.* Путём трансляции из нуклеотидной последовательности гена *dbpAAG* получена аминокислотная последовательность белка DbrAA-G, показанная на рис. 2.

*Экспрессия гибридного гена dbpAAG.* Полученную после культивирования рекомбинантных клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* КЖ и клетки тестировали на наличие рекомбинантного белка с помощью SDS-электрофореза в 13% ПААГ (рис. 3).

Как видно на рис. 3, в КЖ клонов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* (треки 3 и 4) имеется белковая полоса с мол. массой около 30 кД, соответствующей расчётной молекулярной массе белка слитного антигена DbrA *B. afzelii* и *B. garinii*.

*Иммунохимическая характеристика слитного рекомбинантного антигена DbrAA-G.* КЖ после культивирования клона *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* в жидкой среде МТ анализировали методом иммуноблоттинга с пулом сывороток крови больных Лайм-боррелиозом. На рис. 4 представлен результат анализа, из которого видно, что секретируемый в КЖ штамма *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* слитный полипептид DBPA *B. afzelii* и *B. garinii* специфически связывает

антитела к DBPA *B. afzelii* и *B. garinii* возбудителя боррелиоза.

Ранее нами сконструирован гибридный ген *dbpAG*, при экспрессии которого в *E. coli* получен слитный рекомбинантный белок DbrAAG, состоящий из иммуногенных доменов DbrA *B. afzelii* и *B. garinii* и проявляющий высокую иммунохимическую активность в ИФА при анализе сывороток от больных боррелиозом [17]. Рекомбинантный антиген после синтеза в клетках *E. coli* переходит в нерастворимую форму (inclusion bodies), что затрудняет последующее его использование в некоторых форматах иммунохимических тестов, в частности в иммунохроматографии. Предпринята попытка получения растворимого и стабильного рекомбинантного полипептида DbrAAG. Для этого выбрана экспрессионная система на основе штамма *Brevibacillus choshinensis* (TAKARA, Япония, пат. 20103774, 3696322, 3734593, 3433807), с помощью которой успешно получен ряд функционально активных белков из различных организмов в растворимой форме в значительных количествах. Система обеспечивает высокопродуктивную экспрессию в растворённом виде гетерологичных белков, включающих ферменты, антигены, антитела, цитокины с сохранением их функциональной активности в диапазоне 0,1 – 3,7 г/л [18].

Использован полученный ранее слитный ген *dbpAAG*, который переклонирован в плазмиду pNCMO2. Рекомбинантной плазмидой трансформирован штамм *B. choshinensis*. Рекомбинантный клон *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* при культивировании в жидкой питательной среде секретирует белок с мол. массой около 30 кД (соответствует расчётной), способный взаимодействовать с сыворотками крови больных боррелиозом. В связи с недостаточной продуктивностью полученного рекомбинантного клона (не более 5 мг/л), что может быть вызвано токсичностью гибридного белка и/или неэффективной трансляцией из-за вырожденности некоторых кодонов, планируется дальнейшая оптимизация кодонов гена *dbpAAG* и использование векторной системы, адаптированной для экспрессии генов токсичных белков в клетках *B. cho-*

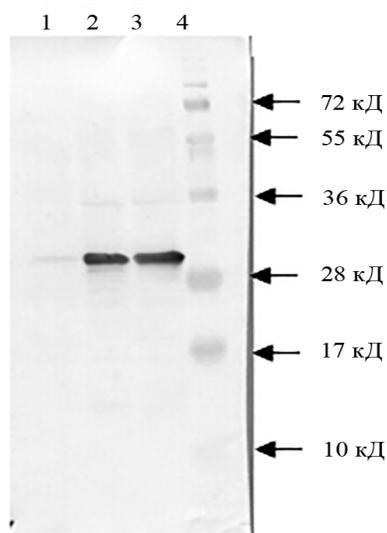


Рис. 4. Иммуноблот препаратов *B. choshinensis/pNCMO2/dbpAAG* с пулом сывороток больных Лайм-боррелиозом.

