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

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Том 66
8 • 2021

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

АВГУСТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостаповская 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. Архипова

Сдано в набор 24.07.2021.
Подписано в печать 06.08.2021.
Формат 60 × 88⅛.
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 Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsever 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: wwwakc.ru, www-pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию: elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика. 2021. № 8. 449–512.

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. СКУИНЬ, 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*), A. 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*), 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-Петербурге*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)

«Издательство"МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

Diagnostika KLINICHESKAYA LABORATORNAYA

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Volume 66
8 • 2021

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

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 permition of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsever 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. MAVZYTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*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

Бородина И.А., Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Селезнева И.А., Борисова О.В., Потякина Е.Е., Колотьева Н.А., Козлов А.В., Горбачева И.В., Кузнецова О.Ю., Балдина О.А., Виноградова Л.Н., Емельянова Н.Г., Коротеева Ю.А.
Новорождённые от женщин, инфицированных COVID-19: соматическое и метаболическое состояние. 453

Николаев А.А., Бабкина И.В., Герштейн Е.С., Алферов А.А., Делекторская В.В., Мамедли З.З., Кушлинский Н.Е.
Прогностическая значимость критериев системы TNM, уровней сывороточных инсулиноподобных факторов роста и их транспортных белков, VEGF и ММП-7 при колоректальном раке 459

Власова О.С., Бичкаева Ф.А.
Возрастные изменения параметров углеводного обмена и обеспеченности витаминами В1, В2 у жителей двух северных регионов. 465

ИММУНОЛОГИЯ

Марданлы С. Г., Авдонина А.С.
Разработка иммуноферментной системы для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Line blot» 472

Мокроносова М.А., Филимонова О.И., Желтикова Т.М.
Новые технологии в компонентной аллергодиагностике 480

Куст А.В., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Воронин Д.Н.
Роль CD20+IL-10+ В-лимфоцитов в иммунорегуляторных процессах при привычном невынашивании беременности 485

Панова И.А., Кудряшова А.В., Панащатенко А.С., Рокотянская Е.А, Малышкина А.И., Парейшвили В. В., Харламова Н.В.
Характер дифференцировки В-лимфоцитов у женщин с гипертензивными расстройствами при беременности 489

МИКРОБИОЛОГИЯ

Корноухова Л.А., Эмануэль В.Л., Денисов Н.Л., Никонов Е.Л.
Инфекция *Helicobacter pylori*: место серологической и культуральной диагностики в клинических рекомендациях 496

Мангутов Э.О., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л.
Corynebacterium spp. – проблемные патогены респираторного тракта человека (обзор литературы). 502

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Алёшкин В.А.
Внешний контроль качества проведения бактериологического исследования при выделении *Corynebacterium diphtheriae* 509

© ОАО «Издательство "Медицина"», 2021

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Borodina I.A., Gil'miyarova F.N., Gusyakova O.A., Selezneva I.A., Borisova O.V., Potyakina E.E., Kolot'eva N.A., Kozlov A.V., Gorbacheva I.V., Kuznecova O.YU., Baldina O.A., Vinogradova L.N., Emel'yanova N.G., Koroteeva Yu.A.
Newborns from women infected with COVID-19: somatic and metabolic status 453

Nikolaev A.A., Babkina I.V., Gershtein E.S., Alferov A.A., Delektorskaya V.V., Mamedli Z.Z., Kushlinskii N.E.
Prognostic significance of the TNM system criteria, levels of serum insulin-like growth factors and their transport proteins, VEGF and MMP-7 in colorectal cancer 459

Vlasova O.S., Bichkaeva F.A.
Age-related changes in the parameters of carbohydrate metabolism and supply of vitamins B1, B2 in residents of two northern regions 465

IMMUNOLOGY

Mardanly S.G., Avdonina A.S.
Development of test kit for detection of specific IgM to SARS-CoV-2 by immune blotting in the «Line blot» format 472

Mokronosova M.A., Filimonova O.I., Zheltikova T.M.
New technologies in molecular allergodiagnostics 480

Kust A.V., Sotnikova N.Y., Malyshkina A.I., Voronin D.N.
Role of CD20 + IL-10 + B-lymphocytes in immunoregulatory processes in women with reccurent miscarriage. 485

Panova I.A., Kudryashova A.V., Panashchatenko A.S.,Rokotyanskaya E.A., Malyshkina A.I., Parejshvili V. V., Harlamova N.V.
The nature of differentiation of β-lymphocytes in women with hypertensive disorders during pregnancy 489

MICROBIOLOGY

Kornoukhova L.A., Emanuel V.L., Denisov N.L., Nikonov E.L.
Helicobacter pylori infection: place of serological and cultural diagnostics in clinical guidelines 496

Mangutov E.O., Kharseeva G.G., Alutina E.L.
Corynebacterium spp. – problematic pathogens of the human respiratory tract (review of literature) 502

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Shepelin A.P., Domotenko L.V., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Aleshkin V.A.
Comparative tests of quality of bacteriological investigation with *Corynebacterium diphtheriae* isolation 509

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бородина И.А.[1], Гильмиярова Ф.Н.[1], Гусякова О.А.[1], Селезнева И.А.[1], Борисова О.В.[1], Потякина Е.Е.[2], Колотьева Н.А.[1], Козлов А.В.[1], Горбачева И.В.[1], Кузнецова О.Ю.[1], Балдина О.А.[1], Виноградова Л.Н.[1], Емельянова Н.Г.[2], Коротеева Ю.А.[2]

НОВОРОЖДЁННЫЕ ОТ ЖЕНЩИН, ИНФИЦИРОВАННЫХ COVID-19: СОМАТИЧЕСКОЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ

[1]ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;
[2]ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. В.Д. Середавина», 443095, Самара, Россия

На данный момент имеется ограниченное количество данных относительно проявлений новой коронавирусной инфекции у младенцев, рождённых от инфицированных SARS-CoV-2 матерей, поэтому цель данного исследования заключается в изучении соматического и метаболического статуса новорожденных детей, рожденных от матерей с диагнозом COVID-19. Исследование проводилось на базах отделения лабораторной диагностики «Самарская областная клиническая больница им. В.Д. Середавина» и кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой Самарского ГМУ Минздрава России. Под наблюдением находились 85 новорожденных, из них 35, родившихся от здоровых матерей, и 50 от матерей, больных COVID-19. Оценка соматического статуса всех новорожденных проводилась по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах после рождения. Также у всех новорождённых определяли показатели общего и биохимического анализов крови, а новорождённых от матерей с COVID-19 обследовали на наличие РНК SARS-CoV-2 в мазках из рото- и носоглотки. Таким образом, при изучении соматического статуса выявлено, что из 50 новорожденных от женщин, инфицированных COVID-19, практически здоровыми были только 18%, остальные имели признаки недоношенности, гипотрофии, перинатального повреждения ЦНС, диабетической фетопатии, ателектаза лёгкого, задержки внутриутробного развития, асфиксии. Метаболическое состояние характеризуется снижением содержания гемоглобина и тромбоцитов, увеличением содержания общего белка, в том числе, С-реактивного, отмечается высокая активность трансаминаз, снижение содержания натрия и хлоридов. Данные параметры общего и биохимического анализов крови могут рассматриваться как индикаторы для оценки состояния новорождённых от матерей с COVID-19.

Ключевые слова: *COVID-19; новорождённые; соматический статус.*

Для цитирования: Бородина И.А., Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Селезнева И.А., Борисова О.В., Потякина Е.Е., Колотьева Н.А., Козлов А.В., Горбачева И.В., Кузнецова О.Ю., Балдина О.А., Виноградова Л.Н., Емельянова Н.Г., Коротеева Ю.А. Новорождённые от женщин, инфицированных COVID-19: соматическое и метаболическое состояние. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (8): 453-458. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-453-458

Borodina I.A.[1], Gil'miyarova F.N.[1], Gusyakova O.A.[1], Selezneva I.A.[1], Borisova O.V.[1], Potyakina E.E.[2], Kolot'eva N.A.[1], Kozlov A.V.[1], Gorbacheva I.V.[1], Kuznecova O.Yu.[1], Baldina O.A.[1], Vinogradova L.N.[1], Emel'yanova N.G.[2], Koroteeva Yu.A.[2]

NEWBORNS FROM WOMEN INFECTED WITH COVID-19: SOMATIC AND METABOLIC STATUS

[1]Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia;
[2]Samara Regional Clinical Hospital named after V.D. Seredavin, 443095, Samara, Russia

To date, there are limited data regarding manifestations of new coronavirus infection in infants born of SARS-CoV-2 infected mothers, so the aim of this study is to investigate somatic and metabolic status of newborn infants born to mothers diagnosed with COVID-19. The investigation was carried out on the bases of Laboratory Diagnostic Department of Samara Regional Clinical Hospital named after V.D. Seredavin and the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics of Samara State Medical University. Under observation were 85 newborns, including 35 born of healthy mothers and 50 born of COVID-19 mothers.The somatic status of all newborns was assessed using the Apgar scale at the 1st and 5th minutes after birth. Also all newborns had general and biochemical blood tests and newborns from mothers with COVID-19 were tested for the presence of SARS-CoV-2 RNA in oral and nasopharyngeal swabs. Thus, the study of somatic status revealed that of 50 neonates from women infected with COVID-19, only 18% were practically healthy, the rest had signs of prematurity, hypotrophy, perinatal CNS damage, diabetic fetopathy, pulmonary atelectasis, delayed intrauterine development, asphyxia. The metabolic state is characterised by decreased haemoglobin and platelets, increased concentration of total protein, including C-reactive protein, high transaminase activity, decreased sodium and chloride content. These parameters of general and biochemical blood tests can be considered as indicators for the evaluation of the condition of newborns from mothers with COVID-19.

Key words: *COVID-19; newborns; somatic status.*

For citation: Borodina I.A., Gil'miyarova F.N., Gusyakova O.A., Selezneva I.A., Borisova O.V., Potyakina E.E., Kolot'eva N.A., Kozlov A.V., Gorbacheva I.V., Kuznecova O.Yu., Baldina O.A., Vinogradova L.N., Emel'yanova N.G., Koroteeva Yu.A. Newborns from women infected with COVID-19: somatic and metabolic status. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 453-458 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-453-458

Для корреспонденции: *Селезнева Инна Александровна*, канд. мед.. наук, доц. каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru

For correspondence: Selezneva I.A., PhD, docent of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics, e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru

Information about authors:

Borodina I.A., https://orcid.org/0000-0001-7115-6430;
Gilmiyarova F.N., http://orcid.org/0000-0001-5992-3609;
Gusyakova O.A., https://orcid.org/0000-0002-5619-4583;
Selezneva I.A., https://orcid.org/ 000-0001-6647-5330;
Borisova O.V., https://orcid.org/0000-0003-1430-6708;
Potyakina E.E., https://orcid.org/0000-0002-1382-1831;
Kolotyeva N.A., https://orcid.org/0000-0002-7583-6222;
Kozlov A.V., https://orcid.org/0000-0001-9384-6854;
Gorbacheva I.V., https://orcid.org/0000-0002-8267-9250;
Kuznecova O.Yu., https://orcid.org/0000-0001-3509-5965;
Baldina O.A., https://orcid.org/0000-0002-7566-2485;
Vinogradova L.N. https://orcid.org/0000-0002-8781-2217;
Emel'yanova N.G., https://orcid.org/0000-0003-4598-1028;
Koroteeva Yu.A., https://orcid.org/0000-0001-8227-5785.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.06.2021
Accepted 15.06.2021

Введение. С декабря 2019 года мировое сообщество столкнулось со вспышкой ранее неизвестного нового инфекционного заболевания, достигшего масштаба пандемии [1, 2]. Секвенирование генома возбудителя показало, что это новый тип вируса, объявленный Всемирной организацией здравоохранения «новым коронавирусом COVID-2019» [3]. На ранних этапах вспышки COVID-19 был преимущественно распространен среди взрослых, более восприимчивых к тяжёлому течению заболевания с развитием острого респираторного дистресс-синдрома [4, 5]. Имеется ограниченное количество данных относительно проявлений новой коронавирусной инфекции у младенцев, рождённых от инфицированных SARS-CoV-2 матерей. Нами подробно приводятся опубликованные в Китае в 2020 г. Данные Y. Chen и соавт. [6], которые провели исследование с участием четырех женщин, больных COVID-19, и их новорождённых детей. Родоразрешение у трёх женщин проводилось при помощи кесарева сечения для исключения возможной передачи материнской инфекции, и у одной через естественные родовые пути. Во время клинического и лабораторно-инструментального обследования новорождённых ни один тест на выявление SARS-CoV-2 не дал положительного результата. Кроме того, у младенцев отсутствовали такие серьезные клинические симптомы, как лихорадка, кашель, диарея, а также отклонения в результатах рентгенологических и гематологических методов исследования. Все четверо младенцев были живы на момент выписки из больницы. В другом исследовании сравнивались клинические симптомы, а также исходы заболевания для матери и новорожденного у беременных с пневмонией COVID-19 и без нее. Диагноз COVID-19 не был поставлен ни одному из новорожденных и ни у одного из них не были выявлены тяжелые неонатальные осложнения [7]. В отечественной литературе результаты ранней диагностики состояния детей, родившихся от матерей с клинически и лабораторно подтверждённой ковидной инфекцией, не представлены. Цель работы заключается в изучении соматического и метаболического статуса новорожденных детей, рожденных от матерей с диагнозом COVID-19.

Материал и методы. Данное исследование проводилось на базах отделения лабораторной диагностики «Самарская областная клиническая больница им. В.Д. Середавина» и кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой Самарского ГМУ Минздрава России. Под наблюдением находились 85 новорожденных, из них 35 родившихся от здоровых матерей (контрольная группа) и 50 от матерей, больных COVID-19, госпитализированных в специализированный инфекционный госпиталь для больных COVID-19 (опытная группа). Наличие у родильниц COVID-19 было подтверждено клинически (присутствие таких симптомов как кашель, одышка, повышение температуры тела выше 37,5°С, аносмия, дисгевзия в момент поступления в родильный дом), инструментально по данным компьютерной томографии органов грудной клетки – наличие симптома «матового стекла», лабораторными методами исследования – обнаружение РНК SARS-CoV-2 в мазках, полученных из рото- и носоглотки. Родоразрешение у рожениц контрольной группы и больных COVID-19 проводилось путём кесарева сечения. Оценка соматического статуса всех новорожденных проводилась по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах после рождения с учетом следующих показателей: окраска кожных покровов, частота сердечных сокращений, рефлекторная возбудимость, мышечный тонус, характер дыхания. У всех новорожденных определяли показатели общего анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе Midray BC-3600 (Midray, Китай): количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, гематокрита. Проводилась оценка метаболических показателей на автоматическом биохимическом анализаторе Olimpus AU 680 (Beckman-Coulter, США): содержание общего белка, мочевины, креатинина, общего билирубина, прямого билирубина, глюкозы, С-реактивного белка (СРБ), натрия, калия, хлоридов, активности аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ). В мазках рото- и носоглотки у новорождённых, родившихся от здоровых матерей и матерей с COVID-19, исследовали РНК SARS-CoV-2 методом одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещённой с полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени, с помощью набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCoV» ком-

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-453-458

Таблица 1

Оценка соматического состояния новорожденных от женщин, инфицированных COVID-19, по шкале Апгар

Количество баллов, полученных на 1-й минуте после рождения	Количество новорождённых, %	Количество баллов, полученных на 5-й минуте после рождения	Количество новорождённых, %
4 балла	4	4 балла	-
6 баллов	16	6 баллов	-
7 баллов	76	7 баллов	20
8 баллов	4	8 баллов	78
9 баллов	-	9 баллов	2

пании «Синтол» (Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Статистический анализ данных исследования проводили с помощью набора статистических программ Microsoft Office Excel 2007 и SPSS Statistics 21. Для оценки полученных результатов рассчитывали показатели описательной статистики. Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения выборок с нормальным распределением использовали параметрический t-критерий Стьюдента. В случаях с ненормальным распределением выборках в качестве альтернативы применяли непараметрический U критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони.

Результаты и обсуждение. Соматическое состояние обследованных здоровых новорожденных оказалось удовлетворительным, соответствуя 9-ти баллам по шкале Апгар: окраска кожных покровов всего тела и конечностей была розового цвета, частота сердечных сокращений более 100 ударов в минуту, рефлекторная возбудимость была удовлетворительной, дети демонстрировали громкий крик и выраженные активные движения. Анализ соматического статуса новорожденных от матерей, инфицированных COVID-19, показал (табл. 1), что состояние 4% из них на 1-й минуте после рождения соответствовало 8-ми баллам по шкале Апгар: новорожденные имели розовую окраску тела и конечностей, нормальное дыхание с громким первым криком, частоту сердечных сокращений более 100 ударов в минуту, несколько сниженный мышечный тонус и удовлетворительную рефлекторную возбудимость. Что касается 76% новорожденных, они имели слабо выраженную рефлекторную возбудимость, сниженный мышечный тонус, нерегулярное дыхание наряду с розовой окраской тела и частотой сердечных сокращений более 100 ударов в минуту, что соответствовало 7 баллам по шкале Апгар. Урежение частоты сердечных сокращений до уровня менее 100 ударов в минуту отмечалось у 16% детей, что в совокупности было оценено в 6 баллов по шкале Апгар. У 4% новорожденных состояние было квалифицировано как соответствующее 4-м баллам по шкале Апгар, поскольку отмечались слабая рефлекторная возбудимость, низкий мышечный тонус, нерегулярное дыхание и частота сердечных сокращений менее 100 ударов в минуту в сочетании с генерализованным цианозом кожных покровов.

Состояние детей на 5-й минуте улучшилось, о чем свидетельствует увеличение числа новорожденных с баллами 8 до 78%, у них улучшились мышечный тонус и рефлекторная возбудимость, частота сердечных сокращений увеличилась более 100 ударов в минуту, что проявилось уменьшением цианоза кожных покровов.

Таблица 2

Распределение по диагнозам новорожденных от женщин, инфицированных COVID-19

Диагноз	Количество новорожденных, %
Здоровый	18
Недоношенность	12
Гипотрофия, 1 степень	24
Гипотрофия, 3 степень	2
Перинатальное повреждение ЦНС	24
Диабетическая фетопатия	8
Ателектаз лёгкого	4
Задержка внутриутробного развития	4
Асфиксия в родах	4

При дальнейшем клиническом обследовании новорожденных, рожденных от инфицированных COVID-19 женщин, установлено, что 18% родившихся детей оказались соматически здоровыми. Диагноз гипотрофии 1 степени был поставлен у 24% детей, гипотрофии 3 степени – у 2% новорожденных. Признаки перинатального повреждения ЦНС отмечены у 24% родившихся детей, диабетической фетопатии – в 8-ми случаях. Ателектаз легкого, задержка внутриутробного развития и асфиксия в родах были у 12 % новорожденных (табл. 2).

Результаты исследования клеточного состава крови новорождённых представлены в табл. 3.

Результаты исследования свидетельствуют, что достоверно уменьшается содержание гемоглобина у детей, родившихся от матерей, больных COVID-19. Мы склонны считать, что это может быть связано со способностью вируса взаимодействовать с молекулой гемоглобина через рецепторы CD147, CD26, расположенные на эритроцитах и их предшественниках. Наряду с этим, S-белок оболочки коронавируса обладает гепсидин-миметическим действием, индуцируя блокировку ферропортина – белка-экспортёра клеточного железа [8]. Вирусный белок ORF8 способен связываться с порфирином, атакуя гем через β1-цепь гемоглобина. SARS-CoV-2, следовательно, может вызывать гемолиз и образовывать комплекс с высвобожденным гемом, генерируя дисфункциональный гемоглобин со сниженной способностью к транспорту кислорода и CO_2 [9, 10].

Таблица 3

Клеточный состав периферической крови новорождённых

Показатели		Контрольная группа	Опытная группа	*p*
Лейкоциты, 10^9/л	M±m	16,14±1,12	16,18±0,94	0,89
	Me	14,6	15	
	Q1 – Q3	13,08-18,71	12,96-16,72	
	95% CIformedian	[10,56; 22,25]	[11,6; 19,7]	
Эритроциты, 10^{12}/л	M±m	4,78±0,11	4,58±0,1	0,19
	Me	4,89	4,53	
	Q1 – Q3	[4,36; 5,23]	[4,13; 5,15]	
	95% CIformedian	4,69-5,13	4,38-4,74	
Гемоглобин, г/л	M±m	176,89±4,02	163,04±3,64	**0,01**
	Me	178	160,5	
	Q1 – Q3	[163; 195,5]	[150; 180]	
	95% CIformedian	172,48-188,76	155-172,19	
Гематокрит, %	M±m	45,92±1,1	45,14±0,97	0,59
	Me	45,92	45,14	
	Q1 – Q3	[43,03; 50,85]	[42,1; 50]	
	95% CIformedian	44-50	42,96-47,28	
Тромбоциты, 10^9/л	M±m	272,54±14,46	214,22±12,62	**0,0029**
	Me	252	217,5	
	Q1 – Q3	[196,2; 340]	[183; 256,79]	
	95% CIformedian	212,21-291	183-256,79	

Примечание. Здесь и в табл.4: M–среднее арифметическое, m–ошибка среднего, Me – медиана,Q1 – Q3 – 1 и 3 квартиль, 95% CI fo rmedian – 95% доверительный интервал для медианы, *p* – уровень межгрупповой значимости. Здесь и в табл.4 жирным шрифтом выделено $p<0,05$.

Снижение количества тромбоцитов мы склонны связывать с повреждением эндотелия и образованием агрегатов тромбоцитов в лёгких [11]. Кроме того, тромбоциты способны вступать во взаимодействие с вирусом через Toll-подобные рецепторы [12]. Имеются указания, что тромбоциты используются для образования легочных тромбов с возможным противоинфекционным эффектом для предотвращения распространения вирусов через кровоток [13].

Метаболический профиль новорожденных контрольной и опытной групп приводится в табл. 4.

Из представленных результатов биохимического анализа крови новорождённых видно, что наибольшие изменения характерны для показателей белкового обмена. Содержание общего белка достоверно выше на 20% ($p=0,0001$) у младенцев, рождённых от больных матерей, при достоверном снижении уровня креатинина на 42% ($p<0,0001$). Хотелось бы обратить внимание на увеличение содержания СРБ – белка острой фазы.

Увеличена активность пиридоксальзависимых ферментов – аланинаминотрансферазы (+260%, $p<0,0001$) и аспартатаминотрансферазы (+185%, $p=0,0013$). Мы склонны считать, что поскольку рецепторы ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) экспрессируются в большом количестве в эпителиальных клетках желчных протоков, они, возможно, способствуют проникновению вируса в клетки печени, разрушению гепатоцитов и выходу аминотрансфераз из цитоплазмы в кровь [14].

Водно-солевой обмен характеризуется достоверным уменьшением содержания ионов натрия и хлоридов ($p<0,0001$) в крови новорожденных опытной группы. Возможно, это связано с функцией ангиотензинпревращающего фермента 2. Фермент представляет собой цинксодержащую карбоксипептидазу, функция которой заключается в конвертации ангиотензина I в нонапептид – ангиотензин 1-9 и ангиотензина II в ангиотензин 1-7, обладающий вазодилаторной активностью и антипролиферативным действием [15]. Вместе с тем, АПФ2 одновременно является рецептором для SARS-CoV-2. Не исключено, что при инфицировании SARS-CoV-2 изменяется количество рецепторов, что влечёт за собой подобные отклонения водно-электролитного обмена.

Заключение. Таким образом, при изучении соматического статуса выявлено, что из 50 новорожденных от женщин, инфицированных COVID-19, практически здоровыми были только 18%, остальные имели признаки недоношенности**,** гипотрофии, перинатального повреждения ЦНС, диабетической фетопатии, ателектаза лёгкого, задержки внутриутробного развития, асфиксии. Метаболическое состояние характеризуется снижением содержания гемоглобина и тромбоцитов, увеличением содержания общего белка, в том числе С-реактивного, отмечается высокая активность трансаминаз, снижение содержания натрия и хлоридов. Данные параметры общего и биохимического анализов крови могут рассматриваться как индикато-

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-453-458

Таблица 4

Характеристика метаболического профиля новорождённых

Показатели		Контрольная группа	Опытная группа	*p*
Общий белок, г/л	M±m	50,78±1,94	61,03±1,57	
	Me	54,4	60,3	**0,0001**
	Q1 – Q3	[41,43; 59,55]	[54,4; 68,5]	
	95% CIformedian	46,72-58,63	57,36-63,24	
АЛАТ, Ед/л	M±m	10,96±1,09	26,21±4,42	
	Me	10	4,42	**<0,0001**
	Q1 – Q3	[6,8; 14,18]	[12,4; 28,15]	
	95% CIformedian	8,27-12,25	13,92-21,99	
АСАТ, Ед/л	M±m	46,97±4,92	87,99±14,19	
	Me	36	58	**0,0013**
	Q1 – Q3	[28,6; 56,47]	[37,78; 104,18]	
	95% CIformedian	30,29-41,01	48,64-67,77	
Мочевина, ммоль/л	M±m	4,49±0,46	3,36±0,2	
	Me	3,8	3,25	0,05
	Q1 – Q3	[2,59; 5,36]	[2,4; 3,8]	
	95% CIformedian	2,91-4,59	2,66-3,54	
Креатинин, мкмоль/л	M±m	79,23±3,73	55,9±3,03	
	Me	80,35	55,9	**<0,0001**
	Q1 – Q3	[64,2; 87]	[36,2; 65,1]	
	95% CIformedian	68,17-84,09	44,44-59,24	
Общий билирубин	M±m	64,46±4,53	60,83±7,43	
	Me	57,5	37,7	0,06
	Q1 – Q3	[40,48; 91,78]	[26,9; 91]	
	95% CIformedian	45,09-79,75	29,74-44,3	
СРБ, мг/л	M±m	2,94±0,2	7,85±2,71	
	Me	2,5	2	**0,04**
	Q1 – Q3	[2; 3,55]	[2; 2,9]	
	95% CIformedian	2,03-3,2	2-2	
Глюкоза, ммоль/л	M±m	3,35±1,22	3,15±0,16	
	Me	3,35	3,01	0,46
	Q1 – Q3	[2,35; 4,1]	[2,3; 3,69]	
	95% CIformedian	2,9-3,83	2,49-3,36	
Натрий, ммоль/л	M±m	137,43±0,78	128,66±0,69	
	Me	137,7	129	**<0,0001**
	Q1 – Q3	[133,73; 139,15]	[126; 133]	
	95% CIformedian	134,25-138,88	127-131,39	
Калий, ммоль/л	M±m	4,68±0,12	5,24±0,74	
	Me	4,63	4,55	0,33
	Q1 – Q3	[4,13; 5,23]	[3,8; 5,1]	
	95% CIformedian	4,36-4,98	4,16-4,84	
Хлор, ммоль/л	M±m	109,31±0,61	102±0,7	
	Me	109,3	102	**<0,0001**
	Q1 – Q3	[106,53; 111,75]	[97; 105]	
	95% CIformedian	107,85-110,71	99,6-104,39	

ры для оценки состояния новорождённых от матерей с COVID-19.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*. 2020; 382(8): 727-33.
2. World Health Organization (WHO). WHO characterizes COVID-19 as a pandemic [EB/OL]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020. Available at: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen.
3. Novel coronavirus (2019-nCoV). Geneva: World Health Organization; 2019. Available at: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus.
4. Dong Y., Mo X., Hu Y., Qi X., Jiang F., Jiang Z., Tong S. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics*. 2020; 145(6): e20200702.
5. Lee P.I., Hu Y.L., Chen P.Y., Huang Y.C., Hsueh P.R. Are children less susceptible to COVID-19? *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020; 53(3): 371-2.
6. Chen Y., Peng H., Wang L., Zhao Y., Zeng L., Gao H. et al. Infants Born to Mothers With a New Coronavirus (COVID-19). *Frontiers in Pediatrics*. 2020; 8: 104.
7. Li N., Han L., Peng M., Lv Y., Ouyang Y., Liu K. et al. Maternal and neonatal outcomes of pregnant women with COVID-19 pneumonia: a case-control study. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71(16): 2035-41.
8. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *International Journal of Clinical Practice*. 2020; 10(2): 1271.
9. Wenzhong L., Hualan L. COVID-19 Disease: ORF8 and surface glycoprotein inhibit heme metabolism by binding to porphyrin. *ChemRxiv*. 2020. Available at: https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c74e1dbb8c1ab62f3db6cb.
10. Wenzhong L., Hualan L. COVID-19: Attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *ChemRxiv*. 2020. Available at: https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c74fa50f50db305139743d.
11. Zhang Y., Zeng X., Jiao Y., Li Z., Liu Q., Ye J. et al. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thrombosis Research.* 2020;193: 110–5.
12. Hottz E.D., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. Frontiers Medicine (Lausanne) 2018; 5: 121.
13. Thachil J. What do monitoring platelet counts in COVID-19 teach us? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020; 18(8): 2071–2.
14. Xie H., Zhao J., Lian N., Lin S., Xie Q., Zhuo H. Clinical characteristics of non-ICU hospitalized patients with coronavirus disease 2019 and liver injury: A retrospective study. *Liver International*. 2020; 40(6): 1321-6.
15. Ferrario C.M., Trask A.J., Jessup J.A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 289: 2281–90.

Поступила 01.06.21
Принята к печати 15.06.21

DOI: http://dx.doi.org/110.51620/0869-2084-2021-66-8-459-464

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Николаев А.А.[1,2], Бабкина И.В.[1], Герштейн Е.С.[1,2], Алферов А.А.[1,2], Делекторская В.В.[1], Мамедли З.З.[1], Кушлинский Н.Е.[1,2]

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ КРИТЕРИЕВ СИСТЕМЫ TNM, УРОВНЕЙ СЫВОРОТОЧНЫХ ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА И ИХ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ, VEGF И ММП-7 ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;
[2]Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

Представлен анализ отдаленных результатов лечения 88 первичных больных аденокарциномой толстой кишки в различных стадиях опухолевого процесса с учетом критериев системы TNM, сывороточных уровней маркеров ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3, VEGF, ММП-7. В качестве критерия прогноза использовали показатель общей выживаемости, оцененный методом Каплана-Майера, а также регрессионную многофакторную модель Кокса. Установили, что сывороточные маркеры ИФР-1, ИФРСБ-2 и VEGF наряду со стадией заболевания можно считать статистически значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости больных колоректальным раком.

Ключевые слова: *ИФР; ИФРСБ; VEGF; ММП-7; сыворотка крови; колоректальный рак.*

Для цитирования: Николаев А.А., Бабкина И.В., Герштейн Е.С., Алферов А.А., Делекторская В.В., Мамедли З.З., Кушлинский Н.Е. Прогностическая значимость инсулиноподобных факторов роста, их транспортных белков, VEGF и ММП-7 в сыворотке крови больных колоректальным раком. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (8): 459-464. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-459-464

Nikolaev A.A.[1,2], Babkina I.V.[1], Gershtein E.S.[1,2], Alferov A.A.[1,2], Delektorskaya V.V.[1], Mamedli Z.Z.[1], Kushlinskii N.E.[1,2]

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE TNM SYSTEM CRITERIA, SERUM INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS, THEIR TRANSPORT PROTEINS, VEGF AND MMP-7 LEVELS IN COLORECTAL CANCER

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478, Russia;
[2]A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127473, Russia

The analysis of long-term results of treatment of 88 primary patients with colon adenocarcinoma at various stages of tumor process is presented, taking into account the TNM system criteria, and serum IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, VEGF, and MMP-7 levels. The overall survival rate assessed by Kaplan-Meier method and Cox multivariate regression model was used as the criterion of prognosis. It was established that IGF-1, IGFBP-2 and VEGF serum levels along with the stage of colorectal cancer might be considered as statistically significant independent predictors of overall survival in patients.

Key words: *IGF; IGFBP; VEGF; MMP-7; blood serum; colorectal cancer.*

For citation: Nikolaev A.A., Babkina I.V., Gershtein E.S., Alferov A.A., Delektorskaya V.V., Mamedli Z.Z., Kushlinskii N.E. Prognostic significance of the TNM system criteria, levels of serum insulin-like growth factors and their transport proteins, VEGF and MMP-7 in colorectal cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (8): 459-464 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-459-464

For correspondence: *Gershtein Elena Sergeevna*, Doctor of Biological Sciences, professor, Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Nikolaev A.A., http://orcid.org/ 0000-0002-3898-4127;
Babkina I.V., http://orcid.org/ 0000-0001-9285-3470;
Gershtein E.S., http://orcid.org/ 0000-0002-3321-801X;
Alferov A.A., http://orcid.org/ 0000-0003-3585-5693;
Delektorskaya V.V., http://orcid.org/ 0000-0002-4550-2069;
Mamedli Z.Z., http://orcid.org/ 0000-0002-9289-1247;
Kushlinskii N.E., http://orcid.org/ 0000-0002-3898-4127.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.05.2021
Accepted 01.06.2021

Введение. В структуре онкологической заболеваемости колоректальный рак (КРР) считают одной из наиболее распространенных форм опухоли: у мужчин он занимает 2-е место, уступая раку легкого; у женщин – 3-е место после рака молочной железы и злокачественных новообразований кожи. При этом показатели роста за-

Для корреспонденции: *Герштейн Елена Сергеевна*, д-р биол. наук, проф., лаб. клин. биохимии ФГБУ; e-mail: biochimia@yandex.ru

болеваемости КРР у мужчин выше по сравнению женщинами [1-2].

Важные данные о роли системы инсулиноподобных факторов роста (ИФР) в канцерогенезе КРР получены на экспериментальных моделях *in vitro*, продемонстрировавших потенциально антиапоптотические и митогенные эффекты ИФР как на нормальных, так и на трансформированных клетках на разных стадиях их развития [3]. Получены данные о том, что ИФР-1 участвует в регуляции экспрессии VEGF – ключевого фактора неоангиогенеза в злокачественных опухолях, в том числе и при КРР [4, 5]. J. Folkman [6] показал, что клетки опухоли могут сформировать новообразование, только если они продуцируют факторы ангиогенеза. W.A. Spannuth и соавт. [7] убедительно доказали, что развитие метастазов опухоли связано с наличием рецепторов VEGF, расположенных на поверхности опухолевых клеток, а также с их протеолитической активностью и степенью выраженности неоваскуляризации опухоли. Разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса (ВКМ), ассоциированными с опухолью протеазами, также считают важным механизмом канцерогенеза [8]. Протеазы связаны с ангиогенезом, так как способствуют разрастанию новых сосудов. Кроме того, при опухолевой прогрессии выявлены нарушения в механизмах регуляторных путей, влияющих на деградацию ВКМ, и как следствие, инициирующих экспрессию белков, активно помогающих опухолевой клетке пройти многоэтапный процесс метастазирования [8]. Показано также, что в реализацию первого этапа метастазирования – инвазии – вовлечен и сигнальный путь ИФР.

Ранее нами было выявлено статистически значимое повышение уровней ИФР-1, ИФРСБ-2, VEGF и снижение уровня ИФРСБ-3 в сыворотке крови общей группы больных новообразованиями толстой кишки [10]. При этом не обнаружено взаимосвязи вышеуказанных маркеров с основными клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Цель настоящего исследования – анализ прогностической значимости критериев системы TNM, уровней основных маркеров системы ИФР **(**ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3), а также VEGF и ММП-7 у больных аденокарциномой толстой кишки.

Материал и методы. В исследование включены 88 больных с впервые выявленным КРР в различных стадиях опухолевого процесса (48 мужчин и 40 женщин) в возрасте от 24 до 85 лет. Следует отметить, что из 88 больных 25 (28,4%) умерли в сроки от 1,3 до 51,6 мес от начала лечения.

Все пациенты проходили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. По данными гистологического исследования удаленной опухоли согласно «Международной гистологической классификации опухолей толстой кишки» (ВОЗ, 2013 г.) у всех обследованных пациентов обнаружена аденокарцинома толстой кишки: умеренной (70,3%), высокой (14,1%) и низкой степени дифференцировки (15,6%).

Содержание ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3, VEGF, ММП-7 определяли в образцах сыворотки крови больных КРР до проведения лечения с помощью стандартных наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа: «IGF-I-ELISA», «IGF-II-ELISA», «IGFBP-1-ELISA», «IGFBP-2-ELISA», «IGFBP-3-ELISA» (Mediagnost®, Германия), Quantikine®, «Human VEGF», Quantikine®, «Human MMP-7 (total) ELISA» (R&D systems, США) в соответствии с инструкциями производителей.

Статистические методы. При анализе полученных результатов применяли однофакторный и многофакторный дисперсионный анализы. Для расчетов использовали персональный компьютер с операционной системой Windows 7 и прикладными программными пакетами Statistica 7.0, MS Office XP: MS Word и MS Excel. Общую выживаемость больных КРР рассчитывали методом Каплана-Майера с оценкой статистически значимых различий с помощью log-rank теста, а также с помощью регрессионной многофакторной модели Кокса. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Провели анализ отдаленных результатов лечения 88 больных КРР с учетом критериев системы TNM. Показатели общей выживаемости больных с распространенностью первичной опухоли, соответствующей T1-T2, при 3-летнем периоде наблюдения практически не различались, тогда как в группе пациентов с критерием T3 на данном сроке наблюдения отмечено снижение показателя общей выживаемости примерно на 15%. Существенно худшие показатели общей выживаемости выявлены в группе больных КРР с критерием T4 (медиана срока жизни составила 30,4 мес, 4-летняя выживаемость – 26,0±19,2%) (рис. 1, *а, б, в)*.

Отдаленные результаты лечения больных КРР достоверно ухудшались по мере увеличения показателя N. Так, при отсутствии у пациентов метастазов в региональных лимфоузлах (N0) медиана срока жизни не была достигнута, а 4-летняя выживаемость составила 61,8±12,9%. При выявлении единичных регионарных метастазов (N1) медиана срока жизни составила 44,8 мес, а при множественных метастазах (N2) – 19,7 мес, при этом показатели 4-летней общей выживаемости составили 44,3±14,4% и 28,6±22,6% соответственно (см. рис. 1, *а, б, в*).

