

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 66
2 • 2021

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

ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 20.02.2021.
Подписано в печать 25.02.2021.
Формат 60 × 88½.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
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.

Индекс 71442 — для подписчиков

**Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-rf.ru**
**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 2. 65–128.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), 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*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), 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*), 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 iagnostika

Volume 66
2 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: 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 EM-BASE, 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 A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY, V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA (executive editor), 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*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), 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*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Воротникова С.Ю., Дзеранова Л.К., Федорова Н.С., Пигарова Е.А., Вершинина М.Г., Ильин А.В.*
Исследование уровня мономерного пролактина с использованием методики преципитации с полиэтиленгликолем и технологии TRACE 69
- Ройтман А.П., Седова Н.А., Годков М.А.*
Лабораторные показатели патологических изменений у больных хронической сердечной недостаточностью с метаболическим синдромом 75

ИММУНОЛОГИЯ

- Ковалева О. В., Белова Т.П., Кушлинский Д.Н., Короткова Е.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Зиновьев С.В., Терешкина И.В., Соколов Н.Ю., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е.*
Растворимые формы контрольных точек иммунитета при раке яичников 80

ЦИТОЛОГИЯ

- Карпова А.Е., Шабалова И.П., Созаева Л.Г., Тумгоева Л.Б.*
Значение комплексного цитологического исследования в диагностике патологии эндометрия (обзор литературы) 87
- Сметанина С.В., Ускова Е.Ю., Хусиянова А.А., Даняева М.Б., Королькова С.Б., Славнова Е.Н., Воронова Н.Н.*
Исследование клеточного состава плевральных выпотов серозного характера. Концептуальные вопросы преаналитики 95
- Абдрахманова Е.Р., Власова Н.В., Масыгутова Л.М., Гизатуллина Л.Г., Гимранова Г.Г., Чудновец Г.М., Садретдинова Г.Р.*
Цитогенетические особенности букарального эпителия при воздействии вредных факторов металлургического производства 99

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Тепленький М.П., Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С., Гасанова А.Г.*
Взаимосвязь показателей пероксидации и гемограммы у детей с патологией тазобедренного сустава. 104

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Боронина Л. Г., Саматова Е. В., Кукушкина М. П., Панова С. А., Устюгова С. С.*
Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для автоматического бактериологического анализатора ЮНОНА®Labstar 50 110
- Полосенко О.В., Шепелин А.П., Ажермачева Н.И., Абаев И.В.*
Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. 115

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Акимов И.А., Тимофеев Д.И., Мавзютов А.Р., Иванов М.К.*
Выявление циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2K/1B вируса гепатита С в сыворотке крови пациентов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. 122

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Vorotnikova S.Yu., Dzeranova L.K., Fedorova N.S., Pigarova E.A., Sukhanova O.V., Vershinina M.G., Il'in A.V.
Evaluation of monomeric prolactin level by TRACE method and precipitation with polyethylene glycol. 69

Roytman A.P., Sedova N.A., Godkov M.A.
Laboratory indicators of pathological changes in patients with chronic heart failure with metabolic syndrome 75

IMMUNOLOGY

Kovaleva O.V., Belova T.P., Kushlinsky D.N., Korotkova E.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Zinoviev S.V., Tereshkina I.V., Sokolov N.Yu., Kudlay D.A., Kushlinskii N.E.
Soluble forms of immune checkpoints in ovarian cancer. 80

CYTOLOGY

Karpova A.E., Shabalova I.P., Sozaeva L.G., Tumgoeva L.B.
Comprehensive approach to diagnostic cytology in endometrial pathology (review of literature) 87

Smetanina S.V., Uskova E.Yu., Khusiyanova A.A., Danyaeva M.B., Korol'kova S.B., Slavnova E.N., Voronova N.N.
Cellular composition research of serous pleural effusion fluids. Conceptual issues of preanalytics 95

Abdrakhmanova E.R., Vlasova N.V., Masyagutova L.M., Gizatullina L.G., Gimranova G.G., Chudnovets G.M., Sadrtidinova G.R.
Cytogenetic features of buccal epithelium under exposure to harmful factors of metallurgical production 99

HEMATOLOGY

Teplen'kiy M.P., Matveeva E.L., Spirkina E.S., Gasanova A.G.
Relationship of peroxidation indicators and hemograms in children with hip joint pathology. 104

MICROBIOLOGY

Boronina L. G., Samatova E. V., Kukushkina M. P., Panova S. A., Ustyugova S. S.
In-laboratory quality control of nutrients for automatic bacteriology analyzer YUNON®Labstar 50 110

Polosenko O. V., Shepelin A. P., Azhermacheva N. I., Abaev I. V.
Clinical trials of new culture media for Staphylococcus isolation. 115

CLINICAL MOLECULAR STADIES

Akimov I.A., Timofeev D.I., Mavzyutov A.R., Ivanov M.K.
Detection of circulating HCV recombinant form RF1_2K/1B in blood serum of patients by real-time RT-PCR. 122

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Воротникова С.Ю.¹, Дзеранова Л.К.¹, Федорова Н.С.¹, Пигарова Е.А.¹, Вершинина М.Г.², Ильин А.В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ МОНОМЕРНОГО ПРОЛАКТИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ ПРЕЦИПИТАЦИИ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ И ТЕХНОЛОГИИ TRACE

¹ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ, 117036, Москва, Россия;

² ФГБУ ДПО «ЦГМА», 121359, Москва, Россия

Пролактин существует в различных формах, включая мономерную биологически активную фракцию (23 кДа) и высокомолекулярную – макропролактин (>100кДа). Макропролактин не обладает биологической активностью, но может являться причиной ложноположительных результатов. В Российской Федерации наиболее распространенным методом определения макропролактина является иммуноферментный метод с проведением ПЭГ-преципитации.

В исследование включены пациенты с предварительным диагнозом «гиперпролактинемия» старше 18 лет. Определение уровня общего пролактина проводилось с помощью иммуноферментного метода (ИФМ). Исследование уровня мономерного пролактина выполнялось двумя способами: ИФМ после ПЭГ-преципитации (ИФМ+ПЭГ) и с применением TRACE технологии.

В исследование включено 37 пациентов (34 женщины и 3 мужчины). Медиана возраста составила 30 [25;35] лет. Медиана уровня мономерного пролактина при анализе ИФМ+ПЭГ составила 461,6 [375,0;821,2] мЕд/л, при анализе с использованием технологии TRACE – 449,9 [357,2;749,2] мЕд/л (p=0,689). Совпадение результатов лабораторного исследования мономерного пролактина двумя методами отмечено у 28 пациентов, из них гиперпролактинемия диагностирована у 46% (17 человек), нормопролактинемия – у 30% (11 пациентов). При этом частота клинических признаков избыточной секреции пролактина (вторичная аменорея, олиго-опсоменорея, бесплодие, галакторея) по группам не различалась (p>0,05). Феномен макропролактинемии (ИФМ+ПЭГ) верифицировался у 12 пациентов (32%), из них у 8 по данным TRACE в уровень мономерного пролактина соответствовал нормопролактинемическому референсному интервалу, а у 4 – превосходил данный диапазон. Измерение уровня пролактина методом TRACE целесообразно для постановки правильного диагноза у пациентов с несоответствием клинической симптоматики результатам исследования пролактина стандартными методами.

Ключевые слова: пролактин; биопролактин; гиперпролактинемия; феномен макропролактинемии.

Для цитирования: Воротникова С.Ю., Дзеранова Л.К., Федорова Н.С., Пигарова Е.А., Вершинина М.Г., Ильин А.В. Исследование уровня мономерного пролактина с использованием методики преципитации с полиэтиленгликолем и технологии TRACE. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 69-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-69-74>

Vorotnikova S.Yu.¹, Dzeranova L.K.¹, Fedorova N.S.¹, Pigarova E.A.¹, Sukhanova O.V.¹, Vershinina M.G.², Il'in A.V.¹

EVALUATION OF MONOMERIC PROLACTIN LEVEL BY TRACE METHOD AND PRECIPITATION WITH POLYETHYLENE GLYCOL

¹ Endocrinology Research Centre, 117036, Moscow, Russian Federation;

² Central state medical academy of department of presidential affairs, 121359, Moscow, Russian Federation

Prolactin exists in various forms including the monomeric biologically active form (23kDa) and a higher molecular weight form, bound most commonly to IgG, known as macroprolactin (>100kDa). Macroprolactin lacks biological activity and is one of the causes of false-positive results. In Russian Federation the most common method for macroprolactin determination is PEG precipitation test. We had conducted a retrospective analysis of 37 samples of patients with hyperprolactinemia (3 of them were males). The mean age was 30 [25;35] years. Prolactin level was measured by the immunoenzyme method with manual PEG precipitation and TRACE. The mean values found by the immunoenzyme method with manual PEG precipitation were 461,6 [375,0;821,2] mU/l, by TRACE – 449,9 [357,2;749,2] mU/l. The number of patients with normal prolactin levels was 30% (11) confirmed by two methods, high prolactin level at 46% (17). The prevalence of clinical symptoms of hyperprolactinemia was not differ depend the groups. The phenomenon of macroprolactinemia was registered in 32% (12) of patients. In 8 persons of this group normal prolactin level was revealed and in 4 patients hyperprolactinemia was found by TRACE. Measurements of prolactin levels by the TRACE method is useful for correct diagnosis in patients with equivocal results received by traditional method with PEG precipitation.

Key words: prolactin; bioprolactin; hyperprolactinemia; phenomenon of macroprolactinemia.

For citation: Vorotnikova S.Yu., Dzeranova L.K., Fedorova N.S., Pigarova E.A., Sukhanova O.V., Vershinina M.G., Il'in A.V. Evaluation of monomeric prolactin level by TRACE method and precipitation with polyethylene glycol. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 69-74 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-69-74>

For correspondence: Vorotnikova S.Yu., Postgraduate student, Endocrinology Research Centre; e-mail: vorotnikova.s.y@gmail.com

Information about authors:

Vorotnikova S.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-9816-5043>;

Dzeranova L.K., <http://orcid.org/0000-0002-0327-4619>;

Pigarova E.A., <http://orcid.org/0000-0001-6539-466X>;

Fedorova N.S., <http://orcid.org/0000-0001-7470-167>;

Vershinina M.G. <https://orcid.org/0000-0001-6051-5231>;

Ильин А.В. <https://orcid.org/0000-0002-0514-7111>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 08.06.2020
Accepted 22.06.2020

Введение. В настоящее время под феноменом макропролактинемии принято понимать наличие макропролактина в сыворотке крови в концентрации более 60% [1,3,4]. Макропролактин представляет собой комплекс антиген-антитело, состоящий из молекулы мономерного пролактина и иммуноглобулина G. Молекулярный вес данной фракции составляет более 150 кДа, в связи с чем макропролактин также называют «big-big» пролактин [1]. Впервые понятие макропролактинемии ввел R.D.Jackson и соавт. [2] при описании пациента без аденомы гипофиза с преобладанием высокомолекулярной фракции пролактина.

Механизм формирования антител к пролактину до конца не ясен. Согласно одной из гипотез стимулирование антигенной активности связано с неадекватным фосфорилированием молекулы. В норме в гипофизе присоединение фосфорной кислоты происходит к 163 и 195 сериновым остаткам пролактина, в то время как циркулирующая в кровотоке молекула фосфорилируется только по 195 серину. У ряда пациентов с макропролактинемией наблюдается преобладание в кровотоке пролактина с остатком фосфорной кислоты в положении серин 163, что, вероятно, рассматривается иммунной системой как аутоантиген [5]. Данный механизм формирования макропролактина подтверждается успешными экспериментальными демонстрациями на мышинных моделях. Пусковой фактор, приводящий к чрезмерной миграции неадекватно фосфорилированных молекул пролактина из гипофиза в общий кровоток дискутабелен, ряд исследователей предполагают иницирующую роль воспалительным процессам, в частности, гипофизиту [6]. В другом исследовании продемонстрирована прямая ассоциативная связь макропролактинемии и активности матричной металлопротеиназы-3 (ММР-3) у пациентов с ревматоидным артритом. В ходе дальнейших экспериментов показано, что ММР-3 участвует в рестрикции молекулы пролактина до низкомолекулярных вазоингибинов, вовлеченных в регуляцию эндотелиальной клеточной пролиферации и ангиогенеза [7].

Частота макропролактинемии в популяции составляет 3,7% без значимых гендерных различий. При этом среди пациентов с гиперпролактинемией встречаемость данного феномена составляет около 25% (5-35%) [9,10].

Отсутствие явной клинической симптоматики у пациентов с макропролактинемией свидетельствует об аморфности высокомолекулярного пролактина в отношении биологического действия. По одной из версий причиной данного факта служит невозможность проникновения большой молекулы через стенку капилляров. При этом в ходе проведения экспериментов с клеточной линией лимфомы Nb2, экспрессирующей крыси-

ные рецепторы к пролактину, показан пролиферативный эффект макромолекулы гормона, что, по мнению авторов, обусловлено непосредственным взаимодействием с клеточной поверхностью и повышенной диссоциацией [8]. О стабильности молекулы макропролактина в условиях *in vivo* судить не представляется возможным.

Проблема диагностики истинной гиперпролактинемии в условиях присутствия значимого количества макропролактина остается актуальной. Многие исследователи признают гель-фильтрационную хроматографию в качестве «золотого стандарта» для сепарации и количественного учета различных форм пролактина [3,11]. Однако, данный метод требует значительных материальных, технических и временных вложений, в связи с чем не получил широкого распространения в клинической практике. На этом фоне более приемлемым для скрининговой диагностики макропролактинемии оказалось использование метода преципитации с полиэтиленгликолем (ПЭГ), базирующегося на иммуноопосредованной дифференцировке высокомолекулярных форм пролактина. Недостатком методики следует считать значимые потери мономерной фракции в преципитате, достигающие 25% за счет так называемого «матричного» эффекта сыворотки крови [12]. Принимая во внимание, что в ряде коммерческих наборов не производится учет такой потери, сомнительными представляются пост-ПЭГ референсные показатели мономерной фракции пролактина. Вторым немаловажным аспектом ПЭГ методики, как не автоматизированного способа лабораторной диагностики, является неизбежность влияния человеческого фактора. В редких случаях повышенный уровень гаммаглобулина в сыворотке или связь молекулы пролактина с иммуноглобулином А приводят соответственно к ложноположительным и ложноотрицательным результатам [13]. Исследователями неоднократно предпринимались попытки усовершенствовать методику определения макропролактина. Так, Y. Chen и соавт. [14] отметили необходимость пятикратного разведения образцов сыворотки перед ПЭГ для снижения концентрации высокомолекулярной фракции, что приводило к уменьшению ПЭГ-потерь мономерного пролактина. J. Schiettecatte и соавт. [15] отметили эффективность применения иммунопреципитации с антителами к человеческим IgG.

В настоящее время разработана новая методика количественного определения мономерного пролактина, основанная на технологии TRACE (Time-Resolved Amplified Cyturate Emission, усиленное разрешение крипта с временным разрешением). Данная методика базируется на слиянии моноклонального антитела, конъюгированного с криптом европия (клеткообразная структура с ионом европия в центре), с мономерной

молекулой пролактина и измерении флуоресценции иммунокомплекса после воздействия азотным лазером. Физико-технологическую уникальность TRACE составляет безызлучательная передача энергии от донора (криптит) к акцептору, который является частью химически модифицированного светособирающего водородо-левого белка (XL 665). Близость криптата и акцептора, когда они являются частью иммунного комплекса, и перекрытие спектра эмиссии донора и спектра абсорбции акцептора, усиливают флуоресцентный сигнал криптата и увеличивают продолжительность сигнала акцептора, позволяя тем самым измерить флуоресценцию с временной задержкой.

Таким образом, исследование биологически активной фракции пролактина производится напрямую, а не после сепарирования других форм с большим молекулярным весом, что позволяет минимизировать неточности результатов лабораторного анализа, обусловленные неполным разделением фракций и присутствием человеческого фактора [16].

Целью настоящего исследования являлась оценка клинических проявлений избыточной секреции пролактина у пациентов с гиперпролактинемией различного генеза и сравнение показателей мономерной фракции пролактина, полученных с использованием двух методов: на основе технологии TRACE (анализатор Brahms Kryptor compact plus) (TRACE) и иммуноферментного (анализатор Cobas 6000) с предварительным этапом ПЭГ-преципитации (ИФМ+ПЭГ).

Материал и методы. В исследовании принимали участие пациенты, проконсультированные в поликлиническом отделении ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России в период с января по июнь 2017 г. с предварительным диагнозом «гиперпролактинемия» и направленные на проведение повторного лабораторного исследования уровня пролактина и биопролактина. Критериями включения являлись: возраст старше 18 лет, гиперпролактинемия (уровень общей фракции пролактина более 540 мЕд/л по данным лаборатории гормонального анализа ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России). Критерии исключения: беременность, лактация. Все пациенты прошли клиническое обследование, включающее сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, общеклинический осмотр, антропометрическое исследование. Для уточнения генеза гиперпролактинемии всем пациентам проводилась магнитно-резонансная томография головного мозга.

Определение уровня общего пролактина проводилось с помощью иммуноферментного метода (ИФМ) на анализаторе Cobas 6000 (Roche, Швейцария). Исследование уровня мономерной фракции пролактина выполнялось двумя способами: ИФМ на анализаторе Cobas 6000 после предварительного этапа преципитации макромолекулярной фракции в 25% растворе полиэтиленгликоля и с применением TRACE технологии на анализаторе BRAMS Kryptor compact plus (BRAHMS GmbH, Германия).

Статистические расчеты производили с помощью программы Statistica 10 (StatSoft inc.). Количественные данные приведены в виде медианы и интерквартильного размаха. Для оценки значимости различий в зависимых группах применялся критерий Вилкоксона для количественных данных и двусторонний тест Фишера для качественных. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. В исследование включено 37 пациентов (34 женщины и 3 мужчин). Медиана возраста составила 30 [25;35] лет. Причины гиперпролактинемии верифицировали у 9 пациентов: 4 имели пролактинсекретирующую аденому гипофиза (2 макроаденомы, 2 микроаденомы), у 2-х женщин повышение уровня пролактина ассоциировалось с генитальным эндометриозом, у 3-х – с синдромом поликистозных яичников. У 25 пациентов диагностирована идиопатическая гиперпролактинемия. Основными клиническими проявлениями гиперпролактинемии у пациенток являлись: вторичная аменорея (11%), галакторея (13,5%), бесплодие (35%). Мужчины предъявляли жалобы на немотивированную слабость, утомляемость и снижение зрения. По результатам проведенной МРТ головного мозга патология гипоталамо-гипофизарной области диагностирована в 46%, из них аденомы гипофиза в 30 % случаев (рис. 1).

Около трети пациентов (35%) в период исследования получали терапию агонистами дофамина (от 1 до 36 мес, в среднем – 3,8 мес). Доза каберголина варьировала от 0,5 до 3,5 мг в неделю, доза бромокриптина – от 0,625 до 2,5 мг.

Медиана уровня общего пролактина при исследовании крови ИФМ составила 854,5 [727,4; 1498,0] мЕд/л.

Медиана уровня мономерного пролактина при анализе, проведенном посредством ИФМ с предварительным этапом ПЭГ-преципитации, составила 461,6 [375,0;821,2] мЕд/л, при анализе с использованием технологии TRACE – 449,9 [357,2;749,2] мЕд/л. Статистически значимой разницы в показателях не выявлено (критерий Вилкоксона, $p=0,689$) (рис. 2).

При попытке выделения из общей группы пациентов с клинической гиперпролактинемией (на основании особенностей дебюта заболевания, подтвержденного диагноза макро- или микропролактиномы, эффективности проводимого лечения агонистами дофамина) и сравнения показателей мономерной фракции пролактина, полученными разными лабораторными способами, статистически значимых различий между двумя методиками не выявлено (критерий Вилкоксона, $p=0,783$). Аналогичные результаты получены и в группе «клинической нормопролактинемии», в которую включены пациенты без клинических проявлений гиперпролактинемии.

Среди обследованных пациентов у 28 отмечено совпадение результатов лабораторного исследования мономерного пролактина двумя методами. Из них гиперпролактинемия диагностирована у 17 человек, нормопролактинемия – у 11 пациентов. При этом, согласно статистическому анализу, частота наиболее распространенных клинических признаков избыточной секреции пролактина (вторичная аменорея, олиго-опсоменорея, бесплодие, галакторея) по группам не различалась (двусторонний точный критерий Фишера, $p>0,05$) (рис.3). Хотя обращает на себя внимание, что в группе нормопролактинемии ни у одной пациентки не было вторичной аменореи, тогда как в группе гиперпролактинемии вторичная аменорея выявлена в 17,6% случаев. Наиболее вероятно, статистической разницы в данном случае не выявлено из-за небольшого числа наблюдений.

Ввиду того, что методом TRACE определяется сразу мономерная фракция пролактина, исследование общего пролактина и диагностика феномена макропролактинемии (ФМ) может быть проведена только с помощью ИФМ+ПЭГ. В настоящем исследовании ФМ верифици-

ровали у 12 пациентов (32%). Структура клинических проявлений у данной категории пациентов в большей степени складывалась из жалоб на олиго-опсоменорею (50%), бесплодие (46%), астенический синдром (33%), галакторею (17%). МР-признаки патологии гипоталамо-гипофизарной области верифицировали у 3 пациентов (25%), при этом у двух из них диагностирована киста кармана Ратке, формирование которой обусловлено некорректным развитием долей гипофиза и достаточно часто сопровождается умеренной гиперпролактинемией. У третьего пациента выявлена макроаденома гипофиза.

Согласно российским и зарубежным исследованиям у пациентов с ФМ клиническая картина гиперпролактинемии не выражена, частота патологии гипоталамо-гипофизарной области достаточно низкая [9,10]. По данным разных авторов наличие галактореи варьирует в пределах от 2% до 10%, частота олигоменореи – в 10%-14% [3, 4, 9, 10]. В проведенном исследовании полученная частота галактореи сопоставима с ранее известными данными, при этом жалобы на нарушение менструальной функции регистрировались значительно чаще, что, вероятно, обусловлено особенностями дизайна исследования и набора пациентов.

По данным TRACE из 12 пациентов с ФМ у 8-ми уровень мономерного пролактина соответствовал нормопролактинемическому референсному интервалу, а у 4-х – превосходил данный диапазон (рис. 4).



Рис. 1. Структура патологии турецкого седла по данным МР-томографии у пациентов с гиперпролактинемией.

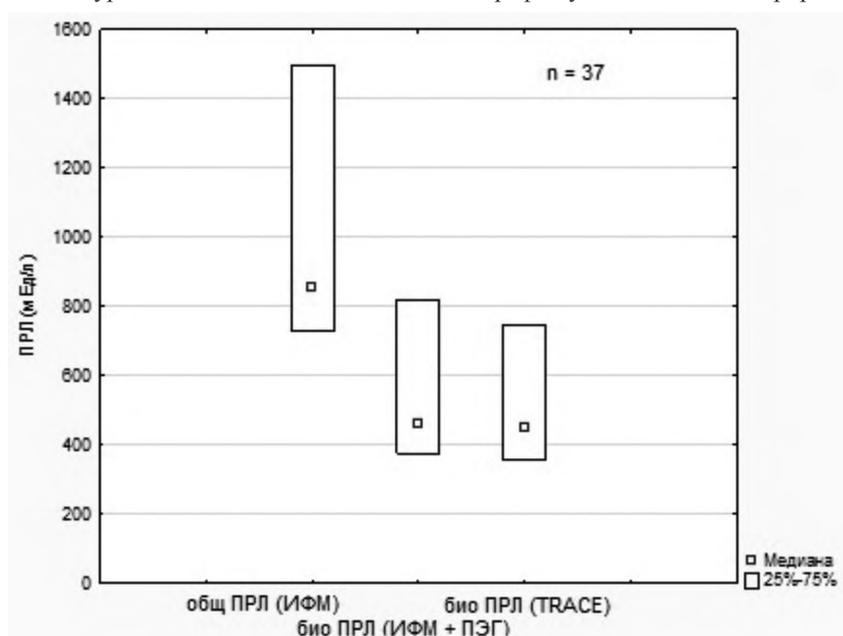


Рис. 2. Уровень общего и мономерного пролактина в группе при применении двух лабораторных методов.

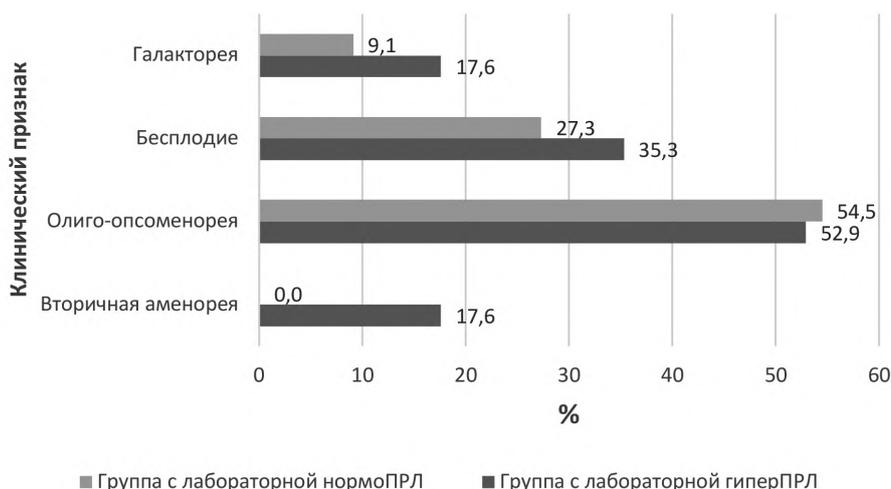


Рис. 3. Клинические симптомы у пациентов с лабораторной гипер- и нормопролактинемией.

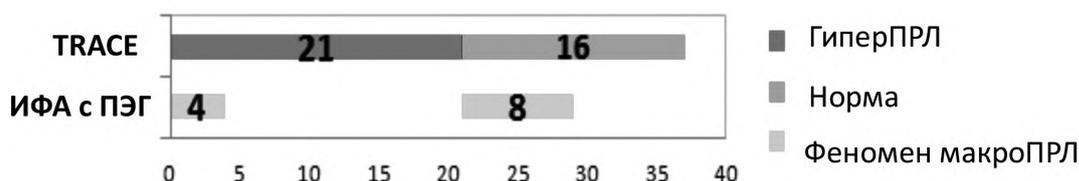


Рис. 4. Преобладание макромолекулярной фракции пролактина после проведения ПЭГ-преципитации в сыворотках пациентов (ГиперПРЛ – гиперпролактинемия, феномен макроПРЛ – феномен макропролактинемии).

Особый интерес представляла группа пациентов из 4 человек с наличием феномена макропролактинемии в сочетании с повышенным уровнем мономерной фракции после ПЭГ, у 2-х из них по результатам TRACE наблюдалась гиперпролактинемия, а у 2-х – нормопролактинемия. У одной из пациенток с ФМ без повышения уровня мономерного пролактина отмечалось наличие клинических признаков гиперпролактинемии в виде галактореи и нарушения менструального цикла. Наличие симптоматики гиперсекреции пролактина в совокупности с результатами лабораторного исследования по методике TRACE (повышенный уровень мономерного пролактина) определило целесообразность назначения терапии агонистами дофамина. Через 2 месяца лечения пациентка отметила прекращение выделений из молочных желез, что свидетельствовало в пользу истинной гиперпролактинемии.

По результатам исследования среди 8 пациенток без ФМ с повышенным уровнем пролактина по данным ИФА+ПЭГ при использовании TRACE верифицировалась нормопролактинемия. Две пациентки из представленной группы предъявляли жалобы на олигоменорею, две – на бесплодие, при этом ни у одной не отмечено галактореи. МР-признаки микроаденомы выявлены у 3-х женщин, у одной – гетерогенность аденогипофиза и четверо не имели патологии гипоталамо-гипофизарной области.

Заключение. Таким образом, очевидно, что пациенты с умеренной гиперпролактинемией и феноменом макропролактинемии, имеющие неспецифические жалобы, а также женщины с повышенным уровнем пролактина и бесплодием, представляют значимые сложности для диагностики и верификации диагноза, в постановке которого врач-эндокринолог в ряде случаев опирается только на

лабораторные показатели. В то же время стоит отметить несовершенство ИФА, который в настоящее время применяется как рутинный метод исследования пролактина, ввиду невозможности исключения человеческого фактора и отсутствия четких референсных параметров для мономерной фракции пролактина. Технология TRACE позволяет минимизировать процент лабораторных ошибок и, как следствие, некорректного лечения. Тем не менее, для более активного внедрения метода в практику, необходимо проведение дальнейших исследований и сопоставление результатов метода с показателями, полученными в ходе гель-фильтрационной хроматографии как «золотого стандарта» исследования уровня мономерной фракции пролактина.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 5-15 см. REFERENCES)

- Мельниченко Г.А., Гончаров Н.П., Дзеранова Л.К., Бармина И.И. Клинические и лабораторные аспекты феномена макропролактинемии. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2007; 3: 52-4.

REFERENCES

- Fahie-Wilson M.N., John R., Ellis A.R. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann. Clin. Biochem.* 2005;42(3):175-92. <http://dx.doi.org/10.1258/0004563053857969>.
- Jackson R.D., Wortsman J., Malarkey W.B. Macroprolactinemia presenting like a pituitary tumor. *Am. J. Med.* 1985;78:346-350. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90448-6](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(85)90448-6).

BIOCHEMISTRY

3. Melmed S., Casanueva F.F., Hoffman A.R. et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Metabol.* 2011; 96: 273-88. doi: 10.1210/jc.2010-1692. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-1692>.
4. Mel'nichenko G.A., Goncharov N.P., Dzeranova L.K., Barmina I.I. Clinical and laboratory aspects of the phenomenon of macroprolactinemia. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2007; 3: 52-4. (in Russian)
5. Hattori N., Ikekubo K., Nakaya Y., Kitagawa K., Inagaki C. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolactinemia due to anti-PRL autoantibodies. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:3036-44. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-1600>.
6. Hattori N., Nakayama Y., Kitagawa K., Li T., Inagaki C. Development of anti-PRL (prolactin) autoantibodies by homologous PRL in rats: a model for macroprolactinemia. *Endocrinology.* 2007;148:2465-70. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1208>.
7. Adachi T., Hattori N., Ishihara T., Iida H., Saito T., Miyashima S. et al. Possible involvement of matrix metalloproteinase-3 in the pathogenesis of macroprolactinaemia in some patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Endocrinol.* 2013;169:203-9. <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-13-0170>.
8. Kavanagh L., Smith T.P., McKenna T.J. Bioactivity of macroprolactin in the Nb2 bioassay may be explained by dissociation yielding bioactive monomeric prolactin. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2007;67:954. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02980.x>.
9. Hattori N., Ishihara T., Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin. Endocrinol.* 2009;71:702-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03570.x>.
10. Gibney J., Smith T.P., McKenna T.J. Clinical relevance of macroprolactin. *Clin. Endocrinol.* 2005;62:633-43. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02243.x>.
11. Samson S.L., Hamrahian A.H., Ezzat S. Clinical relevance of macroprolactin in the absent of presence of true hyperprolactinemia. *Endocr. Pract.* 2015;21(12):1427-35. doi: 10.4158/EP15938.DSC.
12. Kavanagh L., McKenna T.J., Fahie-Wilson M.N., Gibney J., Smith T.P. Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. *Clin. Chem.* 2006;52:1366-72. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.065854>.
13. Fahie-Wilson M., Smith T.P. Determination of prolactin: the macroprolactin problem. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;27:725-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2013.07.002>.
14. Chen Y.J., Song G.Z., Wang Z.N. A new criteria for screening macroprolactinemia using polyethylene glycol treatment combined with different assays for prolactin. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016; 20(9): 1788-94.
15. Schiettecatte J., Van Opdenbosch A., Anckaert E., De Schepper J., Poppe K., Velkeniers B., Smits J. Immunoprecipitation for rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin complexes. *Clin. Chem.* 2005 Sep;51(9):1746-8. Epub 2005 Jul 7. DOI:10.1373/clinchem.2005.048504.
16. Lopez E., Chypre C., Alpha B., Mathis G. Europium (III) trisbipyridine cryptate label for time-resolved fluorescence detection of polymerase chain reaction products fixed on a solid support. *Clin. Chem.* 1993;39(2):196-201.

Поступила 08.06.20
Принята к печати 22.06.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Ройтман А.П.¹, Седова Н.А.^{1,2}, Годков М.А.^{1,3}

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ», 125993, Москва, Россия;

²ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр № 2 Департамента здравоохранения города Москвы», 107564, Москва, Россия;

³ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 129010, Москва, Россия

Наличие метаболического синдрома (МС), значительно увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, приводящих к хронической сердечной недостаточности (ХСН). У 37 пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью (ХСН) без метаболического синдрома (МС) (1 группа) и у 37 пациентов, страдающих ХСН с МС (2 группа), были изучены значения маркеров NT-proBNP, ST-2 и СРБ (С-реактивный белок) и их взаимные корреляции. Целью исследования было определение особенностей их изменений у пациентов с течением ХСН, осложненной МС. Было проведено ранжирование пациентов, путем присвоения ранга значениям концентраций NTproBNP, ST2 и СРБ. Средний уровень ST2 составил 51±24 нг/мл в 1 группе и 62±27 нг/мл у больных во 2-й группе. Средние показатели СРБ в 1 группе составили 23,1±5,3 мг/л, во 2 группе – 33,0±4,4 мг/л (p<0,05). Уровень NTproBNP составил 2413±1586 пг/мл и 2721±1635 пг/мл в 1 и 2 группах соответственно. Были продемонстрированы корреляционные связи между значениями NTproBNP и ST2, NTproBNP и СРБ. В группе ХСН с МС по сравнению с группой ХСН без МС имелось существенно больше больных с наиболее выраженными патологическими уровнями маркеров повреждения: количество больных суммарным рангом 6-9 в группе больных ХСН с МС было 59%, в группе ХСН без МС 38% (p<0,05). Из 18 умерших пациентов 17 входили в число с суммарным рангом от 6 до 9, только 1 больной, умерший после госпитализации, имел суммарный ранг 5. В то же время среди 22 больных, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, 18 пациентов имели суммарный ранг от 0 до 5, у 4 больных этой категории клинические проявления ХСН остались практически без изменений. Результаты ранжирования уровня исследованных лабораторных маркеров позволяют предположить возможность их использования как предиктора различных исходов ХСН.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность; метаболический синдром; NT-proBNP; С-реактивный белок; ST2.

Для цитирования: Ройтман А.П., Седова Н.А., Годков М.А. Лабораторные показатели патологических изменений у больных хронической сердечной недостаточностью с метаболическим синдромом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 75-79. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-75-79>

Roytman A.P.¹, Sedova N.A.^{1,2}, Godkov M.A.^{1,3}

LABORATORY INDICATORS OF PATHOLOGICAL CHANGES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE WITH METABOLIC SYNDROME

¹FGBOU DPO «Russian medical Academy of continuing professional education of the Ministry of health of the Russian Federation», 125993, Moscow, Russia;

²GBUZ «Consultative and diagnostic center No. 2 of the Moscow city health Department», 107564 Moscow, Russia;

³GBUZ «N. V. Sklifosovsky research Institute of emergency medicine of the Moscow city health Department», 129010, Moscow, Russia

The presence of metabolic syndrome (MS) significantly increases the risk of developing cardiovascular diseases that lead to chronic heart failure (CHF). The values of NT-proBNP, ST-2, and CRP markers and their mutual correlations were studied in 37 patients with chronic heart failure (CHF) without metabolic syndrome (MS) (group 1) and 37 patients with CHF with MS (group 2). The aim of the study was to determine the features of their changes in patients with CHF complicated by MS, and to rank patients by assigning a rank value to the values of NTproBNP, ST2, and CRP concentrations. The average ST2 level was 51±24 ng/ml in group 1 and 62±27 ng/ml in group 2. The average values of CRP in group 1 were 23.1±5.3 mg/l, in group 2-33.0±4.4 mg/l (p<0.05). The NTproBNP level was 2413±1586 PG/ml and 2721±1635 PG/ml in groups 1 and 2, respectively. Correlations between the values of NTproBNP and ST2, NTproBNP and CRP were demonstrated. In the group of CHF with MS, compared with the group of CHF, there were significantly more patients with the most pronounced pathological levels of damage markers: the number of patients with a General rank of 6-9 in the group of CHF with MS was 59%, in the group of CHF without MS-38% (p<0.05). Of the 18 patients who died, 17 were among those who had an overall rank of 6 to 9, only 1 patient who died after hospitalization had an overall rank of 5. At the same time, among 22 patients who had improved CHF in the outcome of hospitalization, 18 patients had a total rank from 0 to 5, and in 4 patients of this category, the clinical manifestations of CHF remained virtually unchanged. The results of ranking the level of the studied laboratory markers indicate that they can be used as a predictor of various outcomes of CHF.

Key word: chronic heart failure; metabolic syndrome; NT-proBNP; CRP-C-Reactive Protein; ST2.

For citation: Roytman A.P., Sedova N.A., Godkov M.A. Laboratory indicators of pathological changes in patients with chronic heart failure with metabolic syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 75-79 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-75-79>

Information about authors:

Roytman A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2592-6857>;

Sedova N.A., <http://orcid.org/0000-0002-4990-7733>;

Godkov M.A., <http://orcid.org/0000-0001-9612-6705>.

For correspondence: *Roytman Aleksandr Pol'evich*, doctor of medical Sciences, Professor of the Department of clinical laboratory diagnostics; e-mail: a-roitman@mail.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 15.12.2020
Accepted 30.12.2020

Введение. Среди разных форм сердечно-сосудистой патологии хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является основной причиной летальности, превышая даже летальность после острого инфаркта миокарда. Это связано с увеличением возраста населения и накоплением сопутствующих заболеваний, что способствует увеличению относительного значения и абсолютных цифр развития сердечной недостаточности [1]. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) – это многокомпонентный синдром, который развивается как исход ряда сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Он включает структурную перестройку и дилатацию сердца, уменьшение растяжимости миоцитов, гемодинамические сдвиги, повышающие нагрузку на левый желудочек (ЛЖ), сосудистое воспаление и ремоделирование, нейрогуморальную активацию.

С возрастом и изменением социальных факторов у населения наблюдается нарастание частоты метаболического синдрома (МС). Существует единое мнение о том, что метаболический синдром широко распространен в современной популяции и его наличие существенно повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний, в первую очередь, хронической сердечной недостаточности [2-3]. В связи с многофакторностью патогенеза ХСН были проведены многосторонние исследования, ставившие целью создание эффективного инструмента для скрининга бессимптомной дисфункции левого желудочка (ЛЖ), мониторинга адекватности терапии и прогнозирования течения заболевания [4]. Одним из наиболее эффективных подходов для решения поставленных задач явились лабораторные биомаркеры, в первую очередь это относится к натрийуретическим пептидам (NP), наиболее чувствительным из которых является N-терминальный фрагмент натрийуретического гормона (NT-proBNP) [5-6]. Компоненты метаболического синдрома и сопутствующие патологические процессы могут существенно менять «сердечно-почечную ось» взаимодействия, тем самым влияя на диагностическую специфичность и чувствительность NT-proBNP [7-8]. Дополнительными факторами, усугубляющими развитие ХСН могут выступать воспаление и повреждение сердца. Лабораторным тестом отражающим активность воспаления, в частности сосудистой стенки является высокочувствительный С-реактивный белок (всСРБ), маркером патологических изменений в сердце при хронических заболеваниях и острых повреждениях является белок ST-2- стимулирующий фактор роста, член семейства рецепторов интерлейкина-1 [9]. Лигандом ST-2 является цитокин интерлейкин-33 (IL-33). Сывороточный

ST-2 блокирует кардиопротективный эффект IL-33. Повышенная концентрация циркулирующего в крови ST-2 указывает на высокий риск развития неблагоприятных исходов для больных с хронической сердечной недостаточностью [10].