Трек 1 – лизат биомассы *B. choshinensis/dbpAAG*; 2, 3 – КЖ после ферментации клонов и центрифугирования; 4 – маркёры молекулярных масс.

*shinensis*. После решения проблемы достаточной продукции химерного рекомбинантного антигена DbrAA-G планируется его использование при конструировании серодиагностического теста для диагностики боррелиозов в формате иммунохроматографии.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИР № 050 Роспотребнадзора «Мониторинг за циркуляцией возбудителей боррелиоза в отдельных регионах Российской Федерации и совершенствование средств диагностики боррелиозов».

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-11, 15, 17°19  
см. REFERENCES)

12. Беклемишев А.Б., Рябченко А.В., Караваев В.С. Рекомбинантные химерные полипептиды, несущие эпитопы различных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* и способ диагностики иксодового клещевого боррелиоза. Патент РФ № 2514230; 2014.
13. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Химерный белок, используемый для диагностики лайм-боррелиоза. Патент РФ № 2546246; 2015.
14. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Химерный белок боррелии, нуклеиновая кислота, кодирующая такой белок, экспрессирующая кассета, вектор, способ и набор для диагностики лайм-боррелиоза, вакцина для профилактики боррелиоза. Патент РФ № 2549698; 2015.
16. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. *Паразитология*. 2002; 36 (3): 177-87.

## REFERENCES

1. Hu L.T. In the clinic. Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 2012; 157(3): 2-16.
2. Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.P., Jaulhac B., Kaiser R., et al. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 69-79.
3. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012; 379(9814): 461-73.
4. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(12): 1108-32.
5. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 49(1): 13-21.
6. Ang C.W., Notermans D.W., Hommes M., Simoons-Smit A.M., Herremans T. Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight

ELISAs and five immunoblots. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(8): 1027-32.

7. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(6): 1433-44.
8. Hunfeld K.P., Kraiczy P. When is the best time to order a Western blot and how should it be interpreted? *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37: 167-77.
9. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., et al. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 3602-9.
10. Gerritzen A., Brandt S. Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology. *Methods*. 2012; 56 (4): 477-83.
11. Porwancher R.B., Hagerty C.G., Fan J., Landsberg L., Johnson B.J., et al. Multiplex immunoassay for Lyme disease using VlsE1-IgG and pepC10-IgM antibodies: improving test performance through bioinformatics. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(5): 851-9.
12. Beklemishev A.B., Rjabchenko A.V., Karavaev V.S. Recombinant chimeric polypeptides, carrying epitopes of various immunodominant proteins spirochet of the borrelia burgdorferi sensu lato complex, and method of diagnostics of tick-born borreliosis. Patent RF N 2514230; 2014. (in Russian)
13. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Chimeric Protein used for Lyme-Borreliosis Diagnostics. Patent RF N 2546246; 2014. (in Russian)
14. Leve Lionel., Mezhan-Leturnel Odil. Borrelia hybrid protein, nucleic acid coding this protein, expressing cartridge, vector, method and kit for diagnosing Lyme borreliosis, vaccine for borreliosis prevention. Patent RF N 2549698; 2015. (in Russian)
15. Heikkila T., Seppala I., Saxen H., Panelius J., Yrjanainen H., Lahdenne P. Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(2): 453-60.
16. Korenberg Ye. I., Gorelova N.B., Kovalevskij U.V. The main features of natural foci tick-born borreliosis in Russia. *Parazitologiya*. 2002; 36 (3): 177-87. (in Russian)
17. Baranova E., Solov Ev P., Panfertsev E., Baranova A., Feduykina G., Kolombet L., Morshed M. G., Biketov S. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 807: 9-21.
18. Makoto M., Hiroshi H., Miyauchi A. Brevibacillus Expression System: Host-Vector System for Efficient Production of Secretory Proteins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11(3), 251-8.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

Поступила 27.03.18

Принята к печати 13.04.18

## РЕЦЕНЗИЯ

### **Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдоница А.С. ПРОИЗВОДСТВО НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ. Орехово–Зуево: ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»; 2017. 208 с.**

В 2017 г. ГОУ ВОМО «Государственный гуманитарно-технологический университет» издана монография Марданлы С.Г., Симонова В.В., Авдониной А.С. «ПРОИЗВОДСТВО НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ».