Отдаленные результаты лечения больных КРР статистически значимо ухудшались при выявлении у пациента отдаленных метастазов (M1). Так, медиана длительности жизни не была достигнута при отсутствии отдаленных метастазов и равнялась 15,5 мес при их выявлении. Показатели 4-летней общей выживаемости в вышеуказанных группах составляли 60,0±12,5% и 0% соответственно.

Многофакторный анализ (Proportional hazard (Cox) regression) с включением в модель критериев TNM показал, что длительность общей выживаемости больных КРР определяло наличие отдаленных метастазов (критерий M, p=0,00001), тогда как распространенность первичной опухоли (критерий T, p=0,07) и метастазы в регионарных лимфоузлах (критерий N, p=0,4) в меньшей степени связаны с отдаленными результатами лечения (табл. 1).

Общая выживаемость больных КРР с учетом основных компонентов системы ИФР/ИФРСБ. Для анализа связи отдаленных результатов лечения 88 больных КРР с концентрациями ИФР-1 в сыворотке крови пациенты были разделены на 4 группы, ориентируясь на медиану и квартили показателя: 1) группа – менее 110 нг/мл; 2) группа – от 110 до 159 нг/мл; 3) группа – от 160 до 209 нг/мл; 4) группа – от 210 нг/мл и более. Рассчитали общую выживаемость в 4-х вышеуказанных группах (рис. 2). Наихудшие показатели общей выживаемости

DOI: http://dx.doi.org/110.51620/0869-2084-2021-66-8-459-464

больных КРР выявлены в группе пациентов с низкими уровнями сывороточного ИФР-1 (менее 110 нг/мл; p=0,019). Так, показатель 2-летней общей выживаемости снижался до 59,3±11,3% (на 30% по сравнению с пациентами с высоким уровнем маркера), а медиана длительности жизни составила 36,6 мес. В группах больных

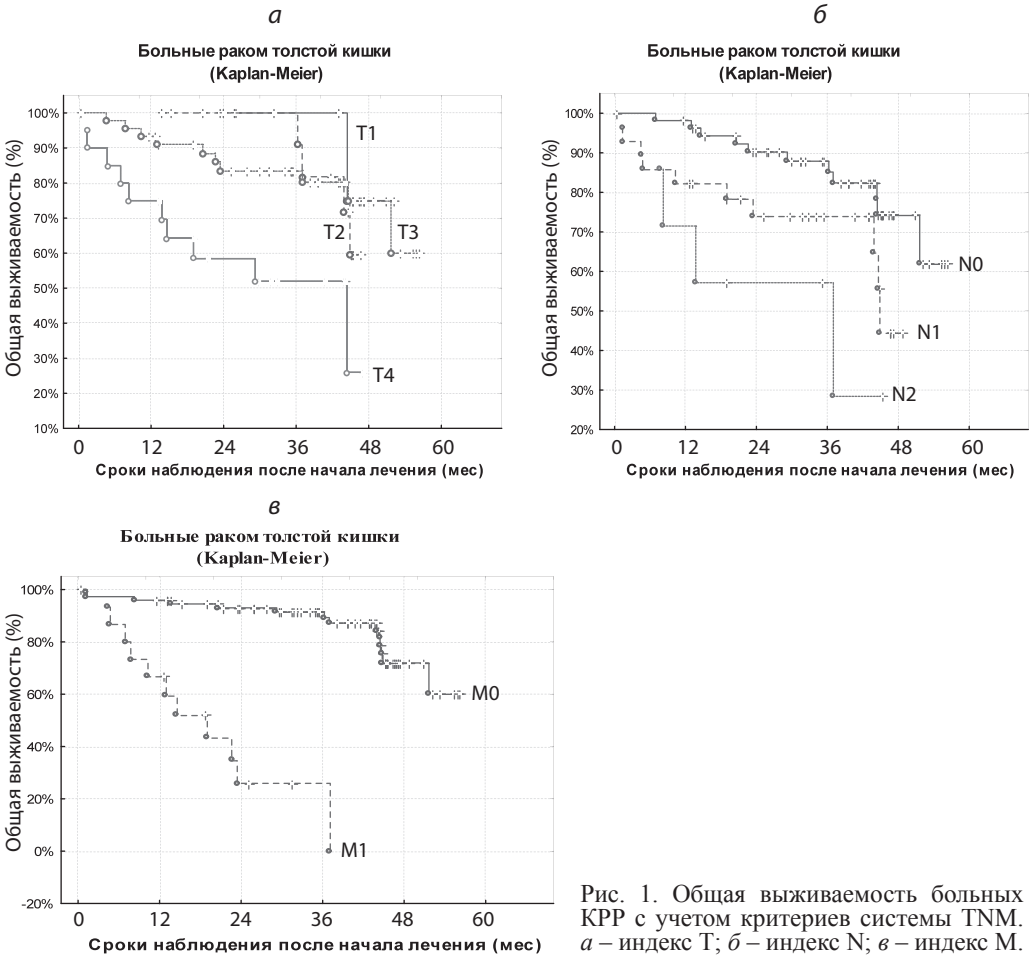


Рис. 1. Общая выживаемость больных КРР с учетом критериев системы TNM. *а* – индекс T; *б* – индекс N; *в* – индекс M.

Таблица 1

Многофакторный анализ связи критериев системы TNM и уровней ИФР-1, ИФРСБ-2, VEGF с отдаленными результатами лечения больных колоректальным раком

Критерии	Бета	Стандартная ошибка	Статистика Вальда	*p*
Критерии системы TNM				
T	0,61±0,34	1,84	3,27	0,071
N	0,24±0,30	1,27	0,67	0,41
M	2,35±0,53	10,45	19,43	0,00001
Критерии системы TNM и сывороточные уровни ИФР-1				
T	0,72±0,38	2,05	3,52	0,06
N	0,46±0,31	1,58	2,24	0,13
M	2,11±0,53	8,31	16,2	<0,0001
ИФР-1 (пороговый уровень 110 нг/мл)	-1,26±0,44	0,29	8,23	0,004
Критерии системы TNM и сывороточные уровни ИФРСБ-2				
T	0,59±0,38	1,8	2,9	0,09
N	0,22±0,22	1,24	0,55	0,46
M	2,09±0,54	8,06	15,0	0,00017
ИФРСБ-2 (пороговый уровень 700 пг/мл)	0,38±0,44	1,46	4,47	0,03
Критерии системы TNM и сывороточные уровни VEGF				
T	0,45±0,32	1,58	1,99	0,16
N	0,27±0,30	1,31	0,82	0,36
M	2,05±0,55	7,78	13,79	0,0002
Уровни VEGF (<600, 600-899, ≥900 пг/мл)	0,48±0,20	1,61	1,61	0,016

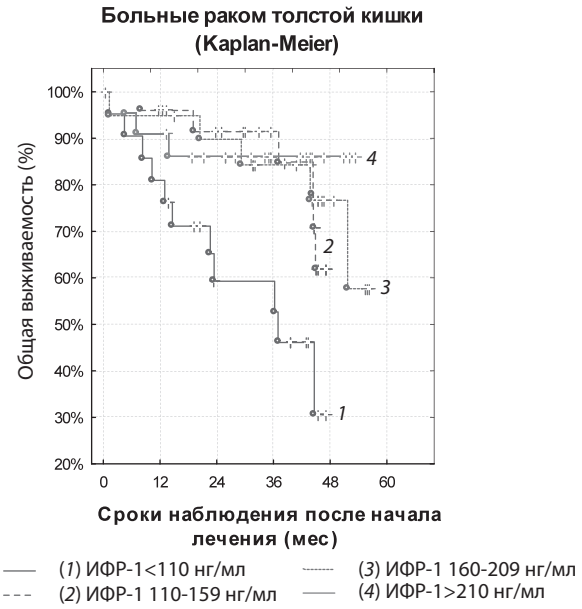


Рис. 2. Общая выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от исходных концентраций ИФР-1 в сыворотке крови.

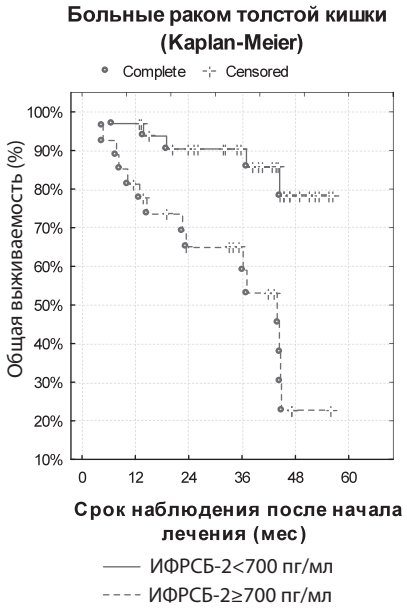


Рис. 3. Общая выживаемость больных КРР с учетом сывороточных уровней ИФРСБ-2.

Таблица 2

Показатели общей выживаемости больных КРР с учетом концентрации ИФРСБ-2 в сыворотке крови

Уровни ИФРСБ-2 (пг/мл)	*n*	Медиана срока жизни (мес)	Общая выживаемость, %			*p*
			2-летняя	3-летняя	4-летняя	
<400	15	43,7	85,6±9,5	85,6±9,5	47,5±21,9	0,01
400-699	18	-	94,1±5,7	94,1±5,7	94,1±5,7	
700-999	11	39,6	62,3±15,0	62,3±15,0	15,61±14,0	
≥1000	16	36,9	67,0±12,1	57,5±13,7	31,9±16,2	
<700	33	-	90,4±5,3	64,9±9,5	78,5±9,3	0,0008
≥700	27	39,9	64,9±9,5		22,7±11,0	

Примечание. Здесь и в табл. 3: *n* – число больных.

КРР с другими исходными значениями сывороточного ИФР-1 различия в показателях общей выживаемости были в пределах статистической ошибки (рис. 3).

Таким образом, ИФР-1 может служить прогностическим фактором у больных КРР с пороговым значением 110 нг/мл (p=0,0019; рис. 3). Показатель 3-летней общей выживаемости по этому порогу различался на 56%, а показатель 4-летней общей выживаемости – на 29%. Многофакторный анализ с включением в модель критериев системы TNM и концентрации ИФР-1 в сыворотке крови больных КРР показал, что критерий М и уровни ИФР-1 по порогу 110 нг/мл можно считать статистически значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости (табл. 1).

Исходные концентрации ИФРСБ-2 в сыворотке крови больных КРР исследованы у 60 больных и разбиты с ориентировкой на квартили и медиану на 4 группы: 1) группа – <400 пг/мл; 2) группа – от 400 до 700 пг/мл; 3) группа – от 700 до 1000 пг/мл; 4) группа – от 1000 пг/мл и более. В этих группах провели сравнительный анализ показателей общей выживаемости (табл. 2). Как следует из данных таблицы 2, показатели общей выживаемости больных КРР с концентрациями ИФРСБ-2 в пределах 700-999 пг/мл и ≥1000 пг/мл были сопоставимы, что позволило разделить больных на 2 группы по порогу ИФРСБ-2 < и ≥700 пг/мл. Как следует из полученных данных, выживаемость больных с уровнями ИФРСБ-2 ≥700 пг/мл существенно снижалась после 4-х лет наблюдения до 22,7±11,0% (на 55%). Стало быть, исходные концентрации ИФРСБ-2 ≥700 пг/мл в сыворотке крови указывают на неблагоприятный прогноз 4-летней выживаемости больных КРР, а количество таких наблюдений составило 45% (рис. 3).

При многофакторном анализе с включением в модель критериев системы TNM и концентрации ИФРСБ-2 в сыворотке крови показано, что данный маркер статистически значимо связан с отдаленными результатами лечения больных КРР (p=0,03) наряду с критерием М (p=0,0001; см. табл. 1). Следовательно, пороговый уровень сывороточного ИФРСБ-2 равный 700 пг/мл можно использовать для уточнения прогноза 5-летней общей выживаемости больных КРР.

Многофакторный анализ не выявил статистически значимой связи сывороточных уровней ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 с показателями общей выживаемости у больных КРР.

Следует отметить, что за последние 10 лет исследований системы ИФР/ИФРСБ установлена определенная взаимосвязь между высоким уровнем ИФР-1 в крови и риском развития злокачественных опухолей [11, 12].

DOI: http://dx.doi.org/110.51620/0869-2084-2021-66-8-459-464

У человека ИФР-1 играет значимую роль в развитии рака простаты, поджелудочной железы, головы и шеи, молочной железы, коры надпочечников, желудка, толстой кишки, печени, яичников, эндометрия [13-22]. Однако, клинические и эпидемиологические исследования роли ИФР-сигнального пути в этиопатогенезе КРР носят в значительной степени противоречивый характер. Данные представленного нами исследования выявили, что только ИФР-1 и ИФРСБ-2 можно использовать в оценке прогноза общей выживаемости больных аденокарциномой толстой кишки. При этом, многофакторный анализ не выявил связи других компонентов системы ИФР/ИФРСБ (ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3) с прогнозом общей выживаемости больных КРР.

Общая выживаемость больных КРР с учетом уровней VEGF. Для анализа связи концентраций сывороточного VEGF у 60 больных КРР с отдаленными результатами лечения концентрации исследованного белка были разбиты на 4 уровня: 1) до 300 пг/мл; 2) 300-599 пг/мл; 3) 600-899 пг/мл и 4) 900 пг/мл и более. Выявлено, что в группе больных с уровнями VEGF в сыворотке крови менее 300 пг/мл общая выживаемость не отличалась от таковой у пациентов с концентрациями VEGF в диапазоне 300-599 пг/мл. Статистически значимое снижение показателей 2-летней общей выживаемости наблюдали в группе больных КРР с концентрацией маркера 600-899 пг/мл (72,9±16,5%) и особенно, в группе пациентов с уровнями VEGF – 900 пг/мл и более (45,5±15,0%). Медианы общей выживаемости в последних двух группах составили 36,7 и 16,5 мес соответственно (p=0,0016).

На основании полученных данных, стало возможным объединение больных КРР 1-й и 2-й вышеуказанных групп в одну с общей концентрацией VEGF в сыворотке крови <600 пг/мл. Таким образом, в созданных нами 3-х группах с учетом концентраций VEGF (<600, 600-899, ≥900 пг/мл) показатели 2- и 3-летней общей выживаемости статистически значимо различались (p=0,0005; рис. 4).

Многофакторный анализ с включением в модель критериев системы TNM и 3-х уровней сывороточного VEGF (<600 пг/мл, 600-899 пг/мл, ≥900 пг/мл), выявил, что критерий M и уровень VEGF являются статистически значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости пациентов с КРР (см. табл. 1).

В одной из первых работ основателя теории неоангиогенеза при опухолях J.Folkman [6] убедительно доказал, что опухоль не может развивается без образования в ней кровеносных сосудов. По мере прогрессирования опухолевого процесса все злокачественные новообразования приобретают ангиогенный фенотип, а ключевым активатором ангиогенеза в них является VEGF [4]. Представленные нами клинические данные указывают на тот факт, что с высокой продукцией VEGF связана распространенность (индекс M, см. табл. 1) опухолевого процесса при КРР. Полученные нами результаты подтверждает исследование W.A.Spannuth и соавт. [7], в котором высокая продукция рецепторов ангиогенеза связана с развитием метастазов. Кроме того, по данным проведенного нами исследования неблагоприятный прогноз общей выживаемости выявлен у больных КРР с высокими сывороточными уровнями VEGF. При этом, в работе J.R.van Beijnum и соавт. [5] показано, что в регуляции экспрессии VEGF принимает активное участие ИФР-1.

Общая выживаемость больных КРР с учетом уровней ММП-7. Проведен анализ общей выживаемости 60 больных КРР с учетом уровня ММП-7 в сыворотке крови. Больных разделили на 4 группы с ориентировкой на квартили и медиану сывороточного уровня ММП-7: 1) менее 4 нг/мл; 2) от 4 до 4,9 нг/мл; 3) от 5 до 6,9 нг/мл; 4) 7 нг/мл и более. В этих группах рассчитали показатели общей выживаемости (табл. 3).

Показатели общей выживаемости во всех группах больных КРР с концентрациями ММП-7 <7 нг/мл были сопоставимы, тогда как в группе пациентов с сывороточным уровнем ММП-7 ≥7 нг/мл – статистически значимо снижались. Однако, многофакторный анализ с

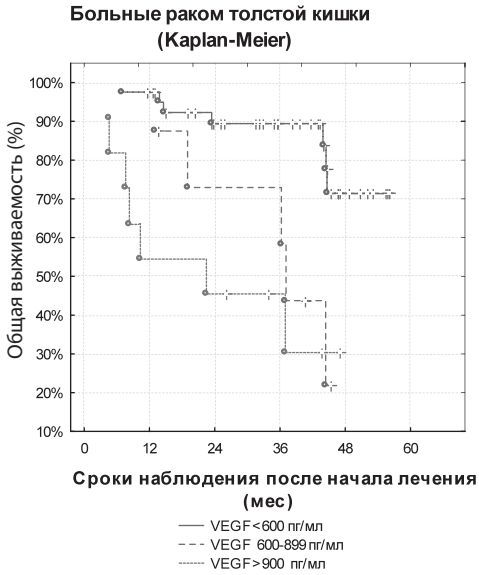


Рис. 4. Общая выживаемость больных КРР с учетом сывороточных уровней VEGF.

Таблица 3

Отдаленные результаты лечения больных колоректальным раком в зависимости от исходного содержания ММП-7 в сыворотке крови

Уровни ММП-7 (нг/мл)	n	Медиана срока жизни (мес)	Общая выживаемость, %			p
			2-летняя	3-летняя	4-летняя	
<4,0	16	-	86,7±8,8	86,7±8,8	52,0±17,9	0,0028
4,0-4,9	17	-	100	100	70,0±14,5	
5-6,9	13	-	75,3±12,6	75,3±12,6	75,3±12,6	
≥7,0	14	20,0	42,3±15,0	42,3±15,0	28,2±15,3	
<7,0	46	-	90,4±5,3	90,4±5,3	78,5±9,3	0,0035
≥7,0	14	20,0	42,3±15,0	42,3±15,0	28,2±15,3	

включением в модель критериев системы TNM и уровня ММП-7 в сыворотке крови показал, что ММП-7 не является статистически значимым фактором прогноза общей выживаемости больных КРР (p=0,48).

D.Hanahan и R.A.Weinberg [8] считают, что ассоциированные с опухолью протеазы, являются важными маркерами канцерогенеза и связаны с разрушением окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса, что способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток в окружающие органы и ткани. Кроме того, продукция протеаз тесно связана с активностью ангиогенеза, что способствует разрастанию новых сосудов и реализации первого этапа метастазирования – инвазии [9], в который вовлечен сигнальный путь ИФР/ИФРСБ. W.A.Spannuth и соавт. [7] убедительно доказали, что развитие метастазов опухоли связано не только со степенью выраженности неоваскуляризации новообразования, но и с их протеолитической активностью. При однофакторном анализе нами выявлено статистически значимое различие в показателях общей выживаемости в группах с «высокими» (<7 нг/мл) и «низкими» (≥7 нг/мл) уровнями ММП-7. Однако, многофакторный анализ сывороточных уровней ММП-7 в сочетании с критериями системы TNM не выявил связи данного маркера с прогнозом общей выживаемости у больных КРР.

Подводя итоги анализа отдаленных результатов лечения больных КРР с учетом основных клинико-морфологических характеристик заболевания и уровней исследованных биологических маркеров (ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3, VEGF, ММП-7) в сыворотке крови можно сделать следующее заключение. Сывороточные уровни маркеров ИФР-1, ИФРСБ-2 и VEGF наряду со стадией КРР можно рассматривать в качестве статистически значимых независимых факторов прогноза общей выживаемости.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 22 см. REFERENCES)

1. Заридзе Д.Г., Каприн А.Д., Стилиди И.С. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России. *Вопросы онкологии.* 2018; 64(5): 578-90.

REFERENCES

1. Zaridze D.G., Kaprin A.D., Stilidi I.S. Dynamics of morbidity and mortality from malignant neoplasms in Russia. *Voprosy onkologii.* 2018; 64 (5): 578-90. (in Russian)
2. Moons L., Mariman A., Vermeir P., Colemont L., Clays E., Van Vlierberghe H., Vogelaers D. Sociodemographic factors and strategies in colorectal cancer screening: a narrative review and practical recommendations. *Acta Clin. Belg.* 2020; 75(1): 33-41.
3. Yakar S., Leroith D., Brodt P. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(4-5): 407-20.
4. Conn G., Soderman D.D., Schaeffer M.-T., Wile M., Hatcher V.B., Thomas K.A. Purification of a glicoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87(4): 1323-27.
5. van Beijnum J.R., Pieters W., Nowak-Sliwinska P., Griffioen A.W. Insulin-like growth factor axis targeting in cancer and tumour angiogenesis – the missing link. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2017; 92(3): 1755-68.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 1985; 43: 175-230.
7. Spannuth W.A., Nick A.M., Jennings N.B., Armaiz-Pena G.N., Mangala L.S., Danes C.G. et al. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer.* 2009; 124(5): 1045-53.
8. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646-74.
9. Duffy M.J., McGowan P.M., Gallagher W.M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J. Pathol.* 2008; 214(3): 283-93.
10. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Nikolaev A.A., Delektorskaya V.V., Korotkova E.A., Dvorova E.K., Kostyleva O.I. Insulin-like growth factors (IGF), IGF-binding proteins (IGFBP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood serum of patients with colorectal cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 156(5): 684-8.
11. Weiss J.M., Huang W.Y., Rinaldi S., Fears T.R., Chatterjee N., Chia D. et al. IGF-1 and IGFBP-3: Risk of prostate cancer among men in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Int. J. Cancer.* 2007; 121(10): 2267-73.
12. Douglas J.B., Silverman D.T., Pollack M.N., Tao Y., Soliman A.S., Stolzenberg-Solomon R.Z. Serum IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, and IGF-I/IGFBP-3 Molar Ratio and Risk of Pancreatic Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010; 19(9): 2298-2306.
13. Harrison S., Lennon R., Holly J., Higgins J.P.T., Gardner M., Perks C. et al. Does milk intake promote prostate cancer initiation or progression via effects on insulin-like growth factors (IGFs)? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2017; 28(6): 497-528.
14. Gong Y., Zhang B., Liao Y., Tang Y., Mai C., Chen T., Tang H. Serum Insulin-Like Growth Factor Axis and the Risk of Pancreatic Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2017; 9(4): 394.
15. Zhi X., Lamperska K., Golusinski P., Schork N.J., Luczewski L., Golusinski W., Masternak M.M. Expression levels of insulin-like growth factors 1 and 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Growth Horm. IGF Res.* 2014; 24(4): 137-41.
16. Kalledsøe L., Dragsted L.O., Hansen L., Kyrø C., Grønbæk H., Tjønneland A., Olsen A. The insulin-like growth factor family and breast cancer prognosis: A prospective cohort study among postmenopausal women in Denmark. *Growth Horm. IGF Res.* 2019; 44: 33-42.
17. Altieri B., Colao A., Faggiano A. The role of insulin-like growth factor system in the adrenocortical tumors. *Minerva Endocrinol.* 2019; 44(1): 43-57.
18. Abdel-Rahman O. Insulin-like growth factor pathway aberrations and gastric cancer; evaluation of prognostic significance and assessment of therapeutic potentials. *Med. Oncol.* 2015; 32(1): 431.
19. Simons C.C., Schouten L.J., Godschalk R.W., van Engeland M., van den Brandt P.A., van Schooten F.J., Weijenberg M.P. Genetic Variants in the Insulin-like Growth Factor Pathway and Colorectal Cancer Risk in the Netherlands Cohort Study. *Sci Rep.* 2015; 5: 14126.
20. Kuemmerle J.F. Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2012; 41(2): 409-23.
21. Gershtein E.S., Isaeva E.R., Kushlinsky D.N., Korotkova E.A., Ermilova V.D., Laktionov K.P., Adamyan L.V. Insulin-Like Growth Factors (IGF) and IGF-Binding Proteins (IGFBP) in the Serum of Patients with Ovarian Tumors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160(6): 814-6.
22. Majchrzak-Baczmańska D., Malinowski A. Does IGF-1 play a role in the biology of endometrial cancer? *Ginekol. Pol.* 2016; 87(8): 598-604.

Поступила 15.05.21
Принята к печати 01.06.21

DOI: http://dx.doi.org/110.51620/0869-2084-2021-66-8-465-471

© ВЛАСОВА О.С., БИЧКАЕВА Ф.А., 2021

Власова О.С., Бичкаева Ф.А.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНАМИ B_1, B_2 У ЖИТЕЛЕЙ ДВУХ СЕВЕРНЫХ РЕГИОНОВ

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова УрО РАН», 163061, Архангельск, Россия

Проведено исследование возрастных особенностей углеводного обмена и обеспеченности витаминами B_1, B_2 среди населения приарктического (ПР) и арктического (АР) регионов, различающихся экстремальностью природных и климатогеографических условий проживания. Обследованный контингент разделен на пять возрастных групп: 16-21, 22-35, 36-45, 46-60 и 61-74 лет. В сыворотке крови определены параметры углеводного обмена (глюкоза, лактат, пируват), в гемолизатах – содержание тиамина (ТДФ-эффект) и рибофлавина, рассчитаны величины отношения лактат/пируват (Лак/Пир). Статистическая обработка данных выполнена непараметрическими методами. Установлено повышение уровня глюкозы у лиц старших возрастных групп. Возрастные колебания метаболитов углеводного обмена проявлялись более низким содержанием лактата и величины отношения Лак/Пир у лиц 16-21 лет. Вне зависимости от возраста и региона обследования выявлены высокие концентрации лактата, значения Лак/Пир и сниженные уровни пирувата, а также низкое содержание глюкозы в группе 16-21 год в АР. Для витаминов B_1, B_2 выраженных возрастных изменений не отмечалось, при этом содержание рибофлавина было выше у лиц ПР. Умеренный гиповитаминоз тиамина выявлен в 13-20,1% и 6,1-22,7% случаев в ПР и АР, выраженный – 8,3-11,6% и 4,6-23,5% соответственно, дефицит витамина B_2 отмечен у 19,4-23,9% лиц в ПР и 33,8-42,9% лиц в АР. Витамины в обоих регионах в разные возрастные периоды вносили свой вклад в формирование уровней показателей углеводного обмена, в ПР, в основном, глюкозы и пирувата, в АР – лактата.

Ключевые слова: *углеводный обмен; глюкоза; витамин B_1; витамин B_2; Арктика; Север; возраст.*

Для цитирования: Власова О.С., Бичкаева Ф.А. Возрастные изменения параметров углеводного обмена и обеспеченности витаминами B_1, B_2 у жителей двух северных регионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (8): 465-471. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-465-471

Vlasova O.S., Bichkaeva F.A.

AGE-RELATED CHANGES IN THE PARAMETERS OF CARBOHYDRATE METABOLISM AND SUPPLY OF VITAMINS B_1, B_2 IN RESIDENTS OF TWO NORTHERN REGIONS

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (FCIAR UrB RAS), 163061, Arkhangelsk, Russia

A great deal of research was being done in studying of the age-related characteristics of carbohydrate metabolism and the provision of vitamins B_1, B_2 among the population of the Subarctic (SR) and Arctic (AR) regions, differing in the extreme natural and climatic-geographic living conditions. The surveyed population was divided into five age groups: 16-21, 22-35, 36-45, 46-60 and 61-74 years old. The parameters of carbohydrate metabolism (glucose, lactate, pyruvate) were determined in the blood serum, the content of thiamine (thiamin diphosphate effect) and riboflavin – in hemolysates, and the values of the lactate/pyruvate ratio (Lac/Pyr) were calculated. Statistical data processing was performed by nonparametric methods. An increase in glucose levels was found in persons of older age groups. Age-related fluctuations of metabolites of carbohydrate metabolism were manifested by a lower content of lactate and the value of the Lac/Pyr ratio in persons aged 16-21 years. Regardless of the age and region of the survey, there were revealed high lactate concentrations, Lac/Pyr values and reduced pyruvate levels, as well as low glucose levels in group aged 16-21 year in AR. For vitamins B_1, B_2, no pronounced age-related changes were observed, while the content of riboflavin was higher in persons of SR. Moderate hypovitaminosis of thiamin was detected in 13-20,1% and 6,1-22,7% of cases in SR and AR, pronounced – 8,3-11,6% and 4,6-23,5%, respectively, vitamin B_2 deficiency was noted in 19,4-23,9% of persons in the AR and in 33,8-42,9% of persons in the AR. Vitamins in both regions at different age periods contributed to the formation of levels of indicators of carbohydrate metabolism: glucose and pyruvate in SR, lactate in AR.

Key words: *carbohydrate metabolism; glucose; vitamin B_1; vitamin B_2; the North; the Arctic; age.*

For citation: Vlasova O.S., Bichkaeva F.A. Age-related changes in the parameters of carbohydrate metabolism and supply of vitamins B_1, B_2 in residents of two northern regions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 465-471 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-465-471

For correspondence: *Vlasova O.S.,* Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the Laboratory of Biological and Inorganic; e-mail: olgawlassova@mail.ru

Information about authors:

Vlasova O.S., http://orcid.org/0000-0002-6956-6905;
Bichkaeva F.A., http://orcid.org/0000-0003-2970-4469.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*
Acknowledgment. *The reported study was funded by the FCIAR UrB RAS according to the research project: «Study of adaptive age-related endocrine-metabolic rearrangements in residents of the Arctic territories» (AAAA-A19-119121090063-7).*

Received 02.04.2021
Accepted 10.05.2021

Для корреспонденции: *Власова Ольга Сергеевна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биологической и неорганической химии; e-mail: olgawlassova@mail.ru

Введение. Одним из факторов, влияющим на содержание параметров углеводного обмена в крови у человека, является возраст. Главное проявление возрастных изменений углеводного обмена – снижение толерантности к глюкозе (Глю) вследствие формирования инсулинрезистентности (ИР) [1-3]. Развитие ИР при старении, определяющее уменьшение скорости транспорта Глю, является первичным метаболическим дефектом и основной причиной угнетения гликолиза, а также окисления Глю в цикле Кребса и синтеза гликогена [4], в результате чего происходит повышение уровня Глю в крови [1, 5].

При этом немаловажную роль в реализации процессов углеводного метаболизма играют водорастворимые витамины (тиамин – B_1 и рибофлавин – B_2). Витамин B_1 в виде кофермента тиаминдифосфата (ТДФ) входит в состав пируватдегидрогеназного (ПД) и оксоглутаратдегидрогеназного комплексов, помимо этого ТДФ является коферментом и для транскетолазы – ключевого фермента неокислительной ветви пентозофосфатного пути (ПФП). Недостаток тиамина снижает активность этих ферментов и тем самым тормозит утилизацию Глю, в результате чего её метаболизм проходит по альтернативным путям (гексозаминовый, полиольный, образование гликированных продуктов) [6, 7]. Дефицит тиамина также нарушает синтез и секрецию инсулина (Инс) [6, 8]. Установлено, что сахарный диабет (СД) связан с низким статусом тиамина в организме [9]. Введение тиамина пациентам с СД приводило к снижению уровня Глю, Лак, Пир в крови, гликированных продуктов метаболизма Глю (гликированного гемоглобина и др.), к повышению синтеза Инс [6, 9-11].

Помимо тиамина большое значение для энергетического метаболизма, в том числе и окисления углеводов, Пир, имеет витамин B_2. Он входит в состав коферментов флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), образующих активные и регуляторные центры флавиновых ферментов [12]. Также как и ТДФ, ФАД является коферментом ПД. Витамин B_2 и его коферментные формы ФМН и ФАД являются ингибиторами гликогенфосфорилазы (ГФ), фермента гликогенолиза [13, 14]. Ингибиторы ГФ снижают распад гликогена и продукцию Глю печенью. Снижение активности ГФ значительно ослабляет гипергликемию, препятствует накоплению Лак и протонов водорода, что имеет значение для сахароснижающей терапии при СД [16].

Как и гомеостаз Глю, с возрастом обеспеченность этими двумя витаминами претерпевает изменения: их уровни снижаются [16, 17], что может оказывать влияние и на возрастные флуктуации углеводных показателей. Однако, высказывается мнение, что при проживании на Севере потребность организма в водорастворимых витаминах ниже по сравнению со средними широтами вследствие уменьшения интенсивности углеводного обмена [18], выражающимся снижением уровня Глю и пирувата (Пир), повышением содержания лактата (Лак) в крови [19, 20].

В связи с вышесказанным, целью работы стало изучение возрастных особенностей углеводного обмена и обеспеченности витаминами B_1, B_2 у северян – жителей двух регионов, различающихся жесткостью природных и климатогеографических условий среды обитания.

Материал и методы. В данной работе использован материал экспедиций, проведенных с 2009 по 2017 гг. Обследованы мужчины и женщины в возрасте от 16 до 74 лет, постоянно проживающие на Севере РФ в Приарктическом (ПР) – 928 человек – и Арктическом регионах (АР) – 1305 человек, вне периода обострения их хронических заболеваний. Территории АР являются менее комфортными для проживания по природным и климатическим факторам, чем в ПР: широкое распространение вечной мерзлоты, субарктический климат с более низкими температурами, напряженной ветровой ситуацией, резкими перепадами атмосферного давления, с суровыми продолжительными зимами.

Из обследования исключены лица, состоящие на диспансерном учете у эндокринолога, имеющие в анамнезе заболевания сердечно-сосудистой системы и СД. Исследование проводилось с письменного согласия волонтеров и в соответствии с требованиями Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000 г.).

Обследованные были подразделены на 5 возрастных групп: 1-я – 16-21 год (юношеский возраст) – 137 человек в ПР и 250 в АР; 2-я – 22-35 лет (1-й период зрелого возраста) – 224 человека в ПР и 270 в АР; 3-я – 36-45 лет (2-й период зрелого возраста) – 168 человек в ПР и 259 в АР; 4-я – 46-60 лет (3-й период зрелого возраста) – 358 человек в ПР и 410 в АР; 5-я (старшая) – 61-74 лет (пожилой возраст) – 41 человек в ПР и 116 в АР [21].

Уровни параметров углеводного обмена определяли в сыворотке крови спектрофотометрическим методом на биохимическом анализаторе «ФУРУНО СА-270» (Япония), анализаторах «Биолаб-100» (Россия), «Cary 50 Scan». Содержание глюкозы (Глю), лактата (Лак) определялось с использованием наборов «Chronolab AG» (Швейцария), пирувата (Пир) – по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Рассчитаны значения коэффициента Лак/Пир, показывающего степень превалирования анаэробных процессов окисления над аэробными. В гемолизатах крови определяли содержание витаминов B_1 и B_2 спектрофотометрическим и флюорометрическим методом на анализаторах «Биолаб-100» и «Флюорат-02-АБЛФ». Тиаминовую обеспеченность оценивали по значениям ТДФ-эффекта. ТДФ-эффект 1,15 усл. ед. и менее отражает нормальную обеспеченность организма тиамином, значения в диапазоне 1,15-1,25 усл. ед. свидетельствуют об умеренном гиповитаминозе, ТДФ-эффект выше 1,25 усл. ед. – о выраженном гиповитаминозе.

Проведен статистический анализ данных полученных значений показателей с помощью пакета прикладных программ SPSS 13.0. Полученные выборки проверялись на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилки. В связи с выявлением частичной асимметрии рядов распределения применялись непараметрические методы анализа. Выполнен дескриптивный анализ (расчет медианы, 25 и 75 перцентилей), дисперсионный анализ (расчет Н-критерия Краскела-Уоллиса), оценка статически значимых различий для независимых выборок проводилась с использованием критерия Манна-Уитни. Проверка гипотезы о различии между двумя пропорциями (долями) выполнялась в программе Statistica 10.0 с помощью двухстороннего критерия статистической значимости, основанного на t-значении. Пороговое значение уровня значимости (p) при сравнении показателей в двух регионах считали равным 0,05, в случае апостериорных сравнений пяти возрастных групп – 0,005 [22]. Корреляционный анализ параметров выполнен по Спирмену с учетом ранговой корреляции при критическом уровне значимости 0,05.

DOI: http://dx.doi.org/110.51620/0869-2084-2021-66-8-465-471

Результаты. Оценка интегрального показателя углеводного обмена – Глю в возрастном аспекте у жителей ПР и АР показала наличие статистически значимых изменений (H=21,46, p<0,001 и H=353,00, p<0,001 соответственно в ПР и АР), содержание Глю у лиц юношеского возраста (16-21 лет) минимально в обоих регионах, но при этом у юношей АР значимо ниже относительно ПР (p<0,001) (см.таблицу). В соответствие с этим частота регистрации концентраций показателя ниже референсных значений (3,9-6,1 ммоль/л) в АР была высокой – 65,3%, когда как в ПР она составила 7,3% (p<0,001).

С возрастом в зрелом периоде (22-60 лет) статистически значимое повышение уровня Глю относительно 16-21-летних лиц в ПР отмечено в группе 46-60 лет (p=0,004), а в АР – начиная с периода 22-35 лет (p<0,001), максимальных значений показатель достигал у лиц пожилого возраста (61-74 лет) (в ПР p<0,001 по сравнению с группой 16-21 год, p=0,001 – группой 22-35 лет; в АР p<0,001 по сравнению с группами 16-21 и 22-35 лет, p=0,002 – 36-45 лет) (см. таблицу). При этом во всех возрастных периодах регистрировались значения показателя, как ниже нормы, так и превышающие норматив, однако число последних с возрастом повышалось с 6,6% до 19,5% в ПР и с 1,6% до 21,6% в АР. При сравнении аналогичных возрастных групп ПР и АР отмечено сглаживание региональных различий, начиная с 22-35 лет.

Проведенное исследование показало, что уровень Пир во всех возрастных группах в обоих регионах был смещен к нижней границе физиологической нормы (0,03-0,1 ммоль/л) – в ПР у каждого пятого обследованного (16,7-20,3%), в АР – у каждого четвертого (24,5-30,1%), исключением стала старшая группа ПР с долей низких значений 5%, т.е. в АР низкие величины Пир регистрировались чаще, что подтверждается наличием значимых различий в возрасте 22-35, 46-60 и 61-74 лет (p=0,001, p=0,017, p=0,007, соответственно). Этим обусловлено наличие региональных различий в концентрациях Пир в группах 16-21, 46-60 и 61-74 лет – в АР они значимо ниже по сравнению с ПР (p<0,001, p=0,019 и p=0,029, соответственно), таким образом, в целом, уровень этого метаболита углеводного обмена в АР более низкий, чем в ПР (см. таблицу). Четко выраженной возрастной динамики для данного показателя не установлено (H=8,47, p=0,076 и H=3,21, p=0,523 соответственно в ПР и АР).