Цель исследования: определение особенностей изменений биомаркеров воспаления и повреждения миокарда у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) и метаболическим синдромом (МС).

Материал и методы. В исследование включено 74 пациента (36 мужчин, возраст 68 ± 14 лет и 38 женщин, возраст 79 ± 8 лет) с ХСН II-III функциональных классов, из них у 37 пациентов имелись компоненты МС. Для постановки диагноза ХСН и метаболического синдрома использовались рекомендации Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК). Функциональные классы сердечной недостаточности определяли согласно критериям Нью-Йоркской классификации NYHA. В каждом случае для постановки диагноза метаболический синдром необходимым условием было центральное ожирение. Сахарным диабетом 2 типа страдали 24 человека, гипертонической болезнью – 68 пациентов, в том числе ГБ I стадии – 1 больной, II стадии – 38, III стадии – 29 больных. Все больные при поступлении имели одышку, в том числе 14 – одышку в покое. В клинике они получали стандартную терапию ХСН, включавшую ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, бета-адреноблокаторы, калийсберегающие диуретики. Из-за использования в период пребывания в клинике разных схем лечения анализировали уровни лабораторных маркеров при поступлении.

Исследования индивидуальных белков и гормонов проводили после однократного размораживания сыворотки венозной крови, хранившейся при -20°C не более 6 месяцев. Концентрацию NT-proBNP определяли с использованием гетерогенного иммунохимического анализа Elecsys 2010 rack/disk (Roche, Швейцария). Уровень СРБ сыворотки крови определяли фотометрическим турбидиметрическим методом, с применением наборов жидких реагентов фирмы «DiaSys». Количественное определение растворимой формы (sST-2) определяли методом иммуноферментного анализа набором компании Critical Diagnostics (США).

Результаты обсчитывались с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics version 23 и Microsoft Excel 2010. Для сравнения независимых выборок использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде $M \pm m$ (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего).

Результаты. Клиническая характеристика больных ХСН без МС (1 группа) и больных ХСН с МС (2 группа). ХСН протекала тяжелее у больных с МС: ХСН 2-го функционального класса (ФК) диагностирована у 9 больных без МС и у 4 больных с МС; ХСН 3-го ФК была у 28 больных без МС и у 33 больных с МС. Одышка в покое и при минимальной физической нагрузке была у 6 больных ХСН без МС и у 8 больных с МС, диффузный цианоз у 4 и 7 больных соответственно. В исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН у 13 больных без МС и 9 больных с МС, без изменений ХСН осталась соответственно у 21 и 24 пациентов, летальный исход у 3 и 4 соответственно. Через 6 месяцев наблюдения у 15 больных без МС и 16 с МС отмечалось клиническое ухудшение с нарастанием функционального класса ХСН. В течение 6 месяцев после госпитального периода умерло 5 пациентов без МС и 6 с МС.

Уровень NTproBNP в группе ХСН без МС у 35 из 37 больных превышал референсные значения, которые для лиц анализируемого возраста составляют до 450 пг/мл; в группе ХСН с МС у всех больных он был выше референсных значений. В группе больных ХСН без МС уровень NTproBNP составил 2413 ± 1586 пг/мл, превышение 2000 пг/мл обнаружено у 19 пациентов. В группе больных ХСН с МС уровень NTproBNP был 2721 ± 1635 пг/мл, у 24 больных уровень маркера превысил 2000 пг/мл (рис. 1).

Таким образом, основной лабораторный маркер сердечной недостаточности был существенно повышен среди исследуемых больных, однако из-за значительных колебаний достоверных различий между группами не выявлено.

Для учета возможного влияния сочетанной патологии на течение ХСН проанализировали клинические показатели и исходы ХСН у больных без МС и с МС в зависимости от уровня маркеров воспаления (вСРБ) и патологических изменений в сердце при хронических заболеваниях (ST-2).

Уровень СРБ превышал референсные значения, характерные для здоровых людей ($\leq 5,0$ мг/л), у 23 из 37 больных ХСН без МС (62%, 1 группа) и у 33 из 37 больных с МС (89 %, 2 группа). Средние показатели в 1-й группе составили $23,1 \pm 5,3$ мг/л, во 2 группе — $33,0 \pm 4,4$ мг/л ($p < 0,05$). При этом у 13 из 37 больных ХСН и МС уровень белка превышал референтные значения в 10 и более раз. У больных со II ФК сердечной недостаточности средний уровень СРБ составил $24,4 \pm 6,3$ мг/л, у больных с III ФК — $29,3 \pm 4,1$ мг/л, достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$). У больных ХСН установлены прямые корреляционные связи уровня NTproBNP с уровнем СРБ: суммарно у исследованных больных $r = 0,28$, $p < 0,05$, в группе ХСН без МС $r = 0,24$ ($p < 0,05$), в группе ХСН с МС $r = 0,54$ ($p < 0,05$).

Уровень ST2 считается характерным для патологических изменений в сердце при значениях свыше 35 нг/л [11]. Такие значения были у 26 из 37 больных из группы ХСН без МС и у 32 из 37 больных с ХСН с МС. Средний уровень ST2 составил 51 ± 24 нг/мл у больных ХСН без МС и 62 ± 27 нг/мл у больных ХСН с МС. Статистически значения ST2 между группами были не достоверными. Выявлены достоверные корреляционные связи между концентрацией NT-proBNP и ST2: суммарно у исследованных больных $r = 0,47$, ($p < 0,05$), в группе ХСН без МС $r = 0,32$ ($p < 0,05$), в группе ХСН с МС $r = 0,51$ ($p < 0,05$).

Было проведено ранжирование пациентов, придав ранг величины изменений концентрациям NT-proBNP,

СРБ и ST-2. Для СРБ ранги были присвоены диапазонам: < 5 мг/л – ранг 0, от 5 до 20 мг/л – ранг 1, от 21 до 50 мг/л – ранг 2, > 50 мг/л – ранг 3. Для NT-proBNP ранги были присвоены с зависимости от концентрации следующим образом, представленным на рис. 1: < 450 пг/мл – ранг 0, от 450 до 1000 пг/мл – ранг 1, от 1000 до 2000 пг/мл – ранг 2, > 2000 пг/мл – ранг 3. Для концентраций ST-2 ранги формировались следующим образом: < 35 нг/мл – ранг 0, 35–70 нг/мл – ранг 1. 71-150 нг/мл – ранг 2, > 150 нг/мл – ранг 3.

В результате сложения рангов для NT-proBNP и СРБ и NT-proBNP и ST-2 и последующего разделения в каждом случае на 4 уровня (суммарно ранги 0-1, 2-3, 4-5 и 6) получено существенное разделение с превышением доли пациентов более высоких уровней рангов среди группы больных ХСН с МС по отношению к группе больных ХСН без МС (рис. 2, а, б).

Если же сложить ранги, присвоенные всем трем исследованным маркерам повреждения сердечно-сосудистой системы – NT-proBNP, СРБ и ST-2, то получается еще более значимое разделение по выраженности патологических лабораторных сдвигов в группе пациентов ХСН с МС по сравнению с группой ХСН без МС (рис. 3).

В группе ХСН с МС по сравнению с группой ХСН без МС оказалось существенно больше больных с наиболее выраженными патологическими уровнями маркеров повреждения: количество больных суммарным рангом 6-9 в группе больных ХСН с МС было 59 %, в группе ХСН без МС 38 % ($p < 0,05$).

Исходы заболевания были значительно хуже среди пациентов с большими суммарными рангами лабораторных показателей. Из 18 умерших пациентов 17 входили в число с суммарным рангом от 6 до 9, только 1 больной, умерший после госпитализации, имел суммарный ранг 5. В то же время среди 22 больных, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, 18 пациентов имели суммарный ранг от 0 до 5, у 4 больных этой категории клинические проявления ХСН остались практически без изменений.

Обсуждение. ХСН является как правило терминальной стадией заболеваний сердечно-сосудистой системы. Метаболический синдром – наиболее выраженный фактор, предрасполагающий к тяжелому течению сердечно-сосудистой патологии, однако, воспаление и поврежде-

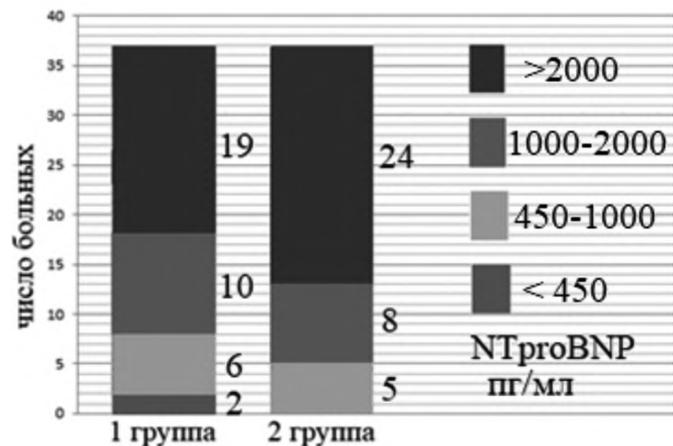


Рис. 1. Распределение больных ХСН без МС и ХСН с МС в зависимости от уровня NT-proBNP в сыворотке крови.

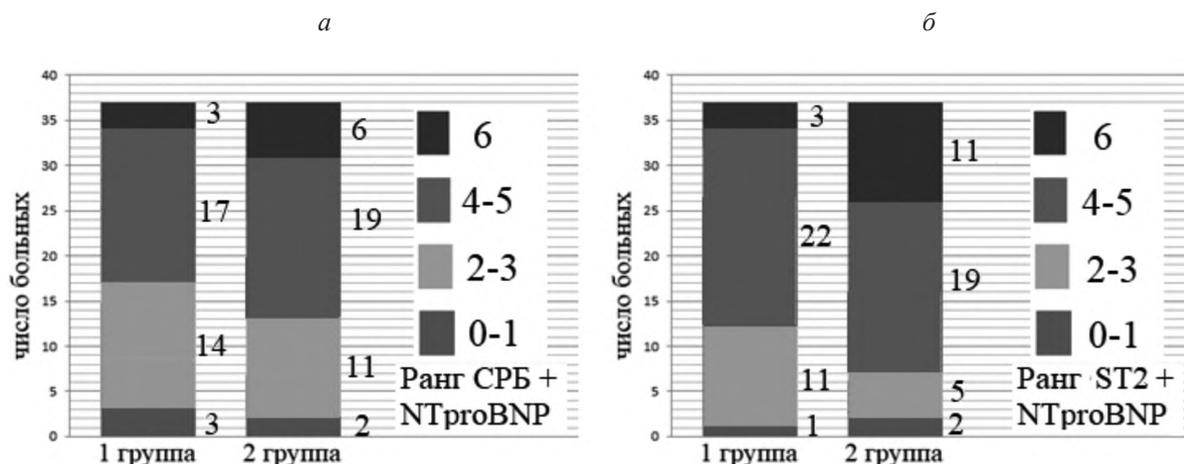


Рис. 2. Распределение больных ХСН без МС и ХСН с МС в зависимости от уровня рангов, присвоенных NTproBNP и СРБ (а), и присвоенных NTproBNP и ST2 (б).

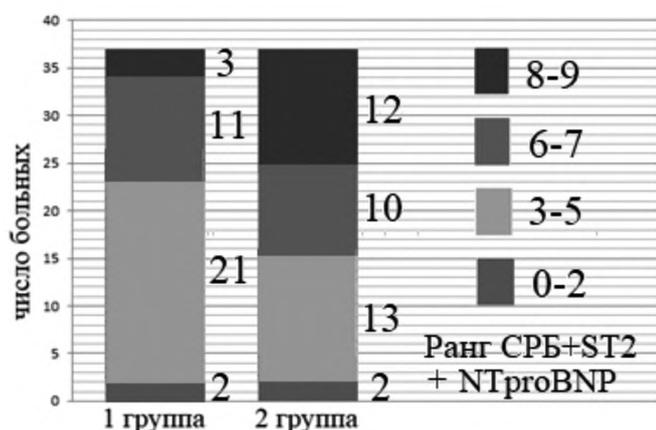


Рис. 3. Распределение больных ХСН без МС и ХСН с МС в зависимости от суммарного уровня рангов, присвоенных NTproBNP, СРБ и ST2.

ния сосудистой стенки и сердечной мышцы также крайне значимы в развитии сердечной недостаточности.

Мы попытались, используя ранжирование значений лабораторных показателей, сопоставить выраженность лабораторных маркеров и клинические проявления и исходы ХСН. Было выбрано равное количество больных ХСН с МС и ХСН без МС с сопоставимой степенью клинических проявлений сердечной недостаточности.

За последние годы общепризнанными лабораторными маркерами сердечной недостаточности стали натрийуретические пептиды, которые обеспечивают функционирование «оси сердце-почки» и способствуют при перегрузке сердца выведению из организма натрия и воды, разгружая тем самым работу сердечной мышцы. Результаты наших исследований соответствовали этим представлениям. Практически у всех больных с ХСН был повышен NT-proBNP.

Классическим биохимическим маркером воспаления является СРБ. Мы использовали тест-систему, которая позволяла определять СРБ в диапазоне, который доступен для тестов высокочувствительного определения СРБ. Однако высокой чувствительности у данной категории больных не понадобилось, так как у большинства

больных СРБ был существенно повышен. При этом достоверных различий в уровне СРБ не было ни между группами больных ХСН с МС и ХСН без МС, ни между группами с разными функциональными классами ХСН. Тем не менее, у больных ХСН установлены прямые корреляционные связи уровня NT-proBNP с уровнем СРБ.

В нашем исследовании не выявлено высокой специфичности ST-2 для диагностики ХСН с МС и ХСН без МС. Для ST-2 выявлена корреляционная связь с NT-proBNP. Наличие корреляционных связей между NT-proBNP и СРБ, а также между NT-proBNP и ST-2 можно интерпретировать как указание, что воспалительный и повреждающий компонент сердечно-сосудистой системы вовлечены в регуляцию функционирования «оси сердце-почки».

Ранжирование уровней лабораторных маркеров патологии миокарда – NT-proBNP, СРБ и ST-2 и оценка суммы рангов этих показателей позволили идентифицировать различную степень повреждения сердечной мышцы у больных ХСН с МС и больных ХСН без МС, а также предположить, что высокий суммарный ранг лабораторных показателей NT-proBNP, СРБ и ST-2, может использоваться в качестве предиктора успешного лечения больных ХСН и исходов заболевания, в том числе летальности.

Выводы.

1. Лабораторные исследования с использованием органоспецифических маркеров свидетельствуют, что тяжесть сердечной недостаточности у больных с метаболическим синдромом усугубляется факторами воспаления сосудистой стенки и структурно-метаболическими повреждениями сердечной мышцы.

2. Ранжирование значений лабораторных маркеров NT-proBNP, СРБ и ST-2 и оценка суммы рангов этих показателей позволяют идентифицировать различную степень повреждения сердечной мышцы у больных ХСН.

3. Величина суммарного ранжирования NT-proBNP, СРБ и ST-2 может использоваться в качестве вероятностного указателя на успешность лечения больных ХСН и исходов заболевания, в том числе летальности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голухова Е. З., Теряева Н. Б., Алиева А.М. Натрийуретические пептиды – маркеры и факторы прогноза при хронической сердечной недостаточности. *Креативная кардиология*. 2007; 1–2: 126-36.
2. Perrone-Filardi P, Paolillo S., Costanzo P., Savarese G., Trimarco B., Bonow R.O. The role of metabolic syndrome in heart failure. *European Heart Journal*. 2015; 36: 2630-4.
3. Федорова Т.А., Семенов Н.А., Иванова Е.А., Рыбакова М.К., Лошиц Н.В. Особенности клинического течения сердечной недостаточности и морфофункциональные показатели миокарда у пожилых больных с метаболическим синдромом. *Клиническая геронтология*. 2019; 5-6: 18-23.
4. Лебедев Д.А., Лясникова Е.А., Васильева А.А., Васильева Е.Ю., Бабенко А.Ю., Шлякто Е.В. Молекулярный биомаркерный профиль хронической сердечной недостаточности с промежуточной и сохраненной фракцией выброса левого желудочка на фоне сахарного диабета 2 типа. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25: 10.
5. Ibrahim N., Januzzi J. Established and Emerging Roles of Biomarkers in Heart Failure. *Circ Res*. 2018; 123(5): 614-29.
6. Мареев В. Ю., Фомин И. В., Агеев Ф.Т., Беграмбекова Ю.Л., Васюк Ю.А., Гарганеева А.А и др. Клинические рекомендации ОССН – РКО – РНМОТ. Сердечная недостаточность: хроническая (ХСН) и острая декомпенсированная (ОДСН). Диагностика, профилактика и лечение. *Кардиология*. 2018; 58(6S): 8-158. <https://doi.org/10.18087/cardio.2475>.
7. Ройтман А.П., Федорова Т.А., Иванова Е.А., Бугров А.В., Долгов В.В. Роль нарушения метаболизма, воспаления, повреждения миокарда в развитии хронической сердечной недостаточности у больных с метаболическим синдромом. *Лабораторная служба*. 2018; 7(4): 5-10.
8. Федорова Т.А., Иванова Е.А., Семенов Н.А., Ройтман А.П., Тазина С.Я., Лошиц Н.В. и др. Клинико-лабораторные аспекты хронической сердечной недостаточности у больных метаболическим синдромом. *Эффективная фармакотерапия*. 2019; 15 (2): 12-8.
9. Долгов В.В., ред. Клиническая лабораторная диагностика. Т. 1. М.: Лабдиаг; 2017.
10. Копьева К.В., Гракова Е.В., Тепляков А.Т. Новые маркеры сердечной недостаточности: значение для диагностики и прогнозирования NT-проBNP и интерлейкиновых рецепторов – членов семейства ST2. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018; 7(1): 94-101.
11. Гракова Е.В., Копьева К.В., Тепляков А.Т., Огуркова О.Н., Солдатенко М.В., Гарганеева А.А. Возможности клинического применения нового биомаркера ST2 у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемического генеза: тест с физической нагрузкой. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2019; 18(4): 12-8.

REFERENCES

1. Golukhova E. Z., Teryaeva N. B., Alieva A.M. Natriuretic peptides are markers and prognostic factors for chronic heart failure. *Kreativnaya kardiologiya*. 2007; 1–2: 126-36. (in Russian)
2. Perrone-Filardi P, Paolillo S., Costanzo P., Savarese G., Trimarco B., Bonow R.O. The role of metabolic syndrome in heart failure. *European Heart Journal*. 2015; 36: 2630-4.
3. Fedorova T.A., Semenenko N.A., Ivanova E.A., Rybakova M.K., Loshchits N.V. Features of the clinical course of heart failure and morphofunctional parameters of the myocardium in elderly patients with metabolic syndrome. *Klinicheskaya gerontologiya*. 2019; 5-6: 18-23. (in Russian)
4. Lebedev D.A., Lyasnikova E.A., Vasil'eva A.A., Vasil'eva E.Yu., Babenko A.Yu., Shlyakhto E.V. Molecular biomarker profile of chronic heart failure with intermediate and preserved left ventricular ejection fraction in the background of type 2 diabetes mellitus. *Rossiyskiy kardiologicheskij zhurnal*. 2020; 25: 10. (in Russian)
5. Ibrahim N., Januzzi J. Established and Emerging Roles of Biomarkers in Heart Failure. *Circ Res*. 2018; 123(5): 614-29.
6. Mareev V. Yu., Fomin I. V., Ageev F.T., Begrambekova Yu.L., Vasyuk Yu.A., Garganeeva A.A et al. Clinical guidelines PRAS – cardiology – internal medicine. Heart failure: chronic (CHF) and acute decompensated (CHF). Diagnosis, prevention and treatment. *Kardiologiya*. 2018; 58(6S): 8-158. <https://doi.org/10.18087/cardio.2475> (in Russian)
7. Roytman A.P., Fedorova T.A., Ivanova E.A., Bugrov A.V., Dolgov V.V. The role of metabolic disorders, inflammation, and myocardial damage in the development of chronic heart failure in patients with metabolic syndrome. *Laboratornaya sluzhba*. 2018; 7(4): 5-10. (in Russian)
8. Fedorova T.A., Ivanova E.A., Semenenko N.A., Roytman A.P., Tazina S.Ya., Loshchits N.V. et al. Clinical and laboratory aspects of chronic heart failure in patients with metabolic syndrome. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2019; 15 (2): 12-8. (in Russian)
9. Dolgov V.V., ed. Clinical laboratory diagnostics [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Tom 1]. Moscow: Labdiag; 2017. (in Russian)
10. Kop'eva K.V., Grakova E.V., Teplyakov A.T. New markers of heart failure: significance for the diagnosis and prediction of NT-proBNP and interleukin receptors – members of the ST2 family. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2018; 7(1): 94-101. (in Russian)
11. Grakova E.V., Kop'eva K.V., Teplyakov A.T., Ogurkova O.N., Soldatenko M.V., Garganeeva A.A. Possibilities of clinical application of the new ST2 biomarker in patients with chronic heart failure of ischemic origin: a test with physical activity. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2019; 18(4): 12-8. (in Russian)

Поступила 15.12.20

Принята к печати 30.12.20

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Ковалева О. В.¹, Белова Т.П.¹, Кушлинский Д.Н.², Короткова Е.А.¹, Подлесная П.А.¹, Грачев А.Н.¹, Зиновьев С.В.³, Терешкина И.В.¹, Соколов Н.Ю.¹, Кудлай Д.А.⁴, Кушлинский Н.Е.¹

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 249031, Обнинск, Россия;

³ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», 603126, Нижний Новгород, Россия;

⁴Институт фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия

Представлены данные комплексного иммуноферментного сравнительного исследования содержания растворимых форм sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 больных эпителиальным раком яичников и 20 здоровых доноров контрольной группы. Определена диагностическая значимость исследованных белков. Исследование показало, что профиль растворимых контрольных точек иммунитета отличается при возникновении злокачественной патологии яичников. Выявлено статистически значимое снижение содержания sPD-L1, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови пациенток, по сравнению с контрольной группой. Обнаружены различия в содержании исследованных белков в зависимости от гистологического типа опухолей. Показаны корреляции между растворимыми формами некоторых исследованных маркеров, указывающие на наличие независимых механизмов иммунной регуляции при раке яичников, что может объяснить недостаточную эффективность существующей иммунотерапии данного типа опухолей. Полученные результаты, несомненно, помогут разработать новые эффективные методы диагностики и терапии рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников; контрольные точки иммунитета; sPD-1; sPD-L1; sNKG2D; sNKG2DL1; sB7-H3; sHLA-G.

Для цитирования: Ковалева О.В., Белова Т.П., Кушлинский Д.Н., Короткова Е.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Зиновьев С.В., Терешкина И.В., Соколов Н.Ю., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы контрольных точек иммунитета при раке яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 80-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-80-86>

Kovaleva O.V.¹, Belova T.P.², Kushlinsky D.N.³, Korotkova E.A.¹, Podlesnaya P.A.¹, Gratchev A.N.¹, Zinoviev S.V.⁴, Tereshkina I.V.¹, Sokolov N.Yu.¹, Kudlay D.A.², Kushlinskii N.E.¹

SOLUBLE FORMS OF IMMUNE CHECKPOINTS IN OVARIAN CANCER

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russia;

²A.F. Tsyb Medical Radiological Scientific Center – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2490031, Obninsk, Russia;

³Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Healthcare Center, 603126, Nizhny Novgorod, Russia;

⁴Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

The data of a complex immunoassay comparative study of the content of soluble forms of sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 and sHLA-G in the blood plasma of 75 patients with epithelial ovarian cancer and 20 healthy donors of the control group are presented. The diagnostic significance of the studied proteins was determined. The study showed that the profile of soluble immunity checkpoints differs when malignant ovarian pathology occurs. There was a statistically significant decrease in the content of sPD-L1, sNKG2DL1, sB7-H3, and sHLA-G in the blood plasma of patients compared with the control group. Differences were found in the content of the studied markers depending on the histological type of tumors. Correlations between the soluble forms of some of the studied proteins are shown, indicating the presence of independent mechanisms of immune regulation in ovarian cancer, which may explain the insufficient effectiveness of the existing immunotherapy for this type of tumor. The results obtained will undoubtedly facilitate the development of new effective methods for the diagnostics and therapy of ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; immune checkpoints; sPD-1; sPD-L1; sNKG2D; sNKG2DL1; sB7-H3; sHLA-G.

For citation: Kovaleva O.V., Belova T.P., Kushlinsky D.N., Korotkova E.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Zinoviev S.V., Tereshkina I.V., Sokolov N.Yu., Kudlay D.A., Kushlinskii N.E. Soluble forms of immune checkpoints in ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 80-86 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-80-86>

For correspondence: Kovaleva O.V., Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of regulation of cellular and viral oncogenes; e-mail: ovkovaeva@gmail.com

Information about authors:

Kovaleva O.V., ORCID 0000-0001-6132-9924;
Belova T.P., ORCID 0000-0002-4776-0555;
Kushlinsky D.N., ORCID 0000-0003-1490-8418;
Podlesnaya P.A., ORCID 0000-0003-2312-5546;
Gratchev A.N., ORCID 0000-0003-2137-1866;
Zinoviev S.V., ORCID 0000-0003-1037-2601;
Tereshkina I.V., ORCID 0000-0003-4427-1374;
Korotkova E.A., ORCID 0000-0002-2509-5232;
Sokolov N.Yu., ORCID 0000-0002-0706-9575;
Kudlay D.A., ORCID 0000-0003-1878-4467;
Kushlinskii N.E., ORCID 0000-0002-3898-4127.

Acknowledgment. *The study was supported by RFBR grant № 20-015-00479.*

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

Received 17.01.2021
Accepted 30.01.2021

Введение. Ежегодно в мире от рака яичников (РЯ) умирает около 140 тыс. женщин и еще у 220 тыс. является это заболевание. Показатели 5-летней выживаемости варьируют от 30 до 50%. Несмотря на успехи в области хирургии и химиотерапии, смертность от РЯ остается высокой. Основными причинами этого, помимо поздней диагностики, являются мозаичность генетических и эпигенетических нарушений в опухолевых клетках и их динамические изменения в ходе лечения, что осложняет выбор химиотерапии. Уникальность набора мутаций и эпигенетических изменений в каждой опухоли определяет индивидуальную чувствительность пациенток к различным схемам лекарственной терапии (в том числе, таргетной), при этом даже в группе больных с обнаруженными мутациями таргетный препарат оказывается эффективным только у 50% пациенток (в частности, дорогостоящий препарат олапариб, который уже внедряется в постоянную клиническую практику в России и назначается больным с мутантными генами *BRCA*, у 70% пациенток оказывается неэффективным) [1]. Это обуславливает необходимость разработки новых терапевтических подходов. В настоящее время в связи с активным развитием иммунотерапии, самые распространенные ингибиторы контрольных точек иммунитета постепенно внедряются в терапию РЯ.

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек (ICI), в основном включающих моноклональные антитела (mAb) к PD-1/PD-L1 (рецептор программируемой гибели клеток 1/лиганд 1 программируемой гибели клеток) и CTLA-4 (антицитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген-4) сформировали терапевтический ландшафт некоторых видов злокачественных опухолей. За последние несколько лет опубликовано ряд исследований, посвященных использованию существующей иммунотерапии (анти-CTLA4 и анти PD-1/PD-L1) при РЯ. F.S. Hodi и соавт. [2, 3] впервые продемонстрировали противоопухолевые эффекты ипилимумаба (анти-CTLA-4) у девяти больных РЯ в IV стадии после вакцинации облученными аутологичными опухолевыми клетками, сконструированными для производства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GVAX). У одного пациента был отмечен объективный ответ, и многократные инфузии антитела анти-CTLA-4 каждые 3-5 мес позволили стабилизировать заболевание на 4 года. Кроме того, у трех пациенток отмечена стабилизация опухолевого процесса на 6, 4 и 2 мес соответственно, что подтверждал уровень CA-125.

Несмотря на большое количество проведенных клинических исследований, результаты лечения РЯ, достигаемые с использованием моноиммунотерапии, не являются столь впечатляющими и многообещающими, как при других новообразованиях. Возможно ли что-то предпринять? Недавние исследования выявили несколько иммунных контрольных точек, таких как NKG2D, B7-H3, HLA-G и др., которые можно использовать в качестве потенциальных мишеней для иммунотерапии опухолей.

B7-H3, также называемый CD276, представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, который кодируется геном на 15-й хромосоме у человека [4]. Первоначальное исследование описало его как положительный ко-стимулятор, так как он может стимулировать Т-клеточный ответ и продукцию IFN- γ [4]. Однако недавние исследования показали, что B7-H3 участвует в ингибировании Т-клеток [5, 6]. Рецептор для B7-H3 еще не идентифицирован, и это может объяснить сложную иммуномодулирующую активность B7-H3, поскольку он может иметь более одного партнера по связыванию с различными функциями [7]. Экспрессию белка B7-H3 можно обнаружить на активированных иммунных клетках, таких как Т-клетки, НК-клетки и APC. Интересно, что B7-H3 гиперэкспрессирован в широком спектре опухолевых клеток и связан с прогрессией заболевания и прогнозом [8].

NKG2D, он же CD314 – трансмембранный белок II типа, принадлежащий к суперсемейству лектинов типа C, кодируется геном *KLRK1* (лектин-подобный рецептор киллерных клеток K1), расположенном на 12-й хромосоме у человека [9]. NKG2D – это активирующий рецептор, экспрессирующийся на поверхности всех НК-клеток, $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитах и CD8 $^+$ $\alpha\beta$ Т-клетках [10]. Таким образом, NKG2D обеспечивает формирование иммунного ответа посредством активации Т-лимфоцитов и НК-клеток, благодаря чему этот белок и его лиганды потенциально могут служить терапевтическими мишенями для лечения иммунных и онкологических заболеваний [11].

Одним из лигандов NKG2D является белок, известный как связывающий гликопротеин UL-16 – белок ULBP1 (NKG2DL1). Известно, что связывание этого белка с рецептором NKG2D приводит к активации сигнальных путей JAK/STAT и PI3K/Akt/ERK и, как следствие, активации цитотоксичности НК и Т-клеток. Уход опухолевых клеток от иммунного над-

зора может осуществляться путем инактивации NKG2DL1 [12]. Прогностическая роль NKG2DL1 при различных онкологических заболеваниях неоднозначна. Так R.W.McGilvray et al. показали, что высокая экспрессия ULBP1 ассоциирована с худшей выживаемостью больных при РЯ [13], в то время как для колоректального рака она ассоциирована с благоприятным прогнозом [14].

Человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), также является лигандом многих рецепторов, например NKG2A и NKG2D. В отличие от NKG2DL1 данный лиганд изучен достаточно хорошо. Накопленные данные свидетельствуют о том, что HLA-G способствует иммунносупрессии. Так, взаимодействие лиганда с рецептором CD8 на поверхности Т-лимфоцитов и NK-клеток стимулирует FasL-опосредованный апоптоз иммунных клеток. Взаимодействие HLA-G с макрофагами через рецепторы ILT2 и ILT4 приводит к ингибированию цитотоксичности последних и формированию незрелого фенотипа, отличающегося сниженной экспрессией CD80/86 и главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) на поверхности мембран.

HLA-G в некоторых наблюдениях ассоциирован с плохим прогнозом РЯ. Так, в обзоре результатов анализа экспрессии HLA-G при РЯ с акцентом на его биологическое и клиническое значение показано, что данный белок участвует в механизмах, обеспечивающих уход от иммунного надзора злокачественной опухоли, а его повышенная экспрессия связана со степенью тяжести заболевания. Авторы отмечают, что не только экспрессия HLA-G в опухоли, но и уровень его растворимой формы в крови может потенциально использоваться в качестве маркера для раннего выявления РЯ у пациенток из группы высокого риска. Более того, sHLA-G в асцитической жидкости может быть использован для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований яичников. Также авторы указали на возможность использования иммунотерапии анти-HLA-G в сочетании с химиотерапией у больных РЯ [15]. Существуют данные о том, что уровень HLA-G в асцитической жидкости положительно коррелирует с экспрессией регуляторных Т-клеток и отрицательно с экспрессией NK и клеток памяти в опухолевой строме [16].

Цель настоящего исследования - сравнительный анализ содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови пациенток с различными гистологическими формами эпителиального РЯ и контрольной группы здоровых доноров.

Материал и методы. В исследование включены 75 больных эпителиальным РЯ (средний возраст 54,6 года) и 20 здоровых доноров (средний возраст 44,1 года), прошедших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациенток подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации. В исследование включены пациентки с эпителиальным РЯ трех гистологических

типов: серозным (52), эндометриоидным (13) и муцинозным (10).

Концентрацию исследуемых белков sPD-L1, sPD-1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике с использованием ЭДТА до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа: Human PD-L1 Platinum ELISA, Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США), Human B7-H3 Quantikine ELISA Kit (Cat # DB7H30, R&D), Human NKG2D ELISA Kit (Catalog # LS-F50251, LifeSpan BioSciences), Human soluble NKG2D ligands ELISA Kit (Catalog MBS744276, MyBiosource), HLA-G ELISA Kit (Catalog # LS-F5033, LifeSpan BioSciences) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг), нанограммах (нг) или условных единицах (Ед) на 1 мл плазмы крови.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведен анализ концентраций растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1, а также sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 первичных больных РЯ и 20 здоровых доноров. Среднее содержание sPD-1 в плазме крови здоровых доноров составило 41,5 (19,0-66,4) пг/мл, а в группе больных РЯ - 51,0 (11,7-213,2) пг/мл. Среднее содержание sPD-L1 в плазме крови в группе контроля составило 70,8 (9,0-149,5) пг/мл, что статистически значимо выше, чем у больных РЯ 38,99 (0,000-113,2) пг/мл ($p=0,0034$). Среднее содержание sNKG2D в плазме крови здоровых доноров составило 4,36 (0-32,63) нг/мл и было статистически значимо ниже, чем у больных РЯ 12,8 (0-289,1) нг/мл ($p=0,1083$). Для лиганда sNKG2DL1, аналогично с sPD-L1, характерно его снижение в плазме крови больных РЯ. Так, среднее содержание sNKG2DL1 в плазме крови здоровых доноров составило 3,8 (0-28,8) нг/мл, а в группе пациенток 1,7 (0-28,7) нг/мл ($p=0,028$). Однако необходимо отметить, что для данной пары белков наблюдали достаточно большое количество образцов, в которых содержание маркеров не выявлено. Так, в контрольной группе sNKG2D не обнаружено в 15% образцов (3 из 20), а его лиганд - sNKG2DL1 в 20% образцов (4 из 20). В случае РЯ sNKG2D отсутствовал в 44% образцов (33 из 75), а sNKG2DL1 в 56% (42 из 75). Уровни HLA-G были статистически значимо выше в плазме крови здоровых доноров 545,7 (90,8-2173) Ед/мл по сравнению с больными РЯ 225,7 (29,9-4421) Ед/мл. Результаты среднего содержания исследованных белков представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Как видно из представленных данных, для четырех исследованных белков наблюдается значимое снижение их содержания в плазме крови больных эпителиальным РЯ.

Далее провели анализ информативности диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности с помощью построения ROC-кривых и вычисления площади под ними (AUC). Результаты представлены на рис. 1, А-Г.

На следующем этапе исследования провели анализ содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и

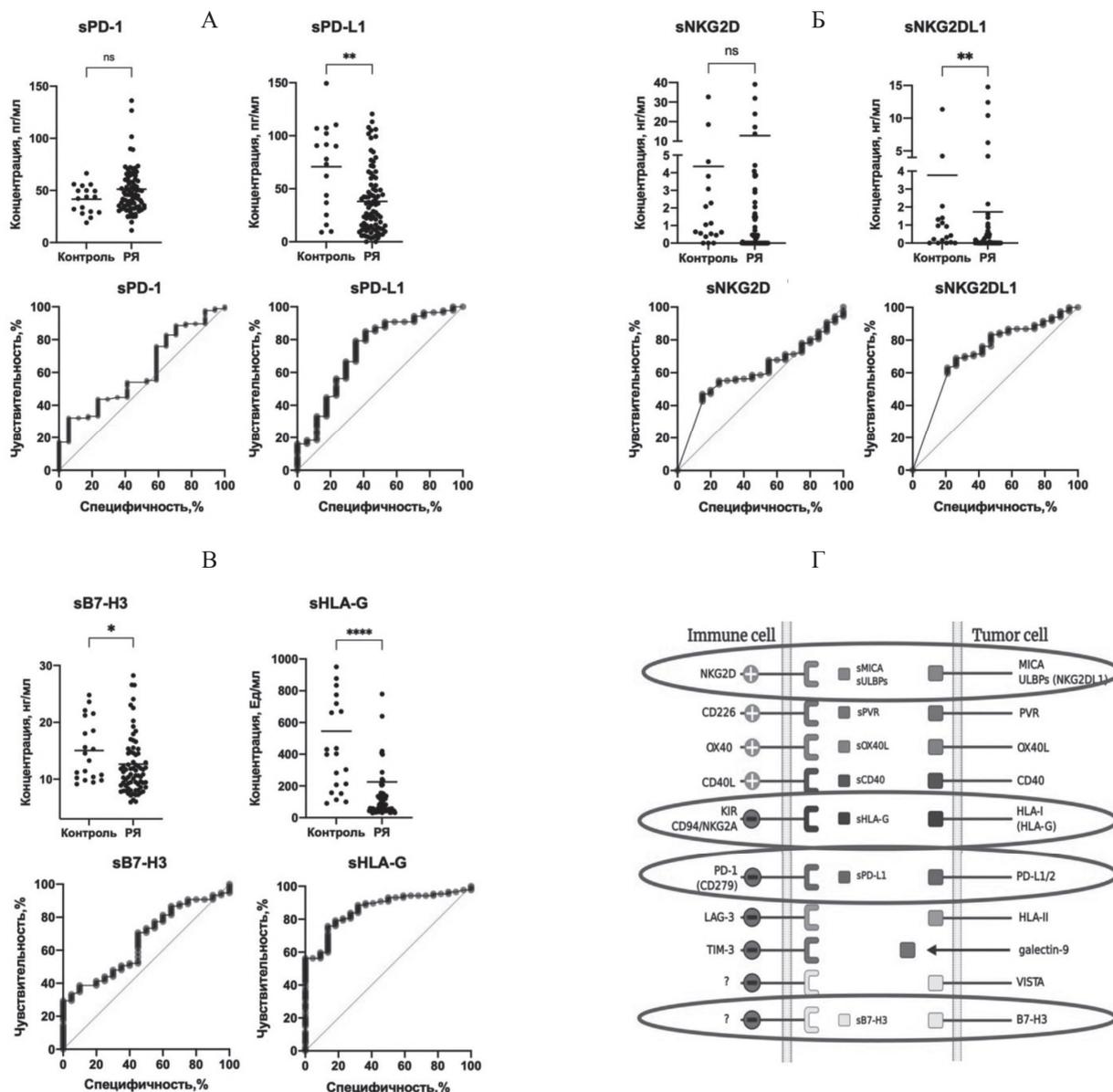


Рис. 1. Сравнительный анализ уровней содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3, sHLA-G у больных РЯ и здоровых доноров.