Авторы рецензируемой монографии – ведущие сотрудники научно-производственного предприятия ЗАО «Эколаб» (г. Электрогорск), специализирующегося в сфере выпуска современных медицинских изделий (МИ) для нужд лабораторно-диагностической практики.

Представленное издание органично расширяет рамочное содержание ряда документов, регламентирующих отечественное производство МИ. В монографии приведён оригинальный иллюстративный материал по современной номенклатуре специализированных МИ, что в целом свидетельствует о большом личном вкладе авторов в разработку и освещение избранной темы.

При всём разнообразии целей и задач, которые поставили перед собой исследователи, основным является ликвидация пробела в производстве наборов реагентов для лабораторных исследований иммунохимическими методами. При этом общие положения технологии их производства иллюстрируются примерами технологических решений из практики производства конкретных наборов реагентов. Данный «модельный принцип» наряду с другими научными материалами издания должен универсально восполнить отсутствие технологического алгоритма, необходимого для успешного производства любого МИ для диагностики *in vitro*, т.е. в интерпретации авторов «... конкретной документально зафиксированной последовательности операций превращения исходного сырья и материалов в конечный продукт производства с использованием конкретных методических приёмов и оборудования».

Важной задачей настоящей монографии является информирование учащихся медико-биологических факультетов и молодых специалистов в сфере производства диагностических препаратов.

Тесное сотрудничество д-ра мед. наук, проф. С.Г. Марданлы, канд. мед. наук В.В. Симонова и специалиста А.С. Авдониной позволило собрать и обобщить большой лабораторно-производственный материал, который лёг в основу научного издания.

Структура монографии включает введение, шесть разделов и заключение. В книге представлены базо-

вые и прикладные сведения по различным аспектам разработки и производства современных наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами в рамках номенклатуры МИ, выпускаемых предприятием ЗАО «Эколаб». Интересен методологический и понятийный блок монографии. Список цитированной литературы содержит 38 наименований.

Раздел «Организация производства» посвящён изучению и оценке конструктивных и технических характеристик целевых производственных подразделений предприятия «Эколаб», роли технической документации (ТУ, ИП, ТД) и других нормативных документов на производство МИ для диагностики *in vitro*. Отмечено значение сертификации производства по ГОСТ Р ИСО 13485-2011. Авторы пришли к выводу, что «в результате внедрения ГОСТ Р ИСО 13485 организация создаёт у себя корпоративную культуру, в основе которой лежит понимание, реализация и соблюдение всех нормативных требований, предъявляемых к МИ от момента разработки, до утилизации». В разделе «Производство иммуноферментных тест-систем (ИФТС)» приведены данные по широкому кругу вопросов оборота ИФТС в рамках номенклатуры, выпускаемой предприятием «Эколаб». Раздел «Производство тест-систем для иммунного блоттинга (ИБ)» посвящён изучению этапов разработки и производства коммерческих наборов ИБ по выявлению патогенов и оценки активности инфекционного процесса.