Оценка содержания Лак в возрастном аспекте показала, что в обоих регионах значимые колебания (H=15,95, p=0,003 и H=77,27, p<0,001 соответственно в ПР и АР) обусловлены минимальными уровнями в юношеской группе (в ПР p<0,001 относительно лиц 22-35 и 46-60 лет; в АР p<0,001 относительно остальных возрастных групп), при этом концентрация метаболита в АР значимо ниже по сравнению с ПР (p=0,002). В дальнейшем уровень Лак возрастал, и в зрелом возрасте для него статистически значимых возрастных и территориальных колебаний не установлено.

Необходимо отметить, что в независимости от возраста и региона обследования значения Лак превышали норму (0,44-2,2 ммоль/л), частоты регистрации аномально высоких величин были велики и превышали 70%, при этом в АР эта частота наиболее низкой, как и уровень Лак, была в группе 16-21 год – 73,3% (p<0,001 относительно лиц 36-45 и 46-60 лет), а наиболее высокой – у лиц 36-45 лет – 88,4%, в ПР, напротив, возраст 36-45 лет характеризовался наименьшей долей лиц с высокими значениями Лак – 77,6 % (p=0,003 относительно группы 46-60 лет), среди пожилых обследованных эти

Содержание параметров углеводного обмена в сыворотке крови у жителей приарктического и арктического региона пяти возрастных групп

Показатели	Возраст, годы	Регион обследования		Статистическая значимость
		ПР	АР	
Глюкоза, ммоль/л	1 (16-21 лет)	4,6 (4,23;5,06)	3,46 (3,04;3,89)	p_p<0,001
	2 (22-35 лет)	4,67 (4,26;5,12)	4,61 (4,05;5,22)	$p_{1\text{-АР}}$<0,001
	3 (36-45 лет)	4,78 (4,42;5,21)	4,68 (4,21;5,14)	$p_{1\text{-АР}}$<0,001
	4 (46-60 лет)	4,85 (4,38;5,29)	4,88 (4,29;5,53)	$p_{1\text{-ПР}}$=0,004; $p_{1\text{-АР,2-АР}}$<0,001
	5 (61-74 лет)	5,03 (4,59;5,61)	4,97 (4,41;5,72)	$p_{1\text{-ПР}}$<0,001, $p_{2\text{-ПР}}$=0,001; $p_{1\text{-АР,2-АР}}$<0,001, $p_{3\text{-АР}}$=0,002
Лактат, ммоль/л	1 (16-21 лет)	2,50 (2,17;2,90)	2,32 (1,96;2,79)	p_p=0,020
	2 (22-35 лет)	2,87 (2,25;3,53)	3,02 (2,21;3,74)	$p_{1\text{-ПР}}$=0,001; $p_{1\text{-АР}}$<0,001
	3 (36-45 лет)	2,71 (2,07;3,58)	2,92 (2,36;3,58)	$p_{1\text{-АР}}$<0,001
	4 (46-60 лет)	2,85 (2,25;3,52)	2,89 (2,32;3,63)	$p_{1\text{-ПР}}$<0.001; $p_{1\text{-АР}}$<0,001
	5 (61-74 лет)	2,90 (2,32;3,79)	3,03 (2,40;3,73)	$p_{1\text{-АР}}$<0,001
Пируват, ммоль/л	1 (16-21 лет)	0,0336 (0,028;0,042)	0,0310 (0,025;0,033)	p_p<0,001
	2 (22-35 лет)	0,0317 (0,027;0,037)	0,0298 (0,024;0,039)	
	3 (36-45 лет)	0,0305 (0,026;0,037)	0,031 (0,025;0,039)	
	4 (46-60 лет)	0,0320 (0,027;0,039)	0,0309 (0,025;0,037)	p_p=0,019
	5 (61-74 лет)	0,0334 (0,031;0,038)	0,0308 (0,025;0,037)	p_p=0,029
Лактат/ Пируват, усл. ед.	1 (16-21 лет)	74,32 (60,09;94,78)	78,56 (64,11;94,61)	
	2 (22-35 лет)	89,39 (65,98;116,66)	93,99 (74,34;120,12)	$p_{1\text{-ПР}}$<0,001; $p_{1\text{-АР}}$<0,001
	3 (36-45 лет)	88,75 (64,03;123,06)	90,89 (73,78;117,23)	$p_{1\text{-ПР}}$<0,001; $p_{1\text{-АР}}$<0,001;
	4 (46-60 лет)	90,59 (62,69;115,99)	94,24 (72,23;119,29)	$p_{1\text{-ПР}}$<0,001; $p_{1\text{-АР}}$<0,001
	5 (61-74 лет)	92,40 (66,65;113,91)	95,58 (71,06;115,95)	$p_{1\text{-ПР}}$=0,025; $p_{1\text{-АР}}$<0,001

Примечание. p_p – уровень значимости при сравнении двух регионов в возрастной группе, $p_{1\text{-ПР}}$ – при сравнении возрастных групп ПР, $p_{1\text{-АР}}$ – при сравнении возрастных групп АР.

значения регистрировались чаще всего – в 91,9 % случаев. В силу подобных изменений частот регистраций в двух регионах значимые территориальные отличия выявлены в группах 16-21 и 36-45 лет (p=0,008 и p=0,004, соответственно).

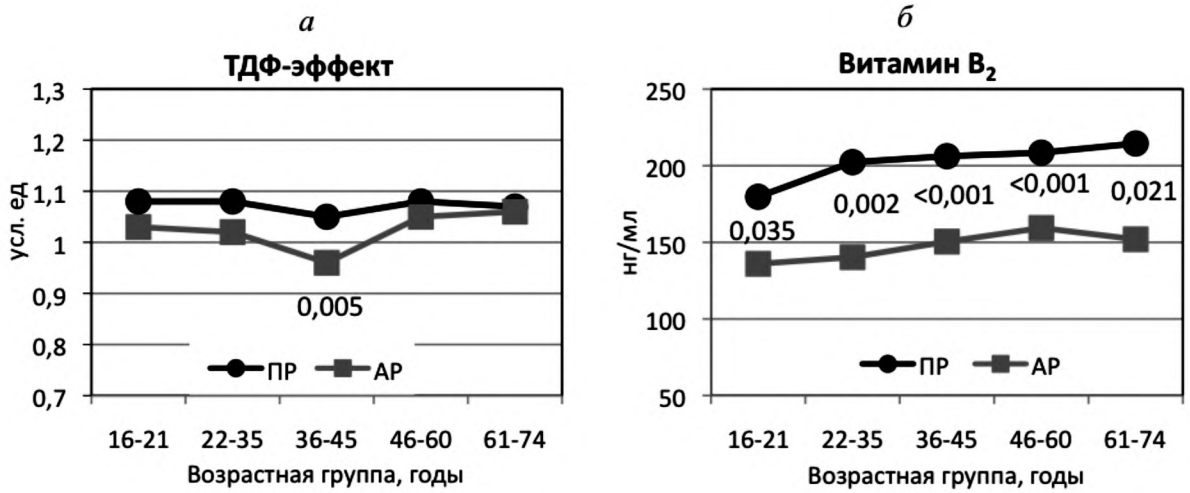
При рассмотрении величины коэффициента Лак/Пир в возрастном аспекте установлено, что, как и содержание Лак, в обоих регионах у лиц юношеского возраста (16-21 лет) значения соотношения были наименьшими (в ПР H=20,46, p<0,001; p<0,001 относительно лиц 22-35, 36-45, 46-60 лет; в АР H=43,47, p<0,001; p<0,001 относительно остальных групп). В начале зрелого периода величина коэффициента нарастала и далее с возрастом мало изменялась, значимых региональных различий не установлено. Как и концентрация Лак, величины коэффициента превышали норму (до 75 усл. ед.), частоты регистрации аномально высоких значений минимальными также были у представителей юношеской группы – в ПР 58,1%, в АР 64,4% (p=0,002, p=0,001, p<0,001, p=0,003 по сравнению с лицами зрелого и пожилого возраста соответственно в АР). В зрелом периоде частоты регистрации превышали 70%, а в АР приближались к 80%, в целом в этом регионе они были более высокими, чем в ПР, и в группе 46-60 лет это различие достигало статистической значимости – 68,6% против 78,1% (p=0,004).

Анализ полученных нами результатов по определению содержания витаминов в крови показал отсутствие выраженной возрастной динамики (H=5,13, p=0,275 и H=9,31, p=0,054 соответственно в ПР и АР для ТДФ-эффекта; H=3,84, p=0,429 и H=2,82, p=0,588 соответственно в ПР и АР для рибофлавина) (см. рисунок, *а, б*). Однако, стоит отметить, что величина ТДФ-эффекта наиболее низкой в обоих регионах отмечена в возрасте 36-45 лет, и в АР значимо ниже по сравнению с ПР (p=0,005).

Если говорить о тиамин-дефицитных состояниях, то в АР они регистрируются с той же частотой (24,3-33,3% случаев), что и в ПР (22,7-31,2%), для возраста 36-45 лет недостаточность витамина наблюдалась несколько реже относительно других возрастов – в 22,7% и 24,3% в ПР и АР соответственно, что совпадает с колебаниями величин ТДФ-эффекта. Умеренный и выраженный гиповитаминозы выявлены во всех возрастных группах, в ПР они составили 17,5 и 9,5%, 17,1 и 11,6%, 13,0 и 9,7%, 20,1 и 11,1%, 16,7 и 8,3%; в АР – 22,7 и 4,6%, 12,7 и 17,6%, 6,1 и 18,2%, 13,2 и 18%, 9,8 и 23,5%, соответственно с 16-21 по 61-74 лет. Значимых возрастных и региональных колебаний при регистрации дефицитных состояний не выявлено, но можно отметить, что в ПР выше вклад умеренного дефицита тиамина, а АР – выраженного, и пожилые люди АР находятся в зоне риска вследствие самой высокой частоты выраженного тиаминдефицита среди всех обследованных.

Изучение уровня рибофлавина у жителей Севера в зависимости от региона проживания и возраста выявило, что содержание витамина было значительно выше у лиц всех возрастных групп ПР по сравнению с АР (p=0,035, p=0,002, p<0,001, p<0,001, p=0,021 для групп с 16-21 по 61-74 лет соответственно) (см.рисунок, *б*). При этом рибофлавин-дефицитные состояния были отмечены во всех возрастных группах обоих регионов, особенно у представителей АР – 33,8-42,9% по сравнению с 19,4-23,9% в ПР (p=0,006, p=0,009, p=0,002, p=0,038 для групп с 22-35 по 61-74 лет соответственно).

Для изучения внутри- и межсистемных взаимодействий рассмотренных параметров был выполнен корреляционный анализ. Он показал наличие значимых взаимосвязей Глю с содержанием витаминов в ПР: у лиц 16-21 года с тиамином (r=0,2, p=0,023), у пожилых людей с рибофлавином (r=0,36, p=0,033), в АР подобных межсистемных связей не установлено, но выявлены корреляции Глю с метаболитами углеводного обмена, в основном с Лак (r=0,15, p=0,014, r=–0,3, p<0,001, r=–0,12, p=0,05, r=–0,16, p=0,001 для групп с 16-21 по 46-60 лет соответственно), у лиц 61-74 года – с Пир (r=0,3, p=0,003), в группах зрелого и пожилого возраста – с величиной Лак/Пир (r=–0,25, p<0,001, r=–0,21, p=0,001, r=–0,12, p=0,012 для групп с 22-35 по 61-74 лет соответственно). Необходимо отметить, что по сравнению с юношами в зрелом возрасте связь Глю-Лак меняет свой знак и становится отрицательной, когда как связь Глю-Лак/Пир неизменно негативная. В ПР внутрисистемные связи Глю установлены у лиц 36-45 лет, для Лак и коэффициента они отрицательные



Величины ТДФ-эффекта (*а)* и содержание витамина B_2 (*б*) у жителей приарктического и арктического регионов в зависимости от возраста. Цифрами обозначена статистическая значимость различий при сравнении двух регионов в возрастной группе.

(r=–0,17, *p*=0,032, r=–0,27, *p*=0,001), для Пир – положительная (r=0,19, *p*=0,014).

Для Лак и Пир отмечено наличие значимых взаимосвязей во всех возрастных группах АР (r=0,24, =0,4, =0,37, =0,3, *p*<0,001, r=0,21, *p*=0,027 для групп с 16-21 по 61-74 лет соответственно), в ПР исключением стала группа 61-74 год (r=0,33, =0,25, *p*<0,001, r=0,17, *p*=0,036, r=0,16, *p*=0,003 для групп с 16-21 по 46-60 лет соответственно), все связи положительные. Уровень Лак у лиц 22-35 и 61-74 лет АР положительно взаимосвязан с величиной ТДФ-эффекта (r=0,21, *p*=0,013, r=0,3, *p*=0,041), в ПР – отрицательно у лиц 36-45 лет (r=–0,19, *p*=0,038). Концентрация Пир коррелировала с величиной ТДФ-эффекта в группе 46-60 лет в ПР (r=0,13, *p*=0,025), с уровнем рибофлавина в старшей группе (r=0,37, *p*=0,029). Для значений коэффициента Лак/Пир значимые связи установлены лишь в АР: у лиц 22-35 лет с обоими витаминами (r=0,21, *p*=0,01, r=0,2, *p*=0,017), в группе 46-60 лет – слабая связь только с величиной ТДФ-эффекта (r=0,14, *p*=0,035).

Значимые взаимосвязи выявлены и между содержанием витаминов, но лишь для обследованных в АР (r=0,47, *p*=0,033, r=0,41, =0,47, =0,37, =0,51, *p*<0,001 для групп с 16-21 по 61-74 лет соответственно), для которых характерны более низкие уровни рибофлавина в крови.

Обсуждение. Проживание в суровых климатических условиях северных регионов предъявляет повышенные требования к энергообеспечению, что приводит к увеличению доли белков и жиров в рационе, в результате чего происходит интенсификация белкового и липидного обмена при снижении роли обмена углеводов с изменением уровня многих биохимических параметров, так, концентрация Глю в крови уменьшается [18].

Однако, исследованиями последних трех десятилетий все чаще регистрируется повышение уровня Глю у жителей различных северных территорий [23-25]. Среди них в настоящее время растет распространение ожирения, ИР, заболеваемости метаболическим синдромом и СД [24, 26, 27]. Повышение частоты встречаемости этих заболеваний связывается, прежде всего, с устойчивым сдвигом в сторону последовательного увеличения вклада в рацион питания продуктов, которые характеризуются высокой степенью переработки, с большим количеством простых сахаров, насыщенных жиров, соли, с низким содержанием белка, клетчатки [27].

В нашем исследовании снижение концентрации Глю выявлено лишь у лиц юношеского возраста в АР, в 65,3% случаев на уровне формирования признаков гипогликемии, в зрелом и пожилом возрасте подобных флуктуаций параметра не наблюдалось, закономерно, что и региональные различия установлены только для контингента в группе 16-21 год. Однако, при этом негативные проявления метаболических перестроек при адаптации к северным условиям – нарастание содержания Лак и снижение Пир у всех обследованных сохранились, но относительно Лак менее выражены они были у самых молодых лиц, а относительно Пир – в ПР. В обоих регионах более чем в 70% случаев регистрировались значения Лак и коэффициента Лак/Пир, находящиеся за верхней границей нормы, когда как частоты регистрации низких значений Пир встречаются реже в 3-4 раза, что свидетельствует о значительном превалировании анаэробных процессов окисления относительно аэробных.

Если говорить о возрастном аспекте состояния гомеостаза Глю, то полученные результаты подтверждают литературные данные [1, 5], содержание Глю увеличивается с возрастом, как и доля лиц с концентрациями, превышающими норматив, в пожилом возрасте она составляет пятую часть обследованных. Касательно флуктуаций содержания метаболитов углеводного обмена, то, как было отмечено выше, уровень Лак и величины отношения Лак/Пир значимо более низкими были в группе 16-21 год, далее с возрастом значимых колебаний не установлено.

По результатам нашего исследования витамин-дефицитные состояния встречаются довольно часто – в среднем у каждого пятого обследованного, что согласуется с другими исследованиями обеспеченности этими водорастворимыми витаминами у северян [16, 28, 29]. Тиамин- и рибофлавин-дефицитные состояния распространены не только у северного контингента, но и среди представителей многих популяций в мире, как и потребление витаминов B_1, B_2 ниже средней расчетной потребности [30-32]. Установленные территориальные различия по содержанию рибофлавина свидетельствуют о снижении статуса витамина по мере продвижения на север вследствие нарастания жесткости воздействия природно-климатических факторов на организм человека, такая же закономерность при регистрации гиповитаминоза рибофлавина, а также и тиамина отмечена Н.Н. Потолицыной и Е.Р. Бойко [29].

Многие исследователи сообщают о сниженном статусе витаминов B_1 и B_2 среди пожилых людей [16, 17, 33, 34], который связывается как с недостаточным потреблением витаминов с пищей, так и со снижением кишечной абсорбции [33]. В нашем исследовании у пожилых лиц АР ситуация по обеспеченности витаминами наиболее неблагоприятная – в 40% случаев выявлен гиповитаминоз рибофлавина, а доля лиц с выраженным тиамин-дефицитом самая большая относительно всех обследованных – 23,5%, однако, эти возрастные отличия статистически не значимы.

При изучении внутри- и межсистемных взаимоотношений параметров углеводного обмена и витаминов у жителей ПР и АР разных возрастных групп установленные взаимосвязи между показателями углеводного метаболизма в ПР у лиц 36-45 лет отражают, видимо, начавшееся повышение Глю относительно юношеского возраста, которое в следующий возрастной период станет значимым, и, скорее всего, свидетельствуют о снижении активности процессов утилизации Глю, а также усилении реакций превращения Лак в Пир. Снижение биологической эффективности действия Инс приводит к нарушению транспорта Глю в клетки, что затрудняет её утилизацию тканями, в результате чего повышается концентрация углевода в крови [2]. В АР подобные связи прослеживаются, начиная с 1-го периода зрелого возраста. Во всех возрастных группах обоих регионов, за исключением лиц пожилого возраста в ПР, отмечены прямые взаимосвязи Пир и Лак, которые указывают на сопряжение смежных метаболитов углеводного обмена.

Выявленные межсистемные связи подтверждают участие витаминов B_1, B_2 в регуляции реакций углеводного обмена и в большинстве своем согласуются с данными литературы о положительном влиянии тиамина и рибофлавина на гомеостаз Глю. Однако, есть связи, выбивающиеся из общего ряда. Так, в группе 36-45 лет ПР отрицательная взаимосвязь величины ТДФ-эффекта и Лак должна была иметь противоположный знак, поскольку лактатацидоз является индикатором дефицита тиамина из-за ингибирования реакций окислительного

декарбоксилирования Пир, катализируемых ПД комплексом [35]. Но, опираясь на экспериментальные результаты об активации глюконеогенеза в печени крыс при вызванном тиамин-дефиците [36], можно предположить усиление процессов глюконеогенеза из Лак и Пир. Появление прямых связей рибофлавина с содержанием Глю и Пир у пожилых лиц в ПР также трудно объяснимо, поскольку витамин оказывает антигипергликемическое действие и способствует утилизации Пир путем ПД реакции. С одной стороны, это может быть обусловлено тем, что связи выявлены у пожилых людей, когда происходят возрастные нарушения углеводного обмена, с другой стороны, есть сведения об уменьшении экспрессии ГЛЮТ4 в жировой ткани рибофлавином [37] и о сниженных уровнях Глю при дефиците витамина B_2 [38].

Стоит также отметить наличие значимых прямых связей ТДФ-эффекта и уровней рибофлавина в АР на фоне сниженного содержания последнего относительно ПР. Смысл этих связей, возможно, состоит в том, что дефицит одного витамина положительно сказывается на содержании другого. Имеются сведения, что тиамин и некоторые его метаболиты стимулируют выведение рибофлавина с мочой. Антирибофлавиновое действие тиамина подтверждается также снижением потребности в тиамине при недостатке рибофлавина [39].

Заключение. У северян установлено повышение уровня Глю у лиц 46-60 и 61-74 лет, скорее всего, вследствие снижения активности гликолитических процессов. Возрастные колебания метаболитов углеводного обмена проявлялись более низкими содержанием Лак и величинами отношения Лак/Пир в юношеском возрасте. Выявленные высокие уровни Лак и сниженные Пир вне зависимости от возраста и региона обследования, а также низкий уровень Глю в группе 16-21 год в АР можно отнести к проявлениям «северной специфики» метаболического профиля. Установленные закономерности, по нашему мнению, связаны с увеличением доли углеводов при сохранении доли липидов в рационе питания обследованных северян.

Для витаминов B_1, B_2 возрастной динамики отмечено не было. Установленные региональные различия – более высокая частота выявления низкой обеспеченности рибофлавином в АР – обусловлены нарастанием жесткости воздействия природно-климатических факторов на организм человека по мере продвижения от территорий ПР к территориям АР. Тиамин и рибофлавин в обоих регионах в разные возрастные периоды вносили свой вклад в формирование уровней параметров углеводного обмена, в ПР, в основном, глюкозы и пирувата, в АР – лактата, при этом витамины, в том числе и за счет распространенности витамин-дефицитных состояний могли принимать участие в росте концентрации Лак у северян.

Финансирование. *Исследование выполнено согласно плану НИР ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН по теме «Изучение адаптивных возрастных эндокринно-метаболических перестроек у жителей арктических территорий» № НИОКТР АААА-А19-119121090063-7.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 6–10, 13, 22, 23, 27, 30–35, 37, 38 см. REFERENCES)

2. Карпин В.А. Метаболический синдром как геронтологическая проблема (обзор литературы). *Успехи геронтологии*. 2020; 33(3); 479–87. Doi: 10.34922/AE.2020.33.3.008.
4. Донцов А.В., Васильева Л.В. Гендерные особенности метаболического синдрома в пожилом возрасте: обзор литературы. *Успехи геронтологии*. 2013; 26(1): 105–10.
5. Мойса С.С., Ноздрачев А.Д. Нарушения углеводного обмена и факторы, способствующие их развитию в процессе онтогенеза. *Успехи геронтологии*. 2011;24(1):61-8.
11. Гурьева И.В., Левин О.С. Диабетическая полинейропатия. *Consilium Medicum*. 2014; 16(4): 12–9.
12. Громова О.А., Торшин И.Ю., Сорокина М.А., Громов А.Н. Дотации магния и витамина B_2 – важный нутрициологический ресурс спортивной медицины. *Медицинский совет*. 2018; 21: 216-30. Doi: https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-21-216-30.
14. Чеботарева Н.А., Меремьянин А.В., Макеева В.Ф., Еронина Т.Б., Курганов Б.И. Связывание гликогенфосфорилазы b и киназы фосфорилазы с гликогеном в условиях молекулярного краудинга. Ингибирующий эффект FAD. *Биохимия*. 2009; 74(50): 691-8.
15. Спасов А.А., Чепляева Н.И., Воробьев Е.С. Ингибиторы гликогенфосфорилазы b в регуляции углеводного обмена при сахарном диабете типа 2. *Биоорганическая химия.* 2016; 42(2): 150–9. Doi: 10.7868/S0132342316020135.
16. Бойко Е.Р., Нильсен О., Бойко С.Г., Калинин А.Г., Потолицына Н.Н. Показатели рибофлавиновой обеспеченности организма и активность глутатионредуктазы у жителей Европейского Севера России. *Физиология человека*. 2004; 30(2): 122–8.
17. Алешин В.А., Мкртчян Г.В., Буник В.И. Механизмы некоферментного действия тиамина: белковые мишени и медицинское значение. *Биохимия.* 2019; 84, (8): 1051-75. Doi: 10.1134/S0320972519080013.
18. Панин Л.Е. Гомеостаз и проблемы приполярной медицины (методологические аспекты адаптации). *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 30(3): 6–11.
19. Бойко Е.Р. Физиолого-биохимические основы жизнедеятельности человека на Севере. Екатеринбург;УрО РАН; 2005.
20. Бичкаева Ф.А. Эндокринная регуляция метаболических процессов у человека на Севере. Екатеринбург: УрО РАН; 2008.
21. Безруких М.М., Сонькин В.Д., Фарбер Д.А. Возрастная физиология (физиология развития ребенка); 2-е изд. М.: Издательский центр «Академия»; 2007.
22. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Сравнение трех и более независимых групп с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса в программе STATA. *Экология человека*. 2014; 6: 55-8.
24. Никитин Ю.П., Воевода М.И., Симонова Г.И. Сахарный диабет и метаболический синдром в Сибири и на Дальнем Востоке. *Вестник РАМН*. 2012; 1: 66-74.
25. Аверьянова И.В., Максимов А.Л., Борисенко Н.С. Особенности липидного и углеводного обмена у юношей-аборигенов и укорененных европеоидов Магаданской области. *Журнал медико-биологических исследований*. 2016; 2: 5-15. Doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.2.5.
26. Бабенко Л.Г., Бойко Е.Р. Этно-социальные особенности заболеваемости ожирением и сахарным диабетом населения Европейского Севера. *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2010; 2: 32-9.
28. Бичкаева Ф.А., Ткачев А.В., Бойко Е.Р., Кулакова И.В., Третьякова Т.В. Обеспеченность организма витамином B_1 у жителей Европейского Севера. *Физиология человека*. 2003; 29(1): 133–5.
29. Потолицына Н.Н., Бойко Е.Р. Витаминный статус жителей Европейского Севера России и его зависимость от географической широты. *Журнал медико-биологических исследований*. 2018; 6(4): 376–86. Doi: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.376.
36. Маглыш С.С., Горбач З.В., Коноваленко О.В. Регуляция глюконеогенеза в печени витамин B_1-дефицитных крыс. *Биохимия*. 1990; 55(8): 1491–7.
39. Петров С.А. Некоферментные эффекты тиамина и его метаболитов. *Биомедицинская химия*. 2006; 52(4): 335–45.

REFERENCES

1. Elahi D., Muller D.C. Carbohydrate metabolism in the elderly. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2000; 54 (Suppl. 3): S112-20. Doi: 10.1038/sj.ejcn.1601032.

2. Karpin V.A. Metabolic syndrome as a gerontological problem (literature review). *Uspekhi gerontologii*. 2020; 33(3): 479–87. Doi: 10.34922/AE.2020.33.3.008. (in Russian)
3. Zhu M., Liu X., Liu W., Lu Y., Cheng J., Chen Y. β cell aging and age-related diabetes. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13(5): 7691-706. Doi: 10.18632/aging.202593.
4. Dontsov A.V., Vasilyeva L.V. Gender-specific characteristic of metabolic syndrome in the elderly. *Uspekhi gerontologii*. 2013; 26(1): 105–10. (in Russian)
5. Moisa S.S., Nozdrachev A.D. Disturbances of carbohydrate metabolism and factors stimulating its development in ontogenesis. *Uspekhi gerontologii*. 2011; 24(1): 61-8. (in Russian)
6. Page G.L., Laight D., Cummings M.H. Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease. *Int. J. Clin. Pract*. 2011; 65 (6): 684–90. Doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02680.x.
7. Sarandol E., Tas S., Serdar Z., Dirican M. Effects of thiamine treatment on oxidative stress in experimental diabetes. *Bratisl. Lek. Listy*. 2020; 121(3): 235-41. Doi: 10.4149/BLL_2020_036.
8. Mee L.N.S., Sekar V.T., Subramanian V.S., Maedler K., Said H.M. Pancreatic beta cells and islets take up thiamin by a regulated carrier-mediated process: studies using mice and human pancreatic preparations. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2009; 297 (1): G197–G206. Doi: 10.1152/ajpgi.00092.2009.
9. Anwar A., Ahmed Azmi M., Siddiqui J., Panhwar G., Shaikh F., Ariff M. Thiamine level in type I and type II diabetes mellitus patients: a comparative study focusing on hematological and biochemical evaluations. *Cureus*. 2020; 12(5): e8027. Doi: 10.7759/cureus.8027.
10. Oh S.H., Witek R.P., Bae S.H., Darwiche H., Jung Y., Pi L. et al. Detection of transketolase in bone marrow-derived insulin-producing cells: benfotiamine enhances insulin synthesis and glucose metabolism. *Stem. Cells Dev*. 2009; 18(1): 37-46. Doi: 10.1089/scd.2007.0255.
11. Gur'eva I.V, Levin O.S. Diabetic polyneuropathy. *Consilium Medicum*. 2014; 16(4): 12-19. (in Russian)
12. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Sorokina M.A., Gromov A.N. Magnesium and vitamin B_2 supplementation is an important nutritional resource of sports medicine. *Meditsinskiy Sovet*. 2018; 21: 216-30. Doi: https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-21-216-230. (in Russian)
13. Klinov S.V., Kurganov B.I., Pekel N.D., Berezovskii V.M. Inhibition of muscle glycogen phosphorylase b by vitamin B_2 and its coenzyme forms. *Biochem. Int.* 1986; 13(1):139-45.
14. Chebotareva N.A., Meremyanin A.V., Makeeva V.F., Eronina T.B., Kurganov B.I. Binding of glycogen phosporylase b and phosporylase kinase to glycogen under conditions of molecular crowding. Inhibiting effect of FAD. *Biokhimiya*. 2009; 74(50): 691-8. (in Russian)
15. Spasov A.A., Chepljaeva N.I., Vorob'ev E.S. Glycogen phosphorylase inhibitors in the regulation of carbohydrate metabolism in type 2 diabetes. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 2016; 42(2): 150–9. Doi: 10.7868/S0132342316020135. (in Russian)
16. Boyko E.R., Nilsen O., Boyko S.G., Kalinin A.G., Potolitsyna N.N. Indicators of riboflavin supply of the body and the activity of glutathione reductase in residents of the European North of Russia. *Fiziologiya Cheloveka*. 2004; 30(2): 122–8. (in Russian)
17. Aleshin V.A., Mkrtchyan G.V., Bunik V.I. Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical significance. *Biokhimiya*. 2019; 84, (8): 1051-75. Doi: 10.1134/S0320972519080013. (in Russian)
18. Panin L.E. Homeostasis and problems of circumpolar health (methodological aspects of adaptation). *Bulleten` Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2010; 30(3): 6–11. (in Russian)
19. Boyko E.R. Physiological and Biochemical Bases of Human Life in the North [Fiziologo-biokhimicheskie osnovy zhiznedeyatel'nosti cheloveka na Severe]. Ekaterinburg: UB RAS; 2005. (in Russian)
20. Bichkaeva F.A. Endocrine regulation of metabolic processes in humans in the North [Endokrinnaya regulyatsiya metabolicheskikh protsessov u cheloveka na Severe]. Ekaterinburg: UB RAS; 2008. (in Russian)
21. Bezrukikh M.M., Son'kin V.D., Farber D.A. Age-specific physiology (development physiology of the child) [Vozrastnaya fiziologiya (fiziologiya razvitiya rebyonka)]. 2nd ed. Moscow: Izdatel'skii tsentr «Akademiya»; 2007. (in Russian)
22. Unguryanu T.N., Grjibovski A.M. Analysis of three independent groups using non-parametric Kruskal-Wallis test in STATA Software. *Ekologiya cheloveka*. 2014; 6: 55-8. (in Russian)
23. Delisle H., Desilets M.C., Vargas E.R., Garrel D. Metabolic syndrome in three ethnic groups using current definitions. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2008; 33: 356–60. Doi: 10.1139/H08-003.
24. Nikitin Y.P., Voevoda M.I., Simonova G.I. Diabetes mellitus and metabolic syndrome in Siberia and in the Far East. *Vestnik RAMN*. 2012; 1: 66-74. (in Russian)
25. Averyanova I.V., Maksimov A.L., Borisenko N.S. Lipid and carbohydrate metabolism in indigenous and caucasian young males living in the Magadan region. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy.* 2016; 2: 5-15. Doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.2.5. (in Russian)
26. Babenko L.G., Boyko E.R. Ethno-social features of obesity and diabetes mellitus mordidity among residents of Russian European North. *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2010; 2: 32-9. (in Russian)
27. Lavigne-Robichaud M., Moubarac J.C., Lantagne-Lopez S., Johnson-Down L., Batal M., Laouan-Sidi A.E. et. al. Diet quality indices in relation to metabolic syndrome in an Indigenous Cree (Eeyouch) population in northern Québec. *Canada Public Health Nutr*. 2018; 21(1):172-80. Doi: 10.1017/S136898001700115X.
28. Bichkaeva F.A., Tkachev A.V., Boyko E.R., Kulacova I.V., Tretyakova T.V. Availability of vitamin B_1 in the population of the European North. *Fiziologiya Cheloveka*. 2003; 29(1): 133–5. (in Russian)
29. Potolitsyna N.N., Boyko E.R. Vitamin status in residents of the European North of Russia and its correlation with geographical latitude. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2018; 6 (4): 376–86. Doi: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.376. (in Russian)
30. Berti P.R., Fallu C., Cruz Agudo Y. A systematic review of the nutritional adequacy of the diet in the Central Andes. *Rev. Panam. Salud. Publica*. 2014; 36(5): 314-23.
31. Whitfield K.C., Karakochuk C.D., Liu Y., McCann A., Talukder A., Kroeun H. et. al. Poor thiamin and riboflavin status is common among women of childbearing age in rural and urban Cambodia. *J. Nutr.* 2015; 145(3): 628-33. Doi: 10.3945/jn.114.203604.
32. Sivaprasad M., Shalini T., Yadagiri Reddy P., Seshacharyulu M., Madhavi G., Naveen Kumar B. et. al. Prevalence of vitamin deficiencies in an apparently healthy urban adult population: Assessed by subclinical status and dietary intake. *Nutrition.* 2019; 63-64: 106-13. Doi: 10.1016/j.nut.2019.01.017.
33. Brachet P., Chanson A., Demigné C., Batifoulier F., Alexandre-Gouabau M-C., Tyssandier V. et.al. Age-associated B vitamin deficiency as a determinant of chronic diseases. *Nutr. Res. Rev*. 2004; 17: 55–68. Doi: 10.1079/NRR200478.
34. Toffanello E.D., Inelmen E.M., Minicuci N., Campigotto F., Sergi G., Coin A. et. al. Ten-year trends in vitamin intake in free-living healthy elderly people: the risk of subclinical malnutrition. *J. Nutr. Health Aging.* 2011; 15(2): 99-103. Doi: 10.1007/s12603-011-0020-x.
35. Moskowitz A., Graver A., Giberson T., Berg K., Liu X., Uber A. et.al. The relationship between lactate and thiamine levels in patients with diabetic ketoacidosis. *J. Crit. Care*. 2014; 29(1): 182.e5–182.e8. Doi: 10.1016/j.jcrc.2013.06.008.
36. Maglysh S.S., Gorbach Z.V., Konovalenko O.V. Regulation of gluconeogenesis in the liver of vitamin B_1-deficient rats. *Biokhimiya*. 1990; 55(8): 1491–7. (in Russian)
37. Plows J., Budin F., Andersson R.A.M., Mills V.J., Mace K., Davidge S.T. et.al. The effects of myo-inositol and B and D vitamin supplementation in the db/+ mouse model of gestational diabetes mellitus. *Nutrients*. 2017; 9(2): 141. Doi: 10.3390/nu9020141.
38. Reddi A.S., Ho P.K., Camerini-Davalos R.A. The role of riboflavin in carbohydrate metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1979; 119: 243-50. Doi: 10.1007/978-1-4615-9110-8_35.
39. Petrov S.A. Non-coenzymic effects of thiamine and its metabolites. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2006; 52(4): 335–45. (in Russian)

Поступила 02.04.21
Принята к печати 10.05.21

ИММУНОЛОГИЯ

© МАРДАНЛЫ С.Г., АВДОНИНА А.С., 2021

Марданлы С. Г.[1,2,3], Авдонина А. С.[1]

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА М К КОРОНАВИРУСУ SARS-COV-2 МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА В ФОРМАТЕ «LINE BLOT»

[1]ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;
[2]ГОУ ВО МО ГГТУ, 142600, г. Орехово-Зуево Московская обл., Россия;
[3]ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 11992, г. Москва, Россия

Разработана иммуноферментная тест-система для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Line blot». Предварительное исследование диагностической эффективности новой тест-системы на клинических образцах сыворотки крови пациентов с установленным диагнозом «COVID-19» и здоровых доноров показало её высокую чувствительность и специфичность. Новая тест-система позволяет обнаруживать IgM ко всем четырём структурным антигенам SARS-CoV-2 и может быть использована в качестве подтверждающего теста для верификации сомнительных результатов скринингового исследования в лабораторной этиологической диагностике COVID-19.

Ключевые слова: *клиническая лабораторная диагностика; COVID-19; SARS-CoV-2; иммуноферментный анализ (ИФА); иммунный блоттинг (ИБ); иммуноглобулины класса М (IgM).*

Для цитирования: Марданлы С. Г., Авдонина А. С. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Line blot». *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (8): 472-479. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-472-479

Mardanly S. G.[1,2,3], Avdonina A. S.[1]

DEVELOPMENT OF TEST KIT FOR DETECTION OF SPECIFIC IGM TO SARS-COV-2 BY IMMUNE BLOTTING IN THE «LINE BLOT» FORMAT

[1]The closed corporation «EKOlab», Elektrogorsk, 142530, Moscow region, Russia;
[2]State University of Humanities and Technology, 142600, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia;
[3]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 11991, Moscow, Russia

Test kit for detection of specific IgM to SARS-CoV-2 by immune blotting in the «Line blot» format has been developed. A preliminary study of diagnostic effectivity on clinical samples of blood serum from patients with COVID-19 and healthy donors showed its high sensitivity and specificity. The new test kit allows to detect IgM to all four structural antigens of SARS-CoV-2 and can be used as a confirmatory test to verify indeterminant screening results in laboratory etiological diagnosis of COVID-19.