А – сравнительный анализ уровня содержания sPD-1 и sPD-L1 у больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sPD1 и sPD-L1 у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,609 ($p=0,1620$) для sPD1 и 0,724 ($p=0,0040$) для sPD-L1;

Б – сравнительный анализ уровня содержания sNKG2D и sNKG2DL1 у больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sNKG2D и sNKG2DL1 у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,614 ($p=0,1174$) для sNKG2D и 0,706 ($p=0,0059$) для sNKG2DL1;

В – сравнительный анализ уровней sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sB7-H3 и sHLA-G у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,657 ($p=0,0316$) для sB7-H3 и 0,875 ($p<0,0001$) для sHLA-G;

Г – растворимые и мембраносвязанные факторы, подавляющие противоопухолевую активность иммунных клеток.

Таблица 1

Среднее содержание исследуемых белков в плазме крови больных РЯ и в контроле

Маркеры	Контроль (среднее, мин.-макс.)	РЯ (среднее, мин.-макс.)	<i>p</i>
sPD-1, пг/мл	41,5 (19,0-66,4)	51,0 (11,7 -213,2)	0,1641
sPD-L1, пг/мл	70,8 (9,0-149,5)	38,9 (0-113,2)	0,0034*
sNKG2D, нг/мл	4,4 (0-32,6)	12,8 (0-289,1)	0,1083
sNKG2DL1, нг/мл	3,8 (0-28,8)	1,7 (0-28,7)	0,0028*
sB7-H3, нг/мл	15,0 (9,1-24,8)	12,7 (5,9-40,3)	0,0310*
sHLA-G, Ед/мл	545,7 (90,8-2173)	225,7 (29,9-4421)	<0,0001*

sHLA-G в образцах плазмы крови больных РЯ в зависимости от гистологического типа опухоли. В исследование включены 13 эндометриоидных, 52 серозных и 10 муцинозных опухолей. Особо необходимо упомянуть о системе sNKG2D/sNKG2DL1. Как было указано ранее, данные белки не обнаружены почти в половине исследованных образцов крови. Так, для муцинозных опухолей яичников характерно выявление растворимой формы рецептора sNKG2D в 80% образцов (8 из 10), а лиганда в 50% образцов (5 из 10). Для серозных опухолей яичников уровни рецептора sNKG2D обнаружены в 50% образцов (26 из 52), а лиганда в 37% образцов (19 из 52). При эндометриоидных опухолях яичников уровни sNKG2D и sNKG2DL1 обнаружены в 62% образцов (8 из 13). Таким образом, sNKG2D чаще выявляли в плазме крови пациенток с муцинозным РЯ, в то время как sNKG2DL1 - в плазме крови пациенток с эндо-

метриоидным РЯ. Результаты анализа содержания растворимых форм всех исследованных маркеров в зависимости от гистологического типа опухоли представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что снижение содержания sPD-L1, sNKG2DL1 и sB7-H3 характерно для серозного РЯ. Для HLA-G отмечено статистически значимое снижение концентрации маркера в плазме крови больных при всех гистологических типах РЯ.

Корреляционная связь между растворимыми формами sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G. Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 2.

Показано, что уровни растворимых форм рецептора sPD-1 и лиганда sPD-L1 статистически значимо

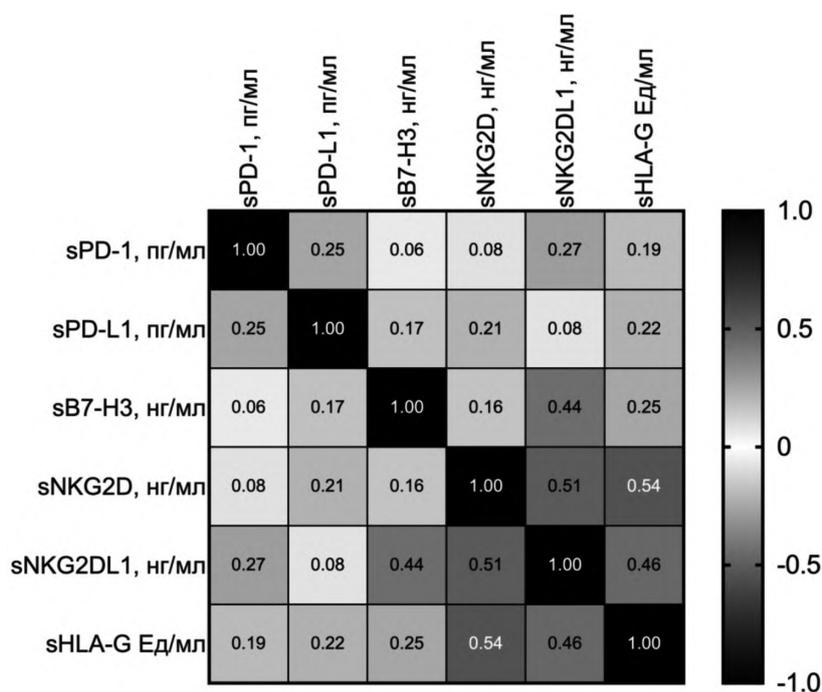


Рис. 2. Корреляционный анализ между содержанием sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови больных раком яичников (коэффициент корреляции Спирмена).

Таблица 2

Среднее содержание исследуемых белков в плазме крови больных раком яичников в зависимости от морфологического типа опухоли (среднее, мин.-макс.)

Маркеры	Контроль (n=20)	Рак яичников			Kruskal-Wallis test, p		
		муцинозная (n=10)	серозная (n=52)	эндометриоидная (n=13)	контроль vs муцинозная	контроль vs серозная	контроль vs эндометриоидная
sPD-1, пг/мл	41,5 (19,0-66,4)	43,0 (30,4-60,3)	52,0 (11,6-213,2)	53,2 (24,6-89,9)	>0,9999	0,5563	0,2932
sPD-L1, пг/мл	70,8 (9,0-149,5)	42,2 (10,8-105,1)	37,1 (0-113,3)	43,9 (5,7-107,9)	0,2683	0,0077*	0,3692
sNKG2D, нг/мл	4,4 (0-32,6)	1,8 (0-6,3)	15,1 (0-289,1)	12,1 (0-79,3)	>0,9999	0,1925	>0,9999
sNKG2DL1, нг/мл	3,8 (0-28,8)	0,4 (0-1,6)	2,0 (0-28,7)	1,6 (0-14,7)	0,2740	0,0053*	0,4753
sB7-H3, нг/мл	15,0 (9,1-24,8)	15,5 (7,9-26,5)	12,3 (5,9-40,2)	11,6 (6,0-16,6)	>0,9999	0,0349*	0,3247
sHLA-G ,Ед/мл	545,7 (90,8-2173)	132,0 (41,8-398,4)	256,7 (29,8-4421)	173,9 (41,8-639,7)	0,0118*	<0,0001*	0,0053*

коррелируют между собой ($r=0,25$; $p=0,028$). Также выявили корреляционную связь между уровнями sPD-1 и sNKG2DL1 ($r=0,27$; $p=0,019$) и sB7-H3 и sNKG2DL1 ($r=0,44$; $p<0,001$). Кроме того, выявили сильную корреляционную связь между концентрациями sHLA-G и sNKG2D, sHLA-G и sNKG2DL1 ($r=0,54$; $p<0,001$ и $r=0,46$; $p<0,001$ соответственно).

Контрольные точки иммунитета играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза посредством стимуляции или подавления сигналов в иммунных клетках и регулирования их функций. В иммунной системе контрольные точки можно разделить на две группы: стимулирующие молекулы, такие как TCR/МНС, и ингибирующие молекулы, такие как CTLA-4/CD80 или CD86 и PD-1/PD-L1 (см.рис.1, Г). За последние годы в иммунной системе выявлено и описано большое количество новых рецепторов и их лигандов. В дополнение к рецепторам и лигандам на клеточной мембране, выявлен ряд растворимых форм иммунных контрольных точек, которые могут быть обнаружены в кровотоке. Эти молекулы играют важную роль в иммунной регуляции, могут участвовать в развитии различных патологических состояний и считаются потенциальными маркерами и/или терапевтическими мишенями.

В данном исследовании впервые проведен комплексный анализ содержания растворимых форм белков sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 первичных больных эпителиальным РЯ и 20 здоровых доноров.

На первом этапе исследования оценили уровень содержания растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных РЯ и в группе контроля. Проведенный анализ показал, что содержание лиганда sPD-L1 статистически значимо снижается в плазме крови при развитии опухолевого процесса ($p=0,0034$). Причем это снижение характерно только для серозного РЯ ($p=0,0077$). Для других гистологических типов РЯ таких закономерностей не наблюдали. Для рецептора sPD-1 не выявлено изменений в содержании у больных РЯ. Литературные данные относительно содержания растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 достаточно противоречивы. Известно, что концентрация sPD-L1 повышается у пациентов с возрастом и при некоторых типах опухолей, например при раке почки [17]. Однако для рака желудка таких закономерностей не выявлено. Наоборот, для опухолей желудка характерно снижение концентрации sPD-1 в крови пациентов [18].

Нами впервые проведен анализ содержания растворимых форм рецептора sNKG2D и одного из его лигандов sNKG2DL1. Роль NKG2D в патогенезе РЯ весьма противоречива. Современная иммунотерапия направлена на стимуляцию функции NKG2D с целью повышения иммунного ответа посредством активации Т-лимфоцитов и НК-клеток, однако представлены исследования, определяющие NKG2D как фактор злокачественности опухоли. Так, на модели РЯ продемонстрировано, что NKG2D+ клетки обладали повышенной способностью к колониеобразованию *in vitro* и инициации развития опухолей *in vivo* у иммунодефицитных мышей [11]. Для данной пары белков результаты были аналогичны маркерам sPD-1 и sPD-L1, а именно содержание рецептора sNKG2D значимо не менялось при наличии опухолевой патологии, в то время как содержание sNKG2DL1 значимо снижалось по сравнению с контрольной группой. Также как и для sPD-L1, снижение наблюдали

только в группе пациенток с серозными опухолями яичников. Необходимо отметить, что приблизительно у половины обследованных больных РЯ в плазме крови белки sNKG2D и sNKG2DL1 не выявлены. Литературных данных относительно содержания данных белков в крови при различных заболеваниях достаточно мало. Показано, что содержание одного из растворимых лигандов sNKG2D в крови пациентов с множественной миеломой выше, чем в контрольной группе [19]. Для РЯ показано, что повышенный уровень двух других лигандов NKG2D - sMICA and sULBP2 в асцитах, ассоциирован с худшим прогнозом [20]. Исследований растворимой формы лиганда sNKG2DL1 при РЯ ранее не проводили.

Кроме того, нами показано значимое снижение содержания sB7-H3 ($p=0,0310$) и sHLA-G ($p<0,0001$) у больных РЯ. Литературные данные, посвященные sB7-H3, чаще ассоциируют его экспрессию с плохим прогнозом различных заболеваний, например, при гепатоцеллюлярной карциноме [21]. В проведенном нами исследовании показано статистически значимое снижение обоих лигандов в группе больных РЯ по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что статистически значимое снижение B7-H3 выявлено в группе больных серозным РЯ ($p=0,0349$), в то время как содержание HLA-G было статистически значимо ниже при всех гистологических типах опухолей по сравнению с контролем. Также необходимо отметить, что экспрессия HLA-G при РЯ ассоциирована с благоприятным прогнозом [22].

Проведенное исследование показало, что для различных морфологических типов эпителиального РЯ содержание растворимых форм исследованных белков статистически значимо отличается. Из литературных данных известно, что муцинозные и эндометриодные опухоли РЯ более благоприятны с прогностической точки зрения, по сравнению с серозным вариантом [23, 24]. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что именно серозные опухоли являются более иммуногенными по сравнению с другими исследованными морфологическими типами РЯ и имеют перспективу для проведения иммунотерапии. На сегодняшний день эффективность иммунотерапии эпителиальных опухолей яичников составляет приблизительно 10-15% независимо от их гистологического варианта [25]. Возможно, для повышения ее эффективности необходимо учитывать данный параметр.

Заключение. Несмотря на накопленное достаточно большое количество данных в области иммунологии опухолей, многие аспекты опухолевой иммуносупрессии и толерантности еще до конца не ясны. Результаты исследований, посвященные контрольным точкам иммунитета в сыворотке и плазме крови, опубликованные за последние годы, свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения роли данных маркеров при опухолях различных локализаций. В настоящее время понятно, что существует большое количество взаиморегулирующих и компенсаторных механизмов, позволяющих опухоли избежать иммунного ответа. Результаты, полученные в данном исследовании это также подтверждают. Изучение взаимодействия и динамики изменения содержания растворимых форм белков контрольных точек иммунитета, а также более строгие критерии отбора больных РЯ для иммунотерапии, помогут повысить эффективность существующего лечения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00479).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-16, 19-25 см. REFERENCES)

17. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Казанцева И.А., Базаев В.В., Матвеев В.Б. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019;15(1):15-22.
18. Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Чанг В.Л., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Соколов Н.Ю., Поликарпова С.Б., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (6): 347-52.

REFERENCES

1. Tomao F., Voccia S.M., Sassu C.M., Chirra M., Palaia I., Petrella M.C. et al. First-Line Treatment with Olaparib for Early Stage BRCA-Positive Ovarian Cancer: May It Be Possible? Hypothesis Potentially Generating a Line of Research. *Cancer Manag. Res.* 2020;12:5479-89.
2. Hodi F.S., Mihm M.C., Soiffer R.J., Haluska F.G., Butler M., Seiden M.V. et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(8):4712-7.
3. Hodi F.S., Butler M., Oble D.A., Seiden M.V., Haluska F.G., Kruse A. et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(8):3005-10.
4. Chapoval A.I., Ni J., Lau J.S., Wilcox R.A., Flies D.B., Liu D. et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2001;2(3):269-74.
5. Prasad D.V., Nguyen T., Li Z., Yang Y., Duong J., Wang Y., Dong C. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.* 2004;173(4):2500-6.
6. Suh W.K., Gajewska B.U., Okada H., Gronski M.A., Bertram E.M., Dawicki W. et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 2003;4(9):899-906.
7. Janakiram M., Shah U.A., Liu W., Zhao A., Schoenberg M.P., Zang X. The third group of the B7-CD28 immune checkpoint family: HH-LA2, TMIGD2, B7x, and B7-H3. *Immunol. Rev.* 2017;276(1):26-39.
8. Castellanos J.R., Purvis I.J., Labak C.M., Guda M.R., Tsung A.J., Velpula K.K., Asuthkar S. B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2017;6(4):66-75.
9. Yabe T., McSherry C., Bach F.H., Fisch P., Schall R.P., Sondel P.M., Houchins J.P. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics.* 1993;37(6):455-60.
10. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-9.
11. Cai X., Caballero-Benitez A., Gewe M.M., Jenkins I.C., Drescher C.W., Strong R.K. et al. Control of Tumor Initiation by NKG2D Naturally Expressed on Ovarian Cancer Cells. *Neoplasia.* 2017;19(6):471-82.

12. Molfetta R., Zingoni A., Santoni A., Paolini R. Post-translational Mechanisms Regulating NK Cell Activating Receptors and Their Ligands in Cancer: Potential Targets for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2019;10:2557.
13. McGilvray R.W., Eagle R.A., Rolland P., Jafferji I., Trowsdale J., Durrant L.G. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer.* 2010;127(6):1412-20.
14. McGilvray R.W., Eagle R.A., Watson N.F., Al-Attar A., Ball G., Jafferji I., Trowsdale J., Durrant L.G. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(22):6993-7002.
15. Sheu J.J., Shih IeM. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):436-43.
16. Ullah M., Azazzen D., Kaci R., Benabbou N., Pujade Lauraine E., Pocard M., Mirshahi M. High Expression of HLA-G in Ovarian Carcinoma: The Role of Interleukin-1 β . *Neoplasia.* 2019;21(3):331-342.
17. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryatcheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Kazantseva I.A., Bazaev V.V., Matveev V.B. Soluble forms of the immune check-point receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and pathologic correlations. *Onkourologiya.* 2019;15(1):15-22. (in Russian)
18. Gershtein E.S., Ognerubov N.A., Chang V.L., Delektorskaya V.V., Korotkova E.A., Sokolov N.Yu., Polikarpova S.B., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. The content of the soluble forms PD-1 and PD-L1 in blood serum of patients with gastric cancer and their relationship with clinical and morphological characteristics of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020;65(6):347-52. (in Russian)
19. von Lilienfeld-Toal M., Frank S., Leyendecker C., Feyler S., Jarmin S., Morgan R. et al. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010;59(6):829-39.
20. Vyas M., Reinartz S., Hoffmann N., Reiners K.S., Lieber S., Jansen J.M., Wagner U., Müller R., von Strandmann E.P. Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncoimmunology.* 2017;6(9):e1339854.
21. Zhao L., Xie C., Liu D., Li T., Zhang Y., Wan C. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatocirrhosis by soluble B7-H3. *J. Gastrointest. Surg.* 2017;21:807-12.
22. Rutten M.J., Dijk F., Savci-Heijink C.D., Buist M.R., Kenter G.G., van de Vijver M.J., Jordanova E.S. HLA-G Expression Is an Independent Predictor for Improved Survival in High Grade Ovarian Carcinomas. *J. Immunol. Res.* 2014;2014:274584.
23. Peres L.C., Cushing-Haugen K.L., Köbel M., Harris H.R., Berchuck A., Rossing M.A., Schildkraut J.M., Doherty J.A. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J. Natl. Cancer Inst.* 2019;111(1):60-8.
24. Irodi A., Rye T., Herbert K., Churchman M., Bartos C., Mackean M. et al. Patterns of clinicopathological features and outcome in epithelial ovarian cancer patients: 35 years of prospectively collected data. *BJOG.* 2020;127(11):1409-20.
25. Palaia I., Tomao F., Sassu C.M., Musacchio L., Benedetti Panici P. Immunotherapy For Ovarian Cancer: Recent Advances And Combination Therapeutic Approaches. *Onco Targets Ther.* 2020;13:6109-29.

Поступила 17.01.21
Принята к печати 30.01.21

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Карпова А.Е.¹, Шабалова И.П.¹, Созаева Л.Г.², Тумгоева Л.Б.²

ЗНАЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИИ ЭНДОМЕТРИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹Кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия;

²Кафедра акушерства и гинекологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия

Цитологическое исследование биологического материала органов репродуктивной системы зарекомендовало себя как эффективный метод выявления и уточняющей диагностики рака и неопухолевых заболеваний эндометрия. Однако при традиционном (классическом) цитологическом исследовании могут возникать сложности интерпретации результатов из-за высокого уровня неадекватных образцов: наличие слизи, большого количества элементов крови, структур из плохо просматриваемых клеток при неправильном приготовлении препарата. В настоящее время все более широкое признание и распространение получает метод жидкостной цитологии, основанный на технологии приготовления стандартных тонкослойных цитологических препаратов из жидкой клеточной суспензии. Эти слайд-препараты при необходимости можно использовать для проведения морфометрии, цитохимических, иммуноцитохимических исследований. Также из этого материала можно готовить клеточные блоки, и при наличии небольших кусочков ткани получать информацию о гистологическом строении биоптата, использовать эти блоки для проведения иммуногистохимических исследований. Детальное исследование содержимого полости матки также необходимо для рассмотрения возможности попадания в нее опухолевых клеток рака яичника, маточной трубы или рака другой локализации, это необходимо для получения дополнительной информации о происхождении, верификации морфологического диагноза и определения тактики ведения и лечения пациентов, так как в вопросах возникновения рака яичника и эндометрия многое остается неясным. Исследование аспиратов и смывов из полости матки с применением усовершенствованных молекулярных методик вместе с уже существующими методами обследования может позволить создавать группы риска по развитию опухолей матки, придатков и брюшины. В литературном обзоре приведены сравнительные характеристики различных методов и их сочетания, позволяющие совершенствовать диагностику неопухолевых поражений и опухолей органов репродуктивной системы, в частности, эндометрия. Поиск литературы проводился по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library.

Ключевые слова: цитологическое исследование эндометрия; жидкостная цитология; рак эндометрия; патология эндометрия; рак яичника; иммуноцитохимическое исследование.

Для цитирования: Карпова А.Е., Шабалова И.П., Созаева Л.Г., Л.Б. Тумгоева Л.Б. Значение комплексного цитологического исследования в диагностике патологии эндометрия (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 87-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-87-94>

Karpova A.E.¹, Shabalova I.P.¹, Sozaeva L.G.², Tumgoeva L.B.²

COMPREHENSIVE APPROACH TO DIAGNOSTIC CYTOLOGY IN ENDOMETRIAL PATHOLOGY (REVIEW OF LITERATURE)

¹Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

²Department of Obstetrix and Gynecology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

A cytological examination of uterine cavity material has proven to be the effective method of detecting and clarifying the diagnosis of cancer and non-tumor endometrial diseases. However, sometimes there are difficulties in interpreting the results in a traditional (classical) cytological examination, due to high level of inadequate samples: the presence of mucus, a large number of blood elements, structures of poorly visible cells in the wrong preparation of the smear. At present, the method of liquid cytology, based on the technology of preparation of standard thin-layer cytological preparations from liquid cell suspension, is increasingly developed and widespread. These slides, if necessary, can be used for morphometry, cytochemical, immunocytochemical studies etc. It is also possible to prepare cell blocks from this material, and to obtain information about the histological structure if small pieces of tissue are presented in cytological material, moreover, to use these blocks for immunohistochemical reactions. Material from the uterine cavity may contain tumor cells from ovarian, tubal or other non- endometrial carcinoma, and it is necessary to obtain information about their origin, to verify the morphological diagnosis and to determine the management and treatment of patients, as a lot of problems concerning ovarian and endometrial cancer remains unclear. Examination of aspirates and scrapes from the uterine cavity using advanced molecular techniques, together with existing examination methods, can help to form risk groups for uterine, tubal, ovarian and even peritoneal tumors. The review of literature contains comparative characteristics of different methods and their combinations, which allow improving diagnostics of non-tumor lesions and endometrial tumors.

Key words: endometrial cytology; endometrial carcinoma; endometrial pathology; liquid based cytology; ovarian carcinoma; immunocytochemistry.

For citation: Karpova A.E., Shabalova I.P., Sozaeva L.G., Tumgoeva L.B. Comprehensive approach to diagnostic cytology in endometrial pathology (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 87-94 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-87-94>

Information about authors:

Karpova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-3415-8183>;
Shabalova I.P., <https://orcid.org/0000-0002-7838-6279>;
Sozaeva L.G., <https://orcid.org/0000-0002-1793-5684>;
Tumgoeva L.B., <http://orcid.org/0000-0002-6173-5954>.

For correspondence: *Shabalova I.P.*, M.D., PhD, Doctor of Medical Sciences, Professor; e-mail: irensheb@inbox.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 06.11.2020
Accepted 07.12.2020

Введение. По данным ВОЗ среди злокачественных новообразований женских половых органов рак эндометрия занимает четвертое место после рака молочной железы, шейки матки и яичников. Рак эндометрия (РЭ) в развитых странах занимает первое место и составляет более 80% в структуре злокачественных новообразований (ЗНО) тела матки [1]. По данным ВОЗ, в 2018 г. в мире зарегистрировано 382 069 новых случаев рака тела матки (РТМ), а смертность от данного заболевания составила более 89 000 наблюдений. В целом в мире рак тела матки занимает 6-е ранговое место среди злокачественных новообразований у женщин всех возрастных групп и на его долю среди всех злокачественных новообразований женского населения приходится до 8,4%. [2]. В России в 2019 г. число первично выявленных наблюдений ЗНО тела матки превысило 26 000 [3]. Распространенность ЗНО тела матки в России с 2009 по 2019 гг. увеличилась с 133,7 до 187,3 больных на 100 000 населения. У 84,6% из них установлена I-II стадия, 8,6% – III стадия, 5,7% – IV [3]. Более 90% всех случаев РЭ приходится на женщин старше 50 лет, при этом медиана возраста и средний возраст заболевших РЭ как в России, так и в большинстве стран Евроатлантического блока, составляет 63 года и 60–62 года соответственно [2, 4].

Для того, чтобы быстро, эффективно, экономично определить характер изменений на ранних этапах развития заболевания, важно установить морфологический диагноз по клеточному составу материала, полученному из патологического очага. Золотым стандартом морфологического исследования является комплексное цитологическое и гистологическое исследование, взаимодополняющие методы.

В течение последних двух десятилетий в гинекологической практике помимо классического (традиционного) метода приготовления и окрашивания препаратов (традиционная цитология (ТЦ)) используют метод жидкостной цитологии (ЖЦ) [5]. Метод основан на технологии приготовления стандартных тонкослойных цитологических препаратов из жидкой клеточной суспензии. Метод ЖЦ приобретает все больший интерес в морфологической диагностике реактивных изменений и злокачественных новообразований. В сравнении с традиционным методом приготовления мазков для цитологического исследования монослойные препараты более информативны и качество их не зависит от качества работы лаборанта. Препараты при необходимости можно использовать для проведения цитохимических, иммуноцитохимических исследований (ИЦХИ). Кроме того, из этого материала можно готовить клеточные блоки, и при получении небольших кусочков ткани полу-

чать информацию о гистологическом строении ткани из патологического очага, а также использовать эти блоки для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХИ) [5].

Целью данного обзора является анализ данных литературы по представлению возможностей повышения эффективности методов диагностики неопухолевых поражений и опухолей эндометрия за счет применения комплексного морфологического исследования (традиционного цитологического, метода жидкостной цитологии и клеточных блоков, с использованием ИЦХИ и ИГХИ) аспирата из полости матки и материала, полученного в ходе операции по поводу неопухолевых поражений и опухолей эндометрия.

Современные методы диагностики патологии эндометрия. В настоящее время значительное место в диагностике патологии эндометрия исследователи отводят биохимическим методам, среди которых наиболее актуальными являются методы определения маркеров окислительной модификации белков, сопровождающихся необратимыми изменениями тканей [6]. Достаточно надежными, хотя и не лишенными недостатков, авторы считают иммунофлюоресцентную и гистохимическую методику исследования ткани эндометрия с обнаружением выделявшихся в эндометриальную слизь ряда ферментов и их изоформ [7]; определение в смывах из полости матки опухолевых маркеров [7]; содержание карбонильных групп белка [8]; цитологическое исследование (ЦИ) аспирата из полости матки [9].

Среди аппаратных методов широкое распространение получило эхографическое исследование органов репродуктивной системы при эндометриозе [10]. Среди дополнительных методов диагностики патологии эндометрия описано радионуклидное исследование [9]. Ведущее место в диагностике внутриматочной патологии занимает гистероскопия [11], для которой авторами показана отрицательная прогностическая ценность на уровне более 97%, когда в полностью визуализированной полости матки не обнаруживается структурных отклонений и когда эндометрий кажется тонким и однородным [12]. Авторы уточняют, что гистероскопия является полезным диагностическим инструментом, но для диагностики патологии эндометрия должна дополняться биопсией эндометрия [13]. Максимально применяемым является метод диагностики патологии эндометрия, основанный на гистологическом исследовании соскоба из полости матки [14, 15].

Патологические состояния эндометрия, классификации. По классификации Я.В. Бохмана [16], патологические состояния эндометрия делятся на:

- фоновые заболевания (железистая гиперплазия, полипы эндометрия);
- предраковые заболевания (атипическая гиперплазия I, II, III степени);
- РЭ.

Гиперплазия эндометрия (ГЭ) – гормонально зависящая патология эндометрия, которая развивается на фоне относительной или абсолютной гиперэстрогемии и проявляется морфологическими изменениями желез и стромы эндометрия [17].

В 2014 г. ВОЗ принимает новую (действующую) классификацию ГЭ, объединяющую две категории [18]:

- 1) ГЭ без атипии;
- 2) атипическая гиперплазия эндометрия/эндометриальная интраэпителиальная неоплазия (АЕН/ЕІN).

Полипы эндометрия выносят за рамки данной классификации. В подавляющем большинстве наблюдений полипы формируются на фоне неизменной слизистой оболочки, и поэтому по современным классификациям их не относят к гиперпластическим процессам эндометрия [19].

Простая ГЭ без атипии – это наиболее часто встречающийся вариант ГЭ, эквивалентом ее являются термины «железистая» и «железисто-кистозная» ГЭ. При гистологическом исследовании (ГИ) отмечают повышение числа железистых и стромальных структур; при этом первые преобладают незначительно. Рак на фоне простой ГЭ развивается у 1-3% пациенток.

Сложная ГЭ без атипии предполагает изменение формы и размера желез с преобладанием железистого компонента над стромальным. Сложная ГЭ без атипии соответствует термину «невыраженная аденоматозная гиперплазия», рак матки на ее фоне развивается приблизительно в 3-10% наблюдений [20].

Атипическую гиперплазию эндометрия относят к облигатно предраковому процессу; выделяют преимущественно структурную (аденоматозную) и клеточную гиперплазию. Атипическая гиперплазия эндометрия (аденоматоз, атипическая железистая гиперплазия) характеризуется более выраженными пролиферативными изменениями эпителиального компонента с атипией строения желез (формы и расположения). Как правило отмечается преобладание объема желез над объемом стромы [21].

Простая ГЭ с атипией проявляется в изменении нормального расположения ядер железистых клеток, а также в их необычной, зачастую округлой форме. Отличительным признаком является наличие атипии клеток желез без изменений стромы. Эпителий демонстрирует повышенную митотическую активность. Рак на ее фоне развивается приблизительно в 8-20% наблюдений.

Сложная ГЭ с атипией – наиболее опасная форма гиперплазии, приблизительно в 22-57% случаев на ее фоне развивается РЭ. Возрастает митотическая активность, число и спектр патологических митозов, что проявляется выраженной пролиферацией железистого компонента, явлениями тканевой и клеточной атипии без инвазии базальной мембраны [20].

РТМ – симптомное заболевание, при этом основной и первый признак РЭ – кровянистые выделения из половых путей, ациклическое или на фоне постменопаузы. При своевременном обращении к врачу и правильной верификации диагноза заболевание диагностируют на ранних (I–II) стадиях опухолевого процесса более чем у 80% пациенток. С этим связаны благоприятный про-

гноз и низкие показатели одногодичной летальности больных: в 2018 г. данный показатель составил 8,9% в России, 6,5% – в США, 5–10% – в различных странах Европы [2, 22].

Средний возраст пациенток составляет 59-62 года. Иными словами, РЭ – это прежде всего постменопаузальный рак. Данный фактор чрезвычайно важен, так как именно состояние постменопаузального эндометрия (линейный тип М-эхо) формирует некоторое понятие нормы при ультразвуковом сканировании, что может и должно быть использовано в качестве скринингового теста [23].

Аденокарцинома эндометрия (эндометриальная аденокарцинома) – наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль тела матки (80%), которая в большинстве наблюдений (80-85%) является эстроген-зависимой опухолью и только на 15-20% – эстроген-независимой.

Йокогамская система для отчетности по эндометриальной цитологии. На симпозиуме, посвященном цитологическому исследованию материала из полости матки, проходившем на международном конгрессе ICC (International Congress of Cytology) в 2016 г. в г. Йокогама (Япония), международные эксперты по эндометриальной цитологии договорились о разработке приемлемой для всего мира системы под названием Йокогамская система (The Yokohama System (TYS) для отчетности по эндометриальной цитологии [24].

Согласно классификации Йокогамской системы выделяют следующие критерии цитологических исследований:

TYS0 – неинформативный материал.

Полученный образец нельзя оценить по разному ряду причин (например, избыток примеси крови или элементов воспаления, контаминация содержимым влагалища, отсутствие клеток эндометрия и т.д.);

TYS1 – отсутствие ЗНО и предшествующих поражений.

Непатологический/физиологический эндометрий. Если все структуры (кластеры) клеток в препарате представлены физиологическими трубчатыми или плоскими формами, сопровождаемыми стромальными клетками и ядерное перекрытие составляет менее трех слоев, цитологическая картина оценивается как отрицательная по наличию злокачественной опухоли и предшественников (TYS1).

TYS2 – атипичные клетки эндометрия неопределенного значения (ATEC-US).

Заключение по АТЕC-US дают в случае, когда атипичные клетки эндометрия присутствуют, но их значимость не может быть определена из-за имеющихся воспалительных, метапластических или ятрогенных изменений. Если цитологических данных недостаточно для классификации по любой другой из вышеуказанных диагностических категорий, следует выбрать АТЕC-US (TYS2). В таких случаях последующая биопсия эндометрия не требуется, если только изменения не повторяются.

TYS3 – гиперплазия эндометрия без атипии. При малом увеличении микроскопа обнаруживают более пяти клеточных скоплений в виде расширенных ветвящихся железистых структур, с наложением ядер не более чем в три слоя. Для того, чтобы дать заключение о гиперплазии эндометрия без атипии, необходимо убедиться в отсутствии ядерной атипии на среднем увеличении микроскопа.

ТYS4 – атипичные клетки эндометрия, нельзя исключить АЕН/ЕИН (АТЕС-АЕ).

Термин АТЕС используют, когда обнаруживают атипичные клетки эндометрия. АТЕС-АЕ используют, когда есть предположение об атипичной гиперплазии эндометрия или злокачественной опухоли, но изменений недостаточно для того, чтобы интерпретировать их как злокачественное новообразование (ТYS6): количество атипичных клеток ограничено или атипия вызвана воспалением, метапластическими изменениями или ятрогенным воздействием. В таком случае рекомендуется последующая биопсия эндометрия.

ТYS5 – атипичная гиперплазия эндометрия/эндометриальная интраэпителиальная неоплазия (АЕН/ЕИН).

ТYS6 – Malignant neoplasms (adenocarcinoma). При малом увеличении микроскопа наблюдаются комплексы из клеток с неравномерными выпячиваниями, нагромождением ядер в три или более слоев. Морфологический диагноз аденокарциномы (ТYS6) или атипичной гиперплазии эндометрия/эндометриальной интраэпителиальной неоплазии (АЕН/ЕИН) (ТYS5) устанавливают, если при среднем увеличении микроскопа отмечают ядерную атипичность или некротический фон, нарушение цитоархитектоники в структурах (комплексах): крибриформные структуры и/или структуры «спина к спине» [24].

АЕН/ЕИН (ТYS5) можно отличить от аденокарциномы (ТYS6), если при наличии четко определенных ядерных аномалий отсутствуют дополнительные данные, свидетельствующие об инвазии: нет явного некротического фона, изолированных злокачественных клеток, структур «спина к спине» или крибриформных структур [24].

Очень важна правильность трактовки изменений в клетках железистого и стромального компонентов в фазу пролиферации и в фазу секреции, так как трудности, с которыми сталкивается цитолог при изучении аспиратов из полости матки, связаны, прежде всего, с тем, что эндометрий постоянно меняется в зависимости от фаз менструального цикла. В пластах отторгнувшегося менструального эндометрия в отдельных случаях встречаются группы клеток, которые могут ошибочно расцениваться как элементы злокачественного новообразования [25].

Сравнительная характеристика различных методов диагностики патологии матки. Существуют инструментальные методы выявления патологии эндометрия, такие как трансвагинальное ультразвуковое исследование (УЗИ), гистероскопия, соногистерография. УЗИ считается первым шагом в оценке состояния женщин с постменопаузальным кровотечением [26].

Трансвагинальное УЗИ является наиболее распространенным диагностическим тестом, который позволяет измерить толщину эндометрия [27]. S. Granberg и соавт. [28] полагают, что толщина эндометрия у женщин в постменопаузе, равная 5 мм и менее, позволяет с высокой (96%) вероятностью исключить заболевание слизистой оболочки тела матки.

«Золотым стандартом» в комплексной оценке состояния эндометрия в репродуктивном возрасте считают морфологическую диагностику по биоптату эндометрия в середине фазы пролиферации на 7–10-й день менструального цикла с последующим исследованием его рецепторного аппарата при помощи ИГХИ [29].

Однако, отмечены две основные проблемы: во-первых, биопсия является очень болезненной и инвазивной процедурой, во-вторых, высока доля неадекватных образцов. Поэтому проведение биопсии у всех пациентов с аномальным генитальным кровотечением считают проблематичным [30].

Альтернативой выскабливанию полости матки является Пайпель-биопсия – метод, позволяющий получить адекватный материал для исследования, при этом минимально травмирующий эндометрий [29].

Зарубежные коллеги признали, что эндометриальная цитология является полезным методом диагностики с высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении эндометриальных нарушений [31]. В Японии ЦИ материала из полости матки является первым шагом для оценки состояния эндометрия у женщин с подозрением на карциному [30].

Применение метода жидкостной цитологии в диагностике патологии эндометрия. Внедрение ЖЦ в рутинную практику позволило исследовать клетки эндометрия на предмет установления цитологического диагноза, а также сделало возможным применение вспомогательных методов изучения молекулярных изменений при РЭ [24].

В образцах, приготовленных методом ЖЦ, клетки эндометрия могут казаться более гиперхромными и полиморфными, с более видимыми ядрышками, чем в традиционных мазках. Лучший диагностический результат по материалу, приготовленному методом ЖЦ, объясняется хорошим сохранением клеток и отсутствием загрязнения элементами крови или воспаления, с которыми часто сталкиваются в традиционных мазках. ЖЦ позволяет обнаружить диагностические клетки даже при их небольшом количестве [21].

В настоящее время используют различные технологии для приготовления препаратов, по данным литературы наиболее распространенными в мире являются две основные технологии жидкостной цитологии: ThinPrep (TP; Hologic Inc., Marlborough, MA, USA) [32, 33] и SurePath (SP; BD Diagnostics, Burlington, NC, USA) [34–36]. Эти два способа отличаются устройствами для отбора проб и технологическими особенностями, но в целом оба метода имеют хорошую диагностическую точность.

Q. Wang и соавт. [37] провели метаанализ для оценки метода цитологии эндометрия в диагностике рака эндометрия примерно у 4179 пациенток с различными поражениями эндометрия с цито-гистопатологическими результатами и установили, что цитологическое исследование эндометрия является эффективным диагностическим методом.

В результате исследования F. Yanaki и соавт. [38] 1116 образцов эндометрия, приготовленных методом ЖЦ и 1044 образцов аспирационной биопсии эндометрия, авторы сообщили, что ЖЦ эндометрия может иметь важное значение в различных клинических ситуациях для выявления и уточняющей диагностики злокачественных опухолей эндометрия. Также они отметили, что ЖЦ можно использовать для скрининга опухолей эндометрия в более широком масштабе.