Материал раздела «Производство наборов реагентов для иммунофлюоресцентного анализа» представлен в рамках перечня коммерческих наборов, выпускаемых предприятием для лабораторной диагностики ряда инфекционных заболеваний (сифилиса, микоплазмоза, герпеса, хламидиоза). Логичным дополнением предыдущих разделов является раздел «Производство наборов реагентов для прочих иммунохимических методов». По мнению авторов, здесь должны фигурировать реагенты, используемые в реакции агглютинации, пассивной гемагглютинации, агглютинации латекса, микропреципитации с кардиолипиновым антигеном при традиционной серологической диагностике ряда бактериальных инфекций. Эти материалы, как и данные по производству МИ для диагностики *in vitro* из крови животных-продуцентов, имеют преимущественно справочный характер. В завершающей части монографии представлена авторская

оценка роли технического контроля в производстве наборов реагентов в рамках требований ГОСТ 15467–79, ГОСТ Р ИСО 9000–2001, ГОСТ Р ИСО/ТО 10013–2007 и других документов, регламентирующих качество продукции.

Компактно составленное «Заключение» отражает авторское видение роли технологии производства современных МИ для диагностики *in vitro*, когда иммунохимические исследования по многим позициям требуют постоянных экспериментальных проработок, выполняемых тем же персоналом, который занят промышленным выпуском соответствующих продуктов. Очевидно, что возникает крайне тонкая ситуационная грань между серийным промышленным производством указанных продуктов и постоянной исследовательской работой. Это вынуждает искать оптимальные соотношения между обязательностью строгой регламентации и максимальной стандартизации всех технологических операций и необходимостью учёта при этом постоянных вариаций реальных условий их выполнения.

Достоинством рецензируемого издания является его междисциплинарный профиль и практическая клинико-лабораторная направленность. Оригинальный материал, формат и структура книги вынужда-

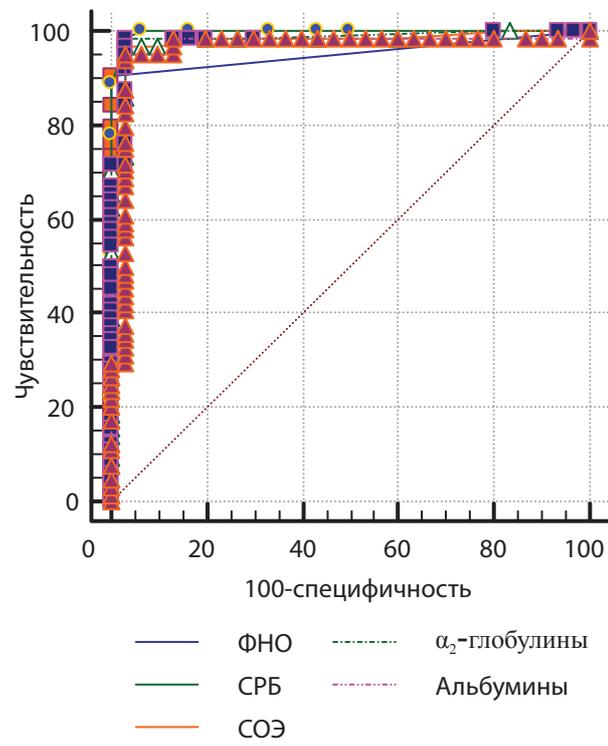
ют авторов в зависимости от ситуации называть свой труд «монография», «учебно-методическое пособие», «научное издание», «пособие». Нам представляется целесообразным рецензируемое издание определить, как «монография по продуктам медицинских изделий». Рекомендуемый формат, с нашей точки зрения, будет наиболее полно соответствовать научно-производственной специфике книги.

Рецензируемая монография написана на высоком научном и методическом уровне, с учётом современных данных по различным аспектам разработки и производства современных наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами.

Обсуждение настоящего издания широким кругом специалистов по клинической лабораторной диагностике должно способствовать активному продвижению и внедрению отечественной номенклатуры медицинских изделий для диагностики *in vitro* в учреждениях здравоохранения Российской Федерации.

В. И. Кочеровец, д-р мед.наук, проф. кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО «ПЕРВЫЙ МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России», Москва

К ст. Ю.И. Третьяковой и соавт.



ROC- кривые для ФНОα, СРБ, СОЭ, α<sub>2</sub>-глобулинов и альбумина.