Key words: *clinical laboratory diagnostics; COVID-19; SARS-CoV-2; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); immune blotting (IB); class M immunoglobulins (IgM).*

For citation: Mardanly S.G., Avdonina A.S. Development of test kit for detection of specific IgM to SARS-CoV-2 by immune blotting in the «Line blot» format. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (8): 472-479. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-472-479

For correspondence: *Mardanly S.G.,* doctor of medical sciences, academician of the Russian academy of medical technical sciences; professor of department of pharmacology and pharmaceutical disciplines of State University of Humanities and Technology; professor of department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); president and director of science of Closed Joint Stock Company «EKOlab»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Information about authors:
Mardanly S.G., https://orcid.org/0000-0002-4556-135X;
Avdonina A.S., https://orcid.org/0000-0002-2990-4930.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

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

Received 20.06.2021
Accepted 25.06.2021

В конце 2019 г. в Китайской провинции Хубэй зафиксирована вспышка новой коронавирусной инфекции, которая переросла в пандемию, захватившую все регионы Земли. С 11.02.2020 г. эта инфекция получила название COVID-19 (Coronavirus disease 2019), а её возбудитель назван SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-

Для корреспонденции: *Марданлы Сейфаддин Гашимович,* д-р мед. наук, акад. Российской академии медико-технических наук; проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; проф. каф. эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

related coronavirus 2) [1]. Разрушительное воздействие этой пандемии на мировую экономику требует её скорейшей ликвидации, что делает исключительно актуальной проблему своевременной и эффективной диагностики COVID-19 и прогностики течения и исходов её манифестных форм и, соответственно, необходимость разработки тест-систем для этиологической диагностики COVID-19.

В официальных рекомендациях ВОЗ и национальных органов здравоохранения [1, 2] в качестве основного метода этиологической лабораторной диагностики этой инфекции указано выявление РНК SARS-CoV-2 с применением метода амплификации нуклеиновых кислот, иммунохимические методы, в частности выявление антигена SARS-CoV-2 с применением иммунохроматографических методов и выявление иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG к SARS-CoV-2 названы только дополнительными к комплексу молекулярно-генетических методов исследования.

Ряд авторов считают, что не менее важное значение для критической оценки тяжести заболевания, для понимания динамики иммунного ответа на инфекцию, его связи с тяжестью и длительностью заболевания, для уточнения связи уровня антител с выработкой невосприимчивости к возбудителю, для диагностики и сортировки пациентов, обращающихся за медицинской помощью на более поздних стадиях заболевания, для отслеживания контактов и сероэпидемиологических исследований, дающих представление о степени распространения COVID-19, имеет выявление специфических антител [3–6].

Исследования такого рода проводятся преимущественно с использованием методов иммуноферментного, иммунохемилюминесцентного анализа (ИФА и ИХЛА). На рынке медицинской продукции представлено большое число соответствующих коммерческих диагностических тестов. В Российской Федерации по состоянию на 25.08.2020 г. зарегистрирован 51 набор реагентов для выявления специфических иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 методами ИФА и ИХЛА [1].

Такое число диагностических тестов – прямой ответ на потребность в них для получения надёжных данных о распространении инфекции и обеспечения массового скрининга групп высокого риска [7]. Но при отсутствии международных стандартов, по которым производители могли бы корректировать методики применения своих тестов, правила регистрации, учёта и интерпретации получаемых результатов, такое обилие тестов явилось неизбежной причиной нередких расхождений в оценках одних и тех же образцов, полученных в разных лабораториях и при использовании тестов различных производителей [8, 9]. Последнее обстоятельство требует обязательного использования для диагностических исследований нескольких тест-систем различных производителей, что существенно осложняет практическую работу диагностических лабораторий.

Задача повышения эффективности лабораторной диагностики COVID-19 может быть решена за счёт более широкого использования преимуществ одной из модификаций ИФА – иммунного блоттинга (ИБ), в частности одного из его форматов – «Line blot» (линейный блот, «лайн блот», ЛБ), при котором на нитроцеллюлозные стрипы иммуносорбента в виде поперечных линий наносятся конкретные антигены возбудителя (или их рекомбинантные аналоги), предварительно охарактеризованные по их антигенной специфичности, что позволяет делать заключение о наличии/отсутствии соответствующих специфических иммуноглобулинов без использования дополнительных диагностических тестов.

Относительная новизна метода является, по-видимому, причиной того, что число тестов для ИБ, разработанных и внедрённых в практику лабораторной диагностики COVID-19, несопоставимо меньше числа соответствующих тестов для ПЦР-диагностики, ИФА в классических форматах и ИХЛА. В России до сих пор не зарегистрирован ни один тест для диагностики COVID-19, работающий на принципе ИБ. Разработка и внедрение в практику новых тест-систем для этиологической диагностики COVID-19 с использованием ИБ представляется актуальной.

Цель исследования – разработка и предварительные испытания диагностической эффективности нового набора реагентов для *in vitro* диагностики – иммуноферментной тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса М к возбудителю COVID-19 методом ИБ в формате ЛБ[1]. Использован опыт аналогичных исследований, накопленный в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве ИФА тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [11 – 15].

Материал и методы. Иммуносорбент получен с использованием рекомбинантных аналогов антигенов SARS-CoV-2:

– полноразмерный нуклеокапсидный антиген фирм «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина);

– RBD-антиген (Receptor-binding domain – рецептор-связывающий домен) S_1-субъединицы spike-антигена фирм «MyBioSource» (США) и «HyTest» (Финляндия);

– оболочечный антиген фирм «MyBioSource» (США) и «Диапроф» (Украина);

мембранный антиген фирм «ProSpec» (США) и «Диапроф» (Украина).

В качестве твёрдой фазы иммуносорбента использована нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм фирмы «GVS» (США).

Контрольные линии на иммуносорбенте нанесены с использованием:

– рекомбинантного антигена 2H-TRX, не содержащего антигенные детерминанты SARS-CoV-2, фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (для контроля специфичности реакции),

– козьих антител против IgM человека фирмы «Имтек» (для контроля внесения образца);

– IgM человека фирмы «Имтек» (для контроля внесения конъюгата).

Для проведения анализа методом ИБ использованы:

– конъюгат козьих антител к IgM человека с щелочной фосфатазой фирмы «Jackson ImmunoResearch» (США);

– субстратный раствор BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phos-phate/Nitro Blue Tetrazolium) фирмы «Kem-En-Tec» (Дания).

В качестве клинического материала использованы 108 сывороток крови пациентов, проходивших лечение в Первой Градской больнице имени Н.И. Пирогова (г.

[1]Работа является очередной в цикле исследований, посвящённых серологической диагностике COVID-19 и начатых разработкой ИФТС для выявления специфических IgG к возбудителю этой инфекции [10].

Москва) с подозрением на COVID-19 (у 104 пациентов диагноз верифицирован путём обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР в назофарингеальных мазках).

В качестве контрольного клинического материала использованы 100 сывороток крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г. и хранившихся при температуре -70° С.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования решены следующие задачи:

– на основе анализа литературы для приготовления имуносорбента выбраны наиболее иммуногенные антигены SARS-CoV-2;

– отработаны оптимальные условия нанесения антигенных и контрольных линий на нитроцеллюлозную мембрану;

– подобран состав реагентов для проведения анализа методом ИБ;

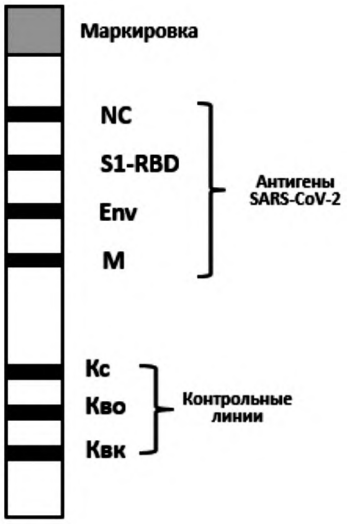
– оптимизирован протокол проведения анализа (время инкубаций, разведение образца).

Наиболее важным этапом разработки явился, очевидно, выбор антигенов.

Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре основных структурных белка (антигена): белок нуклеокапсида (nucleocapsid, N), белок шипа (spike, S), белок мембраны (membrane, M), белок оболочки (envelope, E). N-антиген является структурным компонентом спирального нуклеокапсида. S-антиген состоит из субъединиц S_1 и S_2; S_1 содержит N-концевой домен (N-terminal domain, NTD) и рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), S_2 содержит гептадные повторы 1 и 2 (heptad repeats HR_1, HR_2). M-антиген представляет собой интегрированный в мембрану белок, который в процессе размножения вируса взаимодействует с нуклеокапсидным и S-белком. E-антиген – самый маленький из основных структурных белков – участвует в сборке и высвобождении вирионов [16 – 25].

Поскольку в процессе взаимодействия SARS-CoV-2 с клетками хозяина участвуют все указанные антигены и на них вырабатываются специфические антитела, все они выбраны для конструирования тест-системы.

Отработка условий получения иммуносорбента выполнена с использованием сорбционной машины фирмы «BioDot» (США), позволяющей в автоматическом режиме наносить отдельные линии на нитроцеллюлозную мембрану. Установлено, что оптимальная продолжительность сорбции антигенов и контрольных линий на мембрану составила 22 ч; оптимальными условиями внешней среды для процесса сорбции явились температура воздуха 2-8° С и влажность не более 60%. Специфичность иммуносорбента существенно повышается при 60-минутной экспозиции сорбированных мембран в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем бычий сывороточный альбумин (БСА).



Стандартная схема нанесения антигенов SARS-CoV-2 и контрольных линий на стрип.

В таких условиях оценена чувствительность и специфичность иммуносорбента с использованием перечисленных выше антигенов, полученных от различных производителей.

Установлено, что N-антигены фирм «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина), RBD-антигены фирм «MyBio-Source» (США), «HyTest» (Финляндия) обеспечивают высокую чувствительность и специфичность иммуносорбента, тогда как E-антиген фирмы «MyBioSource» (США) превосходит по соотношению чувствительность/специфичность аналогичный антиген фирмы «Диапроф» (Украина), M-антиген фирмы «Диапроф» (Украина) превосходит по соотношению чувствительность/специфичность аналогичный антиген фирмы «ProSpec» (США).

Оценка различных разводящих и промывающих растворов позволила выбрать в качестве оптимальных трис-солевой буферный раствор (ТСБР) с добавлением в качестве блокирующих агентов сухого молока и ультразвукового лизата клеток *E. coli*.

При отработке протокола постановки ИБ оптимальным временем инкубации стрипов иммуносорбента с исследуемым образцом признан 1 ч 30 мин, с конъюгатом – 1 ч, с субстратным раствором – 10 мин.

Итогом разработки явилась тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-АТ-М» следующего состава:

Иммуносорбент – Полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны белого цвета, с нанесёнными на них в виде отдельных поперечных полос рекомбинантными антигенами SARS-CoV-2 (см. рисунок):

– NC (nucleocapsid antigen – ядерный антиген),

– S_1-RBD (S_1 субъединица spike-антигена шипов оболочки, несущая рецептор-связывающий домен),

– Env (envelope antigen – оболочечный антиген),

– M (membrane antigen – мембранный антиген);

и контрольными линиями:

– рекомбинантным антигеном, не содержащим антигенные детерминанты SARS-CoV-2 для контроля специфичности реакции (Кс);

– козьими антителами против IgM человека для контроля внесения образца (Кво);

– IgM человека для контроля внесения конъюгата (Квк).

Контрольный отрицательный образец (К-) – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к SARS-CoV-2, инактивированная.

Контрольный положительный образец (К+) – сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к SARS-CoV-2, инактивированная.

Раствор для разведения образцов (РРО).

5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(х5)].

Конъюгат – козьи антитела против IgM человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой.

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-472-479

Окрашивающий раствор – раствор 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата и нитроголубого тетразолия.

Результаты анализа учитываются только при выполнении требования по окраске линий иммуносорбента при исследовании контрольных образцов (табл. 1).

Результаты исследования образца интерпретируются следующим образом:

– положительный результат (+) – выявлены антитела к NC-антигену и/или к S_1-RBD-антигену, независимо от наличия или отсутствия антител к антигенам Env и M;

– неопределённый результат (+/-) – выявлены антитела к антигенам Env и/или M;

– отрицательный результат (-) – не выявлены антитела ни к одному из антигенов.

Эффективность разработанной тест-системы оценена при исследовании с её использованием 108 образцов сывороток крови пациентов, проходивших обследование и лечение по поводу COVID-19 и 100 образцов сывороток здоровых доноров крови. Все образцы исследованы также в ИФА с использованием тест-систем «ИФА-SARS-CoV-2-AT-M» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (выявляет антитела к N- и RBD-антигенам SARS-CoV-2) и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» фирмы АО «Вектор Бест» (выявляет антитела к N- и RBD-антигенам SARS-CoV-2).

Результаты выявления IgM к SARS-CoV-2 в ИФА и ИБ. приведены в табл. 2

Результаты, приведённые в табл. 2, показали отсутствие какой-либо связи между оценками образцов в ПЦР

Таблица 1

Требования к окрашиванию линий иммуносорбента при исследовании контрольных образцов

Контрольный образец	Линии иммуносорбента						
	NC	S	Env	M	Кс	Кво	Квк
К-	-	-	-	-	-	+	+
$К^+$	+	+	+	+	-	+	+

Таблица 2

Результаты исследования образцов сыворотки крови на наличие IgM к SARS-CoV-2 в ИФА и ЛБ

№ пп	SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования								
		ИФА				ЛБ				Итоговый результат ЛБ
		«ИФА-SARS-CoV-2-АТ-М» ОПкр=0,251		«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» ОПкр=0,227		NC	RBD	Env	Mem	
		ОПобр	∑	ОПобр	∑					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	+	3,213	+	1,468	+	+	+	-	-	+
2.	+	1,202	+	0,353	+	+	+	+	-	+
3.	+	0,002	-	0,017	-	-	-	-	-	-
4.	+	0,278	+	0,199	+/-	-	+	-	+	+
5.	+	0,742	+	0,604	+	-	+	-	-	+
6.	+	1,337	+	0,363	+	+	+	-	-	+
7.	+	0,06	-	0,159	-	-	-	-	-	-
8.	+	0,433	+	0,537	+	+	+	-	-	+
9.	+	1,865	+	0,685	+	+	+	-	-	+
10.	+	1,357	+	1,411	+	-	+	-	-	+
11.	+	0,401	+	0,302	+	+	+	-	+	+
12.	-	0,015	-	0,061	-	-	-	-	-	-
13.	-	0,023	-	0,058	-	-	-	-	-	-
14.	+	3,593	+	2,727	+	-	+	+	+	+
15.	+	3,417	+	2,561	+	-	+	+	+	+
16.	+	2,026	+	0,541	+	+	+	-	+	+
17.	+	0,017	-	0,092	-	-	-	-	-	-
18.	+	0,272	+/-	0,098	-	+	+	-	+	+
19.	+	0,031	-	0,044	-	-	-	-	-	-
20.	+	0,001	-	0,016	-	-	-	-	-	-
21.	-	0,001	-	0,009	-	-	-	-	-	-
22.	+	0,025	-	0,058	-	+	-	-	+	+
23.	+	0,012	-	0,027	-	-	-	-	-	-
24.	+	0,136	-	0,111	-	-	-	-	-	-
25.	+	0,39	+	0,299	+	-	+	-	+	+
26.	+	0,025	-	0,064	-	-	-	-	-	-
27.	+	0,008	-	0,035	-	-	-	-	-	-

Продолжение табл. 2 см. на стр. 476.

Продолжение табл. 2.

№ пп	SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования								
		ИФА				ЛБ				Итоговый результат ЛБ
		«ИФА-SARS-CoV-2-АТ-М» ОПкр=0,251		«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» ОПкр=0,227		NC	RBD	Env	Mem	
		ОПобр	∑	ОПобр	∑					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
28.	+	0,003	-	0,013	-	-	-	-	-	-
29.	+	0,003	-	0,01	-	-	-	-	-	-
30.	+	0,002	-	0,018	-	-	-	-	-	-
31.	+	0,032	-	0,038	-	-	-	-	-	-
32.	+	0,001	-	0,017	-	-	-	-	-	-
33.	+	1,274	+	0,465	+	+	+	-	+	+
34.	+	0,347	+	0,349	+	+	+	-	+	+
35.	+	2,224	+	1,25	+	+	+	-	+	+
36.	+	0,044	-	0,041	-	-	-	-	-	-
37.	+	0,095	-	0,088	-	-	-	-	-	-
38.	+	0,005	-	0,021	-	-	-	-	-	-
39.	+	0,003	-	0,028	-	-	-	-	-	-
40.	+	1,088	+	0,24	+/-	+	+	-	+	+
41.	+	0,484	+	0,122	-	+	-	-	+	+
42.	+	0,004	-	0,053	-	-	-	-	-	-
43.	+	0,405	+	0,415	+	+	+	-	+	+
44.	+	0,004	-	0,017	-	-	-	-	-	-
45.	+	0,011	-	0,046	-	-	-	-	-	-
46.	+	0,421	+	0,232	+/-	+	+	-	+	+
47.	+	0,665	+	0,379	+	+	+	-	-	+
48.	+	0,001	-	0,034	-	-	-	-	-	-
49.	+	0,042	-	0,049	-	-	-	-	-	-
50.	-	0,005	-	0,033	-	-	-	-	-	-
51.	+	0,004	-	0,018	-	-	-	-	-	-
52.	+	0,455	+	0,475	+	+	+	-	-	+
53.	+	0,161	-	0,043	-	-	-	-	-	-
54.	+	0,015	-	0,051	-	-	-	-	-	-
55.	+	0,005	-	0,038	-	-	-	-	-	-
56.	+	0,047	-	0,014	-	-	-	-	-	-
57.	+	0,002	-	0,018	-	-	-	-	-	-
58.	+	0,004	-	0,022	-	-	-	-	-	-
59.	+	0,215	+/-	0,036	-	-	-	-	-	-
60.	+	0,047	-	0,063	-	-	-	-	-	-
61.	+	0,054	-	0,031	-	-	-	-	-	-
62.	+	2,383	+	2,636	+	+	+	-	-	+
63.	+	3,706	+	3,924	+	+	+	-	-	+
64.	+	0,038	-	0,06	-	-	-	-	-	
65.	+	1,775	+	1,687	+	+	+	-	-	+
66.	+	3,473	+	3,148	+	+	+	-	-	+
67.	+	3,264	+	3,387	+	+	+	-	+	+
68.	+	3,675	+	3,324	+	+	+	-	-	+
69.	+	3,615	+	3,814	+	+	+	-	-	+
70.	+	3,759	+	3,956	+	+	+	+	-	+
71.	+	3,679	+	3,241	+	+	+	-	-	+
72.	+	2,151	+	2,193	+	+	+	-	-	+
73.	+	3,694	+	3,919	+	+	+	-	-	+
74.	+	0,539	+	0,52	+	+	+	+	-	+
75.	+	3,826	+	3,913	+	+	+	-	-	+
76.	+	2,121	+	1,953	+	+	+	-	-	+

Продолжение табл. 2 см. на стр. 477.

Продолжение табл. 2.

№ пп	SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования								
		ИФА				ЛБ				Итоговый результат ЛБ
		«ИФА-SARS-CoV-2-АТ-М» ОПкр=0,251		«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» ОПкр=0,227		NC	RBD	Env	Mem	
		ОПобр	∑	ОПобр	∑					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
77.	+	1,445	+	1,399	+	+	+	-	-	+
78.	+	2,159	+	1,919	+	+	+	-	-	+
79.	+	3,665	+	3,832	+	+	+	-	-	+
80.	+	3,625	+	3,34	+	+	+	-	+	+
81.	+	3,673	+	4,093	+	+	+	-	+	+
82.	+	1,21	+	1,382	+	-	+	-	-	+
83.	+	3,557	+	3,682	+	+	+	-	-	+
84.	+	3,633	+	2,508	+	+	+	-	-	+
85.	+	3,581	+	4,03	+	+	+	-	-	+
86.	+	3,647	+	4,056	+	+	+	-	+	+
87.	+	0,657	+	0,648	+	-	+	-	-	+
88.	+	3,405	+	2,389	+	+	+	-	-	+
89.	+	1,182	+	1,73	+	+	+	+	+	+
90.	+	2,039	+	1,652	+	+	+	-	+	+
91.	+	3,566	+	3,086	+	+	+	+	+	+
92.	+	3,716	+	4,061	+	+	+	+	+	+
93.	+	2,657	+	3,602	+	+	+	-	-	+
94.	+	3,71	+	4,024	+	+	+	+	-	+
95.	+	1,633	+	1,711	+	+	+	+	-	+
96.	+	1,938	+	2,148	+	+	+	-	-	+
97.	+	1,146	+	1,021	+	+	+	-	-	+
98.	+	3,625	+	3,909	+	+	+	-	-	+
99.	+	3,24	+	2,128	+	+	+	-	+	+
100.	+	3,32	+	3,669	+	+	+	-	+	+
101.	+	0,111	-	0,099	-	-	-	-	-	
102.	+	3,691	+	3,686	+	+	+	-	-	+
103.	+	3,67	+	2,887	+	+	+	-	-	+
104.	+	0,777	+	0,754	+	+	+	-	-	+
105.	+	3,662	+	3,558	+	+	+	-	-	+
106.	+	1,759	+	1,312	+	+	+	-	+	+
107.	+	2,373	+	2,285	+	+	+	-	-	+
108.	+	3,676	+	3,962	+	+	+	-	-	+

Примечание. ∑ – итоговый результат исследования образца в ИФА; $ОП_{обр}$ – оптическая плотность исследуемого образца; $ОП_{кр}$ – критическая оптическая плотность; «+» – соотношение $ОП_{обр}/ОП_{кр} \geq 1,1$ – положительный результат; «+/-» – соотношение $ОП_{обр}/ОП_{кр} \geq 0,8$, но $<1,1$ – сомнительный результат; «-» – соотношение $ОП_{обр}/ОП_{кр} < 0,8$ – отрицательный результат.

и наличием специфических антител к возбудителю при исследовании в ИФА и ЛБ. Подтверждена высокая степень связи оценок с использованием обеих тест-систем в ИФА (коэффициент корреляции итоговых оценок образцов в ИФА составил 0,96), тесная корреляция итоговых оценок в ЛБ с использованием разработанной тест-системы с итоговыми оценками в ИФА – коэффициенты корреляции итоговых оценок в ЛБ с результатами исследования в ИФА составили 0,95 и 0,92.

Стоит обратить внимание на сомнительные по наличию IgM в ИФА образцы (№№ 4, 18, 40, 46, 59). Благодаря исследованию в ЛБ, данные образцы получили окончательное подтверждение о наличии или отсутствии антител IgM, что позволяет позиционировать разработанную тест-систему как подтверждающий тест, который можно использовать для верификации неопределённых результатов.

Все 100 образцов сыворотки крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г., при исследовании в разработанной тест-системе показали отрицательный результат (отсутствие окрашивания антигенных линий), что свидетельствует о высокой специфичности тест-системы.

Помимо положительной оценки диагностической эффективности новой тест-системы результаты исследование дают основания для объективного выбора антигенов SARS-CoV-2, обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность иммуносорбентов скрининговых тест-систем. Такие основания даёт анализ распределения спектров антител в исследованных образцах, результаты которого представлены в табл. 3.

Как следует из данных, представленных в табл. 3, в 33 образцах (из 68) выявлены IgM к N- и S-антигенам, в 18 – к N-, S- и M-антигенам, из остальных 17 образцов

Таблица 3

Распределение спектров антител к SARS-CoV-2, выявленное в ИБ

Наличие (+) – отсутствие (-) антител к антигенам SARS-CoV-2				Число образцов	% от общего числа
N	S	Env-	M		
+	+	-	-	33	0,49
+	+	-	+	18	0,26
+	+	+	-	5	0,07
+	+	+	+	4	0,06
-	+	-	+	2	0,03
-	+	-	-	2	0,03
+		-	+	2	0,03
-	+	+	+	2	0,03
ИТОГО				68	100

в 5 выявлены антитела к N-, S- и M-антигенам, в 4 – ко всем использованным антигенам SARS-CoV-2. В подавляющем большинстве образцов, оценённых как положительные по наличию IgM к SARS-CoV-2, выявлены антитела этого класса одновременно к N- и S-антигенам возбудителя. Очевидно, что именно они могут представлять наибольший интерес как специфические компоненты соответствующих иммуносорбентов.

Выводы:

1. Разработанная иммуноферментная тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-АТ-М» для выявления специфических иммуноглобулинов IgM к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Лайн блот» показала хорошую чувствительность при исследовании образцов пациентов с COVID-19 и хорошую специфичность при исследовании образцов здоровых доноров.

2. Новая тест-система после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть рекомендована в качестве подтверждающего теста при этиологической лабораторной диагностике COVID-19.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–9, 16–25 см. REFERENCES)

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021) (утв. Министерством здравоохранения РФ 07 мая 2021 г.) URL: https://xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf.
2. Временное руководство ВОЗ «Выявление антигена в диагностике инфекции SARS-CoV-2 с помощью экспресс-иммуноанализа» (11.09.2020) URL: https://www.white-product.com/pdf/ВОЗ Выявление антигена в диагностике инфекции SARS-CoV-2 с.pdf.
10. Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Мамедова С.Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020; 65 (11): 683-7.
11. Марданлы С.Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2009; 2: 35-7.
12. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH–группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дис. … д-ра мед. наук. М.; 2016.
13. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдонина А.С. *Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами.* Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
14. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. *Инфекции ToRCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль.* М.: Транзит-ИКС; 2018.
15. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. *Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология и профилактика.* Орехово-Зуево: ГГТУ; 2020.

REFERENCES

1. Temporary guidelines “Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)”. Version 11 (05/07/2021) (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on May 07, 2021) [Vremennye metodicheskie rekomendacii «Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)». Versija 11 (07.05.2021) (utv. Ministerstvom zdravoohranenija RF) 07 maya 2021] URL: https://xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf. (in Russian)
2. WHO temporary guidance «Antigen detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassay» (09/11/2020) [Vremennoye rukovodstvo VOZ «Vyyavleniye antigena v diagnostike infektsii SARS-CoV-2 s pomoshch’yu ekspress-immunoanaliza» (11.09.2020)] URL: https://www.white-product.com/pdf/ВОЗ. Vyyavleniye antigena v diagnostike infektsii SARS-CoV-2 c.pdf. (in Russian)
3. Ozcurumez M., Ambrosch A., Frey O., Haselmann V., Holdenrieder S., Kiehntopf M. et al. SARS-CoV-2 antibody testing — questions to be asked. *J. allergy clin. Immunol.* 2020; 146 (1): 35-43.
4. Sethuraman N., Stanleyraj S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020; 323 (22): 2249-51.
5. Watson J., Richter A., Deeks J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ.* 2020; 370: m3325.
6. Du Z., Zhu F., Guo F., Yang B., Wang T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2in patients with COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92 (10): 1735-8.
7. La Marca A., Capuzzo M., Paglia T., Roli L., Trenti T., Nelson S.M. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online.* 2020; 41 (3): 483-99.
8. McAndrews K.M., Dowlatshahi D.P., Dai J., Becker L.M., Hensel J., Snowden L.M. et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight.* 2020; 5 (18): e142386. https://doi.org/10.1172/jci.insight.142386.
9. Haselmann V., Özçürümez M.K., Klawonn F., Ast V., Gerhards C., Eichneret R. et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti-SARS-CoV2-antibody testing. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58 (12): 2121–30.

10. Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mamedova S.G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG-antibodies to the causative agent of COVID-19 in human serum (plasma). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2020; 65 (11): 683-7. (in Russian)
11. Mardanly S.G. Development and testing of new enzyme-linked immunosorbent assay systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 2: 35-7. (in Russian)
12. Mardanly S.G. Epidemiological surveillance of TORCH-group infections based on modern technologies of laboratory diagnostics. Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
13. Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
14. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Torch-group infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. Moscow: Tranzit-IKS; 2018. (in Russian)
15. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Herpesvirus infections: etiology and pathogenesis, clinical picture and laboratory diagnostics, epidemiology and prevention. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2020. (in Russian)
16. Brouwer P.J., Caniels T.G., Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369: 643–50.
17. Shi R., Shan C., Duan X., Chen Z., Liu P., Song J. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584: 120-4.
18. Narayanan K., Maeda A., Maeda J., Makino S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol.* 2000; 74 (17): 8127-34.
19. Opstelten D.J., Raamsman M.J., Wolfs K., Horzinek M.C., Rottier P.J. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell Biol.* 1995; 131 (2): 339-49.
20. Liu J., Sun Y., Qi J., Chu F., Wu H., Gao F. et al. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Infect. Dis.* 2010; 202 (8): 1171-80.
21. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 2019; 16 (1): 69.
22. Peng H., Yang L., Wang L., Li J., Huang J., Lu Z. et al. Long-lived memory T-lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology.* 2006; 351: 466-75.
23. Hiscox J.A., Wurm T., Wilson L., Britton P., Cavanagh D., Brooks G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J. Virol.* 2001; 201: 506-12.
24. Narayanan K., Chen C.J., Maeda J., Makino S. Nucleocapsid independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol.* 2003; 77: 2922-7.
25. Wang N., Shang J., Jiang S., Du L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 298.

Поступила 20.06.21
Принята к печати 25.06.21

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2021; 66(8)
DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-480-484

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мокроносова М.А.[1], Филимонова О.И.[2], Желтикова Т.М.[1]

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОМПОНЕНТНОЙ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКЕ

[1]ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;
[2]ООО «МФК Инмунотех» , 109147, Москва, Россия

В статье приводятся характеристики диагностикума ALEX² (MacroArray Diagnostics, Вена, Австрия). Он предназначен для одновременного определения общего IgE и специфических IgE-aT к 120 экстрактам и 180 молекулам аллергенов (аллергокомпонентам) методом твердофазного иммуноферментного анализа по мультиплексной технологии.

Экстракты и молекулы аллергенов, соединенные с наночастицами, сорбированы на твердофазной подложке, образуя макроскопическую матрицу – иммунный аллергочип. В институте клинических и лабораторных стандартов (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) были проведены исследования по верификации и валидации диагностикума ALEX² по отношению к часто используемой в аллергодиагностике макро тест-системе ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific, Уппсала, Швеция). Полученные на двух тест-системах результаты были сопоставимы. Одна из наиболее важных особенностей тест-системы ALEX² состоит в том, что в ее состав включены уникальные молекулы аллергенов и аллергенные экстракты, и найден способ ингибирования перекрестно-реактивных углеводородных детерминант (CCD), с которыми часто происходит неспецифическое связывание IgE-aT.

Использование этой тест-системы позволяет проводить компонентную аллергодиагностику с выделением доминирующего сенсибилизацирующего фактора в случаях моно- и поливалентной сенсибилизации. Результаты теста влияют на определение показаний и эффективность АСИТ, позволяют оценить риск анафилаксии и прогнозировать дальнейшую тактику лечения пациента.

Ключевые слова: *молекулярная аллергология; молекулярная аллергодиагностика; мультиплексные тест-системы; аллергенные молекулы; рекомбинантные аллергены; аллергенные экстракты.*

Для цитирования: Мокроносова М.А., Филимонова О.И., Желтикова Т.М. Новые технологии в компонентной аллергодиагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (8): 480-484. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-480-484

Mokronosova M.A.[1], Filimonova O.I.[2], Zheltikova T.M.[1]

NEW TECHNOLOGIES IN MOLECULAR ALLERGODIAGNOSTICS

[1]Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serum, 105064, Moscow, Russia;
[2]LLC "MFK Inmunotech", 109147, Moscow, Russia

The article presents the characteristics of the ALEX² (MacroArrayDX, Wien, Austria). It is designed for simultaneous detection of IgE total and specific IgE-aB to 120 extracts and 180 molecules by solid-phase enzyme immunoassay. Extracts and allergen molecules combined with nano-particles are sorbed on a solid-phase substrate, forming a macroscopic multiplex matrix – the immune allergy chip. The Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI) conducted research on the verification and validation of the ALEX² in relation to the ImmunoCAP macroarray test system (ThermoFisher Scientific, Uppsala, Sweden), which is often used in allergodiagnostics. The results obtained on the two test systems were comparable. One of the most important features of the ALEX2 test system is that unique allergen molecules and allergenic extracts are included in its composition, and a method has been found to inhibit cross-reactive hydrocarbon determinants (CCDs), which cause frequent non-specific binding of IgE-aT. The use of this test system makes it possible to carry out component allergy diagnostics with the determine of the dominant sensitizing factor in cases of mono- and polyvalent sensitization. The test results affect the determination of indications and the effectiveness of ASIT, allow assessing the risk of anaphylaxis and predicting further treatment tactics for the patient.

Key words: *molecular allergology; allergen detection assay; multiplex test systems; allergen molecules; recombinant and/or purified natural allergen components.*

For citation: Mokronosova M.A., Filimonova O.I., Zheltikova T.M. New technologies in molecular allergodiagnostics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): (in Russ.) 480-484. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-480-484

For correspondence: *Zheltikova Tatyana M.,* Doctor of biological Sciences, head of laboratory; e-mail: t-zheltikova@yandex.ru

Information about authors:
Mokronosova M.A., https://orcid.org/0000-0003-2123-8440;
Zheltikova T.M., https://orcid.org/0000-0001-5394-7132;
Filimonova O.I., https://orcid.org/0000-0001-9660-464X.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 02.06.2021
Accepted 17.06.2021

Сложно себе представить практику аллерголога в XXI веке без молекулярной аллергодиагностики. Быстрый прогресс в открытии и описании все новых молекул аллергенов, способных реагировать с IgE-aT, проливает свет на таинства аллергических состояний, расцениваемых ранее как идиопатические. Разработка

Для корреспонденции: *Желтикова Татьяна Михайловна*, д-р биол. наук, зав. лаб.; e-mail: t-zheltikova@yandex.ru

новых тест-систем, содержащих аллергокомпоненты, и их внедрение в рутинную практику аллергологов значительно повышает эффективность диагностического поиска и объективного назначения препаратов для базисной терапии и аллерген специфической иммунотерапии (АСИТ) [1-8].

В 2016 г. в Вене была основана компания MacroArray Diagnostics (MADx), поставившая цель разработать более информативные, надежные и доступные решения для диагностики аллергии. Основатель MADx Christian Harwanegg ранее принимал активное участие в разработке аллергочипа ISAC в VBC Genomics, Phadia и Thermo Fisher Scientific.

В 2017 г. сотрудники MADx разработали новый макро аллергочип Allergy Explorer (ALEX) для выявления IgE-aT к 156 аллергенам и 126 их молекулам, а также для одновременного выявления общего IgE. Два года спустя был создан диагностикум-преемник – ALEX^2, содержащий уже 120 аллергенных экстрактов и 180 их молекул. Это самый полный мультиплексный анализ IgE на сегодняшний день. С 2020 года доступна полная автоматизация исследования на платформе MAX 45k, а также специальное программное обеспечение RAVEN для глубокой интерпретации данных молекуляной аллергодиагностики и создания полноценных клинических лабораторных отчетов.

В ALEX^2, основанном на принципах иммунохимического анализа, молекулы аллергенов и экстракты связываются с активированными наночастицами с учетом уникальных биохимических свойств каждого компонента, что обеспечивает стабильность связанных аллергенов и полностью сохраняет конфигурацию.эпитопа. Использование наночастиц в качестве твердой фазы обеспечивает гораздо большую площадь связующей поверхности и последующее высокочувствительное обнаружение. На следующем этапе наночастицы, несущие аллерген, наносятся на нитроцеллюлозную мембрану, образуя макроскопический чип с индивидуальными параметрами анализа [16]. В протокол анализа ALEX^2 интегрирован ингибитор перекрестно-реактивных углеводных детерминант (CCD), который позволяет высокоспецифично определять сенсибилизацию путем блокирования специфических CCD-антител в сыворотке крови пациентов. CCD относится к группе родственных гликанов, продуцируемых беспозвоночными и растениями. Большинство природных аллергенов, полученных из растений или насекомых, содержат CCD, но CCD не действуют как аллергены in vivo и не являются клинически значимыми у пациентов [17]. В изученных 22% образцов сыворотки от пациентов с подозрением на сенсибилизацию к пыльце, продуктам питания или ядам насекомых были обнаружены антитела анти-CCD IgE, причем частота выявления этого показателя достигал 35% в подростковой группе [18].

Анализ результатов иммунохимической реакции на аллергочипе ALEX^2 проводят с помощью устройства сканирования и обработки ImageXplorer. Результаты теста обрабатывают и интерпретируют с помощью аналитического программного обеспечения Raptor (MADx). Концентрацию IgE-aT в сыворотке крови выражают в стандартных количественных единицах, диапазон измерения ALEX^2 для специфического IgE составляет 0,3-50 kU_A/L, а для общего IgE – до 12500 kU/L.

В ряде исследований были проведены верификация и валидация диагностикума ALEX^2 в соответствии с европейским международным стандартом EN 13612. В настоящее время нет эталонных тестов для молекулярной аллергодиагностики. В этой связи, для сравнения был использован диагностикум ImmunoCAP ISAC (ThermoFisher Scientific, Uppsala, Sweden). Результаты, полученные на двух диагностикумах, были сопоставимы (см.рисунок) [9]. Близкие результаты были получены и другими исследователями [10, 11].