В исследовании X. Yang и соавт. [39] по анализу применения этих методов показано, что при атипичной гиперплазии диагностическая точность ЖЦ при исследовании эндометрия составила 86,1%, чувствительность – 70,3%, специфичность – 88,5%, положительное прогностическое значение – 48,0% и отрицательное

прогностическое значение – 95,2%. В отношении карциномы эндометрия диагностическая точность ЖЦ эндометрия составила 94,4%; чувствительность – 53,2%, специфичность – 98,6%, положительное прогностическое значение – 79,8% и отрицательное прогностическое значение – 95,3%. Авторы сделали обоснованный вывод о полезности применения ЖЦ в качестве метода первой линии [39]. Число неадекватных образцов, приготовленных методом ЖЦ, ниже, чем у образцов, приготовленных, традиционным методом [30].

Применение иммуноцитохимического метода в диагностике РЭ. ИЦХИ может быть применено на препарате клеточного блока с отличными результатами и высокой диагностической точностью [40]. Метод клеточного блока может быть использован в качестве вспомогательного способа дифференциальной диагностики при гиперплазии в связи с атипией и аденокарциноме. Подготовка клеточного блока – это хорошо зарекомендовавший себя метод подготовки материала для ЦИ [24]. Показано, что обычная подготовка клеточных блоков требует большого количества клеток в образце, чтобы получить оптимальные парафиновые блоки, которые содержат достаточное количество встроенных клеток, а коэффициент достижения заключенных в парафин срезов клеточных блоков из эффузионных образцов составляет 47,7%, что не является оптимальным для анализа [41].

Имеются основания полагать, что рецепторный статус пайпель-биоптата также возможно исследовать с помощью ИЦХИ. Преимуществами являются: малая инвазивность, небольшой объем достаточного для исследования материала, т.к. материал оценивается цитологически, доступность, всего три этапа предподготовки, высокая скорость, а также высокая информативность метода [29].

Панель антител, применяемая для ИЦХИ эндометриальных поражений, включает:

- рецепторы эстрогена (ER);
- рецепторы прогестерона (PR);
- PTEN (сокр. от англ. Phosphatase and tensin homolog delete on chromosome 10 – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью);
- p53 (белок p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей);
- Ki-67 белок-антиген, показывающий активность опухолевых клеток);
- p16 (белок – ингибитор циклин-зависимых киназ, регулирует клеточный цикл).

Данные маркеры были отобраны исследователями с целью облегчения дифференциации эндометриальной и эндоцервикальной аденокарциномы и эндометриодной карциномы от серозной и светлоклеточной карциномы, а также для реализации использования маркеров, связанных с неоплазией и прогнозом [42]. Однако, прогностическая ценность каждого из этих критериев для диагностики определенного типа рака не в полной мере изучена, и имеется необходимость дальнейшего исследования.

На основе биомаркеров РЭ традиционно разделяют на два подтипа. Наиболее часто встречающийся и, как правило, спорадически возникающий РЭ типа I, обычно характеризуется наличием высокодифференцированных клеток, по гистологическим характеристикам является эндометриодным, а сами клетки опухоли обнаружива-

ют нормальный диплоидный кариотип, нестабильность микросателлитов (MSI) и экспрессируют ER и PR. При РЭ типа I мутации в гене опухолевого супрессора TP53 происходят редко, и больные имеют хорошие шансы на выздоровление [43]. РЭ типа I проявляется мутациями в K-ras, PTEN, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназной каталитической субъединице альфа (PIK3CA), и генах катенина бета-1 (CTNNB1) [44].

В отличие от этого, РЭ типа II не относится к эндометриодным опухолям, содержит низкодифференцированные клетки, для многих из которых характерна анеуплоидия, отсутствуют генетические изменения в белке p53, а ER и PR не экспрессируются. При этом течение болезни имеет неблагоприятный прогноз [43]. Однако, некоторые авторы указывают, что тип II проявляет хромосомную нестабильность [45].

Внедрение в практику ИЦХИ и недавнее открытие новых генов и их функций при раке привели к открытию клеточных белков или нуклеиновых кислот, которые экспрессируются исключительно в опухолях. Эти биомаркеры обладают потенциалом повышения диагностической согласованности и воспроизводимости раковых заболеваний [46]. К биомаркерам помимо описанных относят L1-молекулу клеточной адгезии (L1CAM), MutL гомолог 1 (MLH1), белок-продукт PMS2-гена, участвующий в восстановлении несоответствия ДНК, β-катенин и E-кадгерин [47].

Согласно данным литературы, совпадение результатов ИГХИ и ИЦХИ при опухолевых процессах составляет для ER 98%, для PR – 97% [48].

Мутации генов PTEN, β-Катенин и p53 – наиболее частые молекулярные дефекты при раке эндометрия I и II типа [49, 50, 51]. Потеря PTEN и положительное ядерное окрашивание β-Катенин часто наблюдались при атипичской гиперплазии эндометрия, но не в нормальном пролиферативном эндометрии. Комбинация PTEN – и β-Катенин + в результате могут стать надежными маркерами в диагностике атипичской гиперплазии эндометрия [52].

Несмотря на большое количество работ, как отечественных, так и зарубежных авторов, посвященных изучению молекулярно-биологических аспектов РЭ, в настоящее время к широкому клиническому использованию при раке тела матки не рекомендован ни один из опухолевых маркеров, поскольку недостаточно информации для их внедрения в клиническую практику. Детальное изучение данной проблемы позволит оптимизировать не только диагностику, но и лечение рака эндометрия, а исследование генетических особенностей двух вариантов РЭ, будет способствовать персонализации подходов в его терапии [53], в связи с чем исследовательские усилия сосредоточены на открытии новых неинвазивных методов диагностики и понимания молекулярной архитектуры опухоли в режиме реального времени [54].

Проблема ранней диагностики и лечения новообразований органов репродуктивной системы крайне актуальна, и рассматривая вопросы РЭ нельзя обойти стороной взаимосвязь рака эндометрия, яичника и маточной трубы, тем более что проблема рака яичника является одной из самых трудных в гинекологии [55]. Детальное исследование содержимого полости матки также необходимо в связи с возможностью попадания в нее опухолевых клеток рака яичника и маточной трубы. Актуальность исследований этих нозологических форм возрастает в связи с широкой распространенностью опухолей

и опухолевидных образований яичников и стойкой тенденцией к росту заболеваемости злокачественными опухолями органов репродуктивной системы, хотя за последние за последние 20 лет пятилетия выживаемость и увеличилась на 13% [56]. Во многих странах, включая и Россию, рак яичника занимает 8-е ранговое место среди злокачественных новообразований у женщин всех возрастных групп и на его долю среди всех злокачественных новообразований женского населения приходится до 4,3% [3, 57].

Столь неутешительные показатели связаны и со скудной клинической симптоматикой на ранних стадиях заболевания, отсутствием оптимальных алгоритмов скрининга и ранней диагностики многочисленностью форм опухолей яичников. Также спорным остается вопрос теории возникновения рака яичника, так как известно, что мезотелий органов репродуктивной системы женщины не имеет эмбриологической связи с малигнизированным эпителием при раке яичника, и феномен одного из звеньев патогенеза этого заболевания – регургитация клеток через маточные трубы, наблюдаемая почти у 95% женщин во время менструации, в связи с чем возможен перенос содержимого матки и труб на серозную поверхность матки, придатков матки и брюшины. В 2016 г. R.J. Kigman и соавт [58] была предложена теория овариального канцерогенеза, согласно которой первоисточником рака яичников является эпителий фимбриального отдела маточной трубы или серозная трубная интраэпителиальная карцинома маточной трубы.

Большое число исследований, посвященных канцерогенезу рака яичников, указывает на необходимость детального иммуноцитохимического и иммуногистохимического исследования содержимого полости матки с учетом возможности попадания опухолевых клеток не только в брюшную полость, но в первую очередь в полость матки. Это важно для верификации морфологического диагноза и определения тактики ведения и лечения пациенток.

Исследование аспириатов и смывов из полости матки с применением усовершенствованных молекулярных методов вместе с уже существующими, позволяют создавать группы риска по развитию опухолей матки, придатков и брюшины, в комплексе скринингового алгоритма.

Заключение. Увеличение заболеваемости рака эндометрия продолжается во всем мире, в связи с чем активно идет поиск надежных критериев выявления и уточняющей диагностики злокачественных опухолей полости матки и предшествующих поражений. В настоящее время получены научные доказательства связи рака эндометрия, маточных труб и яичника. Кроме того, элементы рака труб и яичника могут попадать в полость матки и быть обнаружены при исследовании материала из эндометрия. В связи с этим требуется внедрение надежных, безопасных методов выявления и уточняющей диагностики злокачественных новообразований эндометрия и придатков матки с учетом связи рака эндометрия, маточной трубы и яичника. Таким образом, крайне важно изучать и расширять возможности традиционной и жидкостной цитологии с использованием молекулярных методов в выявлении и уточняющей диагностике рака тела и придатков матки.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 12, 14, 18, 22, 24, 26-28, 30-41, 44-52, 54, 56, 58 см. REFERENCES)

1. Нечушкина В. М., Деньгина Н. В., Коломиец Л. А., Кравец О. А., Морхов К. Ю., Новикова Е. Г. и др. Практические рекомендации по лечению рака тела матки и сарком матки. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO*. 2018; 8(3s2): 190–203. DOI:10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-190-203
3. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава; 2020.
5. Шабалова И. П. Клиническая цитология в 21 веке – тупик или развитие специальности? *Лаборатория*. 2015; (4): 4-9.
6. Фролова М. Ю. Возможности метода определения карбонильных групп белков сыворотки крови для оценки состояния «окислительного стресса» в клинической практике. Дисс. канд. биол. наук. СПб; 2003.
7. Шварев Е. Г. Опухолевые маркеры в диагностике и оценке эффективности гормонотерапии рака эндометрия. Дисс. д-ра мед. наук. СПб; 1993.
8. Дикарева Л. В. Способ диагностики гиперпластических процессов эндометрия у больных миомой матки. Патент РФ G01N33/50. RU2327164C1; 2008.
9. Хохлова И. Д. Диагностика и лечение гиперпластических процессов эндометрия. *Акушерство и гинекология*. 1996; (4): 50-5.
10. Демидов В. Н. Современные принципы ультразвуковой диагностики генитального эндометриоза. *Гинекология*. 2002; (2): 48-52.
11. Серов В. Н. Диагностика гинекологических заболеваний с курсом патологической анатомии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2003.
13. Хадарцева К. А. Гистероскопия в оценке состояния эндометрия: *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 10(5): 830-3.
15. Чехоева А. Н. Клинико-диагностические аспекты и лечебная тактика гиперпластических процессов эндометрия с современных позиций (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. Электронное издание. 2019; 4. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16483.
16. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии. М.: Книга по Требованию; 2012.
17. Доброхотова Ю. Э. Гиперплазия эндометрия. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.
19. Давыдов А. И., Новрузова Н. Х., Стрижаков А. Н. Гиперплазии эндометрия: анализ классификации ВОЗ 2014 и протокола RCOG&BSGE с позиций собственных результатов. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2018; 17(4): 11–24.
20. Козаченко В. П., ред. Клиническая онкогинекология: руководство для врачей. М.: Бином; 2016.
21. Шабалова И. П., Касоян К. Т. Цитологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. М.: «Триада»; 2010.
23. Сухих Г. Т., Ашрафян Л. А., Кузнецов И. Н. Ранняя диагностика основных локализаций рака органов репродуктивной системы у женщин: проблемы и перспективы. *Гинекология Эндокринология*. 2018; 2 (146): 6-9.
25. Краснощёкова Г. И. Современные цитологические дифференциально-диагностические критерии злокачественных опухолей тела матки. Дисс. канд. мед. наук. М.; 2005.
29. Зиновьева О. С., Мотовилова Т. М., Качалина Т. С., Зиновьев С. В., Кузнецов С. С., Круглова И. А., Уткин О. В. Исследование пролиферативного потенциала гипопластического эндометрия у пациенток с репродуктивными нарушениями в анамнезе методом флуоресцентной иммуноцитохимии. *Медицинский альманах*. 2017; (6): 84-7.
42. Романовский О. Ю. Гиперпластические процессы эндометрия в репродуктивном периоде. *Гинекология*. 2004; 6(6): 296-302.
43. Коваленко Т. Ф., Морозова К. В., Озолина Л. А., Лапина И. А., Патрушев Л. И. Псевдоген PTENP1, в отличие от гена PTEN, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста. *Acta Naturae*. 2018; 10(1): 43-50. doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-43-50.

53. Уткин Д.О., Попова Н.М., Выборнова О.В., Данилина И.А., Болдырева М.В. Молекулярно-биологические аспекты рака эндометрия: современное состояние проблемы. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2018; 6(1): 144-56. DOI:10.23888/HMJ20181144-156.
55. Урманчиева А.Ф., Кутушева Г.Ф., Ульрих Е.А. Опухоли яичника: клиника, диагностика и лечение. СПб: Н-Л; 2012.
57. Егунова М.А., Куценко И.Г. Дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных новообразований яичников (история вопроса). *Журнал акушерства и женских болезней*. 2016; 65(6):68-78. DOI: 10.17816/JOWD65668-78.

REFERENCES

1. Nechushkina V.M., Den'gina N.V., Kolomiets L.A., Kravets O.A., Morkhov K.Yu., Novikova E.G. and edit. Practical recommendations for the treatment of uterine cancer and uterine sarcomas. *Zlokachestvennye opuholi: prakticheskie rekomendacii RUSSCO*. 2018; 8(3s2): 190–203. DOI:10.18027/2224–5057–2018–8–3s2–190–203. (in Russian)
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., & Jemal, A.. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018; 68(6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
3. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. The state of cancer care for the population of Russia in 2018. Moscow: MNIOI named by P.A. Gertsen, filial FGBU «NMTs radiologii» Minzdruva; 2019. (in Russian)
4. Colombo N., Creutzberg C., Amant F., Bosse T., Gonzalez-Martin A., Ledermann J. et al.. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2016; 27 (1): 16–41. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv484>.
5. Shabalova I.P. Clinical Cytology in the 21st Century – Dead End or Specialty Development? *Laboratoriya*. 2015. (4): 4-9. (in Russian)
6. Frolova M.Yu. Possibilities of the method for determining the carbonyl groups of blood serum proteins for assessing the state of “oxidative stress” in clinical practice. Diss. St.Petersburg; 2003. (in Russian)
7. Shvarev E.G. Tumor markers in the diagnosis and assessment of the effectiveness of hormone therapy for endometrial cancer. Diss. St.Petersburg; 1993. (in Russian)
8. Dikareva L. V. Method for the diagnosis of endometrial hyperplastic processes in patients with uterine myoma. Patent RF MPK G01N33/50. RU2327164C1; 2008. (in Russian)
9. Khokhlova I.D. Diagnostics and treatment of endometrial hyperplastic processes. *Akusherstvo i ginekologiya*. 1996; (4): 50-5. (in Russian)
10. Demidov V.N. Modern principles of ultrasound diagnostics of genital endometriosis. *Ginekologiya*. 2002; (2): 48-52. (in Russian)
11. Serov V.N. Diagnostics of gynecological diseases with the course of pathological anatomy. Moscow: BINOM. *Laboratoriya znaniy*; 2003. (in Russian)
12. de Witt A.C., Vleugels, M. P., de Kruijff J. H. Diagnostic hysteroscopy: a valuable diagnostic tool in the diagnosis of structural intra-cavitary pathology and endometrial hyperplasia or carcinoma? Six years of experience with non-clinical diagnostic hysteroscopy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003; 110(1):79-82. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(03\)00165-9](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00165-9).
13. Khadartseva K.A. Hysteroscopy in assessing the state of the endometrium. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; (10-5): 830-3. (in Russian)
14. Bouet P. E., Hachem H.E., Monceau E., Gariepu G., Kadoch I.-J., Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertility and Sterility*. 2016; 105 (1): 106-10. [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01953-6/fulltext](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01953-6/fulltext).
15. Chekhoaeva A.N. Clinical and diagnostic aspects and therapeutic tactics of endometrial hyperplastic processes from modern positions (literature review). *Zhurnal novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2019; 4. (in Russian)
16. Bokhman Ya.V. Gynecological Oncology Guide. Moscow: Kniga po Trebovaniyu; 2012. (in Russian)
17. Dobrokhotova Yu. E. Endometrial hyperplasia. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
18. Emons G., Beckmann M.W., Schmidt D., Mallmann P. Uterus commission of the Gynecological Oncology Working Group (AGO). New WHO Classification of Endometrial Hyperplasias. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015; 75(2):135-6. doi:10.1055/s-0034-1396256.
19. Davydov A.I., Novruzova N.Kh., Strizhakov A.N. Endometrial hyperplasia: analysis of the WHO 2014 classification and the RCOG & BSGE protocol from the standpoint of our own results. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatalogii*. 2018. 17(4): 11–24. (in Russian)
20. Kozachenko V.P., ed. Clinical gynecological oncology: a guide for doctors. Moscow: Binom; 2016. (in Russian)
21. Shabalova I.P., Kasoyan K.T. Cytological diagnosis of diseases of the cervix and uterine body. Moscow: Triada; 2010. (in Russian)
22. Staples J.N., Duska L.R. Cancer screening and prevention highlights in gynecologic cancer. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2019; 46 (1): 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2018.09.002>.
23. Sukhikh G.T., Ashrafyan L.A., Kuznetsov I.N. Early diagnosis of the main localizations of cancer of the reproductive system in women: problems and prospects. *Ginekologiya Jendokrinologiya*. 2018; 2 (146): 6-9. (in Russian)
24. Fulciniti F., Yanoh K., Karakitsos P., Watanabe J., Di L.A., Margari N. et al. The Yokohama system for reporting directly sampled endometrial cytology: the quest to develop a standardized terminology. *Diagnostic cytopathology*. 2018; 46:400–12.
25. Krasnoshchekova G.I. Modern cytological differential diagnostic qualities of quality tumors of the uterine body. Diss. Moscow; 2005. (in Russian)
26. Ma Ke, Yang Xi, Chen Rui, Zhao J. Liquid-based endometrial cytology associated with curettage in the investigation of endometrial carcinoma in postmenopausal women. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016. 55(6): 777–81.
27. Wang Y., Li L., Douville Ch., Cohen J., Yen T., Kinde I. et al. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers. *Science translational medicine*. 2018; 10(433): eaap8793. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8793>.
28. Granberg S., Wikland M., Karlsson B., A Norström A., Friberg L G. Endometrial thickness as measured by endovaginal ultrasonography for identifying endometrial abnormality. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1991; 164(1): 47-52.
29. Zinov'eva O.S., Motovilova T.M., Kachalina T.S., Zinov'ev S.V., Kuznetsov S.S., Kruglova I.A., Utkin O.V. Study of the proliferative potential of the hypoplastic endometrium in patients with a history of reproductive disorders by the method of fluorescence immunocytochemistry. *Meditsinskiy al'manakh*. 2017; (6):84-7. (in Russian)
30. Shinagawa A., Kurokawa T., Yamamoto M., Onuma T., Tsuyoshi H., Chino Y. et al. Evaluation of the benefit and use of the new terminology in endometrial cytology reporting system. *Diagnost. Cytopathol*. 2018;46:314–9.
31. Yanaki F., Hirai Y., Hanada A., Ishitani K., Matsui H. Liquid-based endometrial cytology using surepath™ is not inferior to suction endometrial tissue biopsy in clinical performance for detecting endometrial cancer including atypical endometrial hyperplasia. *Acta Cytol*. 2017; 61(2):133–9.
32. Papaefthimiou M., Symiakaki H., Mentzelopoulou P., Tsiveleka A., Kyroudes A., Voulgaris Z. et al. Study on the morphology and reproducibility of the diagnosis of endometrial lesions utilizing liquid-based cytology. *Cancer*. 2005;105(2):56-64.
33. Buccoliero A.M., Castiglione F., Gheri C.F., Garbini F., Fambrini M., Bargelli G. et al. Liquid-based endometrial cytology: its possible value in postmenopausal asymptomatic women. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2007;17(1):182-7.
34. Norimatsu Y., Kouda H., Kobayashi T.K., Moriya T., Yanoh K., Tsukayama C. et al. Utility of thinlayer preparations in the endometrial cytology: evaluation of benign endometrial lesions. *Ann. Diagn. Pathol*. 2008;12(2):103-11.

35. Norimatsu Y., Kouda H., Kobayashi T.K., Shimizu K., Yanoh K., Tsukayama C. et al. Utility of liquid-based cytology in endometrial pathology: diagnosis of endometrial carcinoma. *Cytopathology*. 2009;20(6):395-402.
36. Nishimura Y., Watanabe J., Jobo T., Hattori M., Arai T., Kuramoto H. Cytologic scoring of endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *Cancer*. 2005;105(1):8-12.
37. Wang Qing, Wang Qi, Zhao Lanbo, Han Lu, Sun Chao, Ma Sijia et al. Endometrial Cytology as a Method to Improve the Accuracy of Diagnosis of Endometrial Cancer: Case Report and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2019; (9):256.
38. Yanaki F., Hirai Y., Sakamoto K., Kamata M., Fujiwara F., Tamura T. et al. Liquid based endometrial cytology using SurePath™ is not inferior to suction endometrial tissue biopsy for detecting endometrial malignancies: Midterm report of a multicenter study advocated by Japan Association of Obstetricians and Gynecologists. *Cytopathology*. 2019; 30(2):223-8.
39. Yang X. Liquid-based endometrial cytology associated with curettage in the investigation of endometrial carcinoma in a population of 1987 women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2017; 296: 99-105.
40. Zhu Y., Cui F.-Y., Yang Y., Peng H., Li W.-P., Huang Z.-D., et al. Optimized pregelatinized starch technique for cell block preparation in Cell cultures. *Experimental and Molecular Pathology*. 2013; 95(2):144-50.
41. Chen C., Yu L., Wang L. An improved method for generating formalin-fixed, paraffin-embedded cell blocks. *Journal of histotechnology*. 2012; 35(1):11-6.
42. Romanovskiy O.Yu. Endometrial hyperplastic processes in the reproductive period. *Ginekologiya*. 2004; (6): 296-302. (in Russian)
43. Kovalenko T.F., Morozova K.V., Ozolinya L.A., Lapina I.A., Patrushev L.I. The pseudogen PTENP1, in contrast to the PTEN gene, is methylated in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissues of middle-aged and elderly women. *Acta Naturae*. 2018; 10(1). 43-50. doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-43-50. (in Russian)
44. Tzur T., Kessous R., Weintraub A.Y. Current strategies in the diagnosis of endometrial cancer. *Arch. Gynecol. Obstet*. 2017; 296(1): 5-14.
45. Prat J., Gallardo A., Cuatrecasas M., Catusus L. Endometrial carcinoma: Pathology and genetics. *Pathology*. 2007; 39(1):72-87.
46. Nucci M.R., Castrillon D.H., Bai H., Quade B., Ince T., Genest D. et al. Biomarkers in diagnostic obstetric and gynecologic pathology: A review. *Advances in anatomic pathology*. 2003;10(2): 55-68.
47. Geels Y.P., Putten L.J., Tilborg A.A., Lurkin I., Zwarthoff E., Pijnenborg J., et al. Immunohistochemical and genetic profiles of endometrioid endometrial carcinoma arising from atrophic endometrium. *Gynecol. Oncol*. 2015; 137(2): 245-51.
48. Canfell K., Kang Y.J., Clements M., Moa A.M., Beral V. Normal endometrial cells in cervical Cytology: a systematic review of the prevalence and Association with significant endometrial pathology. *Journal of Medical Screening*. 2008; 15(4):188-98.
49. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*. 2004; 444(3):213-23.
50. Wappenschmidr B. Wardelmann E., Gehrig A., Schondort T., Maass N., Bonatz G. et al. PTEN mutations do not cause nuclear betacatenin accumulation in endometrial carcinomas. *Hum. Pathol*. 2004; 35(10):1260-5.
51. Hecht J.L., Mutter G.L. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *Journal of clinical oncology*. 2006; 24(29):4783-91.
52. Norimatsu Y., Moriya T., Kobayashi T.K., Sakurai T., Shimizu K., Tsukayama C., et al. Immunohistochemical expression of PTEN and beta-catenin for endometrial intraepithelial neoplasia in Japanese women. *Annals of diagnostic pathology*. 2007; 11(2): 103-8.
53. Utkin D.O., Popova N.M., Vybornova O.V., Danilina I.A., Boldyreva M.V. Molecular biological aspects of endometrial cancer: current state of the problem. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2018; 6(1): 144-56. (in Russian)
54. Muinelo-Romay L., Casas-Arozamena C., Aba M. Liquid Biopsy in Endometrial Cancer: New Opportunities for Personalized Oncology. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(8): 2311.
55. Urmancheeva A.F., Kutusheva G.F., Ul'rih E.A. Ovarian tumors: clinic, diagnosis and treatment. St.Petersburg: N-L; 2012. (in Russian)
56. Ionescu C.A., Matei A., Navolan D., Dimitriu M., Bohâltea R., Neacsu a. et al. Correlation of ultrasound features and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm score for different histopathological subtypes of benign adnexal masses. *Medicine*. 2018; 97(31):e11762. doi: 10.1097/MD.00000000000011762.
57. Egunova M.A., Kutsenko I.G. Differential diagnosis of benign and malignant ovarian tumors (history). *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2016; 65(6):68-78. DOI: 10.17816/JOWD65668-78. (in Russian)
58. Kurman R.J., Shih I.M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. *Am. J. Pathol*. 2016; 186:733-47.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сметанина С.В.¹, Ускова Е.Ю.¹, Хусиянова А.А.¹, Даныева М.Б.¹, Королькова С.Б.¹, Славнова Е.Н.², Воронова Н.Н.³

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПЛЕВРАЛЬНЫХ ВЫПОТОВ СЕРОЗНОГО ХАРАКТЕРА. КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРЕАНАЛИТИКИ

¹ГБУЗ НО «Нижегородский областной онкологический диспансер» 603163, Нижний Новгород, Россия;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Целью настоящей работы стало на небольшом количестве наблюдений показать эффективность цитологического метода, исключая все возможные ошибки преаналитического этапа. В работе представлены несколько простых и легко воспроизводимых алгоритмов цитологического исследования плевральных выпотов серозного характера с небольшим клеточным содержанием. На примере 20 наблюдений изучения клеточного состава серозных экссудатов показана прямая зависимость результатов исследования от преаналитического этапа. Полное исследование выпотных жидкостей с соблюдением всех этапов преаналитики и применением современных методов цитологической диагностики позволяет свести на нет варианты ложноотрицательных заключений.

Ключевые слова: цитологическая диагностика; пробоподготовка; серозные выпоты.

Для цитирования: Сметанина С.В., Ускова Е.Ю., Хусиянова А.А., Даныева М.Б., Королькова С.Б., Славнова Е.Н., Воронова Н.Н. Исследование клеточного состава плевральных выпотов серозного характера. Концептуальные вопросы преаналитики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 95-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-95-98>

Smetanina S.V.¹, Uskova E.YU.¹, Khusiyanova A.A.¹, Danyaeva M.B.¹, Korol'kova S.B.¹, Slavnova E.N.², Voronova N.N.³

CELLULAR COMPOSITION RESEARCH OF SEROUS PLEURAL EFFUSION FLUIDS. CONCEPTUAL ISSUES OF PREANALYTICS

¹Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, 603163, Nizhny Novgorod, Russia;

²Moscow Research Oncological Institute named after P.A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia;

³FGAOU VO First MGPU named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

The purpose of this work was to show the effectiveness of the cytological method on a small number of observations, excluding all possible errors of the preanalytical stage. The paper presents several simple and easily reproducible algorithms for the cytological study of serous pleural effusions with small cellular content. On the example of 20 observations of the study of the cellular composition of serous exudates, a direct dependence of the research results on the preanalytical stage is shown. A complete study of effusion fluids in compliance with all stages of preanalytics and the use of modern methods of cytological diagnostics makes it possible to nullify the options for false-negative.

Key words: cytological diagnosis; sample preparation; serous effusions.

For correspondence: Slavnova E. N., Doctor of Medicine, Leading Researcher, Department of Oncocytology, P.A. Herzen Moscow Oncological Institute; e-mail: mnioict@mail.ru

For citation: Smetanina S.V., Uskova E.Yu., Khusiyanova A.A., Danyaeva M.B., Korol'kova S.B., Slavnova E.N., Voronova N.N. Cellular composition research of serous pleural effusion fluids. Conceptual issues of preanalytics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (2): 95-98 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-95-98>

Information about authors:

Smetanina S.V. <https://orcid.org/0000-0002-7000-5910>;
Uskova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1694-2321>;
Khusiyanova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-5212-9568>;
Danyaeva M.B. <https://orcid.org/0000-0002-9299-7754>;
Korol'kova S.B. <https://orcid.org/0000-0002-0910-5760>;
Slavnova E.N. <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Voronova N.N. <https://orcid.org/0000-0002-4481-9435>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 12.08.2020
Accepted 12.10.2020

Введение. Синдром плеврального выпота в структуре общей заболеваемости, по данным литературы, составляет 3,4-3,8%, это более 320 случаев на 100 тыс.

населения [1, 2], что соответствует примерно 0,5 млн человек в год по РФ [3]. По данным многих авторов, в 85% наблюдений накопление жидкости в серозных полостях

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, д-р мед. наук, вед.науч. сотр. отд-ния онкоцитологии МНИОИ им.П.А.Герцена, e-mail: mnioict@mail.ru

отмечается при неопухолевой патологии, в остальных 15% наблюдений причиной выпотов являются неопластические процессы [1, 2, 4, 5].

По данным литературы, у 7-15% больных с плевральными экссудатами диагноз злокачественной опухоли впервые устанавливается на основании изучения его клеточного состава, при этом локализация первичной опухоли, как правило, неизвестна [6 – 8].

Основным методом диагностики плеврального выпота являются лучевые методики [9,10]. Единственным методом морфологической диагностики выпотов был и остается цитологический [11 – 14]. Оценка чувствительности цитологического исследования плеврального выпота, по данным литературы, колеблется от 40% до 96% [6, 11, 12, 15 – 18] и напрямую зависит от ряда причин, в том числе, от преаналитического этапа пробоподготовки.

Анализируя данные литературы последних лет по разделу преаналитического этапа обработки выпотных жидкостей, необходимо отметить, что они, в основном, затрагивают вопросы современных методик нанесения материала (монослой с помощью цитоцентрифуги или технологии BD SurePath™ и т.п.) [18 – 20], клеточных блоков [12, 14, 17, 21 – 23]. При наличии данных методик в лаборатории, чувствительность и специфичность цитологического метода при исследовании выпотных жидкостей действительно высока, особенно в тех случаях, когда дополняется иммуноцитохимической диагностикой [12, 17, 23, 24].

Многие авторы оценивают все возможные методы обработки, стремясь найти лучшую методологию и комбинацию. Основываясь на этих исследованиях, рекомендуется использовать комбинацию методов традиционной цитологии в сочетании с методом концентрации для достижения максимальной чувствительности [17,23,25].

Протоколы обработки самой биологической жидкости от получения материала до его нанесения на предметное стекло отражены в руководствах первого десятилетия XXI века [26] и существенно не были изменены с 90-х годов. В интернет-поисковых системах, на сегодняшний день, есть рекомендации по:

- минимальному количеству необходимого материала для адекватности образца [12], что противоречит данным работы В.Ю. Сельчука и соавт. [27], в которой отмечено, что повышение частоты обнаружения опухолевых клеток осуществляется посредством повторных плевральных пункций и не зависит от количества исследуемого объема;
- использованию консервантов типа CytoLyt™, CytoRich™ и т.д. [25].

Необходимо отметить, что выпотные жидкости имеют более высокую концентрацию тромбина и фибриногена, чем кровь. Следовательно, под воздействием тромбина в экссудатах фибриноген образует сгустки фибрина, который имеет тенденцию захватывать диагностические/опухолевые клетки. В руководствах по клинической лабораторной диагностике есть рекомендации по добавлению гепарина или цитрата натрия в эвакуированную жидкость. Важно знать, что это не особенно препятствует свертыванию [28]. Врачи, занимающиеся цитологической диагностикой, должны быть надлежащим образом ознакомлены с возможными причинами ложноотрицательных результатов при выявлении онкопатологии при исследовании жидкостей в подобных ситуациях.

Ни в одной работе мы не встретили рекомендации по обработке серозных экссудатов с образовавшимся фибринозным сгустком. Исключение составляет информационно-методическое письмо для лаборантов и врачей

клинической лабораторной диагностики, врачей-клиницистов «Выпотные жидкости: получение и обработка материала для цитологического исследования», опубликованное в 2015 г. на сайте БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1» [29]. В данном письме рекомендуется тщательно распотрошить и отжать образовавшийся сгусток, а выделившуюся жидкость отцентрифугировать и исследовать по общей схеме, оставшиеся плотные нити и кусочки выбросить.

По опыту нашей работы повышение диагностической значимости результатов цитологического исследования определяется четким соблюдением преаналитического этапа, а именно:

- 1) доставка всей эвакуированной жидкости в лабораторию;
- 2) обработка всего доставленного материала в лабораторию, в том числе, образовавшихся фибринозных сгустков.

В нашей практике количество плевральных выпотов за 2019 г. составило 289 случаев, из них 36,6% ($n=106$) серозного характера. Наибольшие проблемы были связаны именно с обработкой серозных экссудатов больших объемов с низкой клеточностью, что составило 13,5% ($n=39$), особенно, в случаях образования фибринозных сгустков – 3,8 % ($n=11$).

Цель исследования – на небольшом количестве наблюдений показать эффективность результатов исследования при минимизации ошибок на преаналитическом этапе, применяя все возможные методы пробоподготовки, соблюдая основное правило обработки экссудатов: обработка всей эвакуированной жидкости.

Материал и методы. Проведено 20 исследований плевритов серозного характера пациентов в возрасте 36-73 лет, 7 из которых в поликлинику ГБУЗ НО «НОКОД» обратились впервые, 13 в анамнезе имели карциному различной локализации.

Клеточный состав жидкости исследовали цитологическим методом, применяя технику:

- 1) монослойных препаратов на цитоцентрифуге Cellspin-II с режимом 2000 об/мин в течение 10 мин по стандартной методике;
- 2) клеточного обогащения путем центрифугирования на лабораторной центрифуге Elmi CM-6M по 5-8 пробирок $V=10$ мл, объединяя полученные осадки после удаления надосадочной жидкости;
- 3) клеточного блока на основе желатина;
- 4) иммуноцитохимии.

Получившиеся монослойные препараты, в том числе, после клеточного обогащения, окрашивали экспресс красителем LEUKODIF 200 производства Erba Lachema (Чехия), препараты клеточного блока окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуноцитохимическое исследование проводили на иммуногистостейнере Roche Ventana, используя панель антител фирмы CellMarque с учетом клинических данных. Готовые препараты исследовали на световом микроскопе при увеличениях $\times 10$, 20 и масляной иммерсии 100.

Этапы диагностического поиска у пациентов с синдромом скопления жидкости в плевральной полости серозного характера. На первом этапе проводили цитологическое исследование жидкости на препаратах, приготовленных на цитоцентрифуге Cellspin-II с режимом 2000 об/мин в течение 10 мин по стандартной методике. Получившиеся монослойные препараты окрашивали экспресс красителем.

На втором этапе, в случае отрицательного результата на следующие сутки после отстаивания, проводили забор материала пипеткой со дна емкости, в которой была доставлена жидкость. Весь забранный со дна материал центрифугировали, при необходимости применяли клеточное обогащение путем многократного центрифугирования каждой порции, объединяя полученные осадки.

На третьем этапе, в случае отрицательного результата и наличия фибринозного сгустка, проводили исследование сгустка после заключения его в клеточный блок.

Результаты. При цитологическом исследовании плевритов серозного характера после первого центрифугирования обнаружены комплексы карциномы только у 55% пациентов ($n=11$). В 30% ($n=6$) наблюдений метастатический характер экссудата был подтвержден после клеточного обогащения. В 15% ($n=3$) наблюдений наличие опухолевых клеток было обнаружено только в фибринозном сгустке.

У 13 пациентов, имеющих в анамнезе карциному различной локализации, наличие прогрессирования заболевания подтверждалось клиническими данными. В случаях первичных пациентов метастатический характер плеврита был подтвержден обнаружением первичного очага дополнительными инструментальными данными и гистологическим заключением операционного материала.

Особого внимания заслуживает случай первичного обращения женщины в возрасте 70 лет с плевритом неясной этиологии, у которой неоднократно проводилось исследование жидкости в медицинских организациях

Нижегородской области. Эвакуированный плеврит в условиях ГБУЗ НО «НОКОД» был полностью исследован, а именно фибринозный сгусток, где и удалось обнаружить комплексы карциномы (рис. 1). Учитывая клинические данные, ограниченное количество материала клеточного блока, было проведено иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ) с антителами PAX8, WT1, эстрогенов, Cdx2, CK20 (рис. 2, 3, 4, 5). По результатам исследования определен первичный очаг в яичнике.

Обсуждение. Наличие в экссудате опухолевых клеток чаще всего свидетельствует о распространенном опухолевом процессе. В большинстве таких случаев концентрация клеток в жидкости бывает высокой. Однако иногда в экссудатах серозного характера их может быть мало. Для получения достаточной их концентрации необходимо исследовать весь объем полученной жидкости, производить ее отстаивание, центрифугирование придонного слоя жидкости с большим количеством пробирок, что позволяет увеличить количество уверенных цитологических заключений о наличии злокачественного процесса, при этом своевременное назначение противоопухолевого лечения может быть эффективным, а в случае необходимости проведения молекулярно-генетического исследования данного материала будет достаточно [14].

При клиническом проявлении первичного очага наличие в цитологических препаратах небольшого количества опухолевых клеток может быть достаточным для подтверждения метастазирования. Проведение ИЦХ исследований в случаях метастазирования опухолей неясной первичной локализации, в том числе, синхронных или метакронных первично-множественных опухолей, требует достаточного количества клеток, что достигается клеточным обогащением и обработкой всех образовавшихся фибринозных сгустков.

Исследования показали возможные причины ложноотрицательных результатов:

- при обработке в лаборатории только части доставленной жидкости;



Рис. 1. Емкость с плевральной жидкостью серозного характера с наличием фибринозного сгустка.

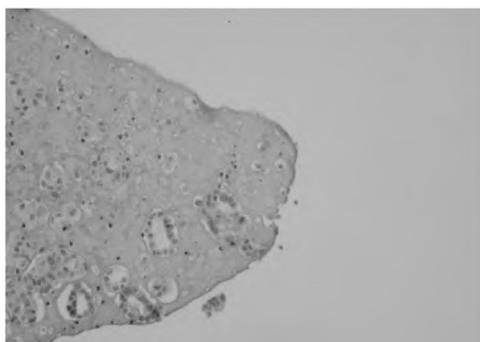


Рис. 2. Срез клеточного блока, сформированного из фибринозного сгустка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 20$.

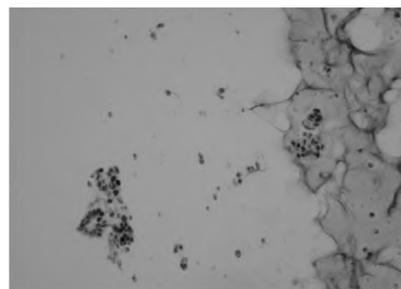


Рис. 3. ИЦХ. Положительная реакция с антителами Pax8. Ув. $\times 20$.

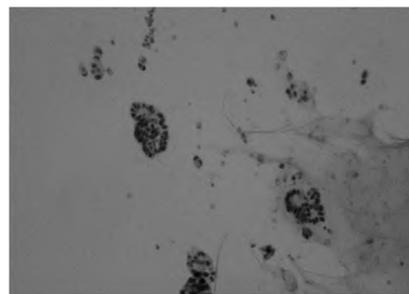


Рис. 4. ИЦХ. Положительная реакция с антителами WT 1. Ув. $\times 20$.

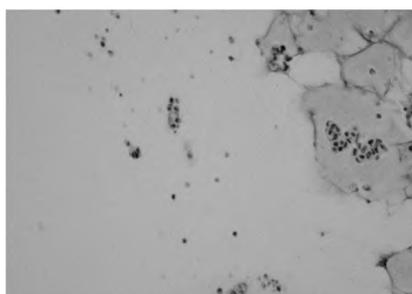


Рис. 5. ИЦХ. Положительная реакция с антителами эстрогенов. Ув. х20.

• при отсутствии возможности изучения клеточного состава фибринозного сгустка.

Заключение. На примере 20 наблюдений изучения клеточного состава серозных экссудатов показана прямая зависимость результатов исследования от преаналитического этапа. Полное исследование выпотных жидкостей с соблюдением всех этапов преаналитики и применением современных методов цитологической диагностики позволяет свести на нет варианты ложноотрицательных заключений.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4, 5, 7-10, 12-25, 28 см. REFERENCES)

3. Чучалин А.Г. Пульмонология. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2016.
6. Григорук О.Г. Цитологическая дифференциальная диагностика плевральных выпотов. Материалы XXVIII Национального конгресса по болезням органов дыхания. М.; 2018.
11. Волченко Н.Н., Борисова О.В. Диагностика злокачественных опухолей по серозным экссудатам. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.
26. Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.И. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. М.- Тверь:Триада; 2006.
27. Сельчук В.Ю., Бычков М.Б., Киселевский М.В. Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты. М: Практическая медицина; 2011.
29. Шевелина Е.Е. Выпотные жидкости: получение и обработка материала для цитологического исследования [Электронный ресурс]. UPL:<https://hospital-vrn.ru/specialistam/publikacii/vypotnye-zhidkosti-poluchenie-i-obrabotka-materiala-dlya-citologicheskogo-issledovaniya/> (дата обращения 14.04.2020).

REFERENCES

1. Incekara F.O., Tikici S.K., Nomenoglu H. Pleural Effusions. *Insights in Chest Diseases*. 2018;1:1-7. doi: 10.21767/2577-0578.10040.
2. Feller-Kopman D., Light R. Pleural Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2018; 378:740-51. doi:10.1056/NEJMra1403503.
3. Chuchalin A.G. Pulmonology [Pul'monologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
4. Walker S.P., Morley A.J., Staddon L., De Fonseka D., Arnold D.T., Medford A.R.L. et al. Nonmalignant Pleural Effusions: A Prospective Study of 356 Consecutive Unselected Patients. *Chest*. 2017; 151(5):1099-1105. doi.org/10.1016/j.chest.2016.12.014.
5. Porcel J.M., Light R.W. Pleural effusions. *Dis Mon*. 2013; 59: 29–57. doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.11.002.
6. Grigoruk O.G. Cytological differential diagnosis of pleural effusions. *Materialy XXVIII Natsional'nogo kongressa po boleznyam organov dyhaniya*. Moscow; 2018. (in Russian)
7. Awadallah S.F., Bowling M.R., Sharma N., Mohan A. Malignant pleural effusion and cancer of unknown primary site: a review of literature. *Ann. Transl. Med*. 2019;7(15): 353. doi:10.21037/atm.2019.06.33.
8. Agrawal A., Tandon R., Singh L., Chawla A. Clinico- pathological profile and course of malignant pleural effusion in a tertiary care teaching hospital in western U.P. with special reference to lung cancer. *Lung India*. 2015;32(4): 326-30. doi:10.4103/0970-2113.159551.

9. Reuter S., Naur T. M. H., Clementsen P. F., Bodtger U. The value of computed tomography in discriminating malignant from non-malignant causes of unresolved unilateral pleural effusions: a systematic review. *European Clinical Respiratory Journal*. 2019;6(1):1-8. doi.org/10.1080/20018525.2019.1565803.
10. Svigals P.Z., Chopra A., Ravenel J.G., Nietert P.J., Huggins J.T. The accuracy of pleural ultrasonography in diagnosing complicated parapneumonic pleural effusions. *Thorax*. 2017;72(1):94-5. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208904.
11. Volchenko N.N., Borisova O.V. Diagnosis of malignant tumors by serous exudates. [Diagnostika zlokachestvennikh opuholey po seroznym eksudatam.] Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
12. Arnold D.A., De Fonseka D., Perry S., Morley A., Harvey J.E., Medford A., et al. Investigating unilateral pleural effusions: the role of cytology. *Eur. Respir. J*. 2018; 52(5):1-9. doi:10.1183/13993003.01254-2018.
13. Agrawal A., Tandon R., Singh L., Chawla A. Clinico- pathological profile and course of malignant pleural effusion in a tertiary care teaching hospital in western U.P. with special reference to lung cancer. *Lung India*. 2015;32(4):326-330. doi:10.4103/0970-2113.159551.
14. Engels M., Michael C., Dobra K., Hjerpe A., Fassina A., Firat P. Management of cytological material, pre-analytical procedures and biobanking in effusion cytopathology. *Cytopathology*. 2019;30(1): 31-8. doi:10.1111/cyt.12654.
15. Porcel J.M., Azzopardi M., Koegelenberg C.F., Maldonado F., Rahman N.M. The diagnosis of pleural effusions. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2015; 9(6): 801-15. doi: 10.1586/17476348.2015.1098535.
16. Brun C., Gay P., Cottier M., Karpathiou G., Patoir A., Tiff O., et al. Comparison of cytology, chest computed and positron emission tomography findings in malignant pleural effusion from lung cancer. *J. Thorac. Dis*. 2018;10(12):6903-6911. doi:10.21037/jtd.2018.11.127.
17. Woo C.G., Son S.M., Han H.S., Lee K.H., Choe K.H., An J.Y. et al. Diagnostic benefits of the combined use of liquid-based cytology, cell block, and carcinoembryonic antigen immunocytochemistry in malignant pleural effusion. *J Thorac Dis*. 2018;10(8):4931-4939. doi:10.21037/jtd.2018.07.139.
18. Ferreiro L., Toubes M.E., San José M.E., Suárez-Antelo J., Golpe A., Valdés L. Advances in pleural effusion diagnostics. *Expert Rev. Respir. Med*. 2020;14(1):51-66. doi:10.1080/17476348.2020.1684266.
19. Jangsiriwitayakorn P., Patarapadungkit N., Chaiwiriyaikul S., Thongbor R., Sirivech P., Nititarakul L. Comparative Analysis of Modified Liquid-Based Cytology and CytoRich Red Preparation in Assessment of Serous Effusion for Cancer Diagnosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2018;19(6):1571-5. doi:10.22034/APJCP.2018.19.6.1571.
20. Hafez N.H., Shaaban H.M. SurePath liquid-based cytology versus conventional smears for interpretation of serous effusion fluids : a study of 104 cases. *Egyptian Journal of Pathology*. 2018; 38(1):154–61. doi: 10.1097/01.XEJ.0000542239.29506.40.
21. Gojiya P., Goswami A.P., & Shah S.N. Cytological Study of Pleural Effusions and its Utility in Clinical Approach. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*. 2017; 4(4):442-5. doi: 10.21276/APALM.1277.
22. da Cunha Santos G., Saieg M.A. Preanalytic specimen triage: Smears, cell blocks, cytopsin preparations, transport media, and cytobanking. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(S6):455-64. doi:10.1002/ency.21850.
23. Wang X., Cheng F., Zhong D., Zhang L. Clinical Value of Cell Block in the Diagnosis of Malignant Pleural Effusion. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2017; 20(6): 395-401. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2017.06.05.
24. Kalogeraki A., Tamiolakis D., Datseri G., Lazopoulos G., Karvelas-Kalogerakis M., Segredakis J., et al. Pleural effusion cytology due to malignancy. A combined cytomorphological-immunocytochemical study of 500 cases. *Rev. Port. Pneumol*. 2016; 22(5): 290-1. doi:10.1016/j.rppnen.2016.03.007.
25. Michael C.W., Davidson B. Preanalytical issues in effusion cytology. *Pleura Peritoneum*. 2016; 1(1):45-56. doi:10.1515/pp-2016-0001.
26. Dolgov V.V., Shabalova I.P., Mironova I.I. Exudative liquids. Laboratory research. [Vypotnye zhidkosti. Laboratornoe issledovanie.]. Moscow-Tver': Triada; 2006. (in Russian)
27. Selchuk V.Yu. Bichkov M.B. Kiselevskii M.V. Tumor serositis: pleurisy, ascites, pericarditis. [Opuholevie seroziti, plevriti, asciti perikarditi.]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2011. (in Russian)
28. Gill G.W. Cytopreparation: principles and practice. London: Springer; 2013. doi:10.1007/978-1-4614-4933-1.
29. Shevelina E.E. Exudative liquids: obtaining and processing material for cytological examination. [Elektronnyy resurs]. UPL:<https://hospital-vrn.ru/specialistam/publikacii/vypotnye-zhidkosti-poluchenie-i-obrabotka-materiala-dlya-citologicheskogo-issledovaniya/> (accessed 14.04.2020). (in Russian)

Поступила 12.08.20
Принята к печати 12.10.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Абдрахманова Е.Р.^{1,2}, Власова Н.В.¹, Масыгутова Л.М.^{1,2}, Гизатуллина Л.Г.¹, Гимранова Г.Г.^{1,2}, Чудновец Г.М.¹, Садретдинова Г.Р.¹

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВРЕДНЫХ ФАКТОРОВ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

¹ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, Россия, Уфа;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

На современном этапе развития общества, актуальными остаются вопросы сохранения и укрепления важнейшей производительной силы, определяющей экономическое развитие и национальную безопасность страны. Одной из базовых отраслей промышленности России, формирующей до 20% ВВП, является металлургия. Данное исследование посвящено оценке состояния слизистой оболочки полости рта у работников этой отрасли.

Цель работы – оценить образование микроядер в буккальных клетках в качестве раннего биомаркера нарушений здоровья в результате профессионального воздействия факторов производства металлургического комбината. Проведены гигиенические и клинико-лабораторные исследования у работников металлургического комбината республики Башкортостан. Выполнены цитологические исследования буккального эпителия. Статистическая обработка результатов проведена при помощи прикладных программ IBM, SPSS, Statistics, Microsoft Excel. Общая оценка условий труда, согласно критериям Р.2.2.2006-05 для работников металлургического комбината, установлена 3.2-3.3. Анализ буккального эпителия выявил встречаемость клеток с цитогенетическими нарушениями у рабочих основной группы. Клетки с ядрами атипичной формы идентифицированы у работников при длительности контакта с неблагоприятными факторами производства более десяти лет. Выявлены признаки деструкции ядра, характеризующие повышение апоптической активности у рабочих с продолжительным временем контакта. Исследования выявили, что при стаже работы более 10 лет происходит преобладание процессов пролиферации над процессами дифференцировки. Полученные результаты могут быть использованы в качестве диагностических методов, расширяющих перспективы выявления предпатологических и патологических состояний.

Ключевые слова: цитотоксические эффекты; металлургическое производство; буккальный эпителий.

Для цитирования: Абдрахманова Е.Р., Власова Н.В., Масыгутова Л.М., Гизатуллина Л.Г., Гимранова Г.Г., Чудновец Г.М., Садретдинова Г.Р. Цитогенетические особенности буккального эпителия при воздействии вредных факторов металлургического производства. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(2): 99-103. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-99-103>

Abdrakhmanova E.R.^{1,2}, Vlasova N.V.¹, Masyagutova L.M.^{1,2}, Gizatullina L.G.¹, Gimranova G.G.¹, Chudnovets G.M.^{1,2}, Sadrtidinova G.R.¹

CYTOGENETIC FEATURES OF BUCCAL EPITHELIUM UNDER EXPOSURE TO HARMFUL FACTORS OF METALLURGICAL PRODUCTION

¹Federal Budgetary Institution of Science "Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology", 450106, Ufa, Russia;

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 450008, Ufa, Russia

At the present stage of development of society, the issues of preserving and strengthening the most important productive force that determine the economic development and national security of the country remain relevant. Metallurgy is one of the basic industries in Russia, which forms up to 20% of GDP. This study assesses the condition of the oral mucosa in workers in the industry. To evaluate the formation of micronuclei in buccal cells as an early biomarker of health disorders as a result of occupational exposure to production factors of a metallurgical plant. Hygienic and clinical laboratory tests were carried out for workers of the metallurgical plant of the Republic of Bashkortostan. Cytological studies of the buccal epithelium were performed. Statistical processing of the results was carried out using the applied programs IBM, SPSS, Statistics, Microsoft Excel. The general assessment of working conditions in accordance with the criteria of R.2.2.2006-05 for workers of the metallurgical plant was established as 3.2-3.3. Analysis of the buccal epithelium revealed the occurrence of cells with cytogenetic disorders in the workers of the main group. Cells with atypical nuclei were identified in workers with a duration of contact with unfavorable factors of production for more than ten years. Signs of nuclear destruction were revealed, characterizing an increase in apoptotic activity in workers with prolonged contact times. Studies have shown that with more than 10 years of work experience, proliferation processes prevail over differentiation processes.

The results obtained can be used as diagnostic methods that expand the prospects for identifying pre-pathological and pathological conditions.

Key words: cytotoxic effects; metallurgical production; buccal epithelium.

For citation: Abdrakhmanova E.R., Vlasova N.V., Masyagutova L.M., Gizatullina L.G., Gimranova G.G., Chudnovets G.M., Sadrtidinova G.R. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 99-103 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-99-103>

For correspondence *Abdrakhmanova Elena Rafilovna*, Candidate of Medical Sciences, Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology; e-mail: elenara@inbox.ru

Information about authors:

Abdrakhmanova E.R. <https://orcid.org/0000-0003-2763-1358>;
Vlasova N.V. <https://orcid.org/0000-0003-3926-0937>;
Masyagutova L.M. <https://orcid.org/0000-0003-0195-8862>;
Gizatullina L.G. <https://orcid.org/0000-0001-6593-2704>;
Gimranova G.G. <https://orcid.org/0000-0002-8476-1223>;
Chudnovets G.M. <https://orcid.org/0000-0002-5807-2037>;
Sadrtidinova G.R. <https://orcid.org/0000-0002-1530-5312>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 28.10.2020
Accepted 02.11.2020

Введение. На современном этапе развития общества, актуальными остаются вопросы сохранения и укрепления важнейшей производительной силы, определяющей экономическое развитие и национальную безопасность страны, а именно ее трудовых ресурсов. Одной из базовых отраслей промышленности России, формирующей до 20% ВВП, является металлургия. Россия на мировом рынке входит в число ведущих экспортеров цветных и, особенно черных металлов [1].

Металлургическое производство относится к предприятиям полного цикла, что предполагает использование огромного числа технологических процессов, различных температурных режимов, связующих и катализаторных материалов. Несмотря на проводимую модернизацию отрасли, существенному снижению доли операций, выполняемых вручную и преобладанию непрерывных технологических процессов, условия труда ряда профессий не исключают воздействия комплекса вредных производственных факторов: нагревающий микроклимат, сложные аэрозоли металлов, а также огнеопасные и взрывоопасные, ядовитые вещества, шум, вибрация, воздействие электромагнитного излучения [2]. Несомненно, указанные факторы, воздействующие на работников в процессе трудовой деятельности, способны явиться причиной развития нарушений здоровья. Исследования отечественных авторов подтвердили значительную роль вредных факторов металлургического производства в формировании патологических состояний различных органов и систем. [3, 4, 5].

В литературе последних лет достаточно работ, посвященных анализу различных маркеров ранней, до-нозологической диагностике при воздействии факторов производства [6,7]. Одним из тестов, позволяющих оценить заболевания и процессы, связанные с индукцией повреждения ДНК, в качестве эффективного биомаркера рассматривается микроядерный тест буккального эпителия [8].

Актуальность проведенного исследования определяется выявлением предпатологических и патологических состояний, позволяющих диагностировать степень тяжести, прогнозировать течение профессиональных и профессионально обусловленных заболеваний. Кроме того, минимальная инвазивность сбора клеток, низкая стоимость, простота хранения и подготовка препаратов делают микроядерный тест буккального эпителия идеальным выбором для молекулярно-эпидемиологических исследований при воздействии различных факторов производства [9 – 11].

Цель работы – оценить образование микроядер в буккальных клетках в качестве раннего биомаркера на-

рушений здоровья в результате профессионального воздействия факторов металлургического производства.

Материал и методы. Для достижения поставленной цели и решения задач настоящей работы на одном из предприятий металлургического комбината проведены цитологические исследования буккального эпителия, взятых у работников, работающих в основных цехах, сгруппированных по технологическому принципу. В основную группу вошли работники, профессиональная деятельность которых не исключает воздействие на организм факторов производственной среды ($n=114$), во вторую группу вошли работники вспомогательных подразделений, не имеющие контакта с промышленными веществами ($n=50$). Основная группа была подразделена по признаку времени контакта с промышленными аэрозолями на 2 подгруппы: с малым временем контакта (до 10 лет) и с продолжительным временем контакта (более 10 лет). Средний возраст обследованных составил $48,35 \pm 8,74$ лет, общий стаж – $18,54 \pm 9,72$ лет. Все группы сопоставимы по полу и возрасту и числу курящих сотрудников.

Отбор проб проведен в условиях углубленного обследования работников, госпитализированных в стационар клиники ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» для уточнения диагноза и решения экспертных вопросов профпригодности. Лабораторные исследования осуществлены с информированного согласия обследуемых, в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации 2000 года.

Материалом исследования служили образцы многослойного плоского неороговевающего эпителия слизистой оболочки полости рта (буккального эпителия) работников. Перед взятием образцов обследуемые тщательно ополаскивали рот стерильным физиологическим раствором. Эпителиальные клетки соскабливали со слизистой щеки стерильным шпателем и наносили на предметное стекло. Образцы высушивали, окрашивали по методу Паппенгейма-Крюкова. Препараты анализировали под микроскопом Микмед-5 (Россия) при увеличении 10×40 ; 10×100 . Микроядра идентифицировали согласно стандарту, описанному в работе Tolbert P.E. [12]. Так же, учитывались двуядерные клетки, кариопикноз, кариорексис, кариолизис.

Анализ частоты встречаемости клеточных аномалий проводили на отдельно лежащих неповрежденных и расправленных клетках с подсчетом не менее 1000 клеток в каждом препарате, определяли отношение количества клеток с микроядрами и другими признаками ядерной дегенерации к общему числу ядросодержащих клеток (%). Из анализа исключали клетки, на поверхности которых имеются многочисленные микроорганизмы.

Для оценки гигиенических параметров условий труда проведен анализ санитарно-гигиенических характеристик, предоставленных предприятием при установлении связи заболевания с профессией. Всего проанализировано 18 характеристик, из них по профессиям: калильщик – 4 человека (22%); прессовщик лома и отходов металла – 3 человека (16,6%); машинист по навивке канатов – 3 человека (16,6%); автоматчик холодно-высадочных автоматов – 3 человека (16,6%); огнеупорщик, занятый на футеровке термических печей – 5 человек (27,7%).

Статистическая обработка результатов проведена при помощи прикладных программ IBM SPSS Statistics, Microsoft Excel. Проверку на нормальность распределения количественных показателей в группах проводили по критериям Колмогорова-Смирнова. Для описания количественных данных использовались следующие расчетные показатели: определение средних величин (M), стандартного отклонения (δ), стандартной ошибки средней (m). Для сравнения двух групп по выраженности количественных признаков применяли критерий Стьюдента. В процессе анализа вывод о статистической значимости принимался при $p < 0,05$.

Результаты. Производства металлургического предприятия имеют в своем составе доменные, марте-новские и прокатные цеха. В процессе работы в этих цехах происходят существенные изменения внешней среды: резкое повышение температуры воздуха в теплый

период года и снижение ее в холодный, мощное излучение от нагретого и расплавленного металла, выделение на некоторых участках значительных количеств окиси углерода, запыленность воздуха на подготовительных процессах и пр.

Общая гигиеническая оценка условий труда, работников металлургического комбината согласно критериям Р.2.2.2006-05 соответствует вредному 3 классу 2-3 степени (3.2-3.3) [13] (см. таблицу).

Встречаемость клеток с цитогенетическими нарушениями у рабочих, контактирующих с вредным производственным фактором, выше, чем в контрольной группе, не имеющих контакта с вредным производственным фактором (рис. 1).

Микроядра являются обособленной частью генетического материала за пределами основного ядра, которая представлена либо фрагментом хромосомы, образовавшимся в результате повреждения ДНК, либо одной или несколькими целыми хромосомами, отставшими в анафазе и не вошедшими в основное ядро. Повышение частоты клеток с микроядрами в ротовой полости исследователи относят к наиболее ранним проявлениям нарушения цитогенетического гомеостаза и снижения адаптационного резерва организма [14]. Клетки с ядрами атипичной формы идентифицированы у работников при длительности контакта с неблагоприятными факторами производства более десяти лет и могут быть обусловлены неправильным расположением хроматина в ядре, а

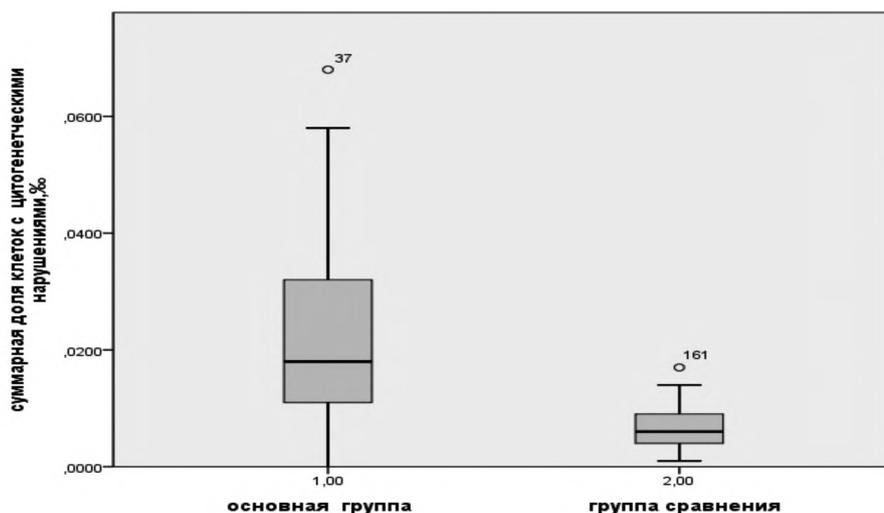


Рис. 1. Встречаемость клеток с цитогенетическими нарушениями.

Классификация условий труда работников металлургического комбината по степени вредности и опасности

Профессия	Вредные факторы, класс условий труда					
	Шум	Пыль растительного и животного происхождения	Химические вещества (най-ти в СГХ)	Тяжесть труда	Микроклимат производственных помещений	Общая оценка условий труда
Калильщик	3.1	3.1	3.1	3.2	3.1	3.3
Прессовщик лома и отходов металла	3.1	3.2	3.2	3.2	3.1	3.3
Машинист по навивке канатов	3.1	3.1	3.1	3.1-3.2	3.1	3.2
Автоматчик холодно-высадочных автоматов	3.1	3.2	3.2	3.2	3.2	3.3
Огнеупорщик, занятый на футеровке термических печей	3.1	3.2	3.1	3.1-3.2	3.1	3.2-3.3

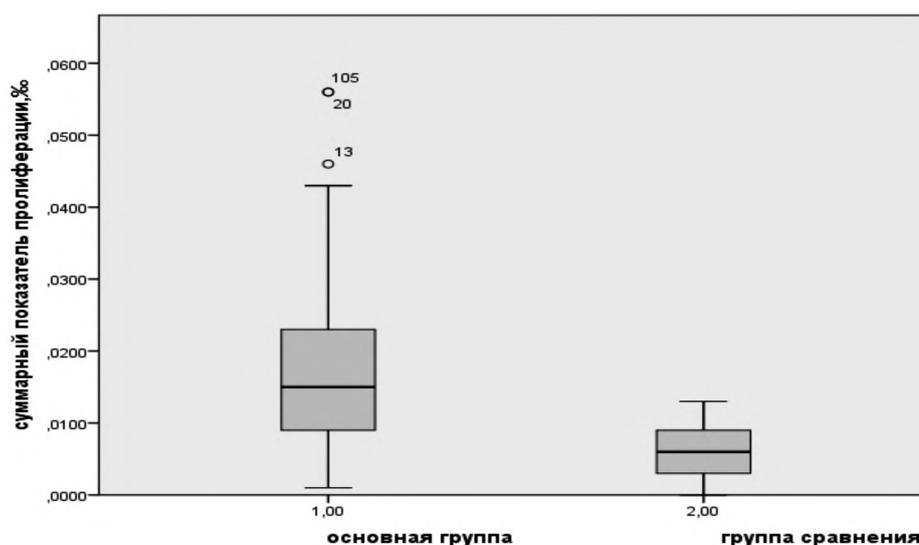


Рис. 2. Суммарный показатель пролиферации у работников металлургического производства.

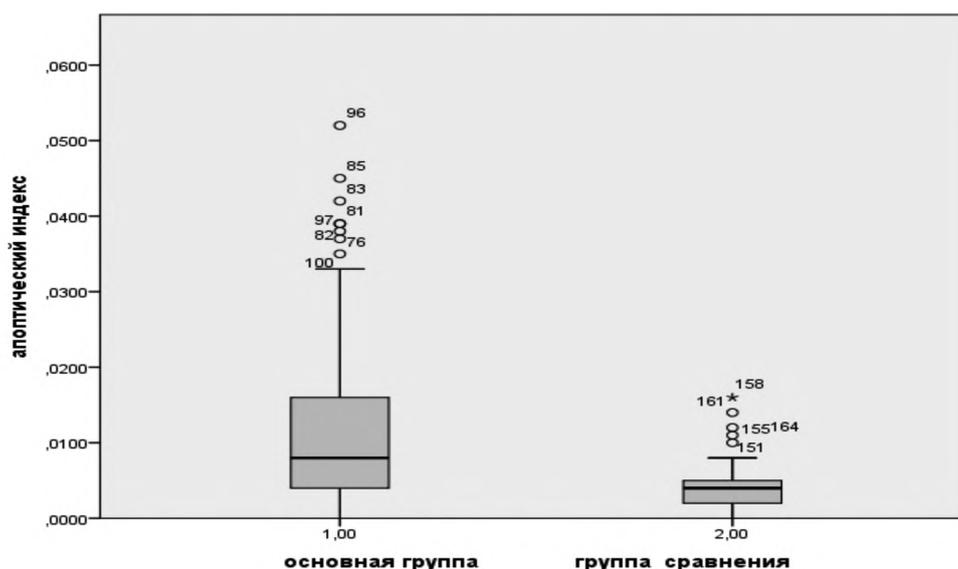


Рис. 3. Апоптическая активность клеток буккального эпителия у работников металлургического производства.

также смещением положения интерфазных хромосом в результате хромосомных aberrаций в митозе или нарушения веретена деления и анеуплоидии [15].

Схожая картина наблюдается и для показателей нарушения пролиферации: частоты встречаемости двуядерных клеток и клеток с круговой насечкой (рис. 2).

Обсуждение. Сравнительный анализ показателей пролиферации клеток буккальных эпителиоцитов выявил, что частота многоядерных клеток у рабочих со стажем до 10 лет в несколько раз меньше относительно данного показателя у рабочих со стажем более 10 лет. Также обращает на себя внимание признаки деструкции ядра, характеризующие повышение апоптической активности у рабочих с продолжительным временем контакта.

Высокий пролиферативный потенциал и апоптическая активность клеток являются предпосылками наличия скрытых механизмов нарушения регенерации, компенсаторного характера (рис. 3). Нарушение баланса

между клеточной пролиферацией и апоптозом влияет на эффективность регенераторных процессов при повреждении и приспособлении к патологическим условиям организма.

Анализ кариологических показателей позволил подтвердить цитотоксическое действие промышленных аэрозолей. Исследования выявили, что при стаже работы более 10 лет происходит преобладание процессов пролиферации над процессами дифференцировки. При профессиональном стаже свыше 20 лет в организме, работающих имеют место адаптивные процессы.

Таким образом, показана связь между частотой встречаемости цитогенетических показателей и показателей деструкции ядра с длительностью контакта с вредным производственным фактором. Полученные результаты могут быть использованы в качестве диагностических методов, расширяющих перспективы выявления предпатологических и патологических состояний; для раз-

работки алгоритма скрининговых обследований работников, а также в качестве ранних индикаторов нарушений здоровья в условиях воздействия вредных факторов производственной среды.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8-12, 15 см. REFERENCES)

1. Аналитический бюллетень /Металлургия: Тенденции и прогнозы. Доступно на сайте http://vid1.rian.ru/ig/ratings/metallurgy_demo.pdf.
2. Симонова Н.И., Кондрова Н.С. Качество и эффективность медицинской помощи, оказываемой работникам, занятым в условиях труда, не отвечающих санитарно-гигиеническим требованиям. *Медицина труда и промышленная экология*. 2010; 6: 1-7.
3. Электронный ресурс. Доступно на сайте <http://www.mechel.ru/sector/steel/bmk/>
4. Зайцева Н.В., Шур П.З., Клименко А.Р., Устинова О.Ю., Лебедева-Несевря Н.А., Костарев В.Г. Гигиеническая оценка факторов риска на производствах порошковой металлургии. *Медицина труда и промышленная экология*. 2011; 11: 16-9.
5. Базарова Е.Л., Федорук А.А., Рослая Н.А., Ошеров И.С., Бабенко А.Г. Опыт оценки профессионального риска, связанного с воздействием промышленных аэрозолей, в условиях модернизации металлургического предприятия. *Здоровье населения и среда обитания*. 2019; 310 (1):38-45.
6. Садртдинова Г.Р., Масыгутова Л.М., Власова Н.В., Чудновец Г.М., Хайруллин Р.У. Гематологические исследования при диагностике ранних нарушений здоровья у работников при наличии хрома в воздухе рабочей зоны. *Санитарный врач*. 2019; 11: 40-4.
7. Масыгутова Л.М., Бакиров А.Б., Симонова Н.И., Гизатуллина Л.Г. Лабораторное обоснование этапности и объема профилактических мероприятий при работе в условиях микробного загрязнения воздуха рабочей зоны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (9): 584-7.
13. Руководство Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда» М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2005.
14. Дерюгина А.В., Ивашенко М.Н., Игнатъев П.С., Самоделькин А.Г., Белов А.А., Гушин В.А. Оценка генотоксических эффектов буккального эпителия при нарушении адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 290-2. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-290-292.
3. Electronic resource. Available at <http://www.mechel.ru/sector/steel/bmk/> (in Russian)
4. Zaitseva N.V., Shur P.Z., Klimenko A.R., Ustinova O.Yu., Lebedeva-Nesevrya N.A., Kostarev V.G. Hygienic assessment of risk factors in the production of powder metallurgy. *Meditsina truda I promyshlennaya ekologiya*. 2011; 11: 16-9. (in Russian)
5. Bazarova E.L., Fedoruk A.A., Roslaya N.A., Oshero I.S., Babenko A.G. Experience in assessing professional risk associated with exposure to industrial aerosols in the context of modernization of a metallurgical enterprise. *Zdorove naseleniya I sreda obitaniya*. 2019;1 (310): 38-45. (in Russian)
6. Sadrtidinova G.R., Masyagutova L.M., Vlasova N.V., Chudnovets G.M., Khairullin R.U. Hematological examinations in the diagnosis of early health disorders in workers in the presence of chromium in the air of the working area. *Sanitarnyi vrach*. 2019; 11: 40-4. (in Russian)
7. Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Simonova N.I., Gizatullina L.G. Laboratory substantiation of the stages and scope of preventive measures when working in conditions of microbial air pollution in the working area. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(9): 584-7. (in Russian)
8. Hopf N.B., Bolognesi C, Danuser B, Wild P. Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: A systematic review and meta-analysis. *Mutat. Res*. 2019 Jul-Sep; 781:11-29. doi: 10.1016/j.mrrev.2019. 02.006.
9. Fenech M., Holland N., Zeiger E., Chang W.P., Burgaz S. et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells – past, present and future. *Mutagenesis*. 2011 Jan; 26(1):239-45. doi: 10.1093/mutage/geq051.
10. Dhillon V.S., Aslam M., Husain S.A. The contribution of genetic and epigenetic changes in granulosa cell tumors of ovarian origin. *Clin. Cancer Res*. 2004 Aug 15; 10(16): 5537-45.
11. Krishna L., Sampson U., Annamala P.T., Unni K.M., Binukumar B., George A., Sreedharan R. Genomic Instability in Exfoliated Buccal Cells among Cement Warehouse Workers. *Int. J. Occup. Environ. Med*. 2020 Jan; 11(1): 33-40. doi: 10.15171/ijjem.2020. 1744.
12. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res*. 1992 Feb; 271(1): 69-77.
13. Manual P2.2.2006-05 “Guidelines for the hygienic assessment of factors working environment and labor process. Criteria and classification of working conditions” Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2005. (in Russian)
14. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. The evaluation of genotoxic effects in buccal epithelium under disorders of adaption status of organism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(5): 290-2. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-290-292. (in Russian)
15. Aguiar Torres L., Dos Santos Rodrigues A., Linhares D., Camarinho R., Nunes Páscoa Soares Rego Z.M., Ventura Garcia P. Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutat. Res. Genet.Toxicol. Environ Mutagen*. 2019. Feb; 838:54-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.

Поступила 28.10.20
Принята к печати 02.11.20

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Тепленький М.П., Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С., Гасанова А.Г.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И ГЕМОГРАММЫ У ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Травматологии и ортопедии» имени академика Г.А. Илизарова Минздрава РФ, 640014, г. Курган, Россия

Рост числа пациентов с патологиями тазобедренного сустава среди детей разного возраста делают диагностику и лечение этих заболеваний одной из самых фактически существующих проблем в современной ортопедии. Цель работы – определение особенностей системы перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты и показателей гемограммы у детей с разными формами патологии тазобедренного сустава. Проанализированы результаты предоперационного обследования 47 пациентов в возрасте 6-15 лет (средний возраст 10,3 лет), находившихся на лечении в клинике «ФГБУ НМИЦ «ТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ. Мальчиков было 25, девочек – 20. С учетом нозологии больные были распределены на пять групп. Диагноз установлен на основании клинико-рентгенологического обследования. I группу составили 8 пациентов мужского пола с болезнью Пертеса II стадии (средний возраст 8,75±1,63). Во II группу отнесены 16 пациентов (8 мальчиков, 7 девочек) с болезнью Пертеса III стадии. (средний возраст 11,80±0,89). В III группу включены 12 пациентов (6 мальчиков, 6 девочек) с асептическим некрозом головки бедренной кости (средний возраст 14,7±2,35). IV группу составили 4 пациента (1 мальчик, 3 девочки) с эпифизарной дисплазией. (средний возраст 10,25±1,36). В V группу отнесены 7 пациентов с дисплазией тазобедренного сустава, осложненной асептическим некрозом головки бедренной кости (средний возраст 8,33±2,11). За норму взяты данные, которые были получены после обследования 10 здоровых подростков мужского пола (возраст 13-14) и 5 подростков женского пола (возраст 8-14 лет). Изменения в показателях перекисного окисления липидов и активности антиоксидантов имеют однонаправленный характер при разных формах патологии тазобедренных суставов у детей, а содержание продуктов перекисидации достоверно коррелирует с показателями гемограммы при остеохондропатии II стадии и при осложненной дисплазии тазобедренного сустава. В комплексе диагностических мероприятий у детей с дистрофическими поражениями тазобедренного сустава для уточнения характера и стадии патологического процесса в качестве дополнительных критериев можно применять показатели гемограммы и системы перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: гемограмма; перекисное окисление липидов; остеохондропатия; асептический некроз головки бедренной кости.

Для цитирования: Тепленький М.П., Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С., Гасанова А.Г. Взаимосвязь показателей перекисидации и гемограммы у детей с патологией тазобедренного сустава. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 104-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-104-109>

Teplen'kiy M.P., Matveeva E.L., Spirkina E.S., Gasanova A.G.

RELATIONSHIP OF PEROXIDATION INDICATORS AND HEMOGRAMS IN CHILDREN WITH HIP JOINT PATHOLOGY

Federal Budgetary State Institution «National Medical Research Center» Traumatology and Orthopedics «named after academician G.A. Ilizarov of the Ministry of Health of Russia», 640014, Kurgan, Russia

The increase in the number of patients with hip pathologies among children of different ages makes the diagnosis and treatment of these diseases one of the most actually existing problems in modern orthopedics. The aim of the work was to determine the features of the lipid peroxidation system – antioxidant protection and hemogram indices in children with various forms of hip joint pathology. The results of a preoperative examination of 47 patients aged 6-15 years (average age 10.3 years) who were treated at the clinic “FSBI NICC” TO “named after academician G. A. Ilizarova, Ministry of Health of the Russian Federation. There were 25 boys and 20 girls. Given nosology, patients were divided into five groups. The diagnosis was established on the basis of a clinical and radiological examination. Group I consisted of 8 male patients with stage II Perthes disease (mean age 8.75 + 1.63). Group II includes 16 patients (8 boys, 7 girls) with stage III Perthes disease. (average age 11.80 + 0.89). Group III included 12 patients (6 boys, 6 girls) with aseptic necrosis of the femoral head (average age 14.7 + 2.35). Group IV consisted of 4 patients (1 boy, 3 girls) with epiphyseal dysplasia. (average age 10.25 + 1.36). Group V includes 7 patients with hip dysplasia complicated by aseptic necrosis of the femoral head (mean age 8.33 + 2.11). The norm is the data that was obtained after examining 10 healthy male adolescents (age 13-14) and 5 female adolescents (age 8-14 years). Changes in lipid peroxidation rates and antioxidant activity are unidirectional in different forms of pathology of the hip joints in children, and the content of peroxidation products reliably correlates with hemogram values in stage II osteochondropathy and complicated hip dysplasia. In the complex of diagnostic measures for children with dystrophic lesions of the hip joint, to clarify the nature and stage of the pathological process, as additional criteria, hemogram indicators and lipid peroxidation systems – antioxidant protection can be used.

Key words: hemogram; lipid peroxidation; osteochondropathy; aseptic necrosis of the femoral head.

For citation: Teplen'kiy M.P., Matveeva E.L., Spirkina E.S., Gasanova A.G. Relationship of peroxidation indicators and hemograms in children with hip joint pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 104-109 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-104-109>

For correspondence: Spirkina E.S., e-mail: spirkina.82@mail.ru

Information about authors:

Teplenkiy M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1973-5192>;
Matveeva E.L., <https://orcid.org/0000-0002-7444-2077>;
Spirkina E.S., <https://orcid.org/0000-0003-2506-2657>;
Gasanova A.G., <https://orcid.org/0000-0001-7734-2808>.