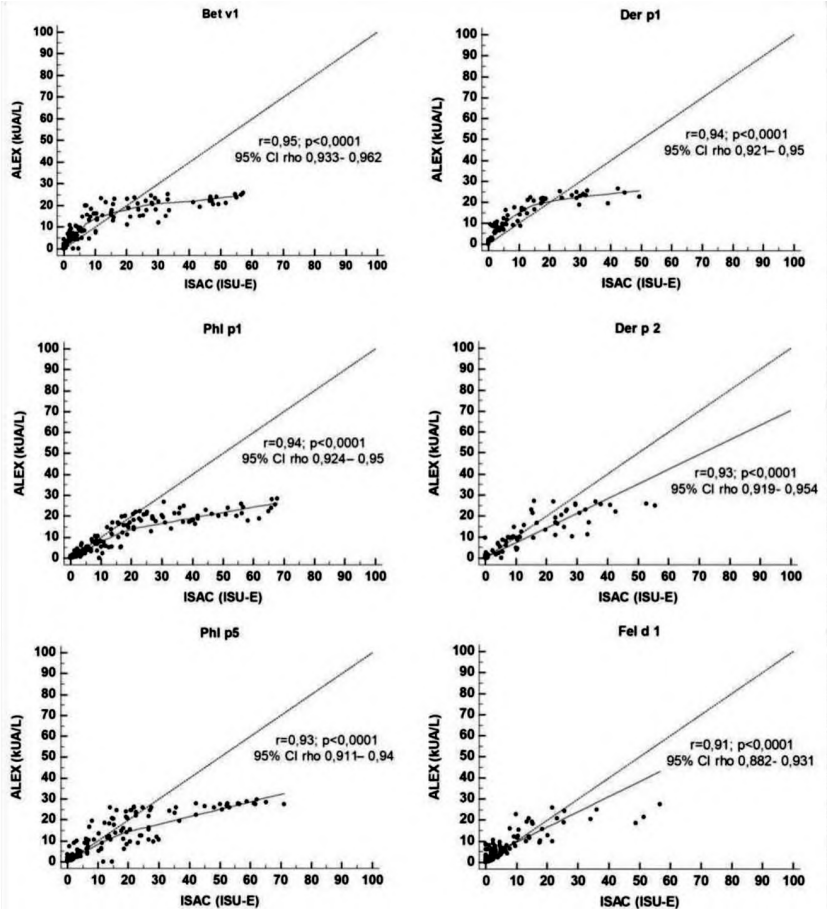
Диагностикумы ALEX^2 и ImmunoCAP $ISAC_{E112i}$ имеют как схожие свойства, так и индивидуальные, отличающиеся характеристики (табл. 1) [9, 10].

Диагностическая значимость тест-системы ALEX^2 заключается в широком, системном подходе к выявлению и прогнозировании рисков и ургентных, жизнеугрожающих состояний вплоть до анафилаксии. В спектр аллергенных компонентов входят молекулы, провоцирующие острые тяжелые аллергические реакции, такие как белки хранения, белки-переносчики липидов, казеин, парвальбумины и тропомиозины. Так, например, в диагностикуме имеются 25 различных молекулярных компонентов белков хранения, относящихся к трем основным группам: 2S альбумины (13 молекул); 7/8S глобулины (6 молекул) и 11S глобулины (6 молекул). Белки-переносчики липидов представлены 17 компонентами, выделенными из разных источников. Спектр парвальбуминов в диагностикуме ALEX^2 также значительно расширен и включает 10 аллергенных молекул из различных видов рыб. Впервые парвальбумины представлены двумя изоформами: α- и β-парвальбуминами. При этом α-парвальбумины – менее аллергенный тип белка, доминирующий в хрящевых рыбах, тогда как β-парвальбумины присутствуют в различных видах речных и костистых рыб. Широкий спектр белков, относящихся к группе липокалинов представлен 14 молекулами, утероглобины – 3 молекулами, сывороточные альбумины – 5 молекулами. Это позволяет оценить реакцию пациента на дериваты (слюна, метаболиты и эпидермис) различных домашних животных, что чрезвычайно важно для объективной оценки аллергии на домашних питомцев [1, 3, 12].

Одно из преимуществ ALEX^2 – внедрение в диагностику новых аллергенных молекул. Например, возможно одномоментное использование широкого спектра пищевых экстрактов и молекул, что очень важно для педиатров. Кроме того, в панель включены уникальные экстракты и молекулы, сенсибилизация к которым может провоцировать, развитие тяжелых аллергических реакций, особенно в детском возрасте (табл. 2).

В ALEX^2 значительно расширен спектр клещевых аллергенов. Кроме, 11 аллергенных молекул пироглифидных клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 11, Der p 20, Der p 21, и Der p 23) и *Dermatophagoides farinae* (Der f 1, Der f 2), в диагностикуме есть еще и аллергенные экстракты клещей амбарно-зернового комплекса: *Acarus siro* (Aca s), *Tyrophagus putrescentiae* (Tyr p), *Blomia tropicalis* (Blo t), *Glycyphagus domesticus* (Gly d), *Lepidoglyphus destructor* (Lep d), которые особенно важны для диагностики профессиональных аллергических заболеваний, или являются доминирующими видами в некоторых тропических странах.

Как подчеркивалось выше, одна из наиболее важных особенностей диагностикума ALEX^2 состоит в том, что найден способ ингибирования перекрестно-реактивных углеводородных детерминант (CCD), с которыми



Корреляция между результатами, полученными с помощью тест систем ImmunoCAP ISAC и ALEX² [9].

Таблица 1

Сравнительная характеристика ALEX² и ISAC

Характеристики	MADx ALEX²	ImmunoCAP ISAC$_{E112i}$
Общее число компонентов	300	112
Молекулярные компоненты	180	112
Экстракты аллергенов	120	0
Общий IgE	Включен	Не включен
Всего источников аллергенов	165	48
Всего семейств аллергенов	71	51
Число уникальных молекул аллергенов	51	6
Объем образца (сыворотки/плазмы)	100 мкл	30 мкл
CCD* ингибитор	Интегрирован	Нет
Min число тестов в постановке	1	4
Время исследования	3,5 ч	3,5 ч
Метод детекции	Колориметрия	Флюоресценция
Количественные результаты sIgE в стандартных единицах, kUA /L	Да	Нет
Поддержка интерпретации	Да	Да
Выбор результатов (с помощью ПО)	Да, возможно создание мультиплексных панелей	Нет, фиксированная панель тестов
Автоматизация	Да	Нет

Примечание. * – CCD – перекрестно-реактивные карбогидратные детерминанты.

часто происходит неспецифическое связывание IgE-аТ (табл. 1). Это позволяет получить максимально точные, истинные количественные результаты уровня IgE-аТ в крови пациента, избегая ложнопозитивных результатов, дает возможность корректно интерпретировать результаты анализов у пациентов с сенсибилизацией к CCD, что в свою очередь, повышает специфичность метода. С использованием тест-систем ALEX² и Im-

Таблица 2

Новые молекулы пищевых аллергенов (бобовые, орехи, семена), используемые в ALEX²

Источники	Аллергенные молекулы	Семейство аллергенов
Фундук	Cor a 11	7S Globulin
Фундук	Cor a 12*	Oleosin
Грецкий орех	Jug r 4	11S Globulin
Грецкий орех	Jug r 6	7S Globulin
Арахис	Ara h 15	Oleosin
Фисташки	Pis v 1	2S Albumin
Фисташки	Pis v 2	11S Globulin
Фисташки	Pis v 3	7S Globulin
Фисташки	Pis v 4*	Mn Superoxid-Dismutase
Мак	Pap s 2S Albumin	2S Albumin
Соя	Gly m 8	2S Albumin
Кукуруза	Zea m 14	nsLTP tpye 1
Макадами	Mac i 2S Albumin	2S Albumin
Семена горчицы	Sin a 1	2S Albumin

Примечание. * – компоненты RUO (research use only – для научных исследований).

Таблица 3

Диагностика аллергических заболеваний с использованием молекулярной диагностики

Молекулы аллергенов	IgE-aT (kU_A/L)	Диагноз
Der p 1/ Der f 1; Der p 2/ Der f 2	44,8/47,27 47,33/48,2	Аллергический ринит
Der p 1/ Der f 1; Der p 2/ Der f 2; Der p 23 и др.	44,8/47,27; 47,33/48,2 30,07	Бронхиальная астма
Der p 10	38,79	Гиперчувсвтительность к тропомиозинам

munoCAP были исследованы 33 сыворотки пациентов с сенсибилизацией к ингаляционным аллергенам. При использовании ImmunoCAP в 11 из 33 сывороток были выявлены IgE-aT к CCD. При использовании ALEX² IgE-aT к CCD были полностью ингибированы [11].

Важный аспект аллегодиагностики – выявление первичного сенсибилизатора (триггера). Как и в любой диагностической технологии, существует вероятность вариабельной реактогенности той или иной молекулы. Поэтому использование многих гомологичных компонентов из одной биохимической группы аллергенов дает возможность проследить закономерность воспроизводимости реакций с белками с идентичной аминокислотной последовательностью. Иными словами, у пациента с истинной сенсибилизацией должны быть положительные титры IgE-aT не только к одной, а сразу нескольким/многим аллергенным молекулам из одной биохимической группы. Так, например, если у пациента наблюдается реакция на мажорный аллерген пыльцы березы Bet v 1, то подтверждением истинной сенсибилизации являются позитивные результаты по выявлению IgE-aT ко всем белкам группы PR-10 независимо от их источника. В то же время, отсутствие этой закономерности ставит под сомнение клиническую значимость полученных результатов. Таким образом, значительный спектр аллергенных экстрактов и молекулярных компонентов позволяет выявить сенсибилизацию, определяющую триггерную роль в персонифицированной истории болезни [1, 4, 7, 8, 13].

У пациентов с положительными кожными пробами или IgE-aT к экстракту клещей домашней пыли, различают три вида гиперчувствительности к различным аллергенным компонентам (табл.3). IgE-aT, преимущественно, на два мажорных аллергенных компонента – Der p 1/Der f 1 и/или Der p 2/Der f 2 типичны для пациентов с поражением верхних дыхательных путей, при ранней сенсибилизации к пироглифидным клещам и диагнозом «аллергический ринит». Выявление IgE-aT к Der p 1/ Der p 2/ Der p 23 характерно для сенсибилизирующего профиля бронхиальной астмы [7, 13]. Таким образом, выявление положительных IgE-aT к мажорным аллергенам клещей подтверждает высокую вероятность атопического фенотипа астмы и необходимость долгострочного курса АСИТ. Третий случай характерен для лиц с гиперчувствительностью к белками тропомиозинам. Эти белки присутствуют как у беспозвоночных, так и позвоночных животных. Однако аллергенной активностью обладают только тропомиозины беспозвоночных: гельминтов, молюсков, ракообразных, клещей, насекомых. Исключением является рыба тилапия, у которой выявлен тропомиозин, обладающий аллергенными свойствами [14]. Для пациентов с сенсибилизацией к тропомиозину характерны острые реакции при употреблении в пищу различных морепродуктов и ракообразных. В данном случае, триггером аллергии являются либо гельминты, либо ракообразные, либо кровососущие насекомые, но не клещи домашней пыли.

Для прогноза эффективности АСИТ необходима идентификация IgE-aT опосредованных реакций на мажорные и минорные аллергены. В зависимости от соотношения IgE-aT к мажорным или минорным аллергенам выявляют показания к АСИТ. Так, например, при пыльцевой аллергии особое значение имеют компоненты из группы 10 (PR-10), а также профилины и полкальцины. Сенсибилизация к мажорному Bet v 1 (PR-10), свидетельствует об эффективности АСИТ, а сенсибилизация к минорным Bet v 2 (профилин) и Bet v 4 (полкальцин) – о том, что эффективность АСИТ может вызывать сомнение [7, 13].

Освоение навыков молекулярной диагностики для практических врачей может показаться сложным в применении в ежедневной клинической практике. Однако по мере накопления информации и опыта интерпретации результатов молекулярные и мультиплексные диагностикумы будут предоставлять аллергологу актуальную информацию. Это особенно важно для пациентов с угрозой риска по анафилаксии, астме, а также для обоснования целесообразности проведения АСИТ. Высокочувствительные методы молекулярной диагностики уже прочно вошли в повседневную практику аллергологов. Для клиницистов, аллергологов и иммунологов крайне необходимо усовершенствование навыков интерпретации анализов по молекулярной аллергологии, для чего необходимо проходить специальную подготовку и курсы повышения квалификации.

Таким образом, недавно разработанный новый аллергочип ALEX² представляет собой новейший мультиплексный количественный *in vitro* тест – эффективный инструмент для молекулярной диагностики аллергии, измеряющий аллерген-специфические IgE, и полуко-

личественный диагностический *in vitro* тест для измерения общего IgE в сыворотке крови человека. ALEX² предназначен для одновременного выявления IgE к 120 экстрактам и 180 молекулам, то есть обладает самым широким на сегодня спектром компонентов и целым рядом уникальных возможностей, что значительно расширяет возможности идентификации первичного триггера, аллергенных компонентов, способных спровоцировать жизнеугрожаемую реакцию, молекул-биомаркеров бронхиальной астмы, а также прогноза безопасности и эффективности АСИТ. Тест ALEX² рекомендован к практическому использованию конценсусным документом WAO – ARIA – GA²LEN [15].

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Canonica G.W., Ansotegui I.J., Pawankar R., Schmid-Grendelmeier P., van Hage M., Baena-Cagnani C.E. et al. A WAO—ARIA—GA (2) LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013;6: 1–16.
2. Luengo O., Cardona V. Component resolved diagnosis: when should it be used? *Clin. Trans.l Allergy*. 2014;4: 28.
3. Tallar M.T., Grayson M.H. Component-resolved allergen testing: the new frontier. *World J. Transl. Med*. 2015;4: 44–50.
4. Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J., Valenta R., Hilger C., Hofmaier S. et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016; 27 (Suppl 23): 1-250.
5. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica GW, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organization Journal*. 2018;11: 1–7.
6. Huss-Marp J., Gutermuth J., Schdffner I., Darsow U., Pfab F., Brockow K., Ring J., Behrendt H. Jakob T., Ahlgrim C. Comparison of molecular and extract based allergy diagnostics with multiplex and singleplex analysis. *Allergo J. Int*. 2015;24: 46–53.
7. Kleine-Tebbe J., Matricardi P.M., Hamilton R.G. Allergy work-up including component-resolved diagnosis: how to make allergen-specific immunotherapy more specific. *Immunol. Allergy Clin. N AM*. 2016;36: 191–203.
8. Hamilton R.G. Kleine-Tebbe J. Molecular Allergy Diagnostics: Analytical Features That Support Clinical Decisions. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2015 Sep;15(9): 57. doi: 10.1007/s11882-015-0556-7. PMID: 26233428.
9. Bojcukova J., Vlas T., Peter Forstenlechner P., Panzner P. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clin. Transl. Allergy.* 2019; 9: 31. https://doi.org/10.1186/s13601-019-0270-y.
10. Buzzulini F., Da Re M., Scala E., Martelli P., Conte M., Brusca I., Villalta D. Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. Clin Chim Acta. 2019;493:73–8.
11. Hemmer W., Altmann F., Holzweber F, Gruber C., Wantke F., Wohrl S. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2018; 141(1): 372-81.
12. Werfel T., Asero R., Ballmer-Weber K. et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy.* 2015;70:1079–90.
13. Goodman R.E., Chapman M.D., Slater J.E. The Allergen: Sources, Extracts, and Molecules for Diagnosis of Allergic Disease. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract*. 2020 Sep;8(8):2506-14. doi: 10.1016/j.jaip.2020.06.043. PMID: 32888526.
14. Liu R., Holck A.L., Yang E., Liu C., Xue W. Tropomyosin from tilapia (Oreochromis mossambicus) as an allergen. *Clin. Exp. Allergy.* 2013;43: 365-77.
15. Ansotegui I.J., Melioli G., Canonica G.W., Gómez RM , Jensen-Jarolim E., Ebisawa M. et al. WAO – ARIA – GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organ J* . 2020; 13(2): 100091. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100091.
16. Florin-Dan Popescu, Mariana Vieru. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J. Medhodol*. 2018, 29;8(3):17-36. doi: 10.5662/wjm.v8.i3.17.
17. H Malandain , F Giroux, Y Cano. The influence of carbohydrate structures present in common allergen sources on specific IgE Results. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol*. 2007, 39(7):216-20.
18. F Holzweber, E Svehla, W Fellner, T Dalik, S Stubler, W Hemmer, F Altmann Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy*. 2013. Oct;68(10):1269-77. doi: 10.1111/all.12229.

Поступила 02.06.21
Принята к печати 17.06.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Куст А.В., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Воронин Д.Н.

РОЛЬ CD20+IL-10+ В-ЛИМФОЦИТОВ В ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

Цель работы - оценить уровень CD20+IL-10+ В-лимфоцитов у беременных женщин с угрозой прерывания беременности в сроке 5-12 недель и привычным невынашиванием в анамнезе и сопоставить полученные данные со сроком завершения гестации. Проведено обследование 65 женщин в сроке беременности 5-12 недель. Основную группу составили 33 женщины с угрожающим привычным выкидышем на момент обследования, группу сравнения – 10 первобеременных женщин с угрожающим спорадическим выкидышем на момент обследования, группу контроля составили 22 беременные женщины без признаков угрожающего выкидыша. Основная группа в зависимости от исходов беременности разделена на 2 подгруппы: подгруппа А – беременность закончилась самопроизвольным выкидышем или неразвивающейся беременностью (9 женщин), подгруппа В – беременность завершилась родами (24 женщины). Методом проточной цитофлуориметрии на FACSCanto II (Becton Dickinson, США) определялось относительное содержание CD20+IL-10+ В-лимфоцитов. Женщины основной группы имели значительно более низкий уровень CD20+IL-10+ В-лимфоцитов по сравнению с остальными обследованными. При ретроспективном анализе выявлено, что среди женщин подгруппы А отмечалось резкое снижение CD20+IL-10+ клеток по сравнению с подгруппой В. Прогнозирование неразвивающейся беременности и самопроизвольного выкидыша до 22 недель гестации у беременных с угрожающим самопроизвольным выкидышем и привычным невынашиванием беременности в анамнезе возможно при относительном содержании CD20+IL-10+ равном или менее 4,5 % (чувствительность 100%, специфичность 82,6%, точность 87,9%).

Ключевые слова: *беременность; привычное невынашивание беременности; угроза прерывания; В-лимфоциты.*

Для цитирования: Куст А.В., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Воронин Д.Н. Роль CD20+IL-10+ В-лимфоцитов в иммунорегуляторных процессах при привычном невынашивании беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (8): 485-488. DOI: http: //dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-485-488

Kust A.V., Sotnikova N.Y., Malyshkina A.I., Voronin D.N.

ROLE OF CD20 + IL-10 + B-LYMPHOCYTES IN IMMUNOREGULATORY PROCESSES IN WOMEN WITH RECCURENT MISCARRIAGE

V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ministry of Health of Russia, Ivanovo

To determine the level of CD20 + IL-10 + B-lymphocytes in pregnant women with the threat of termination of pregnancy at 5-12 weeks and recurrent miscarriage in history and compare the data obtained with the end of gestation. A survey of 65 women at a gestational age of 5-12 weeks was carried out. The main group consisted of 33 women with a threatening recurrent miscarriage at the time of the examination, the comparison group consisted of 10 pre-pregnant women with a threatening sporadic miscarriage at the time of the examination, the control group consisted of 22 pregnant women without signs of a threatening miscarriage. The main group, depending on the outcomes of pregnancy, is divided into 2 subgroups: subgroup A - pregnancy ended in undeveloped pregnancy or miscarriage (9 women), subgroup B - pregnancy ended in childbirth (24 women). The relative content of CD20 + IL-10 + B-lymphocytes was determined by flow cytometry on FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Women in the main group had a significantly lower level of CD20 + IL-10 + B-lymphocytes in comparison with the rest of the surveyed. A retrospective analysis revealed that among women of subgroup A there was a sharp decrease in CD20 + IL-10 + cells compared with subgroup B. Prediction of a non-developing pregnancy and spontaneous miscarriage up to 22 weeks of gestation in pregnant women with threatened spontaneous miscarriage and a history of recurrent miscarriage is possible with the relative content of CD20 + IL-10 + equal to or less than 4.5% (sensitivity 100%, specificity 82.6%, accuracy 87.9%).

Key words: *pregnancy; recurrent miscarriage; threat of interruption; B-lymphocytes.*

For citation: Kust A.V., Sotnikova N.Y., Malyshkina A.I., Voronin D.N. Role of CD20 + IL-10 + B-lymphocytes in immunoregulatory processes in women with reccurent miscarriage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics*). 2021; 66 (8): 485-488 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-485-488

For correspondence: *Kust A.V.,* graduate student of the Laboratory of Clinical Immunology; e-mail: avkMD@yandex.ru

Information about authors:
Kust A.V., http://orcid.org/0000-0002-1355-7225;
Sotnikova N.Y., http://orcid.org/0000-0002-0608-0692;
Malyshkina A.I., http://orcid.org/ 0000-0002-1145-0563;
Voronin D.N., http://orcid.org/ 0000-0003-2836-8694.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 05.03.2021
Accepted 05.05.2021

Для корреспонденции: *Куст Алена Валерьевна*, аспирант лаб. клинической иммунологии; e-mail: avkMD@yandex.ru

Введение. Привычное невынашивание беременности остается актуальной проблемой современной репродуктивной медицины. В последние годы много внимания уделяется иммунологическим аспектам привычной потери беременности, затрагивающим различные звенья иммунной системы беременной женщины и занимающим лидирующее место в этиологии необъяснимых репродуктивных потерь [1]. В структуре иммунных нарушений при привычном невынашивании беременности выделают ауто – и аллоиммуные факторы. Аутоиммунный генез рецидивирующей потери беременности связан с утратой толерантности к аутоантигенам и усилением воспалительной реакции материнского организма [2].

Аллоиммунные причины привычного невынашивания обусловлены нарушением материнского аллоиммунного ответа, приводящие к отторжению полуаллогенного плода [3]. Проблема аллоиммунного генеза привычного невынашивания беременности, несмотря на пристальное внимание многих исследователей, в настоящее время остается нерешенной. Поскольку плод является полуаллогенным по отношению к материнскому организму, иммунная система беременной женщины должна поддерживать его толерантность, в то же время, обеспечивая его защиту от инфекционных агентов. Нарушение адаптации к иммунным реакциям, сопровождающим прикрепление, имплантацию, дальнейший рост и развитие плода может привести к возникновению осложнений беременности, в том числе и возникновению спорадического или привычного выкидыша [4].

В-лимфоциты являются важнейшим компонентом иммунной системы, выполняя функции выработки антител, антигенпредставляющую способность и секрецию иммуномодулирующих цитокинов. Доказано, что В-клетки с регуляторной функцией подавляют или снижают регуляцию негативных иммунные ответов, посредством продукции цитокинов, в частности IL-10, и взаимодействия с другими клетками врожденной и адаптивной иммунных систем. Представление о том, что продуцирующие IL-10 В-лимфоциты модулируют воспалительные процессы аутоиммунитета, позволяет предположить важную роль этих клеток в иммунологической адаптации при беременности [5]. По данным Esteve-Solé и соавт. [6], IL-10-продуцирующие В-лимфоциты, обладающие супрессорными свойствами, обеспечивают периферические механизмы толерантности к антигенам плода. Утверждалось, что IL-10 реализует свои иммунорегулирующие свойства при беременности за счет ингибирования синтеза провоспалительных цитокинов, в особенности TNF-α, а также отрицательной регуляции цитотоксичности маточных NK (uNK) клеток [7]. В литературе имеются данные существовании отдельной популяции В-лимфоцитов с регуляторными свойствами (Breg) [8,9].

В связи с этим, изучение уровня циркулирующих В-лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-10 у женщин с привычным невынашиванием в анамнезе в соответствии со сроком пролонгирования настоящей беременности, позволит судить об эффективности иммунорегуляторных механизмов в поддержании толерантности к полуаллогенному плоду.

Цель настоящего исследования: оценить уровень CD20+IL-10+ В-лимфоцитов у беременных женщин с угрозой прерывания беременности в сроке 5-12 недель и привычным невынашиванием в анамнезе и сопоставить полученные данные со сроком завершения гестации.

Материал и методы. Нами были обследованы 65 беременных женщин в сроке 5-12 недель. Основную группу составили 33 женщины с угрожающим привычным выкидышем на момент обследования, группу сравнения составили 10 первобеременных женщин с угрожающим спорадическим выкидышем на момент обследования, группу контроля составили 22 беременные женщины без признаков угрожающего выкидыша при постановке на учет по беременности. Основная группа в зависимости от исходов беременности разделена на 2 подгруппы: подгруппа А – беременность закончилась самопроизвольным выкидышем или неразвивающейся беременностью (9 женщин), подгруппа В – беременность завершилась родами (24 женщины). Все обследуемые дали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено на заседании Локального этического комитета ФГБОУ «Ивановского НИИ материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ от 21.11.2018 г.

В исследование включены женщины, имеющие спонтанно наступившую одноплодную беременность, не имеющие тяжелой экстрагенитальной патологии, аутоиммунных заболеваний, обострения хронических и тяжелых аллергических заболеваний, острого инфекционного процесса на момент обследования. Из периферической венозной крови производилось выделение мононуклеарных клеток стандартным методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (d-1,078). Выделенные промытые лимфоциты окрашивались с помощью моноклональных антител анти-CD20, коньюгированные с FITC (Beckman Coulter, Франция) и анти-IL-10 коньюгированные с PE (Beckman Coulter, Франция). Оценка внутриклеточной экспрессии IL-10 оценивалась в популяции CD20+ клеток в соответствии со стандартным протоколом внутриклеточного окрашивания с использованием набора для пермеабилизации Intra Prep Permeabilizaton Reagent (Beckman Coulter, (Франция). В каждом образце анализировалось не менее 10 000 клеток. Анализ результатов проводили в программе BDFACS Diva Software (Bector Dickinson, США).

Статистическая обработка полученных данных производилась при помощи прикладных лицензионных программ: Microsoft Office 2010, Statistica for Windows 13.0. Данные представлены в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m), Расчет статистически значимых различий между данными с нормальным распределением оценивали по критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$. Поиск точки разделения, расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ).

Результаты. Во всех исследуемых группах в CD20+ лимфоцитарном гейте В-лимфоцитов определялись клетки с фенотипом CD20+IL-10+. Женщины с привычным невынашиванием беременности и угрожающим выкидышем на момент обследования имели значительно более низкий уровень CD20+IL-10+ (5,43±0,49) по сравнению с группой контроля (11,6±1,2) и первобеременными с угрожающим спорадическим выкидышем (6,77±1,26) (рис. 1).

По данным ретроспективного анализа, в периферической крови женщины подгруппы А отмечалось резкое снижение CD20+IL-10+ В-лимфоцитов 3,84±0,71 по сравнению с подгруппой В 6,07±0,40, ($p<0,05$). Такая

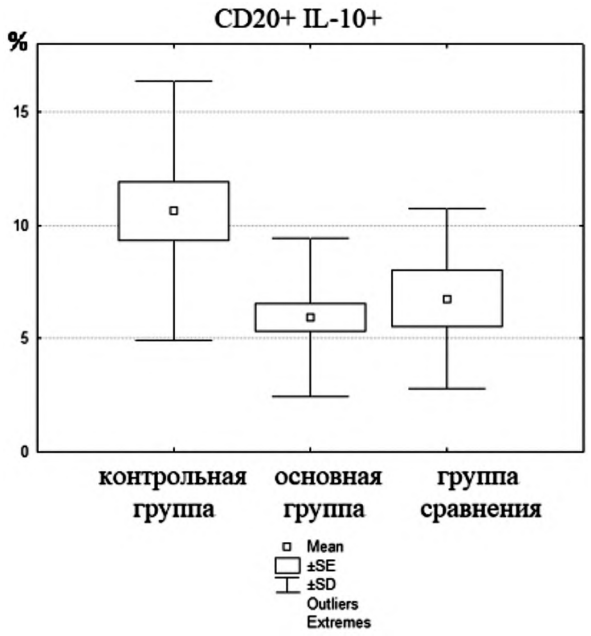


Рис. 1 Относительное содержание IL-10+ В-лимфоцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания беременности и привычным невынашиванием в анамнезе. По оси ординат – процентное соотношение CD20+IL-10+ в пуле CD20+ В-лимфоцитов.

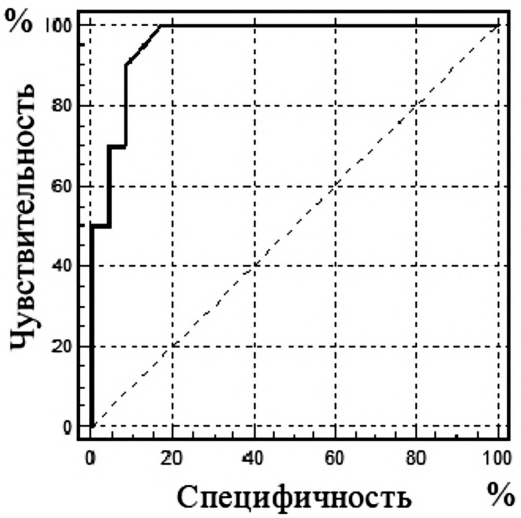


Рис. 2. ROC-анализ показателя относительного содержания CD20+IL-10+ лимфоцитов у женщин с угрозой прерывания беременности и привычным невынашиванием в анамнезе, беременность которых с репродуктивными потерями (самопроизвольным выкидышем или неразвивающейся беременностью) до 22 недель гестации.

существенная разница позволила разработать способ прогнозирования неразвивающейся беременности и самопроизвольного выкидыша в сроке до 22 нед беременности у женщин с угрожающим выкидышем в 5-12 нед и привычным невынашиванием в анамнезе - при уровне CD20+IL-10+ В-лимфоцитов равном или менее 4,5%, определенном в периферической крови в момент госпитализации прогнозируется неблагоприятный репродуктивный исход беременности – самопроизвольный выкидыш или неразвивающаяся беременность до 22 недель. По результатам ROC-анализа, площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,961 (рис.2), чувствительность способа составляет 100%, специфичность 82,6%, точность 87,9%) [10].

В группах контроля и сравнения также происходили неблагоприятные исходы беременности в виде самопроизвольных выкидышей и замерших беременностей, однако уровень CD20+IL-10+ В-лимфоцитов при этом не имел достоверных различий внутри групп по сравнению с беременными, чья беременность завершилась родами.

Обсуждение. IL-10 является важным модулятором реакций врожденного и в адаптивного иммунного ответа, регуляция которых может приводить к развитию иммунной толерантности или ослаблению воспалительных реакций. IL-10 производится в основном моноцитами, регуляторными Т-клетками (Treg), регуляторными В-клетками (Breg), небольшой фракцией естественных киллеров (NK), макрофагами, дендритными (DC) клетками и врожденными лимфоидными клетками (ILC). Клетки Breg представляют собой субпопуляцию иммуносупрессивных В-клеток, регулирующие чрезмерное воспаление за счет высвобождения IL-10, который, в свою очередь, индуцирует дифференцировку регуляторных Т-клеток, ингибирует провоспалительные реакции и увеличивает выработку IgG4, а также подавляет активацию тучных клеток и выработку цитокинов [11].

Известно, что хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) оказывает стимулирующее влияние на В-лимфоциты, индуцируя продукцию ими IL-10. В мировой литературе имеются экспериментальные данные об угнетении продукции IL-10 иммунными клетками трофобласта вследствие нейтрализации ХГЧ с помощью антител. Добавление рекомбинантного ХГЧ повышало синтез IL-10 Breg. Таким образом, ХГЧ играет важную роль в переключении В-клеток на регуляторный фенотип, необходимый для поддержания беременности [5]. В то же время, имеются данные, что количество Breg увеличивается в первом триместре беременности, подавляя тем самым нежелательные иммунные ответы материнских эффекторных Т-клеток. В то время как было выявлено, что у женщин, перенесших самопроизвольный выкидыш, имелось значительно более низкое содержание Breg по сравнению с женщинами, имеющими неосложненную беременность в первом триместре [12].

Заключение. Мы предполагаем, что дефицит продукции IL-10 В-лимфоцитами затрудняет дифференцировку до зрелых эффекторных форм – плазмоцитов, являющихся источником, в том числе и блокирующих антител класса G (aIgG) - факторов защиты семиаллогенного плода от реакций клеточной цитотоксичности и фагоцитов материнского организма [13]. Таким образом, выявленное существенное снижение ИЛ-10 продуцирующих В-лимфоцитов с регуляторными свойствами может лежать в патогенезе аллоиммунного выкидыша. Степень снижения CD20+IL-10+ клеток в периферической крови является отражением нарушений в репродуктивной системе материнского организма: меньший уровень ассоциировался с повторной потерей беременности.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–13 см. REFERENCES)

1. Батрак Н.В., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В. Роль CD178+ мононуклеарных клеток в развитии угрожающего позднего выкидыша у женщин с угрозой прерывания беременности в I триместре и привычным невынашиванием в анамнезе. *Акушерство и гинекология*. 2020; 5: 70-7.
10. Малышкина А.И. Сотникова Н.Ю., Воронин Д.Н., Куст А.В., Таланова И.Е. Способ прогнозирования репродуктивных потерь в сроке до 22 недель беременности у женщин с угрожающим выкидышем и привычным невынашиванием в анамнезе. Патент РФ № 2746033; 2021.

REFERENCES

1. Batrak N.V., Malyshkina A.I., Sotnikova N.Yu., Kroshkina N.V. The role of cd178+ mononuclear cells in the development of threatened late abortion in women with first-trimester threatened pregnancy interruption and a history of recurrent miscarriage. *Akusherstvo i Ginekologiya.* 2016;7:5-10. (in Russian)
2. Grimstad F., Krieg S. Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2016; 33(7):833-47. doi: 10.1007/s10815-016-0720-6.
3. Mekinian A., Cohen J., Kayem G., Carbillon L., Nicaise-Roland P., Gaugler B., Darai E., Bornes M., Fain O. Fausses couches précoces récurrentes inexpliquées : quelle est la place de l'immunomodulation? [Unexplained recurrent early miscarriages: Role of immunomodulation?]. *Rev. Med. Interne*. 2017 Apr; 38(4): 264-8. French. doi: 10.1016/j.revmed.2016.08.001.
4. Luo L., Zeng X., Huang Z., Luo S., Qin L., Li S. Reduced frequency and functional defects of CD4+CD25highCD127low/- regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reprod.Biol.Endocrinol*. 2020;18(1):62. doi: 10.1186/s12958-020-00619-7.
5. Fettke F., Schumacher A., Canellada A., Toledo N., Bekeredjian-Ding I., Bondt A., Wuhrer M., Costa S. D., Zenclussen A.C. Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis. *Front. Immunol*. 2016; Dec 8;7:495. doi: 10.3389/fimmu.2016.00495.
6. Esteve-Solé A., Luo Y., Vlagea A., Deyà-Martínez Á., Yagüe J., Plaza-Martín A.M., Juan M., Alsina L. B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(7) :2099.
7. Danaii S., Ghorbani F., Ahmadi M., Abbaszadeh H., Koushaeian L., Soltani-Zangbar M.S., Mehdizadeh A., Hojjat-Farsangi M., Kafil H.S., Aghebati-Maleki L., Yousefi M. IL-10-producing B cells play important role in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss. *Int. Immunopharmacol*. 2020 Oct; 87: 106806. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106806.
8. Hosseini A., Dolati S., Hashemi V., Abdollahpour-Alitappeh M., Yousefi M. Regulatory T and T helper 17 cells: Their roles in preeclampsia. *J. Cell. Physiol*. 2018;233(9):6561-73. doi: 10.1002/jcp.26604.
9. Furuzawa-Carballeda J., Hernández-Molina G., Lima G., Rivera-Vicencio Y., Férez-Blando K., Llorente L. Peripheral regulatory cells immunophenotyping in primary Sjögren's syndrome: a cross-sectional study. *Arthritis. Res. Ther*. 2013; 15(3): R68. doi: 10.1186/ar4245.
10. Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Voronin D.N., Kust A.V., Talanova I.E. A method for predicting reproductive losses before 22 weeks of pregnancy in women with threatened miscarriage and recurrent miscarriage in history. Patent RF № 2746033; 2021. (in Russian)
11. Boonpiyathad T., Satitsuksanoa P., Akdis M., Akdis C.A. Il-10 producing T and B cells in allergy. *Semin. Immunol*. 2019 Aug; 44: 101326. doi: 10.1016/j.smim.2019.101326.
12. Rolle L.1., Memarzadeh Tehran M., Morell-García A., Raeva Y., Schumacher A., Hartig R. et al. IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2013 Dec; 70(6): 448-53.
13. Gu J., Lei Y., Huang Y., Zhao Y., Li J., Huang T. et al, Fab fragment glycosylated IgG may play a central role in placental immune evasion. *Hum. Reprod.* 2015 Feb; 30(2): 380-91. doi: 10.1093/humrep/deu323.

Поступила 05.03.21
Принята к печати 05.05.21

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-489-495

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Панова И.А., Кудряшова А.В., Панащатенко А.С., Рокотянская Е.А, Малышкина А.И., Парейшвили В.В., Харламова Н.В.

ХАРАКТЕР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В-ЛИМФОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045. Иваново, Россия

Целью работы было выявить особенности дифференцировки В-лимфоцитов у женщин с гипертензивными расстройствами различного генеза, установить их взаимосвязь с показателями эластических свойств сосудистой стенки и разработать дополнительные диагностические критерии степени тяжести преэклампсии. Обследованы 193 женщины в сроке 24–40 недель беременности. Из них 39 женщин с хронической артериальной гипертензией, 35 женщин с преэклампсией, развившейся на фоне хронической артериальной гипертензии, 55- с преэклампсией. Группа контроля- 64 женщины без гипертензивных расстройств. Для оценки эластических свойств сосудистой стенки использовалась сфигмографическая приставка аппаратно-программного комплекса «Поли-Спектр-8» («Нейрософт» Иваново). Относительное содержание В-лимфоцитов (CD19+ и CD20+), регуляторных В-клеток (CD20+IL-10+), «переключенных» (CD19+CD27+IgD-) и «непереключенных» (CD19+CD27+IgD+) клеток памяти, плазматических клеток (CD19+CD20-CD38+) в общей популяции В-лимфоцитов оценивали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSCantoII в программе FACS Diva. Статистический анализ осуществлялся в программах «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2010» и «MedCalc». У всех обследуемых с гипертензивными расстройствами было выявлено повышение жесткости артерий мышечного и эластического типов, наиболее выраженное в группах пациенток с ПЭ, максимально- у женщин с ХАГ и присоединившейся ПЭ. Повышенный уровень В1-лимфоцитов в периферической крови так же отмечен при всех гипертензивных расстройствах. Выявлены положительные корреляционные связи высокой силы между: уровнем CD20+ клеток и скоростью распространения пульсовой волны по артериям мышечного типа (СРПВм) во всех группах с гипертензивными расстройствами; содержанием В1-клеток и СРПВм при умеренной преэклампсии; уровнем В-клеток памяти и СРПВ по артериям эластического типа у женщин с ХАГ и присоединившейся ПЭ. Проведенный ROC-анализ относительного содержания В1-клеток в общей популяции В-лимфоцитов и содержания IL-10- продуцирующих клеток в популяции CD20+ лимфоцитов (Breg) у женщин с умеренной и тяжелой ПЭ выявил критерии дифференциальной диагностики преэклампсии различной степени тяжести. Наличие гипертензивных расстройств различного генеза сопровождается снижением эластичности артериальной стенки сосудов, наиболее выраженным у пациенток с ХАГ и присоединившейся ПЭ. Эти изменения в значительной степени коррелируют с уровнем В-клеток. В качестве дополнительных критериев для определения степени тяжести ПЭ может быть использовано относительное содержание В1-клеток и IL-10- продуцирующих клеток в популяции Breg CD20+ лимфоцитов.