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

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

Received 13.05.2020
Accepted 15.08.2020

Введение. Рост числа пациентов с патологиями тазобедренного сустава среди детей разного возраста делают диагностику и лечение этих заболеваний одной из самых актуальных проблем в современной ортопедии [1, 2]. В настоящее время диагностика с использованием современных методов исследования этой патологии позволяет определить заболевание и детализировать функциональные нарушения, когда они еще не проявляются клинически [3, 4]. Несмотря на предложенное множество оперативных и консервативных способов результаты лечения и эффективности диагностики не всегда удовлетворительны и требуют анализа патогенетических основ развития данной группы заболеваний у детей. В литературных источниках есть информации об изменении иммунологических и биохимических показателей периферической крови у детей с суставной патологией [5]. Кроме того, в литературе активно обсуждается роль механизмов пероксидации и антиоксидантной защиты в патогенезе детской суставной патологии. Поскольку клетки крови эмбриогенетически имеют мезенхимальное происхождение и являются разновидностью соединительной ткани [6], а продукты пероксидации являются ключевыми в механизмах развития деструктивных процессов в клеточных мембранах, некоторые авторы проводят взаимосвязь между степенью выраженности клинических проявлений соединительнотканной недостаточности у детей с нарушениями структурно-метаболического статуса клеток периферической крови, системной перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты [7, 8]. В связи с недостаточностью такого рода сведений нами была поставлена цель исследования – определение особенностей системы перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты и показателей гемограммы у детей с разными формами патологии тазобедренного сустава.

Материал и методы. Проанализированы результаты предоперационного обследования 47 пациентов в возрасте 6-15 лет (средний возраст 10,3 лет), находившихся на лечении в клинике «ФГБУ НМИЦ «ТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ. Мальчиков было 25, девочек – 20. С учетом нозологии больные были распределены на пять групп. Диагноз установлен на основании клинико-рентгенологического обследования. I группу составили 8 пациентов мужского пола с болезнью Пертеса II стадии (средний возраст 8,75±1,63). Во II группу отнесены 16 пациентов (8 мальчиков, 7 девочек) с болезнью Пертеса III стадии. (средний возраст 11,80±0,89). В III группу включены 12 пациентов

(6 мальчиков, 6 девочек) с асептическим некрозом головки бедренной кости (средний возраст 14,7±2,35). IV группу составили 4 пациента (1 мальчик, 3 девочки) с эпифизарной дисплазией. (средний возраст 10,25±1,36). В V группу отнесены 7 пациентов с дисплазией тазобедренного сустава, осложненной асептическим некрозом головки бедренной кости (средний возраст 8,33±2,11).

За норму взяты данные, полученные после обследования 10 здоровых подростков мужского пола (возраст 13-14) и 5 подростков женского пола (возраст 8-14 лет) [9]. При окислительном стрессе первичным механизмом повреждения клеток являются первичные продукты пероксидации – диеновые конъюгаты (ДК). Данный метод определения продуктов липопероксидации основан на поглощении монохроматического потока, в виде спектрально-избирательной световой энергии, которая проходит через исследуемый раствор. Вторичные продукты липопероксидации – малоновый диальдегид (МДА) служат маркерами перекисного окисления жиров и окислительного стресса. Результаты определения продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков представлены в виде расчетного коэффициента суммы и отношений. Основной функцией фермента каталазы является катализирование реакции разложения перекиси водорода до безвредных для организма веществ. Определение активности ключевых ферментов антипероксидной и антирадикальной защиты супероксиддисмутазы (СОД) проводилось на способности фермента, тормозить автоокисление адреналина.

При обработке полученных данных в исследуемых группах была проведена проверка на нормальность распределения выборки, рассчитано значение средней и стандартное отклонение. Статистическую значимость в группах сравнения оценивали, используя непараметрический критерий Вилкоксона. Статистическую взаимосвязь двух или более случайных величин между выборками оценивали по критерию Спирмена (rS). Достоверными считали отличия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. При оценке активности процессов перекисного окисления липидов определяли не только концентрации первичных и вторичных продуктов пероксидации, но и находили их суммарное значение (рис. 1). Снижение количества первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый альдегид) продуктов пероксидации различной степени выявлено у пациентов всех групп. Во II, III, IV, V группе отклонение от нормы было статистически достоверным. У пациентов с II стадией болезни Пертеса эти изменения не имели статисти-

чески значимых отличий. Для III стадии остеохондропатии тазобедренного сустава было характерно повышение активности супероксиддисмутазы. Для пациентов с эпифизарной дисплазией и осложненной дисплазией тазобедренного сустава было характерно значительное снижение уровня первичных продуктов липопероксидации (ДК) и ПОЛ (ДК+МДА). При эпифизарной дисплазии указанные изменения сопровождались повышением активности СОД. При осложненной дисплазии тазобедренного сустава отмечено достоверное снижение активности каталазы. Изучение активности ферментов антиоксидантной системы показало мобилизацию антиоксидантной защиты на стадии разбалансировки. При значительном (в 1,5 раза) и статистически значимом повышении активности СОД во II, III, IV группе, значения активности каталазы были снижены (статистически значимо у пациентов V группы до 32% от нормы). Возможно, снижение активности каталазы вызвано тем, что в условиях повышенного образования свободных радикалов происходило расхождение данного фермента, либо ингибированием каталитической активности продуктами реакции. Эти данные являются признаками развития окислительного стресса, наиболее выраженного в IV и V группе.

На рис. 2 представлены результаты исследования гемограммы во всех пяти группах пациентов до проведения оперативного лечения.

Согласно полученным нами данным, у детей с дисплазией тазобедренного сустава, осложненной асептическим некрозом (АНГБК) V группа количество лейкоцитов достоверно выше нормальных значений. Известно, что лейкоцитоз на фоне асептического некроза отмечается при дистрофических поражениях внутренних органов. Однако, как в анализируемой группе у больных с АНГБК этот показатель достовер-

но не отличался от нормы. Кроме того, у пациентов с осложненной дисплазией тазобедренного сустава отмечено статистически достоверное повышение уровня тромбоцитов. Предположительно, изменения в значениях показателя тромбоцитов в V группе пациентов является следствием состояния затруднения венозного оттока, что является одним из этиопатогенетических моментов асептического некроза. Следует отметить, что особенности гемограммы отмечены только тогда, когда дистрофический процесс сочетается с дисплазией тазобедренного сустава. Показатели периферической крови в группе детей с асептическим некрозом (III группа), практически не имели отличий от соответствующих в группе контроля. Анализ гематологических показателей в группе детей с эпифизарной дисплазией IV группа выявил ряд особенностей. Так, уровень гематокрита и гемоглобина практически значимо отличались от соответствующих величин у детей контрольной группы. Зарегистрировано достоверное отличие ($p < 0,05$) снижение уровня гемоглобина до $110,5 \pm 13,44$ г/л при $145,33 \pm 2,68$ г/л у детей контрольной группы и гематокрита до $31,82 \pm 3,72$ % при $40,79 \pm 0,76$ % в контроле.

Статистически значимые отличия в системе красной крови отмечены у детей с остеохондропатией II и III стадией. При ОХП II стадии (I группа) отмечено статистически значимое снижение содержания гемоглобина, гематокрита и эритроцитов. У детей с III стадией (II группа) – понижение показателей гематокрита, тромбоцитов, эритроцитов и гемоглобина.

Для оценки степени взаимосвязи пероксидации и показателей гемограммы нами рассчитаны соответствующие коэффициенты корреляции (табл. 1, 2). Достоверной корреляционной связи во 2-й и 4-й группах не обнаружено.

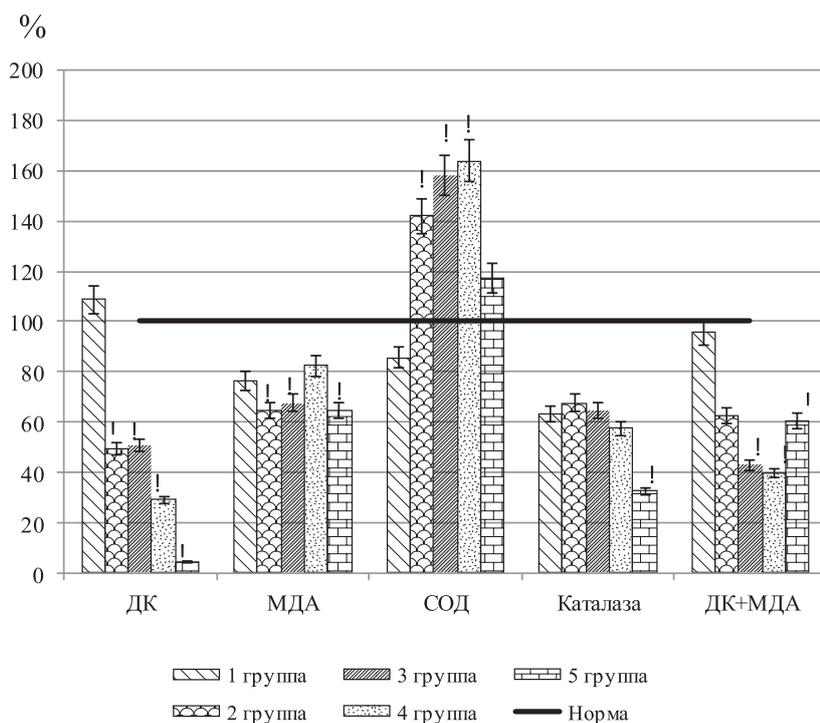


Рис. 1. Биохимические показатели крови (дооперационные значения).

Обнаружено, что у детей с болезнью Пертеса существует достоверная обратная связь между содержанием первичных продуктов перекисидации ДК и количеством лейкоцитов, а также между ДК и содержанием гемоглобина в сыворотке крови. Эти данные указывают на то, что снижение концентрации ДК связано с повышением количества лейкоцитов и гемоглобина. У детей с ослож-

ненной дисплазией тазобедренного сустава активность антиоксидантных ферментов ассоциирована с возрастанием уровня лейкоцитов и тромбоцитов.

Однако, поскольку для стадий остеохондропатией были выявлены признаки анемии, клиническая ценность данного теста (ДК) нами оценивается как информативная только для влияния на красный росток кроветворения.

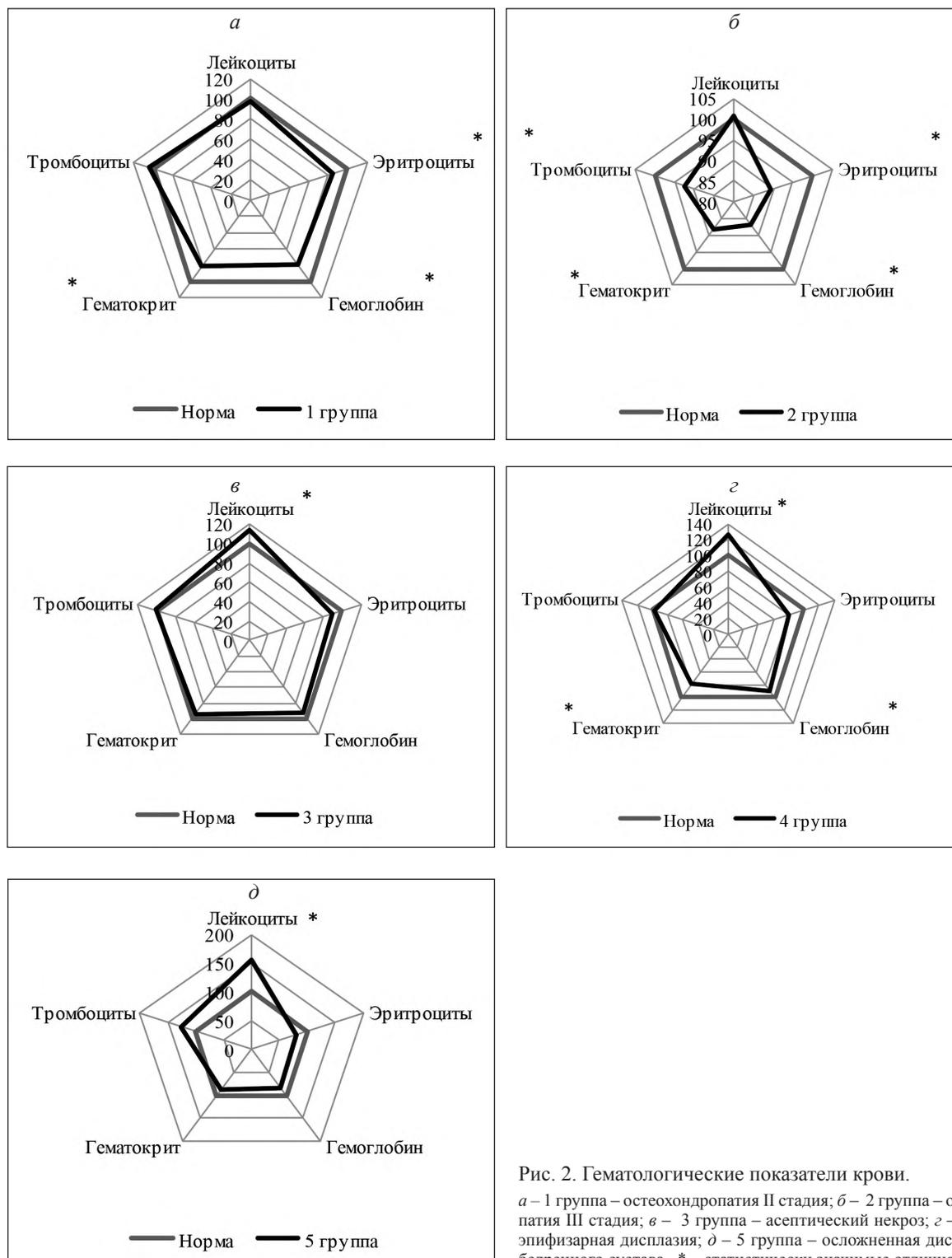


Рис. 2. Гематологические показатели крови.

a – 1 группа – остеохондропатия II стадия; *б* – 2 группа – остеохондропатия III стадия; *в* – 3 группа – асептический некроз; *г* – 4 группа – эпифизарная дисплазия; *д* – 5 группа – осложненная дисплазия тазобедренного сустава. * – статистически значимые отличия от нормы.

Таблица 1

Значения корреляционной связи (коэффициент корреляции/уровень значимости) между клетками иммунной системы и содержанием продуктов пероксидации в сыворотке крови

Показатели	Лейкоциты	Тромбоциты
I группа		
ДК	-0,85714 / 0,013697	0,071429 / 0,879048
МДА	0,178571 / 0,701658	-0,07143 / 0,879048
ДК+МДА	-0,60714 / 0,148231	-0,32143 / 0,482072
III группа		
ДК	-0,72121 / 0,018573	0,393939 / 0,259998
МДА	-0,52381 / 0,182721	0,928571 / 0,000863
ДК+МДА	-0,72121 / 0,018573	0,515152 / 0,127553

Выявленные изменения в показателях пероксидации и антиоксидантов и их связь с показателями клеточного состава крови пациентов обосновывают необходимость восстановления баланса системы ПОЛ-АОС в крови как одного из патофизиологических факторов тяжести поражений тазобедренных суставов. Очевидно, что независимо от тяжести оперативного вмешательства у пациентов с болезнью Пертеса и осложненной дисплазией тазобедренного сустава в послеоперационном периоде важное значение имеют мероприятия, направленные на активацию антиоксидантной системы и контроль за клеточным составом крови.

Согласно полученным результатам, при разных формах дистрофических поражений тазобедренного сустава у детей изменения в показателях перекисного окисления липидов и активности антиоксидантов имеют односторонний, но не однородный характер. Это дает возможность применять их при проведении диагностических мероприятий [10].

Характер, объем и прогноз лечебных мероприятий при болезни Пертеса определяется стадией патологического процесса. В стадии реоссификации превентивное лечение меняется на корригирующее, прогноз усугубляется. При отсутствии четких временных границ, однозначных рентгенологических признаков, показатель активности СОД и уровень диеновых конъюгатов могут быть использованы в качестве дополнительных критериев для определения стадии фрагментации и реоссификации при болезни Пертеса.

Клинические и рентгенологические признаки болезни Пертеса у детей дошкольного возраста имеют много общего с эпифизарной дисплазией и осложненной дисплазией тазобедренного сустава. Уровень активности ферментов СОД, каталазы, содержание первичных продуктов липопероксидации, показатели гемограммы могут применяться в качестве дополнительных критериев при дифференциальной диагностике указанных патологических состояний.

Обсуждение. Оценка состояния антиоксидантной системы и продуктов пероксидации липидов выявило отличия от нормальных значений как в содержании продуктов липопероксидации, так и в активности ферментов антиоксидантной защиты во всех группах больных с патологией тазобедренных суставов. У пациентов с эпифизарной дисплазией и остеохондропатией эти изменения ассоциированы с показателями эритроцитов и гемоглобина. У детей с асептическим некрозом головки бедренной кости показателями абсолютного содержания

Таблица 2

Значения корреляционной связи (коэффициент корреляции/уровень значимости) между показателями красной крови и содержанием продуктов пероксидации в сыворотке крови

Показатели	Эритроциты	Гемоглобин
I группа		
ДК	-0,5 / 0,253	-0,821 / 0,023
МДА	-0,143 / 0,760	0,232 / 0,616
ДК+МДА	-0,321 / 0,482	-0,429 / 0,337
V группа		
ДК	0,5 / 0,391	0,8 / 0,141
МДА	-0,2 / 0,704	0,657 / 0,156
ДК+МДА	-0,179 / 0,701	0,786 / 0,036

форменных элементов крови не имеют достоверных отличий от нормы.

Заключение. В комплексе диагностических мероприятий у детей с дистрофическими поражениями тазобедренного сустава для уточнения характера и стадии патологического процесса в качестве дополнительных критериев можно применять показатели гемограммы и системы перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа проведена на базе и при поддержке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Травматологии и Ортопедии» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nguyen J.C., Dorfman S.R., Rigsby C.K., Siegel A., Karmazyn B. ACR Appropriateness Criteria Developmental Dysplasia of the Hip-Child. *Journal of the American College of Radiology*. 2019;16(5):94-S103.
2. Shore B.J., Miller P.E., Zaltz I., Schoenecker P.L., Sankar W.N. Determining Hinge Abduction in Legg-Calvé-Perthes Disease: Can We Reliably Make the Diagnosis (Article). *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2019;39(2):95-101.
3. Иванов Ю.Н., Рассказов Л.В., Румянцева Г.Н., Крестьяшин В.М., Мурга В.В., Марасанов Н.С. Комплексный подход к диагностике и хирургическому лечению заболеваний и травм костно-мышечной системы у детей с дисплазией соединительной ткани. *Детская хирургия*. 2019; 23(1):30.
4. Крестьяшин И. В., Коварский С. Л., Крестьяшин В. М., Шафранов В. В. и др. Современные стационарзамещающие технологии в работе детского центра амбулаторной хирургии, травматологии-ортопедии. *Детская хирургия*. 2014;5:53-6.
5. Пономарёва Д.А. Состояние периферического звена эритрона при дисплазии соединительной ткани у детей. *Бюллетень Сибирской медицины*. 2008;1:56-9.
6. Стрелкова И.Г., Мусихина И.В., Богосьян А.Б., Сидоркин В.Г., Старикова М.А. и др. Новые аспекты взаимосвязи свободно-радикального окисления и тяжести патологического процесса при врожденном вывихе бедра и дегенеративно-дистрофических заболеваниях тазобедренного сустава у детей. *Современные технологии в медицине*. 2012;4(4):73-5.
7. Белова Ю.С. Оценка метаболического статуса детей с врожденной патологией тазобедренного сустава. *Педиатр*. 2017; 8:57-8.
8. Львов С.Е., Таусиф Раза, Назаров С.Б., Томилова И.К. Метаболизм оксида азота и перекисное окисление липидов при болезни Легга-Кальве-Пертеса и транзиторных синовитах тазобедренного сустава. *Травматология и Ортопедия России*. 2005;2(35):17-20.

9. Тепленький М.П., Матвеева Е.Л., Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Спиркина Е.С., Гасанова А.Г. Интенсивность процессов пероксидации и кислородзависимых механизмов фагоцитарной активности нейтрофилов у здоровых подростков *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2019; 98(4):259-63.
10. Лунева С.Н., Матвеева Е.Л., Тропин В.И., Тепленький М.П., Гасанова А.Г., Спиркина Е.С. Биохимические маркеры поражения соединительной ткани у детей с дисплазией тазобедренного сустава. *Гений ортопедии*. 2014;4:34-8.

REFERENCES

1. Nguyen J.C., Dorfman S.R., Rigsby C.K., Siegel A., Karmazyn B. ACR Appropriateness Criteria Developmental Dysplasia of the Hip-Child. *Journal of the American College of Radiology*. 2019;16(5):94-S103.
2. Shore B.J., Miller P.E., Zaltz I., Schoenecker, P.L., Sankar, W.N.. Determining Hinge Abduction in Legg-Calvé-Perthes Disease: Can We Reliably Make the Diagnosis (Article). *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2019;39(2):95-101.
3. Ivanov Yu.N., Rasskazov L.V., Rumyantseva G.N., Krestyashin V.M., Murga V.V., Marasanov N.S. An integrated approach to the diagnosis and surgical treatment of diseases and injuries of the musculoskeletal system in children with connective tissue dysplasia. *Detskaya khirurgiya*. 2019;23(1):30. (in Russian)
4. Krestyashin I.V., Kovarsky S.L., Krestyashin V.M., Shafranov V.V. et al. Modern hospital-replacing technologies in the work of the children's center for outpatient surgery, traumatology-orthopedics. *Detskaya khirurgiya*. 2014;5:53-6. (in Russian)
5. Ponomareva D.A. The condition of the peripheral unit of erythron in connective tissue dysplasia in children. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny*. 2008;1:56-9.(in Russian)
6. Strelkova I. G., Musikhina I. V., Bogosyan A. B., Sidorkin V. G., Starikova M. A. et al. New aspects of the relationship of free radical oxidation and the severity of the pathological process in congenital dislocation of the hip and degenerative diseases of the hip in children. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*. 2012;4(4):73-5. (in Russian)
7. Belova Yu. S. Assessment of the metabolic status of children with congenital pathology of the hip joint. *Pediatr*. 2017;8:57-8.(in Russian)
8. L'vov S.E., Tausif Raza, Nazarov S.B., Tomilova I.K. Nitric oxide metabolism and lipid peroxidation in Legg-Calve-Perthes disease and transient hip synovitis. *Travmatologiya i Ortopediya Rossii*. 2005;2(35):17-20.(in Russian)
9. Teplenky M.P., Matveeva E.L., Kuznetsova E.I., Chepeleva M.V., Spirkin E.S., Gasanova A.G. The intensity of the processes of peroxidation and oxygen-dependent mechanisms of the phagocytic activity of neutrophils in healthy adolescents. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2019;98(4):259-63. (in Russian)
10. Luneva S.N., Matveeva E.L., Tropin V.I., Teplenky M.P., Gasanova A.G., Spirkin E.S. Biochemical markers of connective tissue damage in children with hip dysplasia. *Geniy ortopedii*. 2014;4:34-8. (in Russian)

Поступила 13.05.20
Принята к печати 15.08.20

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Боронина Л.Г.^{1,2}, Саматова Е.В.², Кукушкина М.П.², Панова С.А.², Устюгова С.С.²

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ЮНОНА® LABSTAR 50

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии, 620028, Екатеринбург, Россия;

²ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», лаборатория клинической микробиологии, 620149, Екатеринбург, Россия

Проведена проверка качества питательных сред для посева крови: питательная среда для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов, среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов, среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов, среда питательная для культивирования аэробов ЮНОНА®, используемых в автоматическом бактериологическом анализаторе ЮНОНА® Labstar 50 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., Kumaï). Использованы 10-кратные разведения из 18-24-часовых культур референс-штаммов: ATCC 13124 Clostridium perfringens; ATCC 25285 Bacteroides fragilis; NCTC 19418 Haemophilus influenzae; ATCC 49619 Streptococcus pneumoniae; ATCC 16615 Streptococcus pyogenes; ATCC 27853 Pseudomonas aeruginosa; ATCC 25923 Staphylococcus aureus; ATCC 25922 Escherichia coli; ВКПГУ-401/-885-653 Candida albicans; ATCC 13813 Streptococcus agalactiae; № 186 Enterobacter cloacae; ATCC 29212 Enterococcus faecalis; клинические изоляты: Acinetobacter lwoffii, Enterobacter cloacae, Candida tropicalis. Все исследуемые референс-штаммы выделялись на питательных средах в соответствии с их биологическими свойствами при посеве 50 КОЕ/мл менее чем через 72 ч, как и заявлено производителем. Как доказано в исследовании, для проверки качества питательных сред бактериями вида Haemophilus influenzae нужно применять факторы роста, и это необходимо отразить в инструкции производителя.

Ключевые слова: культура крови; диагностика бактериемии; контроль качества.

Для цитирования: Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П., Панова С.А., Устюгова С.С. Внутривлабораторный контроль качества питательных сред для автоматического бактериологического анализатора ЮНОНА® Labstar 50. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 110-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114>

Boronina L.G.^{1,2}, Samatova E.V.², Kukushkina M.P.², Panova S.A.², Ustyugova S.S.²

IN-LABORATORY QUALITY CONTROL OF NUTRIENTS FOR AUTOMATIC BACTERIOLOGY ANALYZER YUNON®LABSTAR 50

¹Urals State Medical University, chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology, 620028, Ekaterinburg, Russian Federation;

²Regional Children's Clinical Hospital, clinical microbiology laboratory, 620149, Ekaterinburg, Russian Federation

The quality of culture media for blood culture was checked: nutrient medium for children with an antibiotic neutralizer for the cultivation of aerobes, nutrient medium with an antibiotic neutralizer for the cultivation of anaerobes, a nutrient medium with an antibiotic neutralizer for the cultivation of aerobes, nutrient medium for the cultivation of aerobes UNONA® used in the automatic bacteriological analyzer JUNONA® Labstar 50 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd. China). Used tenfold dilutions from 18-24 hour cultures of reference strains: ATCC 13124 Clostridium perfringens; ATCC 25285 Bacteroides fragilis; NCTC 19418 Haemophilus influenzae; ATCC 49619 Streptococcus pneumoniae; ATCC 16615 Streptococcus pyogenes; ATCC 27853 Pseudomonas aeruginosa; ATCC 25923 Staphylococcus aureus; ATCC 25922 Escherichia coli; ВКПГУ-401/-885-653 Candida albicans; ATCC 13813 Streptococcus agalactiae; No. 186 Enterobacter cloacae; ATCC 29212 Enterococcus faecalis; clinical isolates: Acinetobacter lwoffii, Enterobacter cloacae, Candida tropicalis. All investigated reference strains were isolated on nutrient media in accordance with their biological properties when inoculated with 50 CFU / ml less than 72 hours later, as stated by the manufacturer. The study has shown that growth factors must be used to test the quality of the culture media with Haemophilus influenzae bacteria and this must be reflected in the manufacturer's instructions.

Key words: blood culture; bacteremia diagnosis; quality control.

For citation: Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Panova S.A., Ustyugova S.S. In-laboratory quality control of nutrients for automatic bacteriology analyzer YUNON®Labstar 50. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 110-114 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114>

For correspondence: Boronina Lyubov Grigorievna, Doctor of Medical Sciences, Professor of chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology; e-mail: boroninalg@mail.ru

Information about authors:

Boronina L.G., <http://orcid.org/0000-0003-0152-962X>;
Samatova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3154-6201>;
Kukushkina M.P., <https://orcid.org/0000-0003-1980-9099>;
Panova S.A., <https://orcid.org/0000-0003-4347-0929>;
Ustyugova S.S., <https://orcid.org/0000-0002-0053-4884>.

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

Acknowledgment. *The study was carried out with the sponsorship of Medica Group.*

Received 03.08.2020
Accepted 01.09.2020

Введение. Инвазивные инфекции, сопровождающиеся размножением микроорганизмов в крови, остаются одной из актуальных проблем медицины из-за трудностей диагностики, высокой летальности, значительных экономических затрат, причиняемых этим заболеванием. Обнаружение возбудителя в крови является важным для назначения этиотропной терапии, но сопряжено с трудностями выделения возбудителя [1,3,5]. По прогнозам, в ближайшие десять лет ожидается резкое увеличение числа больных сепсисом в связи с развитием инвазивных медицинских технологий, длительностью пребывания пациентов в отделениях реанимации, увеличением количества высокотехнологичных медицинских манипуляций [5,9]. Главной задачей микробиологического исследования крови является быстрое получение результата: обнаружение, идентификация чистой культуры возбудителя, получения заключения о резистентности выделенного микроорганизма и назначения этиотропной антимикробной терапии. Быстрые и достоверные результаты требуют применения высококачественных питательных сред в связи с различными потребностями микроорганизмов для роста. С этой целью разработаны питательные среды, содержащие все факторы роста, необходимые для роста, в том числе труднокультивируемых микроорганизмов, дающих возможность ускорения процесса индикации роста микроорганизмов при помощи ручных или автоматических систем [1,3,5,9].

При микробиологической диагностике бактериемии и сепсиса посев крови в настоящее время проводят на различные системы для гемокультуры: «Signal» (Oxoid, Великобритания), бульон с сердечно-мозговым экстрактом (Conda, Испания), среды для автоматических анализаторов гемокультуры «ВАСТЕС™ FX» (Becton Dickinson, США), VactAlert (bioMerieux, Франция) и др. [1 – 3, 9, 10].

Применение как коммерческих, так и приготовленных в лаборатории питательных сред, регламентируется нормативными документами, включающими внутривлабораторный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований [4, 6 – 8].

Цель исследования – проверка качества питательных сред для посева крови ЮООНА® (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., Китай), применяемых для автоматического бактериологического анализатора ЮООНА® LABSTAR 50, используя референс-штаммы.

Материал и методы. Исследованы следующие питательные среды: питательная среда для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов (партия № 20200327, дата производства 03.31.2020 г.), среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов (партия № 20200307, дата производства 03.07.2020 г.), среда питательная для

культивирования аэробов (партия № 20200404, дата производства 04.02.2020 г.) среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов (партия № 20200402, дата производства 04.03.2020 г.) ЮООНА®. Исследование сред проведено на автоматическом бактериологическом анализаторе LABSTAR-50 (регистрационные удостоверения: РЗН 2019/9250 от 19.11.2019 г., РЗН 2019/9448 от 24.12.2019 г.); использовали референс-штаммы из международных и иных коллекций: ATCC 13124 *Clostridium perfringens*; ATCC 25285 *Bacteroides fragilis*; NCTC 19418 *Haemophilus influenzae*; ATCC 49619 *Streptococcus pneumoniae*; ATCC 16615 *Streptococcus pyogenes*; ATCC27853 *Pseudomonas aeruginosa*; ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*; ATCC 25922 *Escherichia coli*; ВКПГУ-401/-885-653 *Candida albicans*; ATCC 13813 *Streptococcus agalactiae*; № 186 *Enterobacter cloacae*; ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*; клинический изоляты: *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter cloacae*, *Candida tropicalis*.

Для проведения исследований руководствовались нормативными документами клиническими рекомендациями, методическими указаниями, справочными пособиями [4, 6, 8]. Подготовку тест штаммов из лиофилизированного состояния проводили на жидких питательных средах, затем пересевали на плотные питательные среды, соответствующие виду микроорганизма по потребности питательных свойств и атмосферы культивирования. Исследование штаммов бактериологическим методом проводили на питательных средах: МПК, среда для контроля стерильности кровяной, анаэробный кровяной, «шоколадный» агар, среда Сабуро, на АТВ Expression (bioMerieux, Франция) и Phoenix M50 (Becton Dickinson, США) анализаторах.

Для исследований применяли культуры микроорганизмов, выращенные в требуемых условиях: анаэробные *B. fragilis*, *C. perfringens* – 18 ч, 37° С в анаэробной атмосфере (анаэрогат), факультативные анаэробы – 18 ч при 35±0,5° С в атмосфере 5% углекислого газа (CO₂-инкубатор), аэробы 18 ч при обычной атмосфере при 35±0,5° С в термостате. Производитель, как указано в инструкции к питательным средам, рекомендует использовать для контроля качества питательных сред разведения культур в концентрации 50 КОЕ /мл. Исходный инокулом стандартизовали по «Стандарт мутности для определения количества микроорганизмов в микробной взвеси 0,5 ед. МакФарланда» и отраслевому стандарту мутности согласно ОСО 42-28-85П производства ФГУН ГИСК им. А. А. Тарасевича (Москва), равный 10 единицам. Мутность стандарта, равная 10 единицам соответствует концентрации клеток в 1 мл: 0,93х10⁹ КОЕ/мл микробов группы кишечной палочки, 11,0х10⁹ КОЕ/мл микробов коклюшной группы (*H. influenzae*) [8]. Референс-штаммы и клинические изоляты проверяли на

соответствие свойствам, признанных в национальных и международных коллекциях, определяли показатели стабильности основных биологических свойств микроорганизмов по характеру роста, культуральным, морфологическим (в т. ч. наличие капсулы), тинкториальным (окраска по Граму), биохимическим, антигенным свойствам [4,8]. В процессе 10-кратного разведения в пробирках с 0,9% изотонического раствора хлорида натрия перенос взвеси и дальнейшее титрование проводили в пробирках со сменной стерильной пипетки вместимостью 1,0 мл (ГОСТ 29227-91, второй класс точности). Результаты обнаруживаемого роста проводились в анализаторе бактериологическом автоматическом ЮОНОА®Labstar 50, по индикатору и кривых роста с фиксацией времени и динамики роста референс-штаммов. Во флаконы с исследуемыми питательными средами вносили инокулы из разведений, вначале вносили образец в анаэробный флакон, затем в аэробный. Флаконы с посевами помещали в анализатор для культивирования, при изменении цвета позиции, отображающей конкретный флакон, на экране монитора на красный, оценивали результат исследования как «положительный», оценивали кривую роста микроорганизма, время сигнала от начала культивирования. В случае отрицательной реакции проводили высев из флакона на питательные среды, соответствующие виду микроорганизма, изучение морфологии бактерий, культуральным, морфологическим (в том числе, наличие капсулы), тинкториальным (окраска по Граму), биохимическим, антигенным свойствам. Во флаконе с положительной реакцией в течение, как указывают производители, менее, чем через 72 ч, происходит размножение микроорганизмов, а во флаконе с отрицательной реакцией в течение 5 дней не наблюдается рост микроорганизмов. Проводили контрольные высевы из разведений на специальные плотные питательные среды, соответствующие потребностям микроорганизмов. После фиксации времени роста микроорганизмов во флаконах испытуемых сред, проводили высев на общепринятые питательные среды для определения стабильности биологических свойств микроорганизмов после инкубации по характеру роста, культуральным, морфологическим, тинкториальным, биохимическим, антигенным свойствам на соответствие известных показателей референс-штамма.

При параллельных посевах из десятикратных разведений -7, -8, -9 референс-штаммов, полученных из 18-24 ч культуры микроорганизмов, на питательные среды (кровяной агар, анаэробный кровяной агар, среда Сабу-ро, мясо-пептонный агар – по потребностям микроорганизма) определяли количество КОЕ, которое соответствует разведениям. При посеве культуры *H. influenzae* на «шоколадный» агар разведение -7 соответствовало 1000 КОЕ, разведение -8 соответствовало 100 КОЕ, разведение -9 соответствовало 10 КОЕ. Для всех других бактерий разведение -7 соответствовало 100 КОЕ, разведение -8 соответствовало 10 КОЕ. Для грибов рода *Candida* разведение -6 соответствует 100 КОЕ, разведение -7 соответствует 10 КОЕ. Контроль стерильности флаконов со средами без посева (3 флакона от партии) помещали для культивирования в автоматический анализатор ЮОНОА LABSTAR-50 на 5 сут при $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ и среде для контроля стерильности на 7 суток. Статистические расчёты проводили в программе XL.

Результаты и обсуждение. Флаконы с питательными средами при проверке стерильности были стерильны, что подтверждено результатами высева на среду для контроля стерильности. Фиксировали время полу-

чения роста во флаконах с посевами различных культур референс-штаммов на анализаторе бактериологическом автоматическом ЮОНОА®Labstar 50. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Все исследуемые референс-штаммы показали возможности роста на питательных средах в соответствие с их биологическими особенностями. Среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА®, среда питательная для культивирования аэробов ЮОНОА®, среда питательная для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА® обнаруживала рост аэробных и факультативно-анаэробных бактерий (*P. aeruginosa*, *A. lwoffii*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *E. cloacae*). Среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов ЮОНОА® – обнаруживала рост анаэробных бактерий *C. perfringens* и *B. fragilis*. Рост грибов рода *Candida* (*C. glabrata*, *C. albicans*) обнаружен на питательной среде для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов, на среде питательной для культивирования аэробов на питательной среде с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов, а на среды питательной с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов роста не выявлено, что соответствует биологии возбудителей.

Исключением явилось отсутствие положительных результатов при посеве труднокультивируемого прихотливого микроорганизма – грамотрицательной палочки *H. influenzae*. В соответствии с рекомендациями производителя, описанными в инструкции по применению, контроль над качеством питательной среды во флаконе, не указано, что для проверки среды необходимо вносить факторы роста, в которых имеет потребность этот микроорганизм. При посеве из флакона с посевами культуры *H. influenzae* из разведения -7, который показал отрицательный результат, зафиксированным анализатором через 120 ч, на «шоколадном» агаре обнаружен рост мелких колоний, соответствующих виду *H. influenzae*.

При повторном посеве референс-штамма *H. influenzae* на флаконы со средами и с добавлением дефибрированной крови барана (содержащие необходимые факторы роста) во флаконах выросли бактерии, результат оказался положительным (см. табл. 1).

При определении стабильности биологических свойств референс-штаммов микроорганизмов после инкубации и положительных посевов по характеру роста, культуральным, морфологическим (в т. ч. наличие капсулы), тинкториальным (окраска по Граму), биохимическим, антигенным свойствам не обнаружено изменения указанных свойств. Все показатели и свойства, характерные для каждого вида микроорганизма, оказались стабильными после культивирования на средах в анализаторе бактериологическом автоматическом ЮОНОА®Labstar 50.

Время роста культур референс-штаммов из разных разведений на испытуемых питательных средах различное, поэтому рассчитали среднее время роста на питательных средах по кривой роста и времени «положительного» сигнала на анализаторе. Для оценки размножения на питательных средах по скорости роста вычислили среднее время роста на различных средах из разведений, содержащих 100 и 10 КОЕ/мл (табл. 2).

Как показано в табл. 2, наиболее быстрый рост обнаружили грамотрицательные энтеробактерии, среднее

Таблица 1

Время роста культур на питательных средах при инкубации на анализаторе бактериологическом автоматическом ЮООНА® Labstar 50

Название микроорганизма	Разведение, количество клеток в 1 мл		Среда № 1, время роста (ч:мин)	Среда № 2, время роста (ч:мин)	Среда № 3, время роста (ч:мин)	Среда № 4, время роста (ч:мин)
<i>E. coli</i>	-7	100	10:13	10:38	10:57	10:23
<i>E. coli</i>	-8	10	10:43	11:16	10:42	10:28
<i>E. coli</i>	-9	≤10	12:01	11:55	12:33	12:00
<i>P. aeruginosa</i>	-7	100	13:11	23:37	12:38	12:35
<i>P. aeruginosa</i>	-8	10	13:43	25:48	12:58	15:37
<i>P. aeruginosa</i>	-9	≤10	15;36	отриц.	15:49	15:49
<i>H. influenzae</i>	-7	1000	Отр**	отр	отр	отр
<i>H. influenzae</i>	-8	100	отр	отр	отр	отр
<i>H. influenzae</i> , кр*	-7	1000	17:31	17;13	17:30	16:07
<i>H. influenzae</i> , кр*	-8	100	20:31	21:01	21:09	24:01
<i>H. influenzae</i> , кр*	-9	10	26:50	22:48	-	-
<i>E. cloacae</i>	-7	100	11:31	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-8	10	12:46	12:30	12:46	12:41
<i>A. lwoffii</i>	-7	100	12:50	13:09	-	-
<i>A. lwoffii</i>	-8	10	14:59	14:36	-	-
<i>A. lwoffii</i>	-9	≤10	-	16:09	-	19:34
<i>S. pneumoniae</i>	-7	100	16:01	17:24	18:53	-
<i>S. pneumoniae</i>	-8	10	18:14	16:03	23:42	18:43
<i>S. pneumoniae</i>	-9	≤10	17:34	17:34	26:41	-
<i>S. pyogenes</i>	-7	100	21:46	-	20:33	23:59
<i>S. pyogenes</i>	-8	10	30:23	-	21:50	-
<i>S. pyogenes</i>	-9	≤10	75:00	-	24:42	-
<i>E. faecium</i>	-7	100	12:54	13:32	12:37	13:31
<i>E. faecium</i>	-8	10	14:22	15:44	13:57	15:04
<i>E. faecium</i>	-9	≤10	16:59	17:36	16:19	16:38
<i>S. aureus</i>	-7	100	10:53	13:10	11:56	11:45
<i>S. aureus</i>	-8	10	12:36	15:14	12:49	12:26
<i>S. aureus</i>	-9	≤10	13:27	17:53	-	13:39
<i>S. agalactiae</i>	-7	100	14:08	-	14:08	-
<i>S. agalactiae</i>	-8	10	20:50	-	18:35	17:59
<i>S. agalactiae</i>	-9	≤10	-	-	21:59	-
<i>B. fragilis</i>	-7	100	-	21:40	отр	-
<i>B. fragilis</i>	-8	10	-	72:00	отр	-
<i>C. perfringens</i>	-7	100	-	6:55	отр	-
<i>C. perfringens</i>	-8	10	-	17:35	-	-
<i>C. albicans</i>	-6	100	19:20	-	16:28	18:56
<i>C. albicans</i>	-7	10	-	-	-	26:34
<i>C. glabrata</i>	-6	100	21:05	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-7	10	-	-	-	27:59

Примечание. 1 - среда питательная для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200327, дата производства 03.31.2020 г.); 2 - среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов ЮООНА® (партия № 20200307, дата производства 03.07.2020 г.); 3 - среда питательная для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200404, дата производства 04.02.2020 г.); 4 - питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200402, дата производства 04.03.2020 г.). кр* - внесение дополнительно крови дефибринированной барана, 2,0 мл. ** - рост во флаконе *H. influenzae* не обнаружен, при высеве из флакона на шоколадный агар, 35±0,5 °С 5% CO₂ - обнаружен рост мелких колоний *H. influenzae*. Прочерк - исследование не проводилось.

время роста 10,4-11,9 ч, среднее время роста стафилококков и энтерококков: 12,4-13,8 ч, рост *C. perfringens* обнаружен в среднем через 11,9 часов. Неферментирующие грамотрицательные бактерии (*A. lwoffii*, *P. aeruginosa*) обнаружены на питательных средах в среднем через 13,1-13,6 часов. Труднокультивируемые прихотливые бактерии (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*) обнаружены в среднем через 18,2-23,2 часа. Для обнаружения «положительного» результата инкубация референс-штамма *B. fragilis* заняла

в среднем 48,5 часов. Грибы рода *Candida* обнаружены в среднем через 20,0-24,3 часа.

Рост референс-штаммов на описываемых питательных средах произошёл менее, чем через 72 ч на питательных средах в соответствии с биологией микроорганизма, как и описано в инструкции производителя на питательные среды. Подобные результаты получены в других исследованиях [2,10].

Выводы. Исследование показало, что все испытанные среды: среда питательная для детей с ней-

Таблица 2

Время обнаружения роста референс-штаммов на средах при детекции на анализаторе бактериологическом автоматическом ЮООНА® Labstar 50 при посеве 10-100 КОЕ/мл (M±m)

Референс-штаммы из международных и иных коллекций	Наименование культуры	Среднее время роста на средах во флаконах, ч
ATCC 13124	<i>C. perfringens</i>	11,9±7,6
ATCC 25285	<i>B. fragilis</i>	46,7±35,7
NCTC 19418	<i>H. influenzae*</i>	18,9±2,3
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	10,4±0,3
186	<i>E. cloacae</i>	11,9±0,5
Клинический	<i>A. hwofii</i>	13,6±0,9
ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i>	13,1±1,4
ATCC25923	<i>S. aureus</i>	12,4±1,4
ATCC13813	<i>S. agalactiae</i>	16,9±2,8
Клинический	<i>E. faecium</i>	13,8±1,0
ATCC49619	<i>S. pneumoniae</i>	18,2±2,5
ATCC16615	<i>S. pyogenes</i>	23,3±3,9
ВКПГУ-401/-885-653	<i>C. albicans</i>	20,0±4,3
Клинический	<i>C. glabrata</i>	24,3±4,6

Примечание. * – при дополнительном внесении крови дефибринированной барана, 2,0 мл.

тразлизатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200327, дата производства 03.31.2020 г.); среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов ЮООНА® (партия № 20200307, дата производства 03.07.2020 г.); среда питательная для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200404, дата производства 04.02.2020г.); питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮООНА® (партия № 20200402, дата производства 04.03.2020 г.) соответствовали времени роста и минимальным концентрациям культур референс-штаммов, заявленному производителем: не менее 50 КОЕ/мл и в течение не более 72 часов. Изучение биологических свойств референс-штаммов микроорганизмов после инкубации и положительных посевов по характеру роста, культуральным, морфологическим (в т. ч. наличие капсулы), тинкториальным (окраска по Граму), биохимическим, антигенным свойствам не обнаружено изменения указанных параметров. Как доказано в исследовании, для проверки качества сред бактериями вида *H. influenzae*, нужно применять факторы роста, и это необходимо отразить в инструкции производителя.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ООО «МедикаГрупп».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 10 см. REFERENCES)

- Багирова Н. С. Диагностика бактериемии: что нового? Материалы конференции Национальные дни лабораторной медицины России, Москва, 1-3 октября 2014. URL: <http://www.mma-expo.ru/lab/2014/visitors/presentations/2-3-14>. Багирова Н.С. Диагностика бактериемии.pdf.
- Чжан Гэ, Чжан Сяоцзян, Ху Цзихун, Ян Цин, Сюй Чжипэн, Фань Синь, Чжу Хуадун, Ма Сяоцзюнь, Лун Юнь, Сюй Инчунь. Оценка эффективности отечественной автоматической системы культивирования крови LABSTAR 120 и поддержива-

ющие флаконы для культивирования крови. *Журнал современной лабораторной медицины*. 2018; 33(06):132-9.

- Боронина Л. Г. Расширение возможностей в диагностике бактериемии и сепсиса у детей в многопрофильном стационаре. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10):613-9.
- Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для клинических лабораторных исследований. Клинические рекомендации. М.: Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»; 2014.
- Грувер К. П., Белобородов В. Б. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011; 13(1):90-7.
- Меньшиков В. В. Методики клинических лабораторных исследований. *Клиническая микробиология*. Т.3. М.: ЛАБОРА; 2009.
- Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической микробиологии. Т. IV. М.: Агат Мед; 2003.
- Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания 4.2.12316-08. – М.: ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора; 2008.
- Полухина О.В., Суборова Т.Н., Кузин А.А., Петров А.Н., Осовских В.В., Гранов Д.А. и др. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 14(1):43-8.

REFERENCES

- Bagirova N.S. Diagnosis of bacteremia: what's new? Materials of the conference National days of laboratory medicine in Russia, Moscow, October 1-3, 2014. URL: <http://www.mma-expo.ru/lab/2014/visitors/presentations/2-3-14>. N.S. Bagirova. Diagnostics of bacteremia.pdf. (in Russian)
- Chzhan Ge, Chzhan Syaoczyan, Hu Czihun, YAn Cin, Syuj Chzhipen, Fan' Sin', Chzhu Huadun, MaSyaoczzyun', Lun Yun', Syuj Inchun'. Evaluation of the effectiveness of the domestic automatic blood culture system LABSTAR 120 and supporting vials for blood culture. *Zhurnal sovremennoy laboratornoy meditsiny*. 2018; 33(6):132-9. (in Russian)
- Boronina L.G. Expanding opportunities in the diagnosis of bacteremia and sepsis in children in a multidisciplinary hospital. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10):613-9. (in Russian)
- Intra-laboratory quality control of culture media for clinical laboratory research. [Vnutrilaboratornyi kontrol' kachestva pitatel'nykh sred dlya klinicheskikh laboratornykh issledovaniy]. *Klinicheskie rekomendatsii*. Moscow: Association of Specialists and organizations of Laboratory service «Federation of Laboratory Medicine»; 2014. (in Russian)
- Gruver K.P., Beloborodov V.B. Clinical significance of bacteremia in patients with sepsis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2011; 13(1): 90-7. (in Russian)
- Men'shikov V.V. Clinical laboratory research methods. Clinical microbiology. [Metodiki klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. *Klinicheskaya mikrobiologiya*. Tom 3]. Moscow: LABORA; 2009. (in Russian)
- Clinical Laboratory Analytics. Private Analytical Technologies in Clinical Microbiology. [Pravila vnutrilaboratornogo kontrolya kachestva pitatel'nykh sred. *Klinicheskaya laboratornaya analitika*. Tom IV. Chastnye analiticheskie tekhnologii v klinicheskoy mikrobiologii]. Moscow: Agat Med; 2003. (in Russian)
- Control methods for bacteriological culture media. [Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred]. *Metodicheskie ukazaniya 4.2.12316-08*. Moscow: FBUS FCGiE Rostpotrebнадзора; 2008. (in Russian)
- Polukhina O.V., Suborova T.N., Kuzin A.A., Petrov A.N., Osovskikh V.V., Granov D.A. et al. The spectrum of bacteremia pathogens in patients with immunodeficiency states of various origins. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 14(1): 43-8. (in Russian)
- Pang C., Zhou J., Liu W., Zhen W., Yu Z., Zhang L., et al. Functional evaluation of LABSTAR 50 blood – culturing device. *China Medical Equipment*. 2012; 9(2):70-2.

Поступила 03.08.2020

Принята к печати 01.09.2020

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Полосенко О.В., Шепелин А.П., Ажермачева Н.И., Абаев И.В.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Московская область, Россия

*Проведен сравнительный анализ качества разработанных питательных сред: Основа агар Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая и зарубежных аналогов по результатам клинических испытаний. Качество испытываемых сред оценивали по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства. Оценка статистической достоверности результатов испытаний клинических образцов оценивалась с учетом числа параллельных исследований и количества совпадений результатов исследований, проведенных разными исполнителями. Исследовано 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ 164 в период проведения клинических испытаний. Выделено 46 культур предполагаемых возбудителей заболевания при посеве на испытываемые и контрольные среды: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5. Проявление лецитиназной активности на среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и ферментации маннита на среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в предварительном фенотипическом тесте позволили выделить и дифференцировать клинические изоляты *S. aureus* от *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.*

Ключевые слова: питательные среды; агар Фогель-Джонсона; агар Байрд-Паркера; стафилококки; лецитиназная активность.

Для цитирования: Полосенко О.В., Шепелин А.П., Ажермачева Н.И., Абаев И.В. Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 115-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121>

Polosenko O. V., Shepelin A. P., Azhermacheva N. I., Abaev I. V.

CLINICAL TRIALS OF NEW CULTURE MEDIA FOR STAPHYLOCOCCUS ISOLATION

Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rospotrebnadzor, 142279 Obolensk, Moscow region, Russia

A comparative analysis of the quality of the developed nutrient media, Baird-Parker dry agar base and Vogel-Johnson dry agar Base and foreign analogues, was done based on results of clinical trials. The tested media were qualified by the main biological parameters, such as sensitivity, growth rate, and differentiating and inhibiting properties. The evaluation of statistical reliability of the results of trials of clinical samples was evaluated taking into account the number of parallel studies and the number of matches of the results of studies conducted by different performers.

*116 clinical samples of received by a laboratory of the testing laboratory center for research from hospital no.164 over the period of clinical trials were analyzed. 46 cultures of potential pathogens were isolated when culturing on test and control media: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5.*

*Lecithinase activity on the medium “Baird-Parker dry agar Base” and mannitol fermentation on the medium “Vogel-Johnson dry agar Base” in the preliminary phenotypic test allow the isolation and differentiation of clinical isolates of *S. aureus* from *S. epidermidis*, and *S. saprophyticus*.*

Key words: *nutrient media; Vogel-Johnson agar; Baird-Parker agar; staphylococci; lecithinase activity.*

For citation: Polosenko O. V., Shepelin A. P., Azhermacheva N. I., Abaev I. V. Clinical trials of new culture media for staphylococcus isolation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 115-121. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121>

For correspondence: *Polosenko O.V.*, Ph.D., leading researcher, microbiology unit; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

Information about authors:

Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;

Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;

Azhermacheva N. I., <http://orcid.org/0000-0002-8125-4699>;

Abaev I.V., <http://orcid.org/0000-0003-2724-557X>.

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

Acknowledgment. *The work was carried out within the sectoral program of Rospotrebnadzor.*

Received 17.08.2020

Accepted 07.09.2020

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* относятся к ведущим возбудителям внутрибольничных и внебольничных инфекций человека и способны вызывать раз-

ные по форме и тяжести заболевания: от поверхностных кожных инфекций до тяжёлых форм пневмонии, менингита, эндокардита и др. [1, 2]. Род *Staphylococcus*

Для корреспонденции: Полосенко О.В., ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

состоит из 47 видов: 11 видов коагулазопозитивных и 36 коагулазонегативных видов, причем 20 видов из них ассоциированы с болезнями человека [3].

Однако, наиболее распространенными и важными с медицинской точки зрения стафилококками являются коагулазопозитивный вид *Staphylococcus aureus* и два коагулазонегативных вида: *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus saprophyticus*. Стафилококки этих трех видов являются этиологическими агентами более чем сотни различных нозологических форм инфекционных заболеваний, в том числе, инфекций крови, урогенитальных и имплантат-ассоциированных инфекций. Массовые вспышки стафилококковых инфекций происходят за счёт токсигенных штаммов. Стафилококки, продуцирующие энтеротоксины, вызывают пищевые токсикоинфекции. Наибольшей опасности подвергаются группы населения с общей иммунной недостаточностью, в частности, люди старшего возраста и дети [4-7].

ВОЗ оценивает *S. aureus* как один из пяти наиболее важных бактериальных возбудителей пищевой токсикоинфекции [8, 9]. Вирулентность штаммов *S. aureus* при пищевых токсикоинфекциях связана с продукцией энтеротоксинов, которые стабильны в окружающей среде и способны сохранять активность в желудочно-кишечном тракте человека. Следует отметить, что органолептические свойства продуктов при размножении *S. aureus* и накоплении энтеротоксинов, не изменяются [10, 11].

Стафилококки способны продуцировать большое число факторов патогенности – токсинов и ферментов, что наряду с высокой устойчивостью к хлористому натрию, часто лежит в основе идентификации и дифференциации стафилококков с помощью фенотипических методов. Разнообразие нозологических форм инфекций *S. aureus* тесно коррелирует с большим числом различных экзопродуктов с выраженными токсическими свойствами [12, 13].

В последнее время в связи с ухудшением экологической ситуации участились случаи гнойно-септических поражений кожи, различных органов, слизистых оболочек коагулазоотрицательными видами стафилококков: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* и др. Инфекции, вызванные коагулазоотрицательными стафилококками, развиваются чаще всего у ослабленных больных со сниженной иммунологической защитой, у новорожденных, онкологических больных, при длительной антибактериальной терапии [14, 15].

Несмотря на бурное развитие ускоренных методов диагностики (молекулярно-генетические, иммунохроматографические методы, иммуноферментный анализ и др.) различных заболеваний для подтверждения наличия в клинических образцах стафилококков, по-прежнему, остается бактериологический метод – выявление и идентификация возбудителя с помощью питательных сред. Они позволяют определить таксономически значимые признаки выросших культур микроорганизмов, а, следовательно, и правильно их идентифицировать.

Широкое применение в практическом здравоохранении нашли питательные среды для накопления и выделения культуры стафилококка: солевой бульон, бульон Жиолитти-Кантони с добавлением теллурита калия, лактозо-солевой бульон с фенолрот, питательная среда для выращивания *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 8), питательная среда для идентификации *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 10) – маннит-солевой агар, питательная среда для

выделения стафилококков (стафилококкагар) [16-22].

Для первичного выделения стафилококков из исследуемого материала наиболее информативными и оптимальными являются дифференциально-диагностические среды, в которых элективность достигается высокой концентрацией хлористого натрия.

Недостатком некоторых солевых питательных сред для выделения стафилококков является то, что высокая концентрация хлористого натрия все же недостаточна для подавления некоторых штаммов протей. Высокая селективность современных питательных сред, таких как агары Байрд-Паркера, и Фогель-Джонсона обусловлена наличием хлорида лития и теллурита калия, а наличие в средах глицина и маннита компенсирует их ингибирующее действие на стафилококки.

В связи с этим необходимо применение сухих стандартных питательных сред, обладающих высокой чувствительностью, хорошими дифференцирующими, ростовыми и ингибирующими свойствами российского производства, позволяющими облегчить выделение и идентификацию стафилококков из исследуемого материала.

Как правило, штаммы *S. aureus* обладают лецитиназой и способностью к пигментообразованию, а культуры двух других видов: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* лишены их. Возможны исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью. Но, тем не менее тест на лецитиназу является необходимым для определения *S. aureus* [23]. Поэтому питательные среды: желточно-солевой агар (ЖСА), молочно-желточный-солевой агар (МЖСА), агар Байрд-Паркера, содержащие желточную эмульсию, предназначены для получения первоначальных ориентировочных данных о принадлежности культуры к виду *S. aureus*. Одним из основных тестов при окончательной идентификации изолятов, дающих положительный тест на лецитиназу является последующее определение наличия плазмокоагулазы, дополнительным тестом – способность ферментировать маннит на средах: маннит-солевой агар, агар Фогель-Джонсона.

Перечень отечественных питательных сред для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии обширен и неуклонно расширяется, а разработка современных микробиологических дифференциально-диагностических сред заслуживает отдельного наблюдения и исследования [20, 22].

Цель работы – сравнительный анализ качества разработанных питательных сред: Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая и зарубежных аналогов по результатам клинических испытаний.

Материал и методы. На базе бактериологической лаборатории Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ) в ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164 Федерального медико-биологического агентства» были проведены исследования образцов клинического материала с применением МИ (медицинских изделий): «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» производства ФБУН ГНЦ ПМБ с целью подтверждения возможности использования их по назначению.

В работе использованы 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ № 164 в период проведения клиниче-

ских испытаний МИ: Основа агар Байрд-Паркера сухая и Основа агар Фогель-Джонсона сухая.

Каждый исследуемый образец клинического материала был зашифрован и сопровождался направлением от лечащего врача с указанием предварительного диагноза, времени отбора образца и необходимости бактериологического исследования на наличие патогена и определения его основных биологических свойств. Исследование доставленных образцов в лабораторию осуществляли в течение 24 ч с момента забора каждого образца: были произведены высевы на питательные среды (включая испытуемую среду и среду сравнения), на которых были выделены клинические изоляты по методике, применяемой в бактериологической лаборатории ИЛЦ в соответствии с приказом Минздрава СССР № 535 от 22.04.85 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [23].

В качестве сред сравнения использовали Baird-Parker Agar Base (HiMedia) (lot. №0000230369) РУ № ФСЗ 2009/03709, эмульсию яичного желтка кат. № FD046, теллурида калия кат. № FD047, Vogel-Johnson Agar Base w/o Tellurite (V.J.Agar), (HiMedia) (lot. № 0000288489) РУ ФСЗ 2009/03705, теллурида калия (1 %; 2 %; 3,5% раствор) кат. № FD052, РУ № ФСЗ 2008/01440.

В качестве дополнительных питательных сред и добавок к ним были использованы: питательная среда для выделения стафилококков сухая (Стафилококкагар) РУ № ФСР 2011/10007, желточно-солевой агар (ЖСА) лабораторного приготовления, питательная среда для идентификации *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 10 ГРМ) РУ № ФСР 2007/ 00374, питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (среда Гисса-ГРМ с маннитом, с глюкозой, с лактозой, с сахарозой) РУ № ФСР 2008/ 03494, питательная среда для количественного определения микробной загрязненности (Среда № 1 ГРМ), калия теллурида, раствор 2% ООО Мини Мед, РУ № ФСР 2009/05371, плазма кроличья цитратная сухая НПО «Микроген», яйца куриные пищевые столовые, 1 категории по ГОСТ 31654-2012, водорода перекись медицинская ООО «Инновация» ТУ 2123-002-14356367-2004, фенолфталеинфосфат натрия ТУ 6-09-05-59, НПФ «Синбиас», кровь баранья дефибрированная, стерильная, кат. №50.99.РУ ФСР№2008/03081.

Определение функциональных характеристик питательных сред проводили в соответствии с действующими нормативными документами [23,24]. Качество испытуемых сред оценивали по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства с использованием набора тест-штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ГКПМ-Оболонск. Клинические образцы исследовались параллельно двумя специалистами путем одновременного высева на все питательные среды, заявленные в испытаниях.

Оценка статистической достоверности результатов испытаний клинических образцов оценивалась с учетом числа параллельных исследований и количества совпадений результатов исследований, проведенных разными исполнителями.

Для получения корректных данных были выполнены все звенья бактериологического исследования: от взятия клинического материала, транспортировки его в бакте-

риологическую лабораторию, идентификации возбудителя, до интерпретации полученных результатов [23, 24].

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы проведена сравнительная оценка качества разработанных питательных сред с коммерческими аналогами Baird-Parker Agar Base (HiMedia) и Vogel-Johnson Agar Base (HiMedia) (табл.1). Все питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению.

Агар Байрд-Паркера и Агар Фогель-Джонсона являются селективными средами за счет входящих в их состав хлорида лития и теллурида калия, которые подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов. Стафилококки характеризуются наличием фермента – теллуридредуктазы, поэтому на средах образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурида калия до теллура.

Главным диагностическим признаком агара Байрд-Паркера является выявление зон лецитиназной активности стафилококков, продуцирующих лецитиназу, в результате которой формируются характерные прозрачные и матовые зоны вокруг черных колоний стафилококков, а агара Фогель-Джонсона – выявление маннит ферментирующих стафилококков, изменяющих цвет среды вокруг колоний с красного на желтый в результате проявления кислых продуктов ферментации маннита.

Отличием разработанных питательных сред «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» от импортных аналогов является использование в составах сред отечественных белковых основ: панкреатического гидролизата казеина разной степени расщепления.

Белковой основой питательной среды «Основа агара Байрд-Паркера сухая» является панкреатический гидролизат казеина со степенью расщепления 30–35%. Глицин и пируват натрия, защищая поврежденные микробные клетки, стимулируют рост стафилококков, что способствует выделению культуры.

При разработке компонентного состава питательной среды «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в качестве питательной основы использовали панкреатический гидролизат казеина (ПГК), а также гидролизат казеина низкой степени расщепления (ГКНСР), который обеспечивает ростовые потребности стафилококков, обладающих протеолитической активностью, но в значительной мере уменьшает скорость роста сопутствующих микроорганизмов [19]. Состав разработанной питательной среды «Питательная среда для селективного выявления патогенных маннитположительных стафилококков» защищен патентом [25].

Специфическая активность и ингибирующие свойства оценивались по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств тест-штаммов при росте на приготовленных питательных средах: агара Байрд-Паркера после внесения в основу 2 % раствора теллурида калия и желточной эмульсии, агара Фогель-Джонсона – после внесения в основу 2 % раствора теллурида калия. Инкубация посевов 48 ч при температуре (37±1) °С.

Фотоизображение роста некоторых контрольных тест-штаммов на приготовленном агаре Байрд-Паркера (основа+2 % р-р теллурида калия+желточная эмульсия) и агаре Фогель-Джонсона (основа+2 % р-р теллурида калия) и сред сравнения Baird-Parker Agar Base + до-

Сравнительная характеристика питательных сред по биологическим показателям на контрольных тест-штаммах

Наименование тест-штаммов, разведение (м.к./мл)	Агар Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Baird-Parker Agar Base (HiMedia)	Агар Фогель-Джонсона (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Vogel-Johnson Agar Base (HiMedia)	ГРМ-агар (контроль)*
	Количество, диаметр (мм), свойства колоний через 48 ч				
<i>S. aureus</i> «Виотко», 10 ⁻⁶	71, 70 1,6-1,8 черные, с зоной протеолиза	72, 75 1,6-2,0 черные, с зоной протеолиза	71, 79 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	43, 46 1,6-2,0 черные, с желтой зоной	55, 48 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. aureus</i> Wood-46 ATCC 10832, 10 ⁻⁶	68, 61 1,0-1,2 черные, с зоной липолиза и протеолиза	69, 68 1,0-1,2 черные, с зоной липолиза и протеолиза	78, 76 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	75, 77 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	67, 70 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P FDA 209, 10 ⁻⁶	52, 43 0,5 черные, с зоной липолиза протеолиза	47, 50 0,5 черные, с зоной липолиза протеолиза	49, 52 0,5-1,0 черные, с желтой зоной	46, 49 1,0-1,5 черные, с желтой зоной	45, 48 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305 CCM 883, 10 ⁻⁵	55, 64 менее 0,5 точечные черные	47, 50 менее 0,5 точечные черные	69, 66 0,8-1,0 черные	52, 54 1,2-1,4 черные	67 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990, 10 ⁻⁵	55, 58 менее 0,5 точечные черные	55, 53 менее 0,5 точечные черные	98, 92 0,5-0,8 черные	120, 111 0,2-0,3 черные	90 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>P. mirabilis</i> 3177, 10 ⁻⁴	30, 28 менее 1,0 коричневые, в R-форме	отсутствие роста	отсутствие роста	более 100 1,0-1,5 черные	сплошной рост, роение
<i>E. coli</i> ATCC 25922, 10 ⁻⁴	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста	сплошной рост

Примечание. * – инкубация посевов 24 ч при температуре 37±1 °С.

бавки (HiMedia) и Vogel-Johnson Agar Base w/o Tellurite (V.J. Agar) +добавки (HiMedia) представлено на рис. 1, а, 1, б, 2, а, 2, б (см. обложку).

Таким образом, испытуемые питательные среды обеспечивали рост и предварительную дифференциацию стафилококков по продукции лецитиназы при росте на агаре Байрд-Паркера и ферментации маннита на агаре Фогель-Джонсона.

Сравнительная оценка функциональных характеристик МИ «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства показала соответствие испытуемых сред зарубежным аналогам.

Второй этап работы включал клинические испытания МИ: «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая». Испытания проводились в лабораторных условиях с применением остаточных образцов биоматериала пациентов, взятых в ходе лечебно-диагностического процесса для проверки функциональных свойств, эффективности, качества и безопасности медицинских изделий «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» при использовании в соответствии с назначением питательных сред.

Проанализировано 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ № 164 в период проведения клинических испытаний медицинских изделий с направлением от лечащего врача (мокрота – 14, мазок из инфицированных ран – 3, мазок из носа – 29, мазок из зева – 24, мазок из уха – 5, мазок из глаза – 2, испражнения – 25, кровь – 1, моча – 13).

Тампоны-зонды с взятыми образцами помещались в стерильные пробирки и немедленно доставлялись в лабораторию ИЛЦ. В лаборатории осуществлялась подготовка доставленных образцов для соблюдения равнозначности исследования в соответствии с приказом Минздрава СССР № 535 [23]. После подготовки материал рассевали прямым методом по поверхности сред при помощи петли.

Предварительно через 24 ч, затем 48 ч инкубации посевов при температуре (37±1) °С визуально учитывали наличие и характер роста микроорганизмов, выросших на всех средах. Высевы осуществлялись сразу на несколько сред, для обнаружения возможного наличия стафилококков: желточно-солевой агар (ЖСА), Стафилококкагар; а также на Питательную среду № 1 с добавлением крови (кровяной агар) для выявления гемолитической активности. После инкубации для дальнейшего исследования были отобраны характерные колонии искомым патогенов (стафилококков). Отобранные визуально «подозрительные» колонии затем были отсеяны на среды для дополнительной идентификации и проведены идентификационные тесты.

В результате посева 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ №164 в период проведения клинических испытаний МИ: «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая», стафилококки были обнаружены в 46 образцах, из которых выделено:

46 культур предполагаемых возбудителей заболевания при посеве на испытуемые среды: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5.

46 культур предполагаемых возбудителей заболевания с контрольных сред: желточно-солевой агар, стафи-

Результаты клинических испытаний *

Исследуемый материал	Предварительный диагноз	Агар Байрд-Паркера (основа с добавками) ФБУН ГНЦ ПМБ	Baird-Parker Agar Base (основа с добавками) HiMedia	Агар Фогель-Джонсона с 2 % раствором теллуриата калия ФБУН ГНЦ ПМБ	Vogel-Johnson Agar Base HiMedia с 2 % раствором теллуриата калия	Питательные среды, на которых подтверждено выделение патогена	Выделенный предполагаемый возбудитель**
Мазок из зева/носа (26 образцов)	Хронический тонзилит/ ангина/ ОРЗ/ОРИ	Черные колонии с прозрачными матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Отделяемое глаз (2 образца)	Конъюнктивит	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (рост, пигмент -)	<i>S. epidermidis</i>
Мазок из уха (1 образец)	Гнойный отит	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Гнойное отделяемое раны левого бедра (3 образца)	Абсцесс	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (рост, пигмент -)	<i>S. epidermidis</i>
Мокрота (2 образца)	Острый трахеит	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Испражнения (6 образцов)	Дисбактериоз Паратифт ОКИ Диспепсия	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Моча (6 образцов)	Цистит Беременность Уретрит	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (пигмент -)	<i>S. saprophyticus</i>

Примечание. * – результаты посева каждого образца вторым специалистом аналогичны; ** – принадлежность к данному роду/виду определена после постановки дополнительных тестов.

лококкагар – *S. aureus* -35; *S. epidermidis* – 6; *S. saprophyticus* – 5.

Результаты клинических испытаний представлены в табл. 2 (отрицательные образцы не указаны).

В остальных образцах ни на одной из сред стафилококки не обнаружены.

Идентификацию выделенных изолятов проводили с использованием различных питательных сред. Среды Гисса использовали для определения ферментативных свойств в отношении сахарозы, маннита, глюкозы, лактозы. Кровь баранья использовалась для выявления гемолитической активности (при добавлении к среде №1 ГРМ). Желточная эмульсия применялась для определения лецитиназной активности. Перекись водорода использовалась для определения каталазной активности (на питательной среде №1 ГРМ). Фенолфталеинфосфат

натрия использовали для постановки теста на фосфатазу. 2% раствор теллуриата калия применяли для выявления фермента – теллуриредуктазы. Плазма кроличья использовалась для постановки коагулазного теста (на наличие свёртывающего фактора).

Все испытания проводились двумя специалистами в разных помещениях бактериологической лаборатории ИЛЦ одновременно. Результаты испытаний, проведенные двумя специалистами, совпали полностью: типичная морфология колоний, размеры, цвет, количество и скорость роста на испытуемых средах и средах сравнения были оценены и подтверждены обоими специалистами одинаково. Отмечено, что из выделенных 5 изолятов *S. saprophyticus* маннитположительных выявлено не было; из выделенных 6 изолятов *S. epidermidis* не было выявлено культур, обладающих гемолитической и лецитиназной активностью.

Всего на базе бактериологической лаборатории ИЛЦ в ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164 ФМБА» было исследовано 116 образцов клинического материала, из них выявлено положительных 46 изолятов стафилококков. Таким образом, на всех четырех использованных при работе питательных средах получено 184 положительных результата, что подтверждает отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

В соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации (Москва, 2018)» по статистической обработке данных согласно приложению В, проведена оценка статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов при доверительной вероятности 90% и показано, что истинное значение найденных положительных находок составляет не менее 96 %

Заключение. По среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая»: в результате испытаний при посеве клинических образцов подтверждены диагностические характеристики – на испытуемой среде и среде сравнения визуально четко наблюдали наличие характерных для стафилококков колоний черного цвета, окруженных прозрачной зоной протеолиза или зоной протеолиза с непрозрачной зоной липолиза.

По среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая»: в результате испытаний при посеве клинических образцов подтверждены диагностические характеристики – на испытуемой среде и среде сравнения наблюдали наличие характерных для стафилококков колоний черного цвета. Ферментирующие маннит стафилококки, формировали на среде черные колонии, окруженные желтой зоной; не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг колоний.

Проявление лецитиназной активности на среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и ферментации маннита на среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в предварительном фенотипическом тесте позволяет выделять и дифференцировать клинические изоляты *S. aureus* от *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Таким образом, анализ биологических характеристик разработанных питательных сред Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая по результатам клинических испытаний доказал высокое качество и эффективность препаратов в сравнении с зарубежными аналогами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-11, 13 см. REFERENCES)

12. Абаев И.В., Скрыбин Ю.П., Коробова О.В., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 294-8.
14. Корниенко М.А., Копыльцов В.Н., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В. и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34 (1): 18-25.
15. Меньшиков В.В., ред. Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Т. 4. Справочник. 2003; 343-50.

16. Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В. Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред. *Бактериология*. 2018; 3(2): 64-71.
17. Шепелин А. П., Дятлов И. А., Полосенко О. В. Питательные среды для контроля качества пищевой продукции. *Современная лабораторная диагностика*. 2017; 1: 1: 22-5.
18. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И. Бактериологическая диагностика стафилококковых инфекций. *Справочник заведующего КДЛ*. 2018; 2: 37-44.
19. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Дятлов И.А. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; 4 (56): 39-43.
20. Попова А.Ю., Дятлов И.А., ред. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. 2020.
21. Шепелин И. А., Миронов А. Ю., Шепелин К. А. Питательные среды. *Справочник бактериолога*. 2-изд. 2018.
22. Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Шепелин А. П., Алешкин В. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (8): 61-5.
23. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Минздрава СССР № 535; 1985.
24. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
25. Питательная среда для селективного выявления патогенных маннитположительных стафилококков. Патент RF 2 620 965 С2. – № 2015143570/15; 2017.

REFERENCES

1. Plata K., Rosato A.E., Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an Infectious Agent: Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of Its Pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*. 2009; 56: 597-612.
2. Chambers H.F., Deleo F.R. Waves of resistance in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 629–41. doi: 10.1038/nrmicro2200.
3. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014;27(4):870-926. doi:10.1128/CMR.00109-13.
4. Murray R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005; 35 Suppl 2: 106-19.
5. Kadariya J, Smith TC, Thalipaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Bio Med Research International*. 2014; doi: 10.1155/2014/827965.
6. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61: 1–10. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00377-9.
7. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2010; 2:1751–73. doi: 10.3390/toxins2071751
8. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases 2015. World Health Organization; 2015. English ISBN 978 92 4 156516 5. https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/
9. EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015. *European Food Safety Authority journal*. 2016; 14: 4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
10. Pinchuk I.V, Beswick E.J, Reyes V.E. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2010; 2(8): 2177–97
11. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol.* 2009; 133: 186-94
12. Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P. Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin

- genes of *Staphylococcus aureus* clinical strains, isolated in Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (5): 294-298 (in Russian)
13. Sato Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, et al. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2637–40. doi: 10.1128/JCM.00661-14.
 14. Kornienko M. A., Kopyltsov V. N., Shevlyagina N. V., Didenko L. V., Lyubasovskaya L. A., Pripitnevich T. V. et al. The ability of staphylococci of various types to form biofilms and their impact on human cells. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2016; 34 (1): 18-25. (in Russian)
 15. Menshikov V. V., ed. *Spravochnik. Clinical laboratory Analytics. Private analytical technologies in a clinical laboratory. Vol.3. [Klinicheskaya laboratornaya analitika. Chastnye analiticheskie tekhnologii. Tom 3].* 2003. (in Russian)
 16. Shepelin A. P., Sergeeva A. B., Polosenko O. V. In the detection of staphylococci using modern import-substituting nutrient media. *Bakteriologiya*. 2018; 3(2): 64-711 (in Russian)
 17. Shepelin A. P., Dyatlov I. A., Polosenko O. V. Nutrient media for quality control of food products. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika* 2017; 1: 22-5. (in Russian)
 18. Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I. Bacteriological diagnostics of staphylococcal infections. *Spravochnik zaveduyushhego KDL*. 2018; 2: 377-44. (in Russian)
 19. Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I., Sholokhova L. P., Dyatlov I. A. Nutrient media for detecting staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; 4 (56): 39-43. (in Russian)
 20. Microbiological quality control of food products [Mikrobiologicheskiiy kontrol kachestva pishchevoy promyshlennosti]. Popova A. Yu., Dyatlov I. A., eds. 2020. (in Russian)
 21. Shepelin I. A., Mironov A. Yu., Shepelin K. A. Nutrient media [Pitateanye sredy]. *Spravochnik bakteriologa*. 2nded. 2018 (in Russian)
 22. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Aleshkin V. A. The state and development trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60 (8): 61-5. (in Russian)
 23. On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. *Prikaz Minzdrava SSSR No.535*; 1985. (in Russian)
 24. Methods to control bacteriological nutrient media. *Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.2316-08*. Moscow: Federalnyi tsentr gigieny I epidemiologii. Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)
 25. Culture medium for selective detection of pathogenic mannitol-positive staphylococci. Patent RU 2 620 965 C2. -No. 2015143570/15; 2017. (in Russian)

Поступила 17.08.20
Принята к печати 07.09.20

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Акимов И.А.¹, Тимофеев Д.И.¹, Мавзютов А.Р.^{2,3}, Иванов М.К.¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ RF1_2K/1B ВИРУСА ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹АО «Вектор-Бест», 630117, Новосибирск, Россия;

²ООО ИЦ «Лаборатория», 450075, Уфа, Россия;

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

В мире около 70 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС), и около 400 тыс. умирают ежегодно от осложнений хронического гепатита С. Ведение пациентов с хроническим гепатитом С может требовать генотипирования ВГС, поскольку эффективность некоторых широко применяемых противовирусных препаратов сильно зависит от вирусного генотипа и/или субтипа. Наиболее распространенная циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, RF1_2k/1b, ошибочно классифицируется как генотип 2 многими коммерческими наборами для генотипирования ВГС, основанными на ОТ-ПЦР анализе 5'-нетранслируемой области генома вируса. Это приводит к неправильному лечению пациента, поскольку, принятые схемы лечения ВГС генотипа 2 неэффективны при инфицировании рекомбинантным вариантом RF1_2k/1b. В данной работе мы описали способ обнаружения РНК ВГС RF1_2k/1b в образцах крови методом ОТ-ПЦР анализа в реальном времени двух локусов вирусного генома (5'UTR и NS5b). Метод апробирован на 240 образцах сыворотки крови инфицированных ВГС пациентов, в которых генотип вируса был определен как 2 или микст-инфекция (2+1) или (2+3) двумя коммерческими наборами «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) и «ОТ-Гепатоген-С генотип» (ООО «ДНК-Технология», Москва). Выявлено 50 (20.8%) случаев рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b, в том числе три смешанных инфекции: RF1_2k/1b + 1a, RF1_2k/1b + 3a, RF1_2k/1b + 1b. Во всех случаях правильность типирования ВГС предложенным методом подтверждена секвенированием по методу Сэнгера и филогенетическим анализом. Разработанный метод легко внедряется в клиническую практику и может использоваться в лабораториях, оборудованных для проведения ОТ-ПЦР анализа, чтобы правильно идентифицировать генотип RF1_2k/1b.