Ключевые слова: *преэклампсия; хроническая артериальная гипертензия; гипертензивные расстройства; беременность; В-лимфоциты; скорость распространения пульсовой волны.*

Для цитирования: Панова И.А., Кудряшова А.В., Панащатенко А.С., Рокотянская Е.А, Малышкина А.И., Парейшвили В.В., Харламова Н.В. Характер дифференцировки В-лимфоцитов у женщин с гипертензивными расстройствами при беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (8): 489-495. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-489-495

Panova I.A., Kudryashova A.V., Panashchatenko A.S., Rokotyanskaya E.A., Malyshkina A.I., Parejshvili V.V., Harlamova N.V.

CHARACTER OF B-LYMPHOCYTES DIFFERENTIATION IN WOMEN WITH HYPERTENSIVE DISORDERS DURING PREGNANCY

«Ivanovo Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov» of the Russian Ministry of health, Ivanovo, Russia

The aim of the work was to identify the features of B-lymphocyte differentiation in women with hypertensive disorders of various origins, to establish their relationship with indicators of the elastic properties of the vascular wall, and to develop additional diagnostic criteria for the severity of preeclampsia. We examined 193 women at 24–40 weeks of gestation. Of these, 39 women with chronic arterial hypertension, 35 women with preeclampsia that developed against the background of chronic arterial hypertension, 55 with preeclampsia. The control group consisted of 64 women without hypertensive disorders. To assess the elastic properties of the vascular wall, a sphygmographic attachment of the "Poly-Spectrum-8" hardware-software complex ("Neurosoft" Ivanovo) was used. The relative content of B-lymphocytes (CD19 + and CD20 +), regulatory B-cells (CD20 + IL-10 +), switched (CD19 + CD27 + IgD-) and non-switched (CD19 + CD27 + IgD +) memory cells, plasma cells (CD19 + CD20-CD38 +) in the general population of B-lymphocytes was assessed by flow cytometry on a FACSCantoII flow cytometer using the FACS Diva program. Statistical analysis was carried out using the programs "Statistica for Windows 6.0", "Microsoft Excel 2010" and "MedCals". All subjects with hypertensive disorders showed an increase in the stiffness of the arteries of the muscular and elastic types, the most pronounced in the groups of patients with PE, the maximum in women with CAH and associated PE. An increased level of B1-lymphocytes in the peripheral blood is also noted in all hypertensive disorders. There were revealed positive correlations of high strength between: the level of CD20 + cells and the velocity of pulse wave propagation through the arteries of the muscular type (PWVm) in all groups with hypertensive disorders; the content of B1 cells and PWVM in moderate preeclampsia; level emory B-cells and PWV in elastic-type arteries in women with CAH and associated PE. The ROC analysis of the relative content of B1 cells in the general population of B lymphocytes and the content of IL-10-producing cells in the population of CD20 + lymphocytes (Breg) in women with moderate and severe PE revealed criteria for the differential diagnosis of preeclampsia of varying severity.

Для корреспонденции: *Панащатенко Анна Сергеевна*, аспирант каф. акушерства и гинекологии, неонатологии, анестезиологии и реаниматологии; e-mail: an.zinchencko2017@yandex.ru

The presence of hypertensive disorders of various origins is accompanied by a decrease in the elasticity of the arterial vascular wall, which is most pronounced in patients with CAH and associated PE. These changes are largely correlated with the level of B cells. As additional criteria for determining the severity of PE, the relative content of B1 cells and IL-10-producing cells in the population of Breg CD20 + lymphocytes can be used.

Key words: *preeclampsia; chronic arterial hypertension; hypertensive disorders; pregnancy; B-lymphocytes; pulse wave velocity.*

For citation: Panova I.A., Kudryashova A.V., Panashchatenko A.S.,Rokotyanskaya E.A., Malyshkina A.I., Parejshvili V.V., Harlamova N.V. The nature of differentiation of β-lymphocytes in women with hypertensive disorders during pregnancy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 489-495 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-489-495

Information about authors:

Panova I.A., https://orcid.org/0000-0002-0828-6547;
Kudryashova A.V., https://orcid.org/0000-0002-8501-1029;
Panashchatenko A.S., https://orcid.org/ 0000-0002-9175-5016;
Rokotyanskaya E.A., https://orcid.org/0000-0003-4660-7249;
Malyshkina A.I., https://orcid.org/0000-0002-1145-0563;
Parejshvili V. V., https://orcid.org/0000-0002-1497-1006;
Harlamova N.V., http://orcid.org/0000-0003-2867-1693.

For correspondence: *Panaschatenko An. S.,* postgraduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Reanimatology; e-mail: an.zinchencko2017@yandex.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 12.03.2021
Accepted 14.05.2021

Введение. Проблема гипертензивных расстройств у беременных женщин пристально изучается на протяжении нескольких десятилетий, но, по-прежнему, остается важной для научного сообщества. В современной международной классификации болезней 10-го пересмотра нозологические формы данной патологии представлены хронической/существовавшей ранее артериальной гипертензией, хронической артериальной гипертензией с присоединившейся преэклампсией, гестационной артериальной гипертензией, преэклампсией, эклампсией [1]. Развитие данных осложнений беременности — следствие комплекса патогенетических факторов, среди которых одним из основных является неадекватный ответ иммунной системы матери на наступление и развитие беременности [2]. По данным литературы известно, что у женщин с ПЭ проявляются признаки, сходные с различными хроническими воспалительными заболеваниями, такие как повышение количества воспалительных цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов, а также наличие в крови матери аутоантител [3, 4]. Было показано, что большую часть патофизиологических реакций, связанных с ПЭ, могут определять аутоантитела к рецептору 1 типа ангиотензина II (АТ1-АА), антитела к фосфолипидам (АФА), к эндотелию (АЭАт), anti-GalNAc-β антитела, антигликановые антитела (АгАт) и т.д. [5–7]. Все это наглядно показывает значимость реакций В-лимфоцитов в развитии данного осложнения беременности. Как известно, одним из проявлений поражения органов-мишеней при АГ является гипертензивное ремоделирование сосудов, заключающееся в изменении структуры и свойств сосудистой стенки [8]. Некоторые ученые акцентируют внимание на патогенетической роли в повышении жесткости артериального русла у пациентов при АГ субклинического воспаления, дисфункции эндотелия [9]. Результатом этих преобразований является снижение растяжимости и сужения просвета сосудов артериального русла. Степень поражения сосудов отражается в увеличении скорости распространения пульсовой волны (СРПВ) и модуля упругости сосудистой стенки [10]. Работы по определению взаимосвязи показателей эластичности сосудистой стенки и дифференцировки В-клеток у беременных с гипертензивными расстройствами практически отсутствуют. Поэтому целью нашего исследования было выявить особенности дифференцировки В-лимфоцитов у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза, определить их взаимосвязь с показателями эластических свойств сосудистой стенки и разработать дополнительные диагностические критерии степени тяжести преэклампсии.

Материал и методы. На базе ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России были обследованы 193 беременных женщины. Из них 129 пациенток с гипертензивными расстройствами: с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) – 39 женщин, с преэклампсией (ПЭ) – 55 (из них с умеренной ПЭ (уПЭ) -30, с ПЭ тяжелой степени (тПЭ) – 25 пациенток), с ХАГ и присоединившейся ПЭ (ХАГ+ПЭ) – 35 беременных. Группу контроля, составили женщины без гипертензивных расстройств – 64 пациентки. Все женщины, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие. Методом проточной цитофлуориметрии в общей популяции лимфоцитов оценивали относительное содержание В-лимфоцитов (CD19+ и CD20+), в популяции CD20+ лимфоцитов В1 (CD5+), В2 (CD5-) клеток, IL-10+ В-клеток, в популяции CD19+ В-лимфоцитов – В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD±), переключенных (CD19+CD27+IgD-) и непереключенных (CD19+CD27+IgD+) клеток памяти, плазмоцитов (CD19+CD20-CD38+). В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD19 APC, анти-CD20 FITC, анти-CD38 PE, анти-CD27 PE, анти-IgD FITC (Beckman Coulter, Франция); анти-CD5 PE, анти-CD20 FITC, анти-IL-10 PE производства (eBioscience, США). Процедуру внутриклеточного окрашивания IL-10 проводили в соответствии с инструкцией производителя набора IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter,

Франция). Исследования проводились на проточном цитофлуориметре FACSCantoII в программе FACS Diva (Becton Dickinson and Company, США). При поступлении в стационар для определения скорости распространения пульсовой волны по артериям мышечного и эластического типов также выполнялось обследование на сфигмографической приставке аппаратно-программного комплекса «Поли-Спектр-8» («Нейрософт», Россия).

Статистический анализ данных. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в пакете лицензионных программ: MicrosoftOffice 2010, Statistica for Windows 13.0. Описание величин производилось в виде медианы с указанием 25-го и 75-го перцентилей (Me (Q25%–Q75%)). Проверка данных на нормальность распределения выполнялась при помощи критериев Колмогорова и Шапиро-Уилка. По непараметрическому критерию U (Манна–Уитни) производилась оценка достоверности различий между показателями. Оценка прогностической и диагностической значимости выполнялась при помощи ROC-анализ. Его количественная интерпретация оценивалась по значению AUC (area under ROC-curve), чувствительности и специфичности. Для обнаружения корреляционной связи между признаками определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена для непараметрических данных.

Результаты. Одним из механизмов формирования АГ является дисбаланс вазоконстрикторных и вазомоторных механизмов, направленных на поддержание сосудистого тонуса, который определяется снижением эластичности стенки артерий и проявляется увеличением скорости распространения пульсовой волны и модуля упругости [11]. По нашим данным было выявлено статистически значимое повышение средних значений скорости распространения пульсовой волны по артериям мышечного (СРПВм) и эластического типов (СРПВэ) во всех группах пациенток с гипертензивными расстройствами относительно значений контрольной группы (табл. 1).

Максимальные значения данных показателей были зафиксированы в группе с ХАГ с присоединением ПЭ, что возможно указывает на дополнительную вазоконстрикцию при преэклампсии. При этом у женщин с ПЭ значения СРПВ по артериям мышечного типа были статистически значимо выше по сравнению с группой с ХАГ (p=0,008), а по артериям эластического типа – ниже по сравнению с группой с ХАГ и присоединившейся ПЭ (p=0,005). Данный факт может свидетельствовать о том, что в случаях развития ПЭ (остро возникающем состоянии), выраженных изменений, специфичных для длительно патологического процесса на состояние сосудистой стенки (в группе с ХАГ) не выявлено.

Анализ результатов иммунологического обследования позволил выявить как общие изменения в характеристиках популяции В-лимфоцитов у беременных с гипертензивными расстройствами, так и некоторые изменения, присущие определенной нозологии (табл. 2).

Молекулы CD19 и CD20 по-разному экспрессируются на этапах дифференцировки В-клеток. Молекулы CD19 экспрессируются, начиная со стадии дифференцировки предшественников В-клеток, и сохраняются на всех последующих стадиях, в том числе и на В-клетках памяти и плазматических клетках, в то время как CD20 перестает экспрессироваться на плазмобластах и плазматических клетках [12,13]. В связи с этим мы оценивали уровень В-клеток по экспрессии молекул CD19 и CD20, а В-клетки памяти и плазматические клетки мы оценивали в популяции CD19+ В-лимфоцитов. В своем исследовании CD20+CD5+ B1 клеток мы ориентировались на результаты работы D.O. Griffin и соавт. [14]. Эти авторы показали, что в крови взрослого человека В1-клетки не существуют в популяции CD19+CD20- В-клеток. Уровень IL-10+ клеток исследовали в популяции CD20+ лимфоцитов L.S. Varon и соавт. [15].

По нашим данным в исследуемых группах отсутствовали достоверные различия в относительном содержании CD19+ и CD20+ клеток (p>0,05 во всех случаях), но достоверно увеличивалась доля В1-клеток и снижалось содержание В2-клеток в общей популяции В-лимфоцитов (p<0,05 во всех случаях).

У обследуемых с ХАГ, в том числе и с присоединившейся ПЭ, отмечалось достоверное повышение относительного содержания плазматических клеток по сравнению с группой контроля (p<0,05 во всех случаях).

В популяции CD19+ В-лимфоцитов было выявлено повышение относительного содержания В-клеток памяти (CD27-IgD±) достоверное в группах с ХАГ, с ПЭ, как с умеренной, так и с тяжелой (p<0,05 во всех случаях) и на уровне выраженной тенденции в группе ХАГ+ПЭ (p=0,075) по сравнению с группой контроля. Уровень «непереключенных» В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD+) во всех группах женщин с гипертензивными расстройствами соответствовал таковому в контрольной группе. Содержание «переключенных» В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) было достоверно выше в группах с

Таблица 1

Скорость распространения пульсовой волны по артериям мышечного и эластического типов у женщин с гипертензивными расстройствами различного генеза

Показатель	Группы обследованных женщин					
	Контроль, n=64	ХАГ, n=39	ХАГ с ПЭ, n=21	ПЭ, n=54	уПЭ, n=29	тПЭ, n=25
СРПВм (м/с)	6,81(6,36-7,24)	7,74(7,29-7,92) p_1=0,00	7,88(7,84-7,95) p_1=0,00	7,89(7,74-8,05) p_1=0,00 p_2= 0,008	7,78(7,69-7,92) p_1=0,000	8,02(7,89-8,17) p_1=0,000 p_4=0,004
СРПВэ (м/с)	6,15(6,04-6,2)	7,26(6,88-7,76) p_1=0,00	7,51(7,32-7,77) p_1=0,00 p_3= 0,005	7,03(6,72-7,48) p_1=0,00	6,84(6,62-7,38) p_1=0,000	7,05(6,88-7,66) p_1=0,000

Примечание. Значения величин представлены в виде медианы с указанием 25-го и 75-го перцентилей(Me($Q_{25\%}$–$Q_{75\%}$)); p_1 - статистически значимая разница значений с контрольной группой, p_2 - статистически значимая разница значений с ХАГ, p_3 - статистически значимая разница значений с ПЭ, p_4 - статистически значимая разница значений с уПЭ. n – число больных.

Таблица 2

Относительное содержание популяций В-лимфоцитов, плазматических клеток, В-клеток памяти и регуляторных В-клеток у пациенток с гипертензивными расстройствами при беременности различного генеза

Показатели, %	Контроль, *n*=53	ХАГ, *n*=39	ХАГ+ПЭ, *n*=35	ПЭ, *n*=53	уПЭ, *n*=30	тПЭ, *n*=23
CD19+ в популяции лимфоцитов	4,7(3,5-6,6)	5,2(3,8-8,8)	4,3(2,4-6,9)	4,2(3,1-7,3)	4,0(3,1-6,8)	4,3(3,1-7,6)
CD20+ в популяции лимфоцитов	4,9(3,3-7,0)	5,5(4,3-8,0)	4,2(2,4-7,4)	4,8(3,3-7,1)	4,8(3,4-7,0)	4,8(2,3-7,3)
CD5+ B1-клетки в популяции CD20+ лимфоцитов	10,6(8,8-13,1)	16,1(10,2-21,9), p_1=0,001	21,1(14,8-22,9), p_1=0,00	15,7(11,3-22,6), p_1=0,00	21,0(13,7-26,0) p_1=0,00, p_2=0,089	14,0(9,4- 18,0), p_1=0,049 p_3=0,014
CD5- B2-клетки в популяции CD20+ лимфоцитов	89,4(86,8-91,2)	83,9(77,7-89,8), p_1=0,001	78,9(77,0-85,2), p_1=0,00	84,3(77,4-88,6), p_1=0,00	79,0(74,0-86,3) p_1=0,00	86,3(82,0- 90,6), p_3=0,014
CD20-CD38+ плазматические клетки в популяции CD19+ лимфоцитов	1,2(0,4-2,8)	2,4(1,0-5,9), p_1=0,013	2,7(1,7-7,6), p_1= 0,004	3,6(1,6-8,6), p_1=0,000	4,2(1,9-8,4) p_1=0,00	3,1(1,4-7,2), p_1=0,010
CD27+IgD± клетки памяти в популяции CD19+ лимфоцитов	25,8(20,2-32,2)	41,5(26,8-46,2) p_1=0,001	36,9(18,9-44,8),	35,5(25,4-40,4), p_1=0,005	35,5(24,7-39,0), p_1=0,050	35,6(27,6-46,1), p_1=0,011
CD27+IgD+ «непереключенные» клетки памяти в популяции CD19+ лимфоцитов	10,9(9,2-14,9)	12,7(10,6-17,0)	13,1(4,0-16,3)	13,1(10,2-23,3)	13,1(11,4-19,7)	19,2(8,5-33,6)
CD27+IgD- «переключенные» клетки памяти в популяции CD19+ лимфоцитов	12,6(7,0-18,0)	17,5(16,1-31,6), p_1=0,009	22,0(15,6-27,9), p_1=0,014	18,9(14,7-22,3), p_1=0,018	19,0(18,7-22,3), p_1=0,009	14,2(9,5-19,7)
IL-10+ Breg в популяции CD20+ лимфоцитов	20,2(12,2-24,3)	14,3(9,8-18,1), p_1= 0,034	19(13,3-24,0)	17,7(12,4-22,2), p_1=0,029	18,8(17,1-23,0), p_2=0,017	11,0(8,3-19,4), p_1=0,034, p_3=0,034

Примечание. Значения величин представлены в виде медианы с указанием 25-го и 75-го перцентилей ($Me(Q_{25\%}–Q_{75\%})$); p_1 – уровень значимости различий при сравнении с контролем; p_2 – уровень значимости различий при сравнении с ХАГ; p_3 – уровень значимости различий при сравнении с уПЭ.

ХАГ, ПЭ (за счет группы с уПЭ), а так же у обследуемых с ХАГ и присоединившейся ПЭ (p< 0,05 во всех случаях).

Исследование уровня CD20+IL-10+ клеток, составляющих наибольшую часть регуляторных В-лимфоцитов (Breg), выявило достоверное уменьшение этой популяции у пациенток с ХАГ и с ПЭ (за счет пациенток с тПЭ) по сравнению с пациентками без гипертензивных расстройств (p< 0,05 во всех случаях).

Более пристальное внимание было уделено группе пациенток с преэклампсией различной степени тяжести. У пациенток с тяжелой ПЭ выявлено статистически значимое снижение содержания B1 CD5+ (p=0,014) и уровня Breg (p=0,034) по сравнению с пациентками с умеренной ПЭ.

Проведенный ROC-анализ показателя относительного содержания B1-клеток в общей популяции В-лимфоцитов у женщин с умеренной и тяжелой ПЭ, установил пороговое значение данного показателя – 18,3 %. При значении показателя B1>18,3% диагностируется уПЭ, при значении B1≤ 18,3% -тПЭ (показатель чувствительности-78,3%, показатель специфичности – 60,0% и площадь под кривой 0,705 (AUC= 0,705)) (рис. 1).

При проведении ROC-анализа содержания IL-10-продуцирующих клеток в популяции CD20+ лимфоцитов (Breg) у женщин с умеренной и тяжелой преэклампсией, было установлено пороговое значение для данного показателя – 13,1%. При уровне IL-10- продуцирующих клеток в популяции CD20+ лимфоцитов (Breg) более 13,1% диагностировали уПЭ; при значениях менее или равном 13,1% – тяжелую ПЭ (рис. 2).

Показатель чувствительности составил 70,0%, специфичности 100,0% и площадь под кривой 0,762 (AUC= 0,762).

Полученные результаты относительного содержания B1-клеток и IL-10- продуцирующих клеток в популяции CD20+ лимфоцитов (Breg) могут служить критериями дифференциальной диагностики степени тяжести ПЭ.

Проведенный корреляционный анализ между показателями СРПВ и содержанием В-лимфоцитов в группе пациенток с гипертензивными расстройствами показал положительную прямую корреляционную связь высокой силы между значениями, отражающим эластичность артерий мышечного типа, СРПВм и уровнем CD20+ клеток (r= 0,893, p=0,000). В группе женщин с уПЭ существовала прямая корреляционна связь высокой силы между содержанием B1-клеток и СРПВм (r=0,882, p=0,00). Кроме того установлена прямая корреляционная связь высокой силы между уровнем В-клеток памяти и СРПВэ, показателем отражающим изменение жесткость сосудистой стенки артериального русла, у пациенток с ХАГ и присоединившейся ПЭ (r=0,811, p=0,000).

Обсуждение. В настоящее время в работах, посвященных патогенетическим основам гипертензивных расстройств, большое внимание уделяют реакциям клеток врожденного иммунитета и различных популяций Т-лимфоцитов [16, 17]. При этом значение популяции В-лимфоцитов в развитии хронической артериальной гипертензии и гипертензивных осложнений при беременности изучено в меньшей степени и в основном рассматривает продукцию аутоантител [4–6, 18, 19].

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-489-495

а *б*

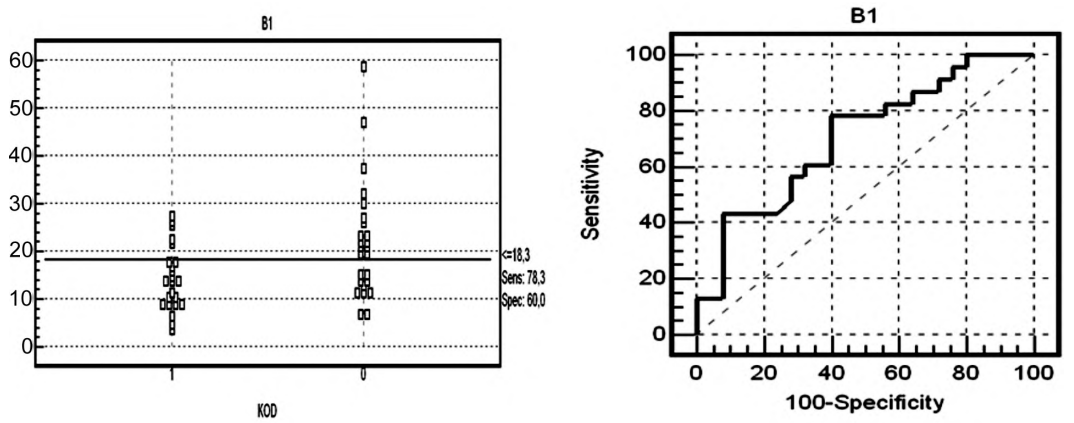


Рис. 1. ROC-анализ показателя относительного содержания B1-клеток при ПЭ. *а* – показатель относительного содержания B1-клеток; *б* – относительный показатель B1-клеток в периферической венозной крови у женщин с умеренной ПЭ (0) и тяжелой ПЭ (1). Здесь и на рис.2: по оси абсцисс – ROC-кривая специфичности, по оси ординат – чувствительности.

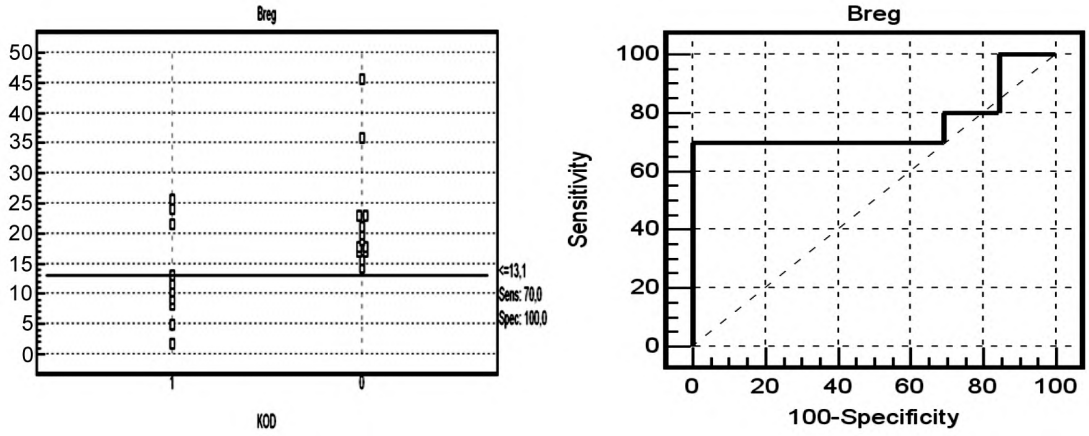


Рис. 2. ROC-анализ показателяотносительного содержания IL-10- продуцирующих клеток в популяции Breg CD20+ лимфоцитов у пациенток с ПЭ различной степенью тяжести. *а* - показатель относительного содержания IL-10- продуцирующих клеток в популяции Breg CD20+ лимфоцитов; *б* – относительный показатель IL-10- продуцирующих клеток в популяции Breg CD20+ лимфоцитов в периферической венозной крови у женщин с уПЭ (0) тПЭ(1).

Несмотря на то, что мы не получили достоверных различий в содержании периферических В-лимфоцитов у беременных с гипертензивными нарушениями и без них, нами была выявлена положительная корреляционная связь высокой силы между уровнем CD20+ клеток и скоростью распространения пульсовой волны по артериям мышечного типа (СРПВм) у пациенток с различными гипертензивными расстройствами. Эти данные подтверждаются C.T.Chan и соавт. [20], которые показали, что инфузия ангиотензина увеличивает активацию В-клеток и плазматических клеток в лимфоидных тканях и индуцирует отложение IgG в аорте. Так же, как и другие исследователи [21–23], мы отметили повышенный уровень В1-лимфоцитов в периферической крови женщин при всех гипертензивных расстройствах. Данное увеличение было наиболее выраженным при умеренной преэклампсии. Следует отметить, что именно в группе женщин с уПЭ существовала прямая корреляционна связь высокой силы между содержанием В1 клеток и СРПВм. Как известно величина СРПВ определяется морфологической структурой сосудистой стенки. Вероятно, для женщин с гипертензией высокий уровень В-лимфоцитов и, особенно, В1-клеток в периферической крови в наибольшей степени ассоциируется с развитием воспалительных и аутоиммунных реакций, изменяющих архитектонику сосудов мышечного типа [24], приносящих кровь к различным органам и тканям. В проведенных ранее исследованиях есть указание на то, что количество В1-клеток периферической крови у женщин с ПЭ значительно увеличено по сравнению с неосложненным течением беременности, однако достоверное увеличение количества В1-клеток у пациенток с уПЭ по сравнению с тПЭ нами было показано впервые.

Оценивая возможности ауторегуляции функциональной активности В-лимфоцитов, мы выявили, что для беременных с гипертензивными расстройствами характерно снижение содержания IL10-продуцирующих В-клеток. Именно эта фракция составляет основную часть популяции Breg [25]. Известно, что Breg ослабляют воспалительный ответ и способствуют стабильному толерантному иммунному профилю в организме при аутоиммунных заболеваниях, трансплантации и др. [26, 27]. Поэтому, можно предположить, что выявленное нами снижение уровня этих клеток, определяет недостаточное ограничение воспаления и аутоиммунных реакций в организме, у беременных с гипертензией.

Конечными этапами дифференцировки В-лимфоцитов являются формирование плазматических клеток и В-клеток памяти. Наше исследование показало, что все виды гипертензивных расстройств у беременных женщин ассоциируются с повышением содержания этих клеточных популяций в периферической крови. Было выявлено, что уровень CD27+IgD± В-клеток памяти достоверно повышался у женщин с ХАГ, и у женщин с ПЭ. Более детальное исследование данной популяции клеток продемонстрировало, что рост CD27+IgD± В-клеток памяти в основном определялся за счет повышения уровня «переключенных» В-клеток памяти. «Переключенные» (Switched) В-клетки памяти, развивают высокоспецифичные реакции при повторном контакте с антигеном [28 – 31] и быстрому генерированию пула плазматических клеток [32,33]. Существующая прямая корреляционная связь между уровнем В-клеток памяти и СРПВэ у пациенток с ХАГ+ПЭ (r=0,811, *p*=0,000), позволяет предположить большую длительность патологических реакций В-клеток у женщин с ХАГ и присоединившейся преэклампсией на уровне сосудов эластического типа.

Выполненный ROC-анализ относительного содержания B1-клеток и IL-10- продуцирующих Breg клеток в популяции CD20+ лимфоцитов позволил установить дополнительные дифференциально-диагностические критерии степени тяжести ПЭ.

Заключение. В развитии АГ различного генеза большую роль играет снижение эластичности артериальной стенки, наиболее выраженное при сочетании ПЭ с ХАГ. Гипертензивные расстройства у беременных женщин сопровождаются усиленной дифференцировкой В-лимфоцитов до конечных этапов, и их участием в развитии воспалительных и аутоиммунных реакций. Причем, в большинстве своем эти воспалительные и иммунные реакции имеют сходство при различных формах гипертензии у беременных, но корреляционные связи между характеристиками проведения пульсовой волны в сосудах мышечного типа и показателями состояния В-лимфоцитов свидетельствуют о значимости данной клеточной популяции в изменении структуры сосудистой стенки при умеренной преэклампсии и преэклампсии, присоединившейся к хронической артериальной гипертензии.

Критерии относительного содержания B1-клеток и IL-10-продуцирующих клеток в популяции Breg CD20+лимфоцитов могут быть использованы в качестве дополнительных в определении степени тяжести ПЭ.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 13-33 см. REFERENCES)

1. Айламазян Э.К., Репина М.А. Комментарии к клиническому протоколу «Гипертензия во время беременности, преэклампсия, эклампсия». *Журнал акушерства и женских болезней*. 2012; 5: 3–9.
2. Батурина И.Л., Абрамовских О.С., Логинова Ю.В., Никушкина К.В., Зотова М.А. и др. Анализ дифференцировки Tcyt-лимфоцитов при привычном невынашивании беременности. *Медицинская иммунология. Специальный выпуск*. 2017;19: 177.
4. Панова И. А., Малышкина А.И., Кудряшова А. В., Хлипунова Д. А., Рокотянская Е. А., Сытова Л. А. Синтез матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов периферическими фагоцитами у беременных с гипертензивными расстройствами. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2015;3: 26-32.
6. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Новаковский М.Е., Николаева М.А., Кан Н.Е., и др. Аутоантитела к антигенам эндотелия при преэклампсии. *Акушерство и гинекология.* 2016; 3: 24-31.
7. Мальсагов А.А., Цахилова С.Г., Сакварелидзе Н.Ю., Смирнова Л.Е., Беризова А.М., Малышева Е.М., и др. Клинико-диагностическое значение определения аутоантител у беременных с преэклампсией. *Проблемы репродукции*. 2020; 26(1): 90-4.
8. Панова И.А., Назаров С.Б., Рокотянская Е.А., Тихомирова О.В., Смирнова Е.В., Сытова Л.А. Особенности эластических свойств сосудов у беременных с различными видами гипертензивных расстройств. *Новости дерматовенерологии и репродуктивного здоровья*. 2015;2: 106-7.
9. Панова И.А., Кудряшова А.В., Рокотянская Е.А., Малышкина А.И. Особенности эластических свойств сосудов и иммунного воспалительного ответа при гипертензивных расстройствах у беременных. *Российский вестник акушера-гинеколога.*2019; 19(1):118-26.
10. Рябоконь Н.Р., Кузнецова Л.В., Зазерская И.Е. Влияние преэклампсии на физиологические и патологические процессы в сосудах и риски развития сердечно-сосудистых заболеваний после родов. *Трансляционная медицина*. 2014;(4):46-50.
11. Рябоконь Н.Р., Зазерская И. Е., Большакова О. О. Особенности жесткости сосудов при преэклампсии и после родов. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2016; (5):49–55.
12. Супоницкая Е.В, Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панафидина Т.А., Верижникова Ж.Г. и др. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (6):30-3.

REFERENCES

1. Ajlamazyan E.K., Repina M.A. Comments on the clinical protocol «Hypertension during pregnancy, preeclampsia, eclampsia». *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2012; 5: 3–9. (in Russian)
2. Baturina I.L., Abramovskih O.S., Loginova Yu.V., Nikushkina K.V., Zotova M.A. et al. Analysis of T cyt-lymphocyte differentiation in recurrent miscarriage. *Meditsinskaya immunologiya*. *Spetsial'nyj vypusk.*2017;19:177. (in Russian)
3. Verlohren S., Muller D.N., Luft F.C., Dechend R. Immunology in hypertension, preeclampsia, and target-organ damage. *Hypertension.* 2009; 54(3):439-43.
4. Panova I. A., Malyshkina A.I., Kudrjashova A. V., Hlipunova D. A., Rokotjanskaja E. A., Sytova L. A. Synthesis of matrix metalloproteinases and their inhibitors by peripheral phagocytes in pregnant women with hypertensive disorders. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2015; 3 :26-32. (in Russian)
5. Granger Joey P. Inflammatory cytokines, vascular function, and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2004; 286 (6): 989 – 90.
6. Ziganshina M.M., Shilova N.V., Hasbiullina N.R., Novakovskij M.E., Nikolaeva M.A., Kan N.E. et al. Autoantibodies to endothelial antigens in preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2016; 3: 24-31. (in Russian)
7. Malsagov A.A., Tsakhilova S.G., Sakvarelidze N.Yu., Smirnova L.E., Berizova A.M., Malysheva E.M. et al. Clinical and diagnostic value of autoantibody determination in pregnant women with preeclampsia. *Problemy reproduktsii.* 2020; 26 (1): 90-4. (in Russian)
8. Panova I.A., Nazarov S.B., Rokotjanskaja E.A., Tihomirova O.V., Smirnova E.V., Sytova L.A. Features of the elastic properties of blood vessels in pregnant women with various types of hypertensive disorders. *Novosti dermatovenerologii i reproduktivnogo zdorov'ya*. 2015;2:106-7. (in Russian)
9. Panova I.A., Kudryashova A.V., Rokotyanskaya E.A., Malyshkina A.I. Features of the elastic properties of blood vessels and the immune inflammatory response in hypertensive disorders in pregnant women. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2019; 19 (1): 118-26. (in Russian)
10. Ryabokon` N.R., Kuznetsova L.V., Zazerskaya I.E. The effect of preeclampsia on physiological and pathological processes in blood ves-

sels and the risks of developing cardiovascular diseases after childbirth. *Translyatsionnaya meditsina.* 2014;(4): 46-50. (in Russian)
11. Ryabokon N.R. Zazerskaya I.E.. Bolshakova O.O. Features of vascular stiffness during preeclampsia and after childbirth. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2016; (5):49–55. (in Russian)
12. Suponitskaya E.V, Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Panafidina T.A., Verizhnikova Zh.G.et al. Determination of subpopulations of B-lymphocytes of peripheral blood by flow cytofluorometry in healthy individuals and patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 6: 30-3. (in Russian)
13. Sarvaria A., Madrigal J.A., Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular&Molecular Immunology*. 2017;14(8):662-74.
14. Griffin D.O., Holodick N.E., Rothstein T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70−. *J.Exp Med.* 2011; 208(1):67-80.
15. Varon L.S., De Rosa J., Machicote A., Billordo L.A., Baz P., Fernández P.M., et al. Characterization of tonsillar IL10 secreting B cells and their role in the pathophysiology of tonsillar hypertrophy. *Sci Rep*. 2017; 7:11077.
16. Zhang J., Crowley S.D. Role of T lymphocytes in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 21:14–9.
17. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R. J. Role of the Immune System in Hypertension. *Physiol Rev*. 2017; 97(3): 1127–64.
18. Norlander A. E., Meena S. M., Harrison D. G. The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.* 2018; 215(1): 21–33.
19. Salema J., Mark L.O. Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: shared disease mechanisms and translational opportunities. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*2017 ;313(6):693-705.
20. Christopher T Chan, Christopher G Sobey, Maggie Lieu, Dorota Ferens, Michelle M Kett, Henry Diep et al. Obligatory Role for B Cells in the Development of Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Hypertension.* 2015;66(5):1023-33.
21. Laule C.F., Odean E.J., Wing C.R., Root K. M., Towner K.J., Hamm C.M. et al. Role of B1 and B2 lymphocytes in placental ischemia-induced hypertension. *Adaptive Immunity in Cardiovascular Disease.* 2019; 317(4): 732–42.
22. Hoffman W., Lakkis F.G., Chalasani G.B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016 ; 11(1): 137–54.
23. LaMarca B., Cornelius D., Wallace K. Elucidating immune mechanisms causing hypertension during pregnancy. *Physiology*. 2013; 28(4): 225–33.
24. Mozos I., Malainer C., Horbańczuk J., Gug C., Stoian D., Luca C.T., et al. Inflammatory Markers for Arterial Stiffness in Cardiovascular Diseases. *Front Immunol*. 2017; 8 :1058.
25. Esteve-Solé A., Luo Y., Vlagea A., Deyà-Martínez Á., Yagüe J., Plaza-Martín A.M., et al. B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(7): 2099.
26.Fettke F., Schumacher A., Serban-Dan C., Zenclussen A.C. B Cells: The Old New Players in Reproductive Immunology. *Front Immunol*. 2014; 5: 285.
27. Guzman-Genuino R.M., Diener K.R. Regulatory B Cells in Pregnancy: Lessons from Autoimmunity, Graft Tolerance, and Cancer. *Front Immunol*. 2017; 8: 172.
28. Borhis G., Richard Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunol*. 2015; 16:15.
29. Chen X., Li G., Wan Z., Liu C., Zeng Y., Liu W. How B cells remember? A sophisticated cytoplasmic tail of mIgG is pivotal for the enhanced transmembrane signaling of IgG-switched memory B cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2015; 118(3): 89–94.
30. Pieper K., Grimbacher B., Eibel N. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2013; 131(4): 959–71.
31. Deenick E.K., Avery D.T, Chan A., Berglund L.J., Ives M.L., Moens L. et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J. Exp. Med*. 2013; 210(12);2739–53.
32. Seifert M., Przekopowitz M., Taudien S., Lollies A., Ronge V., Drees B. et al. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2015; 112(6): E546-55.
33. Davey A.M., Pierce S.K. Intrinsic differences in the initiation of B cell receptor signaling favor responses of human IgG(+) memory B cells over IgM(+) naive B cells. *J. Immunol*. 2012; 188(7): 3332–41.

Поступила 12.03.21
Принята к печати 14.05.21

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2021; 66(8)
DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-496-501

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Корноухова Л.А.[1, 2], Эмануэль В.Л.[1, 2], Денисов Н.Л.[1], Никонов Е.Л.[3]

ИНФЕКЦИЯ *HELICOBACTER PYLORI:* МЕСТО СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ В КЛИНИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЯХ

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, 190103, Санкт-Петербург, Россия;
[2]ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;
[3]ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Цель работы – ознакомление врачей с методами и значением серологической и культуральной диагностики инфекции H. pylori на примере теста для диагностики состояния слизистой оболочки желудка «ГастроПанель». Для 1057 больных и 122 здоровых в возрасте 18-64 лет выполнены исследования сыворотки крови: пепсиноген I (PG I), пепсиноген II (PG II), гастрин-17 (G-17), базальный/стимулированный), антитела (IgG_{Hp}) к H. pylori (Biohit Oyj, Финляндия). Выявлено, что медианы изучаемых показателей групп не превышали референтных интервалов. 398 (34%) пациентов характеризуются отрицательным H. pylori статусом (IgG_{Hp-}). Выявлено 275 (26%) больных с пепсиногеном I сыворотки ≤70 мкг/мл. Отношение PG I/II≤3 у 84 (8%), 36 из них (43% группы PG I/II≤3) – IgG_{Hp-}.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori; атрофический гастрит; диагностика инфекции H. pylori.*

Для цитирования: Корноухова Л.А., Эмануэль В.Л., Денисов Н.Л., Никонов Е.Л. Инфекция *Helicobacter pylori:* место серологической и культуральной диагностики в клинических рекомендациях. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (8): 496-501. DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-496-501

Kornoukhova L.A.[1, 2], Emanuel V.L. [2], Denisov N.L. [2], Nikonov E.L.[3]

HELICOBACTER PYLORI INFECTION: THE PLACE OF SEROLOGICAL AND CULTURAL DIAGNOSTICS IN CLINICAL GUIDELINES

[1]Saint Petersburg State University Hospital, Saint Petersburg;
[2]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg;
[3]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education « Pirogov Russian National Research Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

The purpose of this work was to familiarize doctors with the methods and significance of serological and cultural diagnostics of H. pylori infection on the example of the test for diagnosing the state of the gastric mucosa «Gastropanel». Blood serum tests were performed for 1057 patients and 122 healthy people aged 18-64 years: pepsinogen I (PG I), pepsinogen II (PG II), gastrin-17 (G-17), basal/stimulated), antibodies (IgG_{Hp}) to H. pylori (Biohit Oyj, Finland). The medians of the studied group indicators did not exceed the reference intervals. 398 (34%) patients have negative H. pylori status (IgG_{Hp-}). 275 (26%) patients with serum PG I≤70 mcg/ml were identified. The ratio of PG I/II≤3 in 84 (8%), 36 of them (43% of the group PG I/II≤3) – IgG_{Hp-}.

Key words: *Helicobacter pylori; atrophic gastritis; diagnosis of H. pylori infection.*

For citation: Kornoukhova L.A., Emanuel V.L., Denisov N.L., Nikonov E.L. Helicobacter pylori infection: place of serological and cultural diagnostics in clinical guidelines. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 496-501 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-496-501

For correspondence: *Kornoukhova L.A.,* Director for infectious safety of the Saint Petersburg State University Hospital, bacteriologist; assistant of the Department of clinical laboratory diagnostics with the course of molecular medicine; e-mail: kornouchova@mail.ru

Information about authors:
Kornoukhova L.A., https://orcid.org/0000-0002-3840-1032;
Emanuel V.L., https://orcid.org/0000-0002-2079-0439;
Nikonov E.L., https://orcid.org/0000-0003-3021-6534.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 12.01.2021
Accepted 12.04.2021

Для корреспонденции: *Корноухова Любовь Александровна*, зам. дир. по инфекционной безопасности Клиники высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, врач-бактериолог; ассистент каф. клин. лаб. диагностики с курсом мол. медицины ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; e-mail: kornouchova@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-496-501

Наиболее распространённой причиной хронического гастрита в мире является инфекция *Helicobacter pylori*, вызывающая прогрессирующее повреждение слизистой оболочки желудка, являющаяся этиологическим агентом таких заболеваний, как язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарцинома желудка и MALT-лимфома слизистой оболочки желудка.

В Российской Федерации, по данным Международного агентства по исследованию рака, злокачественные новообразования желудка занимают 5-е место в структуре общей онкологической заболеваемости – более 35 тыс. новых случаев рака желудка в 2018 г. (табл. 1). Статистика свидетельствует о снижении стандартизированного возрастного коэффициента на 100 тыс. человек (англ. Age-Standardised Rate per 100,000 (World), ASR_w) с 16,0 в 2012 г. до 13,3 в 2018 г. [1, 2]. В 2012 г. по заболеваемости раком желудка Корея (ASR_w 41,8), Япония (ASR_w 29,9), Китай (ASR_w 22,7), Российская Федерация (ASR_w 16,0) заняли первое, третье, пятое и девятнадцатое место в мире соответственно [1]. В 2018 г. сохранили свои позиции Корея (ASRw 39,6) и Япония (ASR_w 27,5), Китай (ASR_w 20,7) занял 4-е место, РФ (ASR_w 13,3) – двадцатое из 184 стран [2].

Возможно, на снижение уровня ASR_w определённое положительное влияние оказали публикации с 2015 г. нескольких основных консенсусных документов по диагностике и лечению инфекции *H. pylori* [3-7], имеющих различия в подходах к лабораторной диагностике. В РФ разработано два документа в виде клинических рекомендаций (КР): «VI национальные рекомендации по диагностике и лечению кислотозависимых и ассоциированных с *Helicobacter pylori* заболеваний (VI московские соглашения)», подготовленные Научным обществом гастроэнтерологов России, (КР НОГР) и «Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых» (КР РГА) [8, 9]. В них указано, что основными диагностическими тестами являются неинвазивные дыхательные тесты и определение антигена *H. pylori* в кале лабораторным способом. Неоднозначно в данных рекомендациях определены показания к эзофагогастродуоденоскопии и культуральному исследованию с определением чувствительности к антибиотикам. КР НОГР, отмечая, что чрезвычайно низкие показатели о регионарной резистентности к кларитромицину в РФ противоречат общим тенденциям, рекомендуют подбор терапии после определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам только при отсутствии эрадикации *H. pylori* после лечения препаратами второй линии [8]. В КР РГА показания для культурального исследования определены следующим образом: «в отсутствие возможности использовать референсные методы диагностики целесообразно комбинировать доступные диагностические тесты или (в случае применения методов непосредственного обнаружения бактерии в биоптате слизистой оболочки желудка – бактериологического, морфологического, быстрого уреазного теста) исследовать хотя бы два биоптата из тела желудка и один биоптат из антрального отдела (УДД 5, УУР D)» [9].

По данным лаборатории Северо-Западного центра доказательной медицины (г. Санкт-Петербург) в 2018 г. среди заявок на лабораторные исследования доминировали тесты на определение IgG к *H. pylori* (IgG_{Hp} – 51%) и антигена *H. pylori* в кале (20%), далее расположились тесты для оценки состояния желудка: Пепсиноген I (PG I – 14%); Пепсиноген II (PG II – 10%); «Гастропанель» ((PG I, PG II, гастрин-17(G-17), Ig G_{Hp}) – 4%); G-17 (1%). Самым невостребованным тестом стал культуральный метод с определением чувствительности к антибактериальным препаратам (0%). Можно предположить, что врачи-клиницисты правильно используют определение антигена *H. pylori* в фекалиях (до и после лечения) и однократно оценивают состояние слизистой оболочки желудка. Однако, свободное использование IgG_{Hp} и пренебрежение культуральными исследованиями свидетельствует об отсутствии чётких диагностических алгоритмов.

Цель работы – ознакомить практикующих врачей с методами и значением серологической и культуральной диагностики инфекции *H. pylori* на примере теста для неинвазивной диагностики состояния слизистой оболочки желудка «ГастроПанель».

Материал и методы. Лабораторные исследования проводились на базе лаборатории Северо-Западного центра доказательной медицины в период 2008-2015 гг. В исследование включены 1057 больных и 122 здоровых человека в возрасте от 18 до 64 лет, которым выполнены

Таблица 1

Расчётное количество новых случаев злокачественных новообразований желудка в мире в 2018 г.

Население	Число случаев	Интервал неопределенности	ASR_w*
В мире	1 033 701	[1006270.0-1061880.0]	11.1
Китай	456 124	[449048.0-463312.0]	20.7
Япония	115 546	[113989.0-117124.0]	27.5
Индия	57 394	[54849.0-60057.0]	4.5
Корея, Республика Корея	37 266	[36347.1-38208.1]	39.6
Российская Федерация	35 213	[34630.3-35805.5]	13.3
Соединенные Штаты Америки	26 026	[25539.3-26522.0]	4.1
Бразилия	20 927	[19849.4-22063.1]	7.9
Вьетнам	17 527	[16371.4-18764.1]	15.9
Германия	14 173	[13669.2-14695.4]	6.7
Италия	12 803	[12441.3-13175.2]	7.2

Примечание. * – ASRw - стандартизированный по возрасту коэффициент на 100 тыс. населения. По данным Международного агентства по исследованию рака [2] http://gco.iarc.fr/today/online-analysis table?v=2018&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=643&key=asr&sex=0&cancer=7&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1.

исследования сыворотки крови с учётом клинических рекомендаций [8]: PG I, PG II, G-17 (базальный/стимулированный), IgG_{Hp} (Biohit Oyj, Финляндия, иммуноферментный анализ).

Результаты исследования представлены абсолютными числами и процентами, значениями медианы (Me) и 95%-го доверительного интервала (ДИ), *n* – объём анализируемой подгруппы, *p* – достигнутый уровень значимости. Статистический анализ результатов проведён с использованием статистических программ MedCalc (MedCalc Software, Бельгия). Для нормального распределения данных применены параметрические методы анализа (дисперсионный анализ, t-критерий Стьюдента), в остальных случаях – непараметрические методы (критерии Вилкоксона, Манна – Уитни). Взаимосвязь признаков оценена с использованием метода корреляции Пирсона (для параметрического семейства) или Спирмена. Критическое значение уровня значимости принято равным 5% ($p<0,05$).

Результаты и обсуждение. Средний возраст пациентов – 49 лет, наиболее часто обследование проводится в группах 41-50лет (26%) и 51-60 лет (31%).

Медианы изучаемых показателей двух групп не превышали пороговых значений – референсных интервалов, вместе с тем выявлены статистически значимые различия между больными и здоровыми по уровням лабораторных биомаркёров, характеризующих изменения функции желудка и IgG_{Hp} ($p<0,001$), за исключением уровня стимулированного G-17 ($p=0,26$) (табл. 2).

При серологической диагностике *H. pylori*-инфекции 398 (34%) пациентов характеризуются отрицательным *H. pylori* статусом (IgG_{Hp}-). Среди 1057 больных нормальные значения IgG_{Hp} выявлены у 276 (26%). Среди больных лиц зарегистрировано статистически достоверное повышение медианы IgG_{Hp} по сравнению со здоровыми обследованными: 75,4 EIU (EIU – иммуноферментные единицы), 95% ДИ [69,82 – 79,47] vs 9,65 EIU, 95% ДИ [7,77-10,95], $p<0,0001$.

Серологические тесты являются неинвазивными, менее дорогими, быстрыми, простыми в проведении, не требуют ограничения по использованию антибиотиков, препаратов висмута и ингибиторов протонной помпы (ИПП). Серологические тесты считаются полезными для скрининга пациентов [4, 5, 9]. В рекомендациях Хьюстонской консенсусной конференции по тестированию инфекции *H. pylori* в США предложено не использовать серологию для выявления активной инфекции *H. pylori* [7].

При выборе и интерпретации серологических тестов необходимо обратить внимание на рекомендации по локальной валидации тест-систем в соответствии с антигенным составом циркулирующих штаммов, поскольку точность диагностики зависит от штамма бактерий, из которого получен антиген *H. pylori* [4, 5]. Следует использовать только проверенные тесты после исследования сыворотки пациентов с *H. pylori*-положительными результатами инвазивных методов (гистологией, бактериологией, ПЦР). Данный тест может быть рекомендован при низком уровне обсеменённости *H. pylori*, например, при атрофическом гастрите, ложноотрицательных результатах других тестов. При диагностике инфекции следует обратить внимание на титр антител; если результат отрицательный, но близок к пороговому значению, следует использовать другие тесты для подтверждения наличия или отсутствия инфекции *H. pylori*. IgG_{Hp} не рекомендованы для оценки эффективности эрадикационной терапии, при необходимости количественное сравнение может быть проведено не ранее чем через ≥6 мес после лечения, при этом уровень антител должен сократиться более 50% от титра до лечения [4].

Уровни PG сыворотки используют как неинвазивный тест для изучения состояния слизистой оболочки желудка, оценки воспаления и атрофии слизистой оболочки желудка до и после лечения. PG I синтезируется клетками главных желёз в теле желудка и является первым маркёром атрофии тела желудка. В случае тяжёлого атрофического гастрита происходит утрата главных клеток, что ведёт к снижению PG I. PG II синтезируется мукоидными клетками во всех отделах желудка и является показателем воспаления любой этиологии. PG II вырабатывается и при наличии метаплазии, которая часто сочетается с атрофией, при этом значения PG II остаются в пределах нормы, а уровень PG I снижается. Атрофический гастрит с поражением тела желудка будет сопровождаться низким соотношением PG I к PG II (далее PG I/II).

При наличии *H. pylori*-инфекции повышаются уровни PG I и PG II, уровень PG II повышается в большей степени (в 2 и более раз), чем уровень PG I. У пациентов с успешной эрадикацией *H. pylori* PG II возвращается к референсному уровню через два месяца после лечения. За повышенными значениями PG II часто скрываются предопухолевые процессы, что требует назначения дополнительного инструментального обследования пациентов [10].

PG не используются для диагностики *H. pylori*. По рекомендациям Киотского консенсуса у пациентов с нормальными PG независимо от статуса *H. pylori* очень низкие показатели ежегодного прогрессирования рака

Таблица 2

Лабораторная характеристика *H. pylori* – статуса пациентов

Показатели	Критерий интерпретации*	Здоровые (*n*=122)		Больные (*n*=1057)		*p*-значения
		Me	95%-й ДИ	Me	95%-й ДИ	
Ig G_{Hp}, EIU	<30	9,65	7,77-10,95	75,4	69,82-79,47	$p<0,0001$
PG I, мкг/л	30-160	83,75	79,37-89,26	95,6	92,33-98,84	$p=0,0009$
PG II, мкг/л	3-15	6,8	6,57-7,30	10,5	10,00-10,90	$p<0,0001$
Отношение PG I/PG II	3-20	12,18	11,48-13,01	8,63	8,28-9,01	$p<0,0001$
$G\text{-}17_{баз.}$, пмоль/л	1-7	2,45	2,10-2,70	4,1	3,40-4,80	$p=0,0083$
$G\text{-}17_{стим.}$, пмоль/л	3-30	13,8	9,66-16,55	9,4	7,20-11,61	$p=0,2548$

Примечание. * – референсные значения Biohit Oyj, Финляндия, PG I – пепсиноген I, PG II – пепсиноген II, G-17 – гастрин-17, баз. – базальный, стим. – стимулированный, IgG_{Hp} – антитела IgG к *H. pylori*.

желудка. При этом у лиц с низким уровнем пепсиногена в сыворотке крови, характерным для атрофического гастрита, ежегодное прогрессирование рака желудка существенно выше (3,5-6 на 1000 в год), особенно среди пациентов с IgG_{Hp}- [3].

Низкий уровень PG I отмечен у 92 (8%) больных, в то время как высокая кислотность установлена у 150 (14%) человек. У 169 (16%) больных нарушение продукции PG I сопровождалось наличием высокого уровня антител к *H. pylori*. Превышение верхней границы нормы PG II выявили у 329 (31%) больных. IgG_{Hp} статистически значимо влияет на изменение PG II (p<0,001; отношение шансов (OR)=7,32; 95%-й ДИ [5,13-10,44]).

PG I/II снижается при воспалении слизистой оболочки желудка. При диагностике гастрита перед эрадикационным лечением предложено несколько точек отсечения отношения PG I/II:

1. PG I/II≤5,0 (методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) или PG II≥10 нг/мл). Когда коэффициент до лечения PGI/II≤5,0, а после эрадикационного лечения PG I/II увеличивается ≥25% лечение считают успешным; если до лечения PG I /II≥5,0, то ≥10% увеличение оценивается как улучшение [4].

2. Пациенты с PG I сыворотки до лечения ≤70 нг/мл (мкг/л) и соотношением PG I/II≤3 (без ссылок на метод исследования) требуют регулярного эндоскопического наблюдения [3].

В нашем исследовании выявлены 275 (26%) больных с PG I сыворотки ≤70 мкг/л, отношение PG I/II≤3 у 84 (8%), у 36 из них (43% группы PG I/II≤3) отсутствовали антитела к *H. pylori*. Необходимо обратить внимание на важность учёта метода выполнения исследования PG при оценке полученных результатов. Так, при использовании точки отсечения для отношения PG I/II≤5, рекомендованной для метода CLIA, двукратно повышается количество подозрительных на наличие атрофии слизистой оболочки желудка лиц: 198 (19%), IgG_{Hp}- 56 из них (28% группы PG I/II≤5). Вероятно, определение порога принятия клинического решения как показания для эндоскопического исследования, является прерогативой не только клинических исследований и КР, но и принятой стратегией раннего выявления рака желудка.

В заявлении 9 Маастрихтского V/Флорентийского консенсуса «Лечение инфекции *Helicobacter pylori*» указано, что соотношение Pg I/II нельзя считать биомаркёром неоплазии желудка, а значение исследования PG ограничено для пациентов с атрофией антрального отдела желудка и определяется надёжностью определения точек отсечения, используемых для выявления атрофии. Там же указано, что исследуемая нами группа серологических тестов (Гастропанель, GastroPanel) предложена в качестве «серологической биопсии» у пациентов с диспепсией при низкой распространённости атрофического гастрита [5]. В нашем исследовании среди 376 пациентов (36%) с полной оценкой продукции G-17 признаки атрофии слизистой оболочки антрального отдела желудка присутствуют у 208 (20%) пациентов, чему в 126 (12%) случаях сопутствует высокий уровень IgG_{Hp}.

Для исключения влияния распространённости заболевания на положительные и отрицательные прогностические значения существует рекомендация по подтверждению результата вторым тестом с иным механизмом действия [7, 8].

В идеале, после установления этиологического фактора, необходимо выбрать схему лечения на основе чувствительности *H. pylori* к антибактериальным препаратам на изолятах, культивируемых из биоптатов желудка [3, 6]. *H. pylori* считается трудно культивируемым микроорганизмом, что осложняется недавним использованием ИПП, препаратов висмута или антибиотиков. В связи со сложностью, высокой стоимостью рутинное тестирование для первичной диагностики недоступно в некоторых странах и не рекомендовано [5, 6, 11]. В России к этим факторам присоединяются отсутствие спроса на эти исследования, несогласованность действий врачей-гастроэнтерологов и эндоскопистов, отсутствие/недоступность реагентов. Эмпирический выбор схемы лечения исключает возможность максимизировать вероятность успешной эрадикации.

Данные о чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам в Российской Федерации недостаточны. По данным оценки чувствительности 143 культур в 2015-2017 гг. онлайн платформы AMRmap для анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России [12], разработанной в НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России (Смоленск, Россия), чувствительность *Helicobacter* spp. к кларитромицину находится на высоком уровне (S: 93.7% , N=143; 95% ДИ [88.5-96.7]; I: 1.4% 95% ДИ [0.4-5.0]), устойчивость менее 15% (R: 4.9%, 95% ДИ [2.4-9.8]). Резистентность к метронидазолу составляет 23.8% (N_R= 143; 95% ДИ [17.5-31.4]) (рис. 1).

Чувствительность к кларитромицину *H. pylori* составляет 94% по критериям оценки чувствительности EUCAST (Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам, 2020 г.: 0,25 мг/л ≤S – R>0,5 мг/л), позволяющим единообразно интерпретировать результаты микробиологических исследований [13]. Доминируют штаммы с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) кларитромицина 0,016 мг/л (64%), это отличается от данных EUCAST [14], по которым показано нормальное распределение чувствительности на примере оценки 10 926 штаммов *H. pylori* (МИК 0,016 мг/л – 16%, 0,032 мг/л – 17%, 0,064 мг/л – 16%). Это позволяет предположить наличие терапевтических резервов для эмпирической терапии кларитромицином в РФ (рис. 2).

Предполагается, что уровень устойчивости к антибиотикам параллелен уровню потребления антибиотиков в популяции, это подтверждено недавним исследованием Европейской исследовательской группы *Helicobacter*, показывающим значительную связь между использованием макролидов длительного действия и устойчивостью к кларитромицину *H. pylori* [15]. Учёт производства и потребления противомикробных препаратов входит в Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г., утверждённую в 2017 г. (Стратегия -2030) [16]. Косвенно уровень потребления противомикробных препаратов можно оценить по уровню резистентности микроорганизмов других видов. По данным платформы AMRmap за период 2015-2018 гг. у амбулаторных пациентов 18-64 лет отмечена относительная чувствительность *Streptococcus spp*. к кларитромицину, устойчивость колеблется от 16.7% (N_R=29; 95% ДИ [11.9-22.9]) для *b*- гемолитических *Streptococcus spp.* (N_R= 174) до 22.3% (N_R= 29; 95% ДИ [16.0-30.2]) для *Streptococcus pneumoniae* (N= 130). Для *S. pneumoniae* характерно нарастание резистентности: в период 2006-2009 гг. для

DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-496-501

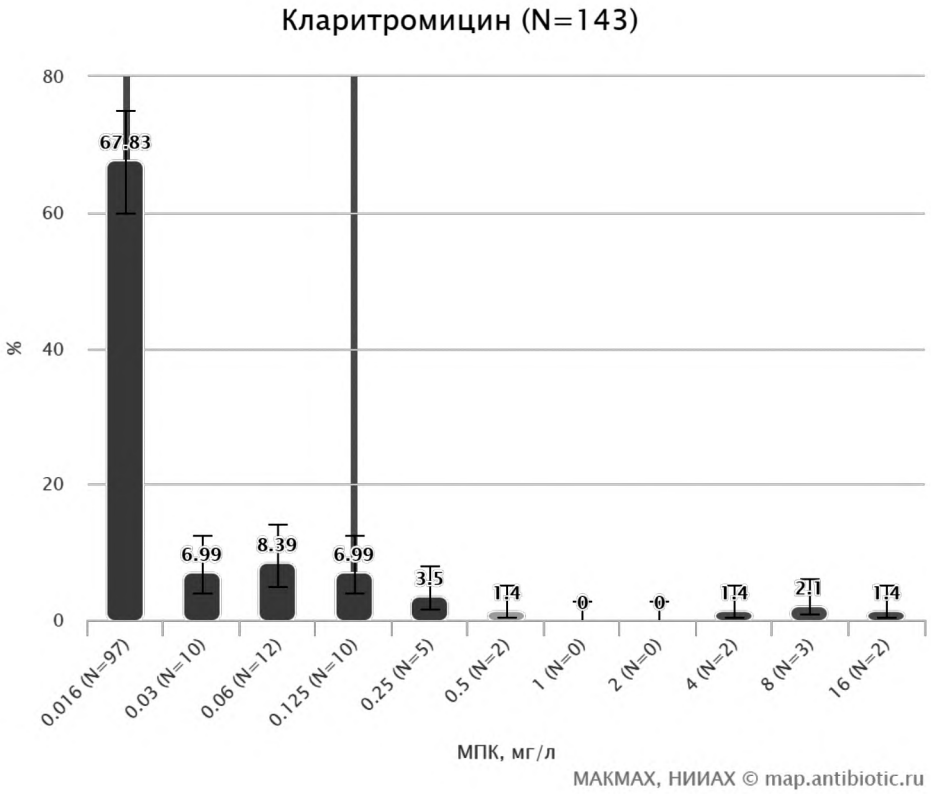


Рис. 1. Чувствительность *Helicobacter* spp. к кларитромицину и метронидазолу. Визуализация данных о чувствительности по состоянию на 03.12.2020, AMRmap http://www.amrmap.ru.

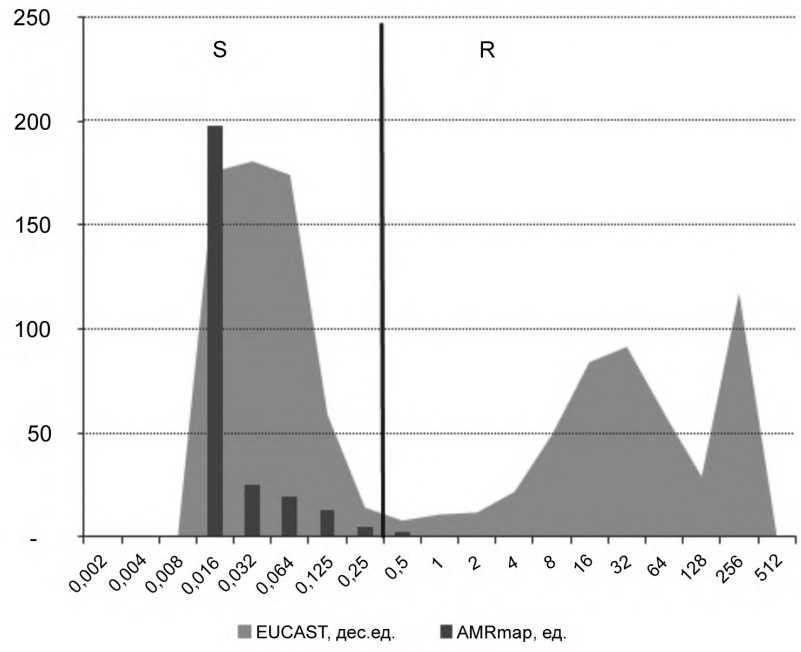


Рис. 2. Распределение МПК *H. pylori* к кларитромицину. Визуализация данных о чувствительности по состоянию на 11.07.2019 г., AMRmap http://www.amrmap.ru EUCAST http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/.

этих пациентов (N= 208) R: 10.6% N_R= 22; 95% ДИ [7.1-15.5]), в 2010-2014 гг. (N=130) R: 20.8% (N_R=22; 95% ДИ [14.1-29.4]). Это подтверждает факт нарастающей динамики внебольничного потребления макролидных антибиотиков, учитывая, что ведущими направлениями клинического использования макролидов, помимо лечения *H. pylori*, являются внебольничные респираторные инфекции, вызванные грамположительными бактериями и атипичными возбудителями, урогенитальные инфекции.

Несмотря на низкий уровень резистентности *H. pylori* к кларитромицину, который относит их к восприимчивым к данному препарату микроорганизмам (0-10% резистентных [5]), необходимо более широкое применение культурального метода и формирование локальных баз с актуальными данными о резистентности *H. pylori*. Эти источники должны использоваться для разработки рекомендаций по лечению и являются мерой по ограничению распространения и циркуляции возбудителей с антимикробной резистентностью в соответствии со Стратегией 2030 [16].

Учитывая, что *H. pylori* инфекция, как правило, приобретается в детстве и длительно персистирует во взрослом возрасте, необходимо определить показания для проведения срочной терапии [7]. Для большей части пациентов показана плановая диагностика, включающая отказ от ИПП, препаратов висмута и антибиотиков не менее, чем за 2-4 недели до исследований [7, 9]. Данные препараты снижают антигенную нагрузку, что влияет на диагностическую точность всех инвазивных тестов (гистологических, культуральных, уреазного теста) и некоторых неинвазивных тестов (дыхательный тест с мочевиной,

меченной^{13}C, определение антигена *H. pylori* в кале). С точки зрения управления лабораторными назначениями для скрининга целесообразно использовать диагностический алгоритм, включающий определение PG I и отношения PG I/II – для определения лиц высокого риска атрофического гастрита; и для диагностики инфекции *H. pylori* один из двух тестов: дыхательный тест с мочевиной, меченной ^{13}C, или определение антигена *H. pylori* в кале. Пациентам, которым показано эндоскопическое исследование (клинические данные, PG I≤70 нг/мл (мкг/л), PG I/II≤3), проводится культуральное исследование. Прочим пациентам – второй тест для подтверждения *H. pylori* инфекции.

Заключение. При формировании лабораторных модулей в клинических рекомендациях необходимо проводить междисциплинарный диалог для ранжирования информативности различных лабораторных технологий и её коррекции по результатам мета-анализов.

Целесообразно включить определение чувствительности *H. pylori* к противомикробным препаратам в программы антибактериального надзора для формирования иерархии рекомендаций по применению антибиотиков первой линии терапии и препаратов выбора при наличии нескольких вариантов лечения амбулаторных инфекций [17].

С экономической точки зрения целесообразна централизация данного исследования, учитывая особенности культивирования этой бактерии и постановки антибиотикограммы.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 11, 13-15, 17 см. REFERENCES)

8. Лазебник Л.Б., Ткаченко Е.И., Абдулганиева Д.И., Абдулхаков Р.А., Абдулхаков С.Р., Авалуева Е.Б. и др. VI национальные рекомендации по диагностике и лечению кислотозависимых и ассоциированных с *Helicobacter pylori* заболеваний (VI московские соглашения). *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017; 138 (2): 3–21.
9. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л., Шептулин А.А., Трухманов А.С., Баранская Е.К. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2018; 28(1): 55-70.
10. Клиническая лабораторная диагностика в комплексной оценке состояния здоровья специалистов опасных профессий (коллективная монография). Алексанин С.С., Калинина Н.М., ред. СПб: Политехника-сервис; 2009.
12. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Денич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(2): 84-90.
16. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Москва: Правительство Российской Федерации. Распоряжение от 25 сентября 2017 г. № 2045-р; 2017;1-14. http://static.government.ru/media/files/onJ3GY3ObDGqLDvrED7AhpLF3ywRRFpp.pdf [В Интернете] 14.07.2019.

REFERENCES

1. World Cancer Research Fund International. Stomach cancer statistics, 2016. http://www. wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/stomach-cancer-statistics. [In Internet] 14.07.2019.
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C. et al.. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. http://globocan.iarc.fr. [In Internet] 06.07.2019.
3. Sugano K., Tack J., Kuipers E. J., Graham D. Y., El-Omar E. M., Miura S. et al. Kyoto global consensus report on *Helicbacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015;64: 1353-67. https://doi: 10.1136/gutjnl-2015-309252.
4. Kato M., Ota H., Okuda M., Kikuchi S., Satoh K., Shimoyama T.et al. Japanese Society for *Helicobacter* Research. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan. 2016 ed, revised. *Helicobacter*. 2019; 24: e12597. https://doi.org/10.1111/hel.12597.
5. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017; 66:6–30. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288.
6. Chey W.D., Leontiadis G.I., Howden C.W., Moss S.F. ACG Clinical Guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol*. 2017;112: 212–39. https://doi.org/10.1038/ajg.2016.563.
7. El-Serag H.B., Kao J. Y., Kanwal F., Gilger M., Vecchio F.L., Moss S.F. et al. Houston Consensus Conference on Testing for *Helicobacter pylori* Infection in the United States. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018; 16: 992-1002. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.03.013.
8. Lazebnik L.B., Tkachenko E.I., Abdulganieva D.I., Abdulhakov R.A., Abdulhakov S.R., Avalueva E.B. et al. VI vi national guidelines for the diagnosis and treatment of acid-related and *Helicobacter pylori* -associated diseases (VI Moscow agreement). *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2017; 138 (2): 3-21. (in Russian)
9. Ivashkin V.T., Mayev I. V., Lapina T. L., Sheptulin A.A., Trukhmanov A.S., Baranskaya E.K. et al. Diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults: Clinical guidelines of the Russian gastroenterological association. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2018; 28(1): 55-70. https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-1-55-70. (in Russian)
10. Clinical laboratory diagnostics in a comprehensive assessment of the health status of specialists in dangerous professions (collective monograph). Aleksanin S. S., Kalinina N. M., ed. Saint Petersburg: Politechnika-service; 2009. (in Russian) [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika v kompleksnoy otsenke sostoyaniya zdorov'ya specialistov opasnykh professiy (kollektivnaya monografiya). Aleksanin S.S., Kalinina N.M., eds. St.Petersburg: Politekhnika-servis; 2009. (in Russian)]
11. Kim S. G., Jung H. K., Lee H. L., Jang J. Y., Lee H., Kim C. G.et al. Korean College of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research. Guidelines for the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Korea, 2013 revised ed. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2014;29(7): 1371-86. https://doi.org/10.1111/jgh.12607.
12. Kuz'menkov A. YU., Trushin I. V., Avramenko A. A., Ejdel'shtejn M. V., Dekhnich A. V., Kozlov R. S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2017; 19(2): 84-90. (in Russian)
13. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (1 Jan, 2020) 2016; Version 10.0. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf. [В Интернете] 14.09.2020.
14. EUCAST. MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=-performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=241. [В Интернете] 14.07.2019.
15. Megraud F., Coenen S., Versporten A., Kist M., Lopez-Brea M., Hirschl A. M. et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut.* 2012; 62(1): 34-42. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302254.
16. Strategy for preventing the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030. Moscow: Government of the Russian Federation. Order No. 2045-r of September 25, 2017. 2017; 1-14. (in Russian) http://static.government.ru/media/files/onJ3GY3ObDGqLDvrED7AhpLF3ywRRFpp.pdf [In Internet] 14.07.2019.
17. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Antibiotic stewardship statement for antibiotic guidelines – the recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), 2016. https://www.cdc.gov/hicpac/pdf/Antibiotic-Stewardship-Statement.pdf [In Internet] 14.07.2019.

Поступила 12.01.21
Принята к печати 12.04.21

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2021; 66(8)
DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-502-508

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мангутов Э.О., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л.

CORYNEBACTERIUM SPP. – ПРОБЛЕМНЫЕ ПАТОГЕНЫ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344029, Ростов-на-Дону, Россия

Corynebacterium spp. – представители нормальной микрофлоры организма человека, однако известна их роль в развитии заболеваний, как у иммунокомпрометированных, так и иммунокомпетентных пациентов. Corynebacterim spp. (C. pseudodiphtheriticum, C. striatum, C. amycolatum, C. accolens, C. argentoratense, и др.) связывают с заболеваниями респираторного тракта: трахеитом, фарингитом, риносинуситом, бронхитом и др. Они могут передаваться воздушно-капельным, контактно-бытовым и, возможно, гематогенным путём. Corynebacterim spp. токсины не продуцируют, но способны к адгезии и инвазии, биопленкообразованию, продукции нейраминидазы, гиалуронидазы, гемолизина. Следует учитывать не столько видовую, сколько штаммовую принадлежность изолятов Corynebacterium spp., так как среди представителей одного вида недифтерийных коринебактерий (например, C. pseudodiphtheriticum), колонизирующих респираторный тракт, могут присутствовать штаммы, способные проявлять не только патогенные свойства, но и пробиотическую активность. Микробиологическая диагностика основана на их количественном определении в биологическом материале, фенотипических (культуральное исследование, тест-системы для биохимической идентификации, автоматизированные системы Vitek 2) и генотипических (секвенирование генов 16SpPHK и rpoB) методах. Возможно использование масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF-MS). Наибольшую активность в отношении Corynebacterium spp. при исследовании in vitro сохраняют ванкомицин, тейкопланин, линезолид. Сообщается об успешной терапии с использованием, по крайней мере, двух из следующих антимикробных препаратов (АМП): ванкомицин, рифампицин, линезолид, даптомицин. Чувствительность изолятов Corynebacterium spp. к АМП связана не с видовой принадлежностью, а обусловлена штаммовыми различиями, в связи с чем нужно тестировать каждый выделяемый штамм. Необходим постоянный мониторинг чувствительности штаммов Corynebacterium spp. к АМП ввиду наблюдаемой вариабельности этих признаков. Особую важность имеет выявление изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, расцениваемых в настоящее время как высоко патогенные. При составлении обзора использованы базы данных РИНЦ, CyberLeninka, Scopus, Web of Science, The Cochrane Library.

Ключевые слова: *обзор; Corynebacterim spp.; респираторный тракт; факторы патогенности; биопленкообразование; микробиологическая диагностика; антибиотикочувствительность.*

Для цитирования: Мангутов Э.О., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л. *Corynebacterium* spp. – проблемные патогены респираторного тракта человека (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66(8): 502-508.
DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-502-508

Mangutov E. O., Kharseeva G. G., Alutina E. L.

CORYNEBACTERIUM SPP. – PROBLEMATIC PATHOGENS OF THE HUMAN RESPIRATORY TRACT (REVIEW OF LITERATURE)

Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 29, 344022, Rostov-on-Don, Russia

Corynebacterium spp. – representatives of the normal microflora of the human body, but their role in the development of diseases in both immunocompromised and immunocompetent patients is known. Corynebacterim spp. (C. pseudodiphtheriticum, C. striatum, C. amycolatum, C. accolens, C. argentoratense, etc.) is associated with diseases of the respiratory tract: tracheitis, pharyngitis, rhinosinusitis, bronchitis, etc. They can be transmitted by airborne droplets, household contact, and possibly by hematogenic pathways. Corynebacterim spp. toxins do not produce, but are capable of adhesion and invasion, biofilm formation, production of neuraminidase, hyaluronidase, and hemolysin. It is necessary to take into account not so much the species, but the strain affiliation of isolates of Corynebacterium spp., since among the representatives of one species of non-diphtheria corynebacteria (for example, C. pseudodiphtheriticum), colonizing the respiratory tract, there may be strains that can exhibit not only pathogenic properties, but also probiotic activity. Microbiological diagnostics is based on their quantitative determination in biological material, phenotypic (culture study, test systems for biochemical identification, Vitek 2 automated systems) and genotypic (16SpRNA gene sequencing and rpoB) methods. It is possible to use mass spectrometric analysis (MALDI-ToF-MS). The greatest activity against Corynebacterium spp. in vitro studies preserve vancomycin, teicoplanin, and linezolid. Successful therapy with at least two of the following antimicrobial agents (AMP) has been reported: vancomycin, rifampicin, linezolid, and daptomycin. The sensitivity of isolates of Corynebacterium spp. to AMP is not related to the species, but is due to strain differences, and therefore it is necessary to test each isolated strain. Continuous monitoring of the sensitivity of Corynebacterium spp. strains to AMP is necessary due to the observed variability of these traits. Of particular importance is the identification of multidrug-resistant isolates that are currently considered highly pathogenic. When compiling the review, the databases Scopus, Web of Science, The Cochrane Library, CyberLeninka, RSCI were used.