Ключевые слова: вирус гепатита С; рекомбинанты ВГС; RF1_2k/1b; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Акимов И.А., Тимофеев Д.И., Мавзютов А.Р., Иванов М.К. Выявление циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С в сыворотке крови пациентов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 122-128. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128>
Akimov I.A.¹, Timofeev D.I.¹, Mavzyutov A.R.^{2,3}, Ivanov M.K.¹

DETECTION OF CIRCULATING HCV RECOMBINANT FORM RF1_2K/1B IN BLOOD SERUM OF PATIENTS BY REAL-TIME RT-PCR

¹АО «Vector-Best», 630117, Novosibirsk, Russia;

²Research Center «Laboratory», 450075, Ufa, Russia;

³Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia

Globally, about 70 million people are infected with the hepatitis C virus (HCV), and about 400 thousand people die annually from chronic hepatitis C complications. The management of patients with chronic hepatitis C may require HCV genotyping, since the efficiency of some widely used antiviral drugs strongly depend on the viral genotype and/or subtype. The most prevalent HCV circulating recombinant form, RF1_2k/1b, is misclassified as genotype 2 by many commercial HCV typing kits, based on the RT-PCR analysis of the 5' untranslated region of the HCV genome. This leads to inappropriate patient treatment, since the accepted treatment schemes for HCV genotype 2 are ineffective for the RF1_2k/1b. Here we describe a method for detecting the RNA HCV RF1_2k/1b in blood samples by RT-PCR analysis of two regions in HCV genome (5'UTR and NS5b). The method was tested on 240 blood serum samples from HCV infected patients, in which HCV genotype was defined as 2 or mixed (2+1 or 2+3) by the two commercial genotyping kits "OT-HepatoGen-C genotype" ("DNA-Technology", Moscow) and "RealBest RNA HCV-1/2/3" ("Vector-Best", Novosibirsk). 50 (20.8%) RF1_2k/1b cases were revealed, including three mixed infections: RF1_2k/1b + 1a, RF1_2k/1b + 3a, RF1_2k/1b + 1b. In all cases, the accuracy of HCV typing by the proposed method was confirmed by Sanger sequencing and phylogenetic analysis. The method is easy to implement into clinical practice and may be used in clinical settings equipped for RT-PCR analysis to correctly identify the recombinant variant RF1_2k/1b.

Key words: HCV; HCV recombinants; RF1_2k/1b; Real-Time PCR.

For citation: Akimov I.A., Timofeev D.I., Mavzyutov A.R., Ivanov M.K. Detection of circulating HCV recombinant form RF1_2k/1b in blood serum of patients by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (2): 122-128 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128>

For correspondence: Akimov Ivan Alekseevich, PhD, scientific researcher of the PCR laboratory of AO «Vector-Best»; e-mail: akimov@vector-best.ru

Information about authors:

Akimov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5299-6917>;
Timofeev D.I., <https://orcid.org/0000-0001-8615-5983>;
Mavzyutov A.R., <https://orcid.org/0000-0001-5943-1882>;
Ivanov M.K., <https://orcid.org/0000-0001-7503-2435>.

Acknowledgment. *The authors declare no external financing.*

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

Received 17.09.2020
Accepted 26.10.2020

Введение. В мире около 70 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС). Ежегодно регистрируют около 2 млн новых случаев заражения. От осложнений хронического гепатита С (ХГС) ежегодно умирают 400 тыс. человек [1-3]. Разработанные схемы лечения больных ХГС значительно замедляют развитие заболевания, предупреждают возникновение цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы печени и, в итоге, снижают смертность [4, 5].

В настоящее время на основании филогенетического анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммы ВГС подразделяют на 7 основных генотипов, каждый из которых, в свою очередь, делят на субтипы [6, 7]. Установлено, что пациенты, инфицированные ВГС генотипов 1, 2 и 3, которые наиболее распространены в мире и в России, по-разному отвечают на противовирусную терапию [4, 8]. Поэтому определение генотипа ВГС может иметь важное значение при назначении терапии определёнными препаратами [5, 9]. Известно, что, инфицированные ВГС генотипов 2 или 3, лучше поддаются классической терапии пэгинтерферон/рибавирином, быстрее и значительно чаще достигают устойчивого вирусологического ответа, чем зараженные генотипом 1 [8]. В этой связи для разных генотипов ВГС предписанные схемы лечения различаются по дозировкам и длительности терапии [4, 5]. На рынке также имеются препараты прямого противовирусного действия (ППВД), которые действуют непосредственно на белки ВГС, препятствуя его размножению, и обладают как генотип-специфичным, так и пангенотипным действием [10-12]. Они обладают более высокой эффективностью и меньшим побочным действием, чем комбинация пэгинтерферон/рибавирин [13]. При выборе оптимальной тактики лечения генотип-направленными препаратами прямого действия также необходимо определение генотипа вируса, а при инфицировании генотипом 1 – дополнительно определение субтипа (1a или 1b) [4, 5, 14, 15].

В течение многих лет после открытия ВГС в 1989 году, генетическое разнообразие вируса связывали с высокой частотой возникновения мутаций, накапливаемых в его геноме. А другой фундаментальный механизм изменчивости – рекомбинацию, происходящую между РНК ВГС различных генотипов, исключали, полагая, что такие варианты, если и образуются, то не являются жизнеспособными [16-19]. Однако, в Санкт-Петербурге впервые была обнаружена циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, названная RF1_2k/1b [20]. Сформировалась она посредством гомологичной рекомбинации между геномами субтипов 2k и 1b. Сайт рекомбинации расположен в гене NS2 ВГС таким образом, что все его структурные гены относятся к субтипу 2k, а неструктурные – к 1b, наиболее трудно поддающемуся лече-

нию комбинацией пэгинтерферон/рибавирин [21, 22]. Данная рекомбинантная форма ВГС была впоследствии обнаружена в Грузии, Узбекистане, Ирландии, Франции, Германии, Кипре, Израиле и других странах [23-26]. Установлено, что этот вариант вируса возник на территории бывшего СССР в период с 1923 по 1956 г. [24, 25].

К настоящему времени описано 17 рекомбинантных форм ВГС [21, 26], 9 из которых зарегистрированы в международной таксономической классификации (https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/38/table-4-recombinant-rt-hcv-genomes). Кроме штаммов 2b/1a, 2b/1b и RF1_2k/1b, другие рекомбинанты ВГС были выявлены лишь однократно. Сегодня RF1_2k/1b – это единственный рекомбинантный вариант ВГС, широко распространенный в мире и имеющий эпидемиологическое значение [25].

Сейчас на российском рынке отсутствуют зарегистрированные тесты для выявления рекомбинантов ВГС. При использовании имеющихся наборов реагентов для генотипирования, рекомбинант RF1_2k/1b ошибочно определяется как генотип 2 [27]. Это представляет собой серьезную проблему, поскольку есть данные о том, что рекомендуемые схемы лечения зараженных генотипом 2 ВГС, малоэффективны для лиц, инфицированных RF1_2k/1b [28-33]. Вероятность ошибки при назначении курса терапии значительно возрастает в регионах, где этот вариант вируса имеет широкое распространение. Установлено, что в Грузии, где 7.7% взрослого населения заражено ВГС, 69 – 76% клинических образцов с ВГС, первоначально определяемых как генотип 2, в действительности являются RF1_2k/1b [27, 28, 34].

В настоящее время для выявления рекомбинантов ВГС используют секвенирование как минимум двух, удаленных друг от друга геномных локусов вируса (чаще всего 5'UTR и NS5b), и последующий филогенетический анализ [35-37]. Сложность проведения и высокая стоимость этого метода ограничивают его применение в клинической практике, для которой крайне необходима более простая и доступная методика определения геноварианта RF1_2k/1b, позволяющая анализировать достаточно большое количество клинических образцов.

Цель настоящего исследования – апробация метода выявления циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b ВГС в сыворотке крови пациентов с помощью обратной транскрипции, совмещенной с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Материал и методы. В работе исследовали 240 образцов сыворотки крови больных, инфицированных ВГС. Первоначальный анализ, проведенный в ООО ИЦ «Лаборатория» (Уфа) с помощью набора реагентов «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск), показал присутствие во всех пробах этой вы-

борки РНК ВГС генотипа 2, в том числе в двух образцах в сочетании с генотипом 1, а в одном – с генотипом 3. Все образцы были зашифрованы, архивированы и хранились при -70°C до проведения дополнительных исследований.

Выделение РНК ВГС из сыворотки крови для генотипирования методом ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с помощью набора «РеалБест экстракция 1000» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Дополнительное исследование образцов проводили в лаборатории ПЦР АО «Вектор-Бест» с использованием теста «ОТ-Гепатоген-С генотип» (ООО «ДНК-Технология», Москва), а трех проб с наличием более одного генотипа ВГС – также набора «АмплиСенс HCV-генотип-FL g1-6» (ООО «ИнтерЛаб-Сервис», Москва).

В предлагаемом методе определения геноварианта RF1_2k/1b каждый образец РНК исследовали с помощью ОТ-ПЦР-РВ одновременно в двух пробирках, содержащих лиофилизированные готовые реакционные смеси [38] (ГРС1, 2), которые позволяют выявлять участки генома ВГС, специфичные для генотипа 2 и субтипа 1b (табл. 1).

Подбор генотип-специфичных олигонуклеотидных праймеров и зондов (табл. 2) осуществляли так, чтобы они не формировали стабильных димеров между собой и с последовательностями нецелевых локусов. При их дизайне использовали нуклеотидные последовательности ВГС генотипа 2 и субтипа 1b, представленные в базах данных NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) и Los Alamos National Laboratory (<https://hcv.lanl.gov>).

ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера CFX96 (Bio-Rad, США) по протоколу: 45°C – 30 мин, 94°C – 1 мин; далее 50 циклов: 94°C – 10 сек, 60°C – 20 сек (измерение флуоресценции при 60°C). В каждую пробирку с ГРС вносили 50 мкл раствора выделенной РНК.

Таблица 1

Фрагменты генома и генотипы ВГС, определяемые с помощью ГРС1, 2

Пробирка	Исследуемый участок гена	Определяемый генотип / субтип ВГС
ГРС1	5'UTR	2
ГРС2	NS5b	1b

Таблица 2

Праймеры и зонды*, использованные для детекции генотипа 2 и субтипа 1b ВГС

Наименование	Последовательность 5'→3'
5'UTR, тип 2	G2F CCCGGGAGAGCCATAGT
	G2R CAAGCACCCSTATCAGGCAGT
	G2P FAM-ACCCACTCTATGCCCGCCATTTGGGC-GTGCC-BHQ1
NS5b, тип 1b	bF1 ACATGTTACTTGAAGGCCWCT
	bF2 ACATGTTACTTGAAGCCCTCT
	bF3 ACATGCTACTTGAAGCCCTCT
	bR1 ATAGCCTCCGTGAAGACTCGTA
	bR2 GTCGTATTCTGGTTGGGGC
	bP1 R6G-AGGTCGTCTCCGCACACGAGCATC-BHQ1
	bP2 R6G-AGGTCGTCTCCGTTCACGAGCATC-BHQ1
bP3 R6G-AGGTCGTCTCCGCACACGAGCATT-BHQ1	

Примечание. * FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; R6G: 6-карбоксихлорофлуоресцеин.

Ампликоны участков 5'UTR, NS2, NS5b генома ВГС для последующего секвенирования нарабатывали с помощью термоциклера T100 (Bio-Rad), методом одностадийной ОТ-ПЦР, используя, соответственно, пары праймеров: 5UTRF и 5UTRR (специфичные к 5'UTR всех генотипов ВГС), NS2F и NS2R (специфичные к рекомбинанту RF1_2k/1b ВГС), NS5bF1 и NS5bR1 (специфичные к NS5b всех генотипов ВГС), NS5bF2 и NS5bR2 (специфичные к NS5b субтипа 1b) (табл. 3).

ОТ-ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей по 0.25 мкМ прямого и обратного праймеров, лиофилизированный «мастер-микс» (АО «Вектор-Бест») и 10 мкл раствора выделенной РНК. Реакцию проводили по протоколу: 45°C – 30 мин, 94°C – 10 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 30 сек.

Секвенирование полученных продуктов амплификации по методу Сэнгера выполняли в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск), для интерпретации секвенограмм применяли программу Chromas 2.6.4 (<http://technelysium.com.au>). Для проб, в которых были обнаружены более одного генотипа ВГС, по гетерогенной секвенограмме выявляли одновременное наличие смеси двух разных последовательностей, на основании присутствующих мажорных и минорных пиков.

Дизайн олигонуклеотидов выполнен в программе OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Синтез олигонуклеотидов осуществлён в лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест». Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы Unipro UGENE 35.0 (<http://ugene.net>). Филогенетический анализ выполняли методом «Neighbor-Joining» (NJ) в программе MEGA 6.06 (<http://megasoftware.net>). Гомологию последовательностей сравнивали с использованием сетевых on-line ресурсов: NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), NCBI Genotyping (<https://ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) и Los Alamos National Laboratory (https://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html). Определение точки рекомбинации выполняли методом «BootScan» в программе RDP 4.95 (<http://web.cbio.uct.ac.za>).

Результаты и обсуждение. В результате генотипирования образцов с помощью набора «ОТ-Гепатоген-С генотип» в 237 пробах был определен только генотип 2, так же как при первоначальном генотипировании с применением теста «РеалБест РНК ВГС-1/2/3». В пробах №8 и 42 кроме генотипа 2 ВГС были обнаружены, соответственно, субтипы 1a и 1b, а в №17 – генотип 3.

Таблица 3

Праймеры, применяемые для амплификации и секвенирования фрагментов генома ВГС

Наименование	Последовательность 5'→3'	Длина ампликона, п.н.
5UTRF	ACTCCCCTGTGAGGAACT	301
5UTRR	TGCACGGTCTACGAGACCT	
NS2F	GTTTGACATAACCAAGTGGCT	513
NS2R	TCGACCTGGTCTTGTCC	
NS5bF1	GAYACCCGYTGCTTTGACTC	380
NS5bR1	TAYCTGGTCATAGCCTCCGT	
NS5bF2	GACTA-ATTCAAAAAGGGCAGAACT	280
NS5bR2	GTCGTATTCTGGTTGGGGC	

Таблица 4

Результаты генотипирования ВГС в трех образцах сыворотки крови использованием трех различных наборов реагентов

№ образца	Генотипы / субтипы ВГС, выявленные с помощью набора		
	РеалБест РНК ВГС-1/2/3	ОТ-Гепатоген-С генотип	АмплиСенс HCV-генотип-FL g1-6
8	2 + 1	2 + 1a	2 + 1a
17	2 + 3	3	2 + 3a
42	2 + 1	2 + 1b	2 + 1b

При дополнительном исследовании этих трех проб с помощью набора «АмплиСенс HCV-генотип-FL g1-6» результаты, полученные для № 8 и 42, полностью совпали с данными теста «ОТ-Гепатоген-С генотип», а в пробе №17 выявлены генотип 2 и субтип 3a (табл. 4). Сходные результаты для всех трех проб №8, 42 и 17 получены при генотипировании тестом «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» с учетом того, что последний не позволяет дифференцировать субтипы ВГС.

При анализе образцов с помощью предлагаемого в данной работе метода результаты интерпретируют следующим образом. Если положительный сигнал детектируется только в ГРС1, то результат интерпретируется как «генотип 2»; если только в ГРС2 – как «субтип 1b». Если положительный сигнал детектируется одновременно в ГРС1 и ГРС2, то это указывает на присутствие в пробе рекомбинанта RF1_2k/1b.

При анализе всей выборки образцов с использованием разработанного нами метода в 190 пробах был определен только генотип 2 ВГС (табл. 5). В других 47 пробах этот генотип выявлялся одновременно с субтипом 1b, что соответствует наличию в исследуемых сыворотках крови рекомбинанта RF1_2k/1b. Такой же результат получен при тестировании проб №8, 17, 42.

Для подтверждения присутствия RF1_2k/1b в 50 образцах проведено секвенирование методом Сэнгера участков локусов 5'UTR, NS2 и NS5b во всех этих пробах. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей верифицировал данные генотипирования, вы-

Таблица 5

Результаты исследования 240 образцов сыворотки крови пациентов, инфицированных ВГС, с помощью предлагаемого нами метода

Количество образцов, №	Результат ОТ-ПЦР при исследовании образца в пробирке (определяемый генотип / субтип ВГС)	
	ГРС1 (генотип 2)	ГРС2 (субтип 1b)
190	+	-
47	+	+
3 (№ 8, 17, 42)	+	+

полненного разработанным методом. Все образцы с положительным результатом ОТ-ПЦР-РВ одновременно в пробирках с ГРС1 и ГРС2 содержали фрагмент 5'UTR, соответствующий генотипу 2 ВГС (рис. 1), а участок гена NS5b – субтипу 1b (рис. 2).

Нуклеотидные последовательности фрагмента NS2, определенные в этих пробах, соответствуют геноварианту RF1_2k/1b (рис. 3, 4).



Рис 1. Филогенетическое дерево, построенное методом NJ в программе MEGA 6.06, для нуклеотидных последовательностей фрагмента локуса 5'UTR длиной 238 н. в секвенированных образцах № 01 – 50.

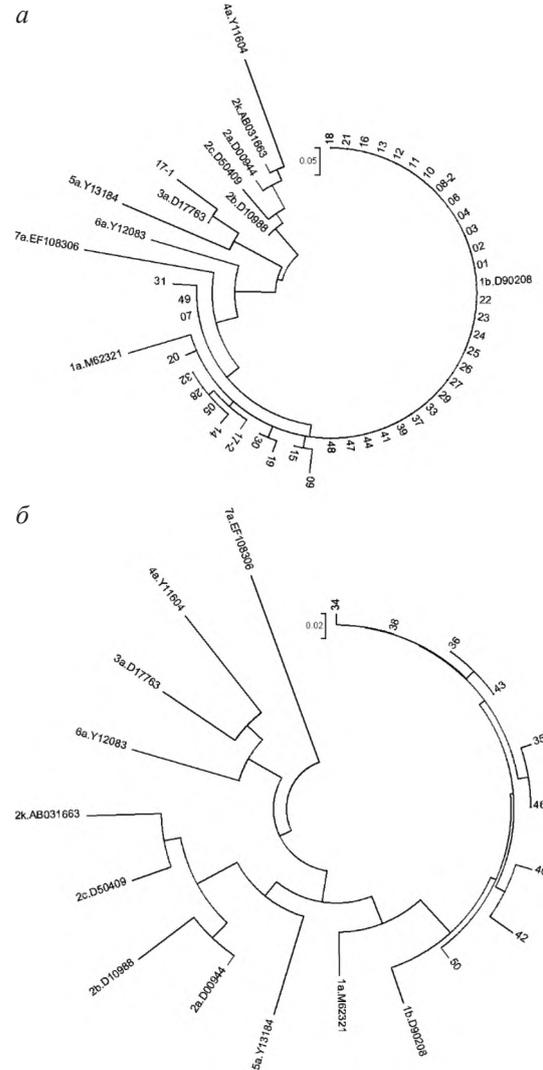


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное методом NJ в программе MEGA 6.06, для нуклеотидных последовательностей фрагментов гена NS5b длиной 340 н. (а) или 238 н. (б) в секвенированных образцах № 01 – 50.

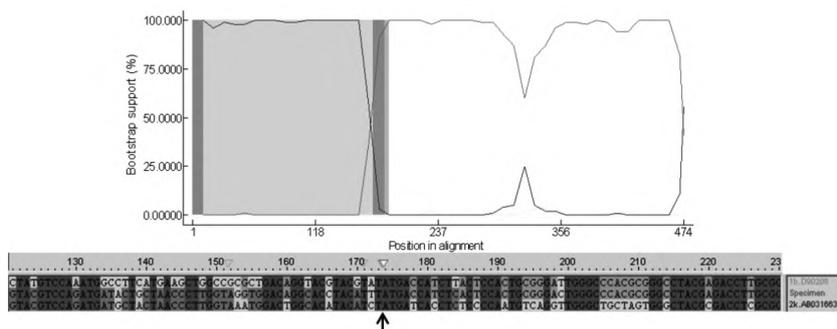


Рис. 3. Результат «BootScan» анализа рекомбинантных РНК по последовательности фрагмента NS2 на примере образца № 20 выполненный в программе RDP 4.95. Исходные генотипы представлены субтипами 2k (AB031663) и 1b (D902208). Стрелка указывает определенное программой место рекомбинации.

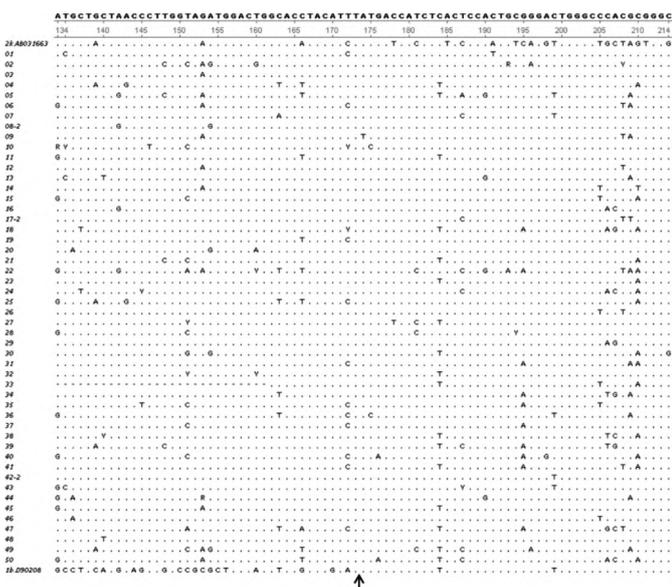


Рис. 4. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса NS2 в секвенированных образцах № 01 – 50. В качестве референсных использованы последовательности 2k.AB03166 и 1b.D902208 из базы данных NCBI. Место рекомбинации указано стрелкой.

В пробе №8 разработанным нами методом, в дополнение к результатам, полученным с помощью коммерческих тестов (табл. 4), определено наличие субтипа 1b (табл. 5). Секвенированием по методу Сэнгера установлено, что в этой пробе содержатся сразу две нуклеотидные последовательности локуса 5'UTR, соответствующие генотипу 1 (РНК №08-1) и 2 (РНК №08-2) (рис. 1, 5), а также последовательность участка гена NS5b, принадлежащая субтипу 1b (рис. 2A). Фрагмент гена NS2 соответствует геноварианту RF1_2k/1b (см.рис. 4).

Секвенированием образца № 17 установлено, что в нем содержатся одновременно два участка 5'UTR области, соответствующие генотипам 3 (РНК №17-1) и 2 (РНК № 17-2) (рис. 1, 6), и последовательность участка гена NS5b, принадлежащая субтипу 1b (рис. 2A). Фрагмент NS2 соответствует рекомбинанту RF1_2k/1b (рис. 4).

В результате секвенирования участков последовательностей РНК ВГС, выделенной из образца № 42, обнаружены два фрагмента 5'UTR области, принадлежащие генотипу 1 (РНК №42-1) и генотипу 2 (РНК №42-2)

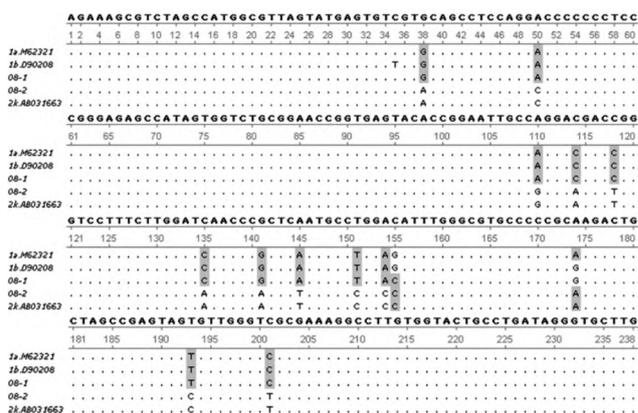


Рис. 5. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 08-1, 08-2. В качестве референсных использованы последовательности 1a.M62321, 1b.090208 и 2k.AB03166 из базы данных NCBI.



Рис. 6. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 17-1, 17-2. В качестве референсных использованы последовательности 3a.D17763 и 2k.AB03166 из базы данных NCBI.

(рис. 1, 7). Участок гена NS5b соответствует субтипу 1b (см. рис. 2, б), а фрагмент NS2 – геноварианту RF1_2k/1b (см. рис. 4).

Исходя из полученных результатов, 50 из 240 исследованных образцов сыворотки крови содержат рекомбинантную форму RF1_2k/1b ВГС (см. рис. 3, 4), структура которой соответствует имеющимся литературным данным [20, 39].

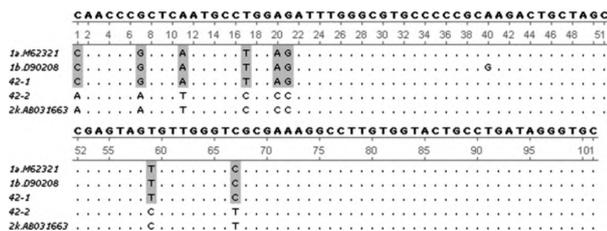


Рис. 7. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 42-1, 42-2. В качестве референсных использованы последовательности 1a.M62321, 1b.090208 и 2k.AB031662 из базы данных NCBI.

Сопоставление результатов секвенирования с данными, полученными методом ОТ-ПЦР-РВ, указывает на наличие в образце №8 РНК ВГС субтипа 1a (РНК № 08-1) и рекомбинанта RF1_2k/1b (РНК № 08-2). Полученные результаты также свидетельствуют, что в пробе №17 содержатся одновременно субтип 3a (РНК № 17-1) и RF1_2k/1b ВГС (РНК № 17-2). Совокупность данных, полученных по образцу №42 доказывает, что он содержит как субтип 1b (РНК № 42-1), так и геновариант RF1_2k/1b ВГС (РНК № 42-2).

Заключение. Таким образом, в настоящей работе предложен и апробирован метод обнаружения циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Апробация метода, проведенная на 240 образцах сыворотки крови пациентов, инфицированных ВГС, отнесенных при анализе с помощью двух коммерческих наборов реагентов к генотипу 2, показала, что в 50 (20,8%) из этих проб содержится рекомбинант RF1_2k/1b. Разработанный нами метод достаточно прост в исполнении и может применяться в лабораториях, оснащенных оборудованием для проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с целью выявления РНК геноварианта RF1_2k/1b, а также дифференцирования рекомбинанта от генотипа 2 ВГС, что необходимо для проведения адекватной и успешной терапии инфицированных пациентов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8-11, 13, 14, 16-26, 28, 29, 33-37, 39 см. REFERENCES)

7. Ерёмин Ф. В. Современные классификация и номенклатура вируса гепатита С. Подходы к терапии и профилактике. *Здравоохранение*. 2015; 12: 40-8.
12. Мязин Р.Г., Емельянов Д.Н., Свириденко О.Ю., Стаценко И.Ю., Сергеев В.С. Современные стратегии лечения вирусного гепатита С при использовании ингибиторов протеазы и полимеразы. *Лекарственный вестник*. 2015. 58 (9): 26-32.
15. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. М.: *Минздрав России*; 2017.
27. Дементьева Н.Е., Калинина О.В., Знойко О.О., Беляков Н.А., Жебрун А.Б. Циркулирующая рекомбинантная форма вируса гепатита С RF2k/1b: проблемы диагностики и терапии. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2016; 8(1): 42-52.
30. Николаева Л.И., Сапронов Г.В., Колотвин А.В., Самохвалов Е.И., Лейбман Е.А., Самоходская Л.М. Гепатит С при инфицировании рекомбинантной формой вируса RF2k/1b: течение и терапия. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(3): 9-15.

31. Юшук Н.Д., Знойко О.О., Дудина К.Р., Козина А.Н., Калинина О.В. Эффективность противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С, инфицированных вирусами гепатита С рекомбинантных вариантов. *Терапевтический архив*. 2016; 88(6): 101-5.
32. Знойко О.О., Дудина К.Р., Козина А.Н., Шутько С.А., Огарев В.В., Калинина О.В. и др. Диагностическая тактика и рекомендации по лечению больных хроническим гепатитом С, инфицированных генотипом 2 ВГС. *Лечащий врач*. 2016; 16(2): 1-8.
38. Ведерников В.Е., Иванов М.К., Трухина А.В., Кандрушин Е.В. Два новых диагностических набора: «РеалБест РНК ВГС» и «РеалБест РНК ВГС-генотип». *Новости «Вектор-Бест»*. 2009; 52(2): 2-8.

REFERENCES

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009; 29(s1): 74-81.
2. Mohd H.K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013; 57(4): 1333-42.
3. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Casciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016; 34(22): 7824-40.
4. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. *J. Hepatol*. 2018; 69(2): 461-511.
5. American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatitis C Guidance 2019 Update. *Hepatology*. 2020; 71(2): 686-721.
6. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59(1): 318-27.
7. Eremin F. V. Modern classification and nomenclature of hepatitis C virus. Approaches to a therapy and prevention. *Zdravookhraneni*. 2015; 12: 40-8. (in Russian)
8. Palumbo E. Pegylated interferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *Ther. Adv. Chronic Dis*. 2011; 2(1): 39-45.
9. Maughan A., Ogbuagu O. Pegylated interferon alpha 2a for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin Drug Metab. Toxicol*. 2018; 14(2): 219-27.
10. Shahid I., AlMalki W.H., Hassan S., Hafeez M.H. Real-world challenges for hepatitis C virus medications: a critical overview. *Crit Rev Microbiol*. 2018; 44(2): 143-60.
11. Spengler U. Direct antiviral agents (DAAs) – a new age in the treatment of hepatitis C virus Infection. *Pharmacol Ther*. 2018; 183:118-26.
12. Myazin R.G., Emel'yanov D.N., Sviridenko O.Yu., Statsenko I.Yu., Sergeev V.S. Modern strategies for the treatment of viral hepatitis C using protease and polymerase inhibitors. *Lekarstvennyy vestnik*. 2015. 58 (9): 26-32. (in Russian)
13. Seifert L.L., Perumpail R.B., Ahmed A. Update on hepatitis C: Direct-acting antivirals. *World J. Hepatol*. 2015; 7(28): 2829-33.
14. Wyles D.L., Gutierrez J.A. Importance of HCV genotype 1 subtypes for drug resistance and response to therapy. *J. Viral. Hepat*. 2014; 21(4): 229-40.
15. Recommendations for the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis C. Moscow: *Minzdrav Rossii*; 2017. (in Russian)
16. Yun Z., Lara C., Johansson B., Lorenzana de Rivera I., Sonnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J. Med. Virol*. 1996; 49(3): 155-60.
17. Simmonds P., Smith D.B., McOmish F., Yap P.L., Kolberg J., Urdea M.S. et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J. Gen. Virol*. 1994; 75 (5): 1053-61.
18. Viazov S., Widell A., Nordenfelt E. Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection*. 2000; 28(1): 21-5.
19. Smith D.B., Simmonds P. Review: molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12(7): 522-7.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

20. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J. Virol.* 2002; 76(8): 4034-43.
21. Gonzalez-Candelas F., Lopez-Labrador F.X., Bracho M.A. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses.* 2011; 3(10): 2006-24.
22. Kalinina O., Norder H., Magnius L.O. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(7): 1853-7.
23. Morel V., Fournier C., Francois C., Brochot E., Helle F., Duverlie G. et al. Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. *J. Viral Hepat.* 2011; 18(2): 77-83.
24. Raghwanji J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., Schinkel J., Molenkamp R., van de Laar T.J. et al. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. *J. Virol.* 2012; 86(4): 2212-20.
25. Susser S., Dietz J., Schlevogt B., Zuckerman E., Barak M., Piazzolla V. et al. Origin, prevalence and response to therapy of hepatitis C virus genotype 2k/1b chimeras. *J. Hepatol.* 2017; 67(4): 680-6.
26. Galli A., Bukh J. Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 2014; 22(6): 354-64.
27. Dement'eva N.E., Kalinina O.V., Znoyko O.O., Belyakov N.A., Zhebrun A.B. Circulating recombinant form RF2k/1b of hepatitis C virus: problems of diagnosis and therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2016; 8(1): 42-52. (in Russian)
28. Karchava M., Chkhartishvili N., Sharvadze L., Abutidze A., Dvali N., Gatserelia L. et al. Impact of hepatitis C virus recombinant form RF1_2k/1b on treatment outcomes within the Georgian national hepatitis C elimination program. *Hepatol. Res.* 2018; 48(1): 36-44.
29. Hedskog C., Doehle B., Chodavarapu K., Gontcharova V., Crespo G.J., De K.R. et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology.* 2015; 61(2): 471-80.
30. Nikolaeva L.I., Saponov G.V., Kolotvin A.V., Samokhvalov E.I., Leybman E.A., Samokhodskaya L.M. Hepatitis C upon infection with the recombinant form RF2k/1b of the virus: course and therapy. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2014; 19(3): 9-15. (in Russian)
31. Yushchuk N.D., Znoyko O.O., Dudina K.R., Kozina A.N., Kalinina O.V. Efficiency of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C infected with recombinant variants hepatitis C viruses. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2016; 88(6): 101-5. (in Russian)
32. Znoyko O.O., Dudina K.R., Kozina A.N., Shut'ko S.A., Ogarev V.V., Kalinina O.V. et al. Diagnostic tactics and recommendations for the treatment of patients with chronic hepatitis C infected with HCV genotype 2. *Lechashchiy vrach.* 2016; 16(2): 1-8. (in Russian)
33. Mourez T., Decroos A., Gorla O., Montialoux H., De O.F., Larrat S. et al. Misidentification of recombinant hepatitis C virus leading to treatment failure with direct acting antivirals. *J. Med. Virol.* 2018; 90(5): 994-7.
34. Zakalashvili M., Zarkua J., Weizenegger M., Bartel J., Raabe M., Zangurashvili L. et al. Identification of hepatitis C virus 2k/1b intergenotypic recombinants in Georgia. *Liver Int.* 2018; 38(3): 451-7.
35. Schuermans W., Orlent H., Desombere I., Descheemaeker P., Van V.H., Geerts A. et al. Heads or Tails: Genotyping of Hepatitis C Virus Concerning the 2k/1b Circulating Recombinant Form. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(9): 1384.
36. De K.S., Descheemaeker P., Reynders M. Potential risk of misclassification HCV 2k/1b strains as HCV 2a/2c using VERSANT HCV Genotype 2.0 assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(3): 201-2.
37. De K.S., Descheemaeker P., Reynders M. Diagnosis of hepatitis C virus genotype 2k/1b needs NS5B sequencing. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 41: 1-2.
38. Vedernikov V.E., Ivanov M.K., Trukhina A.V., Kandrushin E.V. Two new diagnostic kits: "RealBest HCV RNA" and "RealBest HCV RNA genotype". *Novosti "Vektor-Best".* 2009; 52(2): 2-8. (in Russian)
39. Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N. et al. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol. Res.* 2008; 38(5): 457-64.

Поступила 17.09.20
Принята к печати 26.10.20

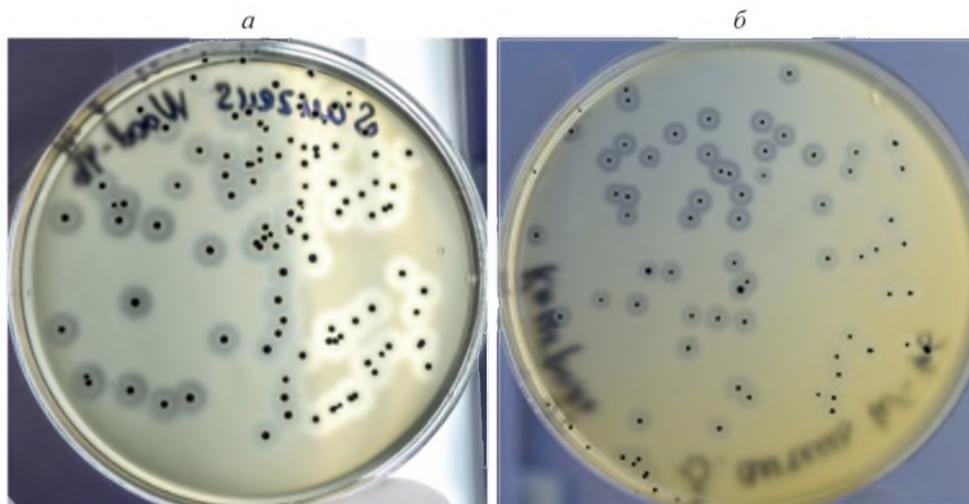


Рис. 1. Рост *S. aureus* Wood-46.

a – на агаре Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ); *б* – Baird-Parker Agar Base (HiMedia).

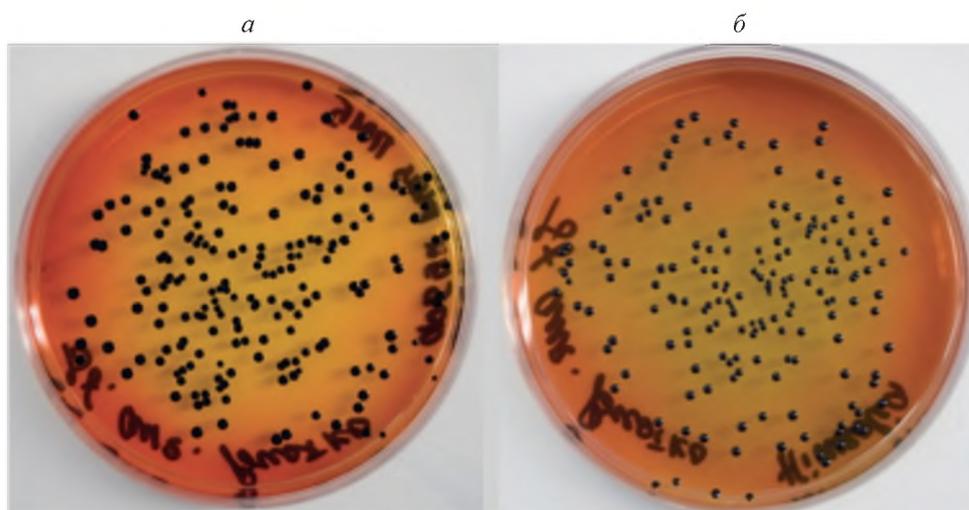


Рис.2. Рост *S. aureus* «Виотко».

a – на агаре Фогель-Джонсона (ФБУН ГНЦ ПМБ); *б* – на Vogel-Johnson Agar Base. (HiMedia).