Key words: *review; Corynebacterim spp.; respiratory tract; pathogenicity factors; biofilm formation; microbiological diagnostics; antibiotic sensitivity.*

For citation: Mangutov E.O., Kharseeva G.G., Alutina E.L. *Corynebacterium spp*. – problematic pathogens of the human respiratory tract (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(8): 502-508 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-502-508

Для корреспонденции: *Харсеева Галина Георгиевна*, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

For correspondence: *Kharseeva Galina Georgievna*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department for Microbiology & Virusology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Mangutov E. O., http://orcid.org/0000-0001-6959-2540;
Kharseeva G. G., http://orcid.org/0000-0002-6226-2183;
Alutina E. L., http://orcid.org/0000-0001-6968-0583.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 11.05.2021
Accepted 20.05.2021

Род *Corynebacterium*, относящийся к классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales,* семейству *Corynebacteriaceae* (Lehmann K. B., Neumann R. O., 1896), насчитывает более 132 видов и 11 подвидов, 53 из которых имеют медицинское, ветеринарное и биотехнологическое значение [1, 2]. *Corynebacterium* spp. – представители нормальной микрофлоры организма человека. Однако известна их роль в развитии заболеваний, в том числе, респираторного тракта, как у иммунокомпрометированных, так и иммунокомпетентных пациентов. Недостаточность врождённого иммунитета, хроническая патология, социальные и другие условия способствуют активации факторов патогенности недифтерийных коринебактерий, что ведёт к развитию патологических процессов. Инфекции, вызываемые *Corynebacterium* spp., не контролируются средствами массовой вакцинации, проводимой препаратами дифтерийного анатоксина, поэтому к ним следует относиться с настороженностью.

Роль в патологии. *C. pseudodiphtheriticum*, близкородственный ему вид *C. propinquum, C. striatum, C. amycolatum, C. accolens, C. argentoratense, C. tuberculostearicum* и др. связывают с заболеваниями респираторного тракта: трахеитом, фарингитом, риносинуситом, бронхитом, пневмонией, обострением бронхоэктатической болезни, хронической обструктивной болезнью лёгких, абсцессами лёгких, муковисцидозом [3-5]. Инфекции, связанные с *Corynebacterium* spp., не ограничиваются дыхательными путями, и могут вызывать развитие эндокардита, кератита, патологии мочевыводящих путей, суставов, кожи [6-10]. Известна роль *Corynebacterium* spp. в развитии оппортунистических инфекций и инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), которые чаще регистрируются у детей и пожилых людей [11-13]. *C. pseudodiphtheriticum* часто вызывает инфекционный процесс у лиц с хроническими заболеваниями лёгких, артериальной гипертензией, дислипидемией, у пациентов после инвазивных манипуляций [12]. Среди лиц, инфицированных *C. pseudodiphtheriticum* и имеющих клинические проявления респираторной патологии, зарегистрировано 14% смертельных случаев [12]. Известны случаи дифтериеподобных заболеваний у полностью иммунизированных лиц, сопровождающиеся развитием экссудативного фарингита с имитацией дифтерийной псевдомембраны и выделением из дыхательных путей *C. pseudodiphtheriticum* [14, 15]. *C. striatum*, обладая множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), может вызывать вспышки ИСМП, поражая респираторный тракт [16]. Штаммы *C. striatum* выделяют в отделениях реанимации и интенсивной терапии, хирургических отделениях, главным образом, из аспиратов трахеи пациентов после проведения процедуры эндотрахеальной интубации и бронхоскопии [17-19] Эти штаммы, в основном, обладают МЛУ и выделяются от взрослых с иммунодефицитными состояниями в возрасте старше 50 лет [3].

Эпидемиология. *Corynebacterium* spp., являющиеся возбудителями нозокомиальных инфекций, изолируют из больничной среды: воздух, абиотические поверхности в непосредственной близости от пациента, приборы для проведения инвазивных медицинских процедур, руки медицинского персонала [20-22]. *Corynebaterium* spp. часто выделяют с поверхности металлических стентов, используемых при бронхоскопическом исследовании, в том числе, и в составе биоплёнки, что существенно затрудняет борьбу с ними [7]. Недифтерийные коринебактерии могут передаваться воздушно-капельным, контактно-бытовым путём, предполагается возможность их гематогенного распространения в организме [12].

Факторы патогенности. *Corynebacterium* spp., выделяемые от пациентов с заболеваниями респираторного тракта, не продуцируют дифтерийный и PLD-экзотоксины, что указывает на ведущую роль в развитии патологического процесса иных факторов патогенности, помимо токсинов. В качестве основных параметров патогенности целесообразным является характеристика адгезии, инвазии, цитотоксичности недифтерийных коринебактерий [21]. Необходимо обращать внимание на их способность формировать биоплёнку, что особенно важно для штаммов, выделяемых при развитии нозокомиальных инфекций. Следует учитывать не столько видовую, сколько штаммовую принадлежность изолятов *Corynebacterium* spp. Это обусловлено тем, что среди представителей одного вида недифтерийных коринебактерий (например, *C. pseudodiphtheriticum*), колонизирующих респираторный тракт, могут присутствовать штаммы, способные проявлять не только патогенные свойства, но и пробиотическую активность [22].

На начальных этапах развития инфекционного процесса патогенный потенциал *Corynebacterium* spp. реализуется за счёт адгезии на эпителиальных клетках и их колонизации [23]. Адгезия коринебактерий осуществляется с помощью поверхностных структур бактериальной клетки (белки DIP1281, PS2, 67-72p**),** компонентов клеточной стенки (корд-фактор, арабиногалактан, липоманнан, липоарабиноманнан), ключевая роль в которой принадлежит пилям [24]. Наличие у коринебактерий пилей различного типа (SpaA, SpaB, SpaC и др.) обусловливает их тропизм к соответствующим рецепторам тканей организма, в частности, SpaA-пили способствуют адгезии коринебактерий на клетках фарингеального эпителия [25, 26]. Для *C. pseudodiphtheriticum* характерен агрегированный характер прикрепления с последующей пенетрацией в эпителиальные клетки Hep-2 [22]. Адгезии коринебактерий к эпителиальным клеткам способству-

ют ферменты нейраминидаза и гиалуронидаза. Они нарушают структуру и функции цитоплазматической мембраны, что облегчает инвазию коринебактерий в ткани организма [22]. У штаммов *C. pseudodiphtheriticum* выявлены гены, кодирующие предполагаемый гемолизин [26]. Уреаза, продуцируемая некоторыми представителями *Corynebacterium* spp., обеспечивает прямой токсический эффект на клетки человека и подавляет клеточное дыхание, расщепляя мочевину с образованием аммиака и углекислоты.

Поверхностные белки 67-72p и DIP1281 обусловливают, помимо адгезивных, и инвазивные свойства коринебактерий [24]. Ряд штаммов *C. pseudodiphtheriticum* способны к внутриклеточной персистенции в клетках карциномы фарингеального эпителия Hep-2 в течение 24 ч после инфицирования, что, возможно, позволяет им избежать действия эффекторов врождённого иммунитета [24]. Важную роль в инвазии и внутриклеточном выживании коринебактерий играет их клеточная стенка, в состав которой входят миколовые кислоты, арабиногалактан, корд-фактор, обусловливающие незавершённость процессов фагоцитоза, разрушение митохондрий, угнетение тканевого дыхания [25]. Патогенные виды коринебактерий (*C. diphtheriae, C. ulcerans*) способны не только к адгезии, но и к инвазии и сохранению в макрофагах после поглощения [27]. Предполагают, что выживание этих видов коринебактерий в макрофагах и последующий их некротический лизис могут способствовать распространению возбудителя инфекции в организме хозяина и поддерживать колонизацию тканей [27].

Составные элементы слоя миколовых кислот, входящих в состав корд-фактора, могут активировать врождённый иммунитет, способствуя экспрессии TLR, и ингибировать функцию макрофагов [28]. *C. pseudodiphtheriticum* способствует повышенной экспрессии TLR_1, TLR_2, TLR_3, сопровождающейся увеличением содержания IL-6 и IL-1β, синтезом антимикробных пептидов S100A8, S100A9 и β-дефензина 1 [10, 29]. Антимикробные пептиды обладают иммуномодулирующим и противомикробным действием, предотвращающим внутриклеточную инвазию бактерий. Такая реакция врождённого иммунитета позволяет сдерживать патогенное воздействие *C. pseudodiphtheriticum* на организм человека, ограничивая её комменсализмом [29].

Липофильность и гидрофобность некоторых видов коринебактерий способствуют адгезии и обеспечивают формирование биоплёнки, особенно в условиях развития инфекции при дефиците железа [30-31]. Патогенные свойства нозокомиальных штаммов *C. striatum*, изолированных от пациентов после проведения процедуры эндотрахеальной интубации и катетеризации, а также выделенных из кровотока, связывают с их способностью образовывать биоплёнку [3]. У нозокомиальных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. striatum* обнаружена выраженная способность к образованию биоплёнки на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях, особенно в присутствии фибриногена и фибронектина человека [32]. Штаммы коринебактерий с МЛУ отличаются выраженной биоплёнкообразующей активностью, что, способствует распространению устойчивости к АМП в условиях стационара [3]. Способность коринебактерий к биоплёнкообразованию определяется не видовой, а штаммовой принадлежностью в соответствии с их сиквенс-типом (ST) [32-33].

Микробиологическая диагностика. Ввиду принадлежности *Corynebaterium* spp. к представителям нормальной микрофлоры человека, микробиологической диагностике инфекций, вызываемых этими микроорганизмами, не уделяется должного внимания. Накапливается всё больше данных о роли *Corynebaterium* spp. в патологии. Это указывает на значимость и целесообразность проведения микробиологической диагностики инфекций, связанных с ними. Для установления клинической значимости изолятов *Corynebacterium* spp. в патологии респираторного тракта большое значение имеет определение их количества (более 10^6 КОЕ/мл) в правильно собранном клиническом материале (мокрота, промывные воды бронхов) [7, 34]. Выделение *Corynebacterium* spp. как преобладающих микроорганизмов в биологическом материале из дыхательных путей, может быть связано с активным инфекционным процессом и не должно игнорироваться при проведении культурального исследования [7]. Коринебактерии, идентифицированные в клинических образцах из обычно стерильных локусов, или изолированные из нескольких образцов биологического материала, должны быть идентифицированы до вида [1].

Фенотипическая идентификация недифтерийных коринебактерий может проводиться культуральным методом с использованием тест-систем для биохимической идентификации: API Coryne (BioMerieux, Франция), RapID CB Plus (Remel/ThermoFisher Scientific, США), система BBL Crystal Gram Positive ID (Becton Dikinson, США) и других и автоматизированных систем Vitek 2 [1]. При выделении этих комменсальных микроорганизмов из респираторного тракта и других биотопов человека возникают определённые трудности. Это обусловлено вариабельностью фенотипа *Corynebacterium* spp., связанной, в том числе, и с применением АМП, требовательностью к условиям культивирования и возможностью подавления их роста другими микроорганизмами (*P. aeruginosa, S. aureus, H. influenzae* и др.) [13]. Виды *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum* являются морфологически схожими и почти не отличаются по биохимической активности, но вид *C. pseudodiphtheriticum* описан как уреазаположительный, а *C. propinquum* – уреазаотрицательный [35]. Ряд штаммов *C. propinquum* могут быть уреазаположительными. Идентификация *C. striatum* культуральным методом сложна, поскольку её колонии похожи на колонии коагулазонегативных стафилококков [36]. Тест-системы для биохимической идентификации коринебактерий содержат ограниченный перечень субстратов, позволяющих провести корректную видовую идентификацию, и обновляются редко [1]. Это осложняет идентификацию близкородственных, метаболически неактивных и медленно растущих видов коринебактерий, например, *C. amycolatum* и *C. xerosis* [37]. Сложной является дифференциация колонизации и инфекции, обусловленной недифтерийными коринебактериями [12, 38, 39].

Ввиду ненадёжности выделения и идентификации *Corynebacterium* spp. фенотипическими методами, целесообразно использование молекулярно-генетических методов исследования (секвенирование генов 16S рРНК и *rpoB*).

Секвенирование генов 16S рРНК позволяет выявить различия в последовательностях генов у большинства видов рода *Corynebacterium*, отличающихся на 1,3% или с большей дисперсией (при сравнении последова-

тельности всего гена), а также величину критерия идентичности >98,7% для представителей одного вида [40]. Некоторые виды рода *Corynebacterium* отличаются друг от друга с уровнем дисперсии ≤2%: *C. propinquum* и *C. pseudodiphtheriticum*; *C. xerosis, C. freneyi* и *C. hansenii*; *C. macginleyi* и *C. accolens* и др. [41]. Высокий внутривидовой полиморфизм генов 16S рРНК также затрудняет идентификацию [37, 41].

Более точная идентификация различных видов недифтерийных коринебактерий, в том числе, и близкородственных, может быть проведена секвенированием гена *rpoB* в том случае, когда секвенирование генов 16S рРНК даёт неоднозначные результаты. При идентификации близкородственных видов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*, имеющих более чем 99%-е сходство последовательностей геномов, идентификацию можно проводить только путём полного или частичного секвенирования гена *rpoB* («золотой стандарт» диагностики), но не риботипированием по 16S рРНК [35]. Целесообразно идентифицировать *C. striatum* с использованием генотипических методов (секвенирование генов 16S рРНК и *rpoB*), которые позволяют выявить гены вирулентности и резистентности, преобладающие эпидемически успешные клоны, распространяющиеся в больничной среде [36].

Для быстрой идентификации *Corynebacterium* spp. можно использовать масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), позволяющий определить специфический масс-спектр рибосомальных белков для каждого вида [41-43] с помощью коммерческих систем Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) и VITEK® MS (bioMerieux) [13, 41, 43, 44]. При сравнении результатов видовой идентификации недифтерийных коринебактерий масс-спектрометрическим методом с «золотым стандартом» (секвенирование генов 16S рРНК), 57-87% изолятов определялись точно. Исключение составили *C. aurimucosum, C. pseudodiphtheriticum*, которые MALDI-ToF MS определил как генетически близкородственные виды *C. minutissimum* и *C. propinquum* соответственно [43]. Большинство из указанных штаммов (около 70%) имели при MALDI-ToF MS индекс Score ≥2,0 [42]. Данный подход имеет и недостатки: определение только известных видов коринебактерий, невозможность дифференциации близкородственных видов (например, *C. propinquum* и *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum* и *C. minutissimum*), необходимость подтверждения полученных результатов основными фенотипическими и биохимическими характеристиками исследуемых видов и др. [41, 43-45]. Метод MALDI-ToF MS может дополнять фенотипические методы идентификации коринебактерий, введённые в базу данных, но требует дальнейшего пополнения библиотеки масс-спектров для определения более широкого разнообразия видов рода *Corynebacterium*.

Для проведения идентификации *Corynebacterium* spp. необходим комплексный подход, основывающийся на фенотипической и генотипической информации.

Чувствительность к антимикробным препаратам (АМП). До недавнего времени для *Corynebacterium* spp. отсутствовала ясность в понимании вопроса о критериях оценки их антибиотикочувствительности. Полагали, что следует сравнивать результаты определения их чувствительности к АМП с аналогичными данными для грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки). Считалось также, что следует принимать во внимание только случаи полной антибиотикорезистентности, выявляемые с помощью диско-диффузионного метода и характеризующиеся полным отсутствием какой-либо зоны задержки роста. В настоящее время для коринебактерий определены критерии оценки чувствительности к пенициллинам (бензилпенициллин), фторхинолонам (ципрофлоксацин, моксифлоксацин), аминогликозидам (гентамицин), гликопептидам (ванкомицин), макролидам, линкозамидам (эритромицин, клиндамицин), тетрациклинам (тетрациклин), оксазолидинонам (линкозамид), рифампицину (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2020. Доступно на: http://antibiotics.ru/iacmac/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf).

Определение чувствительности к АМП рекомендуется проводить диско-диффузионным методом (по пограничным значениям диаметров зон подавления роста) и методом серийных разведений (по пограничным значения минимальной подавляющей концентрации антибиотика) (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2020. Доступно на: http://antibiotics.ru/iacmac/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf).

Идентифицированы виды недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum, C. propinqqum, C. striatum, C. minutissimum, C. amycolatum, C. jeikeium* и др.), обладающие природной и/или приобретённой устойчивостью к АМП [11, 46-48]. Механизмы устойчивости к АМП, становятся все более понятными. Резистентность может быть природной или приобретённой. Приобретённая резистентность бактерий может быть генетически детерминирована (мутации, горизонтальный перенос генов резистентности в биоплёнке), а также обусловлена регуляцией экспрессии генов, приводящей к активации (эффлюкс) или угнетению (проницаемость) механизмов взаимодействия АМП с клеткой [49-51]. Механизмы приобретённой резистентности бактерий заключаются в исчезновении мишени для АМП, продукции ферментов, инактивирующих АМП, снижении проницаемости, гиперфункции эффлюкс-помп [52]. Распространение штаммов *Corynebacterium* spp. с МЛУ обусловлено как передачей генов резистентности от других видов микроорганизмов, так и географическим регионом [1, 52]. Под воздействием АМП и дезинфицирующих веществ метаболизм у бактерий приостанавливается, вследствие чего они выживают, но не размножаются. У бактерий с пониженным и/или приостановленным метаболизмом может изменяться морфологическое строение, химический состав [49] и, возможно, патогенные свойства.

Некоторые механизмы устойчивости к АМП, в частности, фторхинолонам, у *Corynebacterium* spp. связаны со спонтанными мутациями в гене, кодирующем субъединицу А фермента гиразы в штаммах *C. amycolatum* и типом заменяемой аминокислоты. Комбинации аминокислот Val/Asn и Tyr/Asp в положениях 87 и 91 области QRDR *gyrA*-гене соответственно, придают устойчивость к ципрофлоксацину и моксифлоксацину [3]. Ген *ermX* (метилирование рибосомы эритромицином), кодирующий фермент метилазу рРНК, ведёт к сочетанной устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограминам В. Ген *ermX* обнаружен на хромосомах, плазмидах, транспозонах коринебактерий. Ген *ermX* может участвовать в фенотипе устойчивости к клиндамицину, эритромицину

[3]. У штаммов *C. striatum*, характеризующихся МЛУ к АМП, выявлены гены резистентности: *erm(X)*, кодирующий резистентность к эритромицину, клиндамицину; *tetA* и *tetB*, кодирующие резистентность к тетрациклину, окситетрациклину, оксациллину; *cmx* и *aphA1*, кодирующие резистентность к аминогликозидам, хлорамфениколу [53]. Ген *cmx* обнаружен в транспозонах, плазмидах, геномах различных видов *Corynebacterium* spp., в частности, у штаммов, устойчивых к хлорамфениколу [54]. Штаммы *C. striatum* устойчивы к аминогликозидам. Устойчивость к аминогликозидам обусловлена ферментами, модифицирующими аминогликозиды: aac (ацил-коферментА-зависимая ацетилтрансфераза), ant (нуклеозидтрифосфат-зависимая нуклеотидилтрансфераза), aph (нуклеозид-зависимая фосфотрансфераза). Эти ферменты часто распространяются генами мобильных генетических элементов. Многие аминогликозиды могут быть инактивированы более чем одним ферментом.

В последние годы наблюдают увеличение частоты приобретённой устойчивости *Corynebacterium* spp. к β-лактамным АМП, клиндамицину, эритромицину, ципрофлоксацину, гентамицину. Изоляты *C. pseudodiphtheriticum* обладают, как правило, чувствительностью к b-лактамным АМП (пенициллину), поскольку не продуцируют фермент b-лактамазу. У некоторых штаммов *C. pseudodiphtheriticum* выявлена резистентность к макролидам, клиндамицину, хлорамфениколу, цефтриаксону, цефотаксиму, цефокситину, цефтазидиму, имипенему, котримоксазолу [54, 55]. Имеются данные, что предшествующее лечение пациентов АМП, по-видимому, даже способствует колонизации *C. pseudodiphtheriticum* их организма [5, 55–57].

Штаммы *C. striatum*, как правило, обладающие МЛУ, выделяют наиболее часто из респираторного тракта от пациентов с внебольничными и внутрибольничными инфекциями. Изоляты *C. striatum* чувствительны к даптомицину, но имеются данные о формировании устойчивости к этому АМП у штаммов, выделенных от пациентов с инвазивными инфекциями. Выявленная, быстро сформированная устойчивость к даптомицину у некоторых штаммов *C. striatum* подчеркивает важность постоянного мониторинга чувствительности к АМП *Corynebacterium* spp. [58]. Выявлена устойчивость к имипенему у изолятов *C. striatum* в Японии, Испании, Италии [3]. В Японии штаммы *C. striatum* имели высокий уровень резистентности к эритромицину, тетрациклину, рифампицину, ципрофлоксацину на фоне 100%-ной чувствительности к ванкомицину и вариабельной чувствительности к β-лактамным АМП и аминогликозидам [3]. В Испании все штаммы *C. striatum*, выделенные при нозокомиальных вспышках, показали устойчивость к трём или более АМП разных классов и обладали МЛУ к АМП. 65% этих штаммов были устойчивы к четырём или пяти классам АМП; 6,9% чувствительны только к имипенему и ванкомицину, 11% – только к ванкомицину [47]. Следует уделять особое внимание штаммам *Corynebacterium* spp. с МЛУ, поскольку такие штаммы в настоящее время расцениваются как высоко патогенные и, в соответствии с этим, работать с ними рекомендовано в условиях оснащения бактериологической лаборатории III-IV класса опасности [СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней, а также к организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»].

Наибольшую активность в отношении *Corynebacterium* spp. при исследовании *in vitro* сохраняют ванкомицин, тейкопланин, линезолид [48, 59]. У штаммов *C. pseudodiphtheriticum* обнаружена чувствительность к аминогликозидам, ванкомицину, рифампицину, гентамицину, доксициклину. В соответствии с этим в большинстве случаев лечение только пенициллином или в сочетании с аминогликозидами является успешным. Чувствительность штаммов *C. pseudodiphtheriticum* к ципрофлоксацину, линкомицину, клиндамицину, тетрациклину вариабельна [3]. Штаммы *C. striatum* с МЛУ остаются одинаково чувствительными к ванкомицину, тейкопланину, линезолиду [53]. При инфекции, обусловленной *C. striatum*, следует проводить эмпирическое лечение ванкомицином и линезолидом из-за низкой чувствительности к другим АМП [3]. Сообщается об успешной терапии с использованием, по крайней мере, двух из следующих АМП: ванкомицин, рифампицин, линезолид, даптомицин [3].

Чувствительность изолятов *Corynebacterium* spp. к АМП связана не с видовой принадлежностью, а обусловлена штаммовыми различиями, в связи с чем нужно тестировать каждый выделяемый штамм [36]. Необходим постоянный мониторинг чувствительности штаммов *Corynebacterium* spp. к АМП ввиду наблюдаемой вариабельности этих признаков. Особую важность имеет выявление изолятов с МЛУ, расцениваемых в настоящее время как высоко патогенные.

Финансирование. *Исследование проводилось за счет средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркеры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта».*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-29, 31-42, 44-48, 50-59 см. REFERENCES)

30. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Железо и микроорганизмы. Ханты-Мансийск: ООО «Печатный мир г. Ханты-Мансийск»; 2016.
43. Миронов А.Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркёры патогенов. М.: ООО «Тираж»; 2013.
49. Чеботарь И.В., Бочарова Ю. А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020; 65 (2): 116-21.

REFERENCES

1. Zasada A.A., Mosiej E. Contemporary microbiology and identification of Corynebacteria spp. causing infections in human. *Lett Appl. Microbiol*. 2018; 66: 472-83.
2. Genus Corynebacterium. Available at: https://lpsn.dsmz.de/genus/corynebacterium/. Open Element.
3. Silva-Santana G., Silva C.M.F., Olivella J.G.B., Oliveira Fernandes I.F.S.L.M., Sued-Karam B.R., Silva Santos C., Souza C. et al. Worldwide survey of Corynebacterium striatum increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020. *Archives of Microbiology*. 2021; 24: 1-18.
4. Nishiyama A., Ishida T., Ito A., Arita M. Bronchopneumonia caused by Corynebacterium pseudodiphtheriticum. *Int. Med*. 2013; 52: 1847.
5. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbajosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C., Canton R., Meseguer M.A. Non-diphtheriae Corynebacterium species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 2013; 32: 769-71.

6. Ming-Jie Zhang, Xiao-Jie Cao, Jin Fan, Ze-Gang Yin, Ke Yu. Corynebacterium striatum meningitis combined with suspected brain and lung abscesses: a case report and review. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20 (1): 389.
7. Gupta R., Popli T., Ranchal P., Khosla J., Aronow W.S., Frishman W.H. et al. Corynebacterium jeikeium endocarditis: a review of the literature. The Cardiology in Review Journal. September 21, 2020. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32976125/. doi: 10.1097/CRD.0000000000000355. Open Element.
8. Cantarelli V.V., Brodt T.C.Z., Secchi C., Inamine E., Pereira F. de. Cutaneous infection caused by Corynebacterium pseudodiphtheriticum. A microbiological report. *Rev. Inst. Med. Trop. S.* Paulo. 2008; 50: 51-2.
9. Passos R.M., Cariello A.J., Yu M.C., Hofling-Lima A.L. Microbial ceratitis in the elderly: a 32-year review. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2010; 73: 315-9.
10. Roy S., Marla S., Praneetha D.C. Recognition of Corynebacterium pseudodiphtheriticum by Toll-like receptors and upregulation of antimicrobial peptides in human corneal epithelial cells. *Virulence.* 2015; 6 (7): 716-21.
11. Carvalho R.V., Lima F.F.D.S., Santos C.S.D., Souza M.C, Silva R.S.D., Mattos-Guaraldi A.L. Central venous catheter-related infections caused by Corynebacterium amycolatum and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018; 22: 347-51.
12. Valdoleiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., Gonçalves C., Vasconcelos P.P.O., Castro A.P., Ramos M.H. Infection and colonization by Corynebacterium pseudodiphtheriticum: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2020; 39 (9): 1745-52.
13. Bittar F., Cassagne C., Bosdure E., Stremler N., Dubus J.C., Sarles J. et al. Outbreak of Corynebacterium pseudodiphtheriticum infection in cystic fibrosis patients, France *Emerg. Infect. Dis*. 2010; 16 (8): 1231-6.
14. Indumathi V.A., Shikha R., Suryaprakash D.R. Diphtheria-like illness in a fully immunised child caused by Corynebacterium pseudodiphtheriticum. *Indian. J. Med. Microbiol.* 2014; 32 (4): 443-5.
15. Weil L.M., Williams M.M., Shirin T., Lawrence M., Habib Z.H., Aneke J.S. et al. Investigation of a large diphtheria outbreak and co-circulation of Corynebacterium pseudodiphtheriticum among forcibly displaced myanmar nationals, 2017-2019. *J. Infect. Dis.* 2020. https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiaa729/6007686.
16. Souza C., Faria Y.V., Sant'Anna L.O., Viana V.G., Seabra S.H., Souza M.C. et al. Bioflm production by multi-resistant Corynebacterium striatum associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110: 242-8.
17. Souza C., Mota H.F., Faria Y.V., Cabral F.O., Oliveira D.R., Sant'Anna L.O. et al. Resistance to antiseptics and disinfectants of planktonic and bioflm-associated forms of Corynebacterium striatum. *Microb. Drug. Resist.* 2020; 26: 1546-58.
18. Superti S.V., Martins D.S., Caierão J., Soares F., Prochnow T., Cantarelli V.V. et al. Corynebacterium striatum infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2009; 51: 115-6.
19. Wong K.Y., Chan Y.C., Wong C.Y. Corynebacterium striatum as an emerging pathogen. *J. Hosp. Infect*. 2010; 76:371-2.
20. Díez-Aguilar M., Ruiz-Garbajosa P., Fernández-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C. et al. Nondiphtheriae Corynebacterium species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 32: 769-72.
21. Möller J., Busch A., Berens C., Hotzel H., Burkovski A. Newly isolated animal pathogen Corynebacterium silvaticum is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2021; 22 (7): 3549.
22. Burkovski A. Corynebacterium pseudodiphtheriticum: putative probiotic, opportunistic infector, emerging pathogen. *Virulence.* 2015; 6 (7): 673-4.
23. Souza M.C., dos Santos L.S., Gomes D.L.R., Sabbadini P.S., Santos C.S., Camello T.C.F. et al. Aggregative adherent strains of Corynebacterium pseudodiphtheriticum enter and survive within HEp-2 epithelial cells. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* 2012; 107: 486-93.
24. Burkovski A. Cell envelope of Corynebacteria: structure and influence on pathogenicity *ISRN Microbiol*. 2013: 1-11.
25. Mandlik A. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*. 2008; 16 (1): 33-40.
26. Karlyshev A.V., Melnikov V.G. Draft genome sequence of Corynebacterium pseudodiphtheriticum strain 090104 «Sokolov». *Genome Announc*. 2013; 1 (6): e00921-13.
27. Weerasekera D., Hahn J., Herrmann M., Burkovski A. Induction of necrosis in human macrophage cell lines by Corynebacterium diphtheriae and Corynebacterium ulcerans strains isolated from fatal cases of systemic infections. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (17): 4109.
28. Hansmeier N., Kalinowski J., Pühler A., Tauch A., Chao T.C. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen Corynebacterium diphtheriae. *Proteomics*. 2006; 6 (8): 2465-76.
29. Sanhita R., Marla S., Praneetha D.C. Recognition of Corynebacterium pseudodiphtheriticum by toll-like receptors and up-regulation of antimicrobial peptides in human corneal epithelial cells. *Virulence*. 2015; 6 (7): 716-21.
30. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Iron and microorganisms: Hanty-Mansiysk: OOO «Pechatnyi mir g. Hanty-Mansiysk»; 2016. (in Russian)
31. Olson M.E., Ceri H., Morck D.G., Andre A.G., Read R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res*. 2002; 66 (2): 86-92.
32. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V., Diot A., Tasse J., Conrad A. Bone and joint infection involving Corynebacterium spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med (Lausanne)*. 2020; 7: 539501.
33. Qin L., Sakai Y., Bao R., Xie H., Masunaga K., Miura M. et al. Characteristics of multidrug-resistant Corynebacterium spp. isolated from blood cultures of hospitalized patients in Japan. *Jpn J. Infect. Dis*. 2017; 70:152-7.
34. Kang S.J., Choi S-M., Choi J-A., Choi J.U., Oh T-H., Kim S.E. et al. Factors affecting the clinical relevance of Corynebacterium striatum isolated from blood cultures. *PLoS. ONE*. 2018; 13:e0199454.
35. Clariot S., Constant O., Lepeule R., Fihman V., Razazi K., Cook F. et al. Clinical relevance and impact of Corynebacterium isolation in lower respiratory tract of critically ill patients requiring mechanical ventilation. *Infection*. 2020; 48 (3): 413-20.
36. Bernard K., Pacheco A.L., Cunningham I., Gill N., Burdz T., Wiebe D. Emendation of the description of the species Corynebacterium propinquum to include strains which produce urease. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiol.*2013; 63: 2146-54.
37. Wang X., Zhou H., Chen D., Du P., Lan R., Qiu X. et al. Wholegenome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of Corynebacterium striatum, an emerging multidrug-resistant pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57: e00683-e719.
38. Venezia J., Cassiday K.P., Marani R.P., Shem Z., Buckley E.M., Peters Y. et al. Characterization of Corynebacterium species in macaques. *J. Med. Microbiol*. 2012; 61 (10): 1401-8.
39. Camello T.C.F., Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D., Marques E.A. Nondiphtherial Corynebacterium species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital. *Braz. J. Microbiol.* 2003; 34: 39-44.
40. Martins C.A.S., Faria L.M.D., Souza M.C., Camello T.C.F., Velasco E., Hirata R. Jr et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 905-13.
41. Stackebrandt E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today. 2006; 33: 152-5.
42. Bernard K.A. The Genus Corynebacterium and other medically relevant Coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012; 50 (10): 3152-8.
43. Mironov A.Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. Moscow : Izdatel'stvo OOO «Tirazh»; 2013. (in Russian)
44. Vila J., Juiz P., Salas C., Armela M., Fuente G.G. de la, Zboromyrska Y. et al. Identification of clinically relevant Corynebacterium spp., Arcanobacterium haemolyticum, and Rhodococcus equi by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2012; 50 (5): 1745-7.

45. Alatoom A.A., Cazanave C.J., Cunningham S.A. Identification of non-diphtheriae Corynebacterium by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2012; 50: 160-3.
46. Kawasaki Y., H. Matsubara, H. Ishihara, A. Nigami, K. Iwata, Kawaguchi Y. Corynebacterium propinquum as the first cause of infective endocarditis in childhood. *J. Infect. Chemother.* 2014; 20 (5): 317-9.
47. Renom F., Garau M., Rubí M., Ramis F., Galmés A., Soriano J.B. Nosocomial outbreak of Corynebacterium striatum infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 2064-7.
48. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U., Jayaprada R., Reddy G., Ramana B.V. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial corynebacteria (Diphtheroids). *Indian. J. Med. Microbiol.* 2012; 30: 52-7.
49. Chebotar` I.V., Bocharova Yu.A., Guryev A.S., Mayansky N.A. Strategies for bacterial survival in contact with antibiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65 (2): 116-21. (in Russian)
50. Pu Y., Ke Y., Bai F. Active efflux in dormant bacterial cells – new insights into antibiotic persistence. *Drug. Resist. Updat*. 2017; 30: 7-14.
51. Hauryliuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p) pp Gpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol*. 2015; 13(5): 298-9.
52. Sandoval-Motta S., Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. Wiley Interdisciplinary Reviews. *Systems Biology and Medicine*. 2016; 8 (3): 253-67.
53. Ramos J.N., Souza C., Faria Y.V., Silva E.C., Veras J.F.C., Baio P.V.P. et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multi-drug resistant and biofilm producer Corynebacterium striatum. *BMC Infect Dis.* 2019; 19: 672.
54. Campanile F., Carretto E., Barbarini D., Grigis A., Falcone M., Goglio A. et al. Clonal multidrug-resistant Corynebacterium striatum strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 75-8.
55. Shariff M., Aditi A., Beri K. Corynebacterium striatum: an emerging respiratory pathogen. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2018; 12 (7): 581-6.
56. Camello T.C.F., Souza M.C., Martins C.A.S., Damasco P.V., Marques E.A., Pimenta F.P. et al. Corynebacterium pseudodiphtheriticum isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48 (4): 458-64.
57. Olender A., Niemcewitz M. Macrolide, licosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in Corynebacterium pseudodiphtheriticum isolated from upper respiratory tract specimens. *Microb. Drug. Resist.* 2010; 16: 119-22.
58. Hagiya H., Kimura K., Okuno H., Hamaguchi S., Morii D., Yoshida H. et al. Bacteremia due to high-level daptomycin-resistant Corynebacterium striatum: A case report with genetic investigation. *J. Infect. Chemother.* 2019; 25 (11): 906-8.
59. Yoon S., Kim H., Lee Y., Kim S. Bacteremia caused by Corynebacterium amycolatum with a novel mutation in gyrA gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J. Lab. Med*. 2011; 31: 47-8.

Поступила 11.05.21
Принята к печати

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Борисова О.Ю.[1], Гадуа Н.Т.[1], Пименова А.С.[1], Шепелин А.П.[2], Домотенко Л.В.[2], Миронов А.Ю.[1], Афанасьев С.С.[1], Афанасьев М. С.[3], Алёшкин В. А.[1]

ВНЕШНИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

[1]ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;
[2]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, г. о. Серпухов, Московская обл., Россия;
[3]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия

Представлены результаты сравнительных исследований по выделению и идентификации нетоксигенного штамма C. diphtheriae, проведённых тремя различными коммерческими лабораториями. Использован типовой нетоксигенный штамм C. diphtheriae биовара mitis. Для проведения исследований готовились три линейки серийных десятикратных разведений чистой бактериальной культуры с последующим контрольным высевом на среды первичного посева и подсчётом КОЕ/мл. Произведено пулирование тампонов 24-часовой бактериальной культурой нетоксигенного штамма C. diphtheriae. Тампоны предоставлены из трёх различных лабораторий – тупферы ∑-Transwab® с жидкой средой Эймса и аппликатором с тонким удлинённым тампоном ∑-Swab® для отбора проб из узких полостей (из первой и второй лабораторий) и вискозный тампон-зонд в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём (из третьей лаборатории). После пулирования тампоны доставлены в коммерческие лаборатории. В лабораториях выделены в чистой культуре и идентифицированы: Corynebacterium spp. (не менее 10^3 КОЕ/тамп) (первая лаборатория), S. epidermidis (10^2 КОЕ/мл) (вторая лаборатория), C. diphtheriae биовар gravis нетоксигенный (третья лаборатория). Проведённое исследование свидетельствует о том, что необходимо усилить надзор за культуральными исследованиями, проводимыми в различных лабораториях. Это позволит повысить качество исследований на дифтерийную инфекцию и выявлять скрытое бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя дифтерийной инфекции, и будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения России в отношении дифтерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae; бактериологическая диагностика.*

Для цитирования: Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Миронов А.Ю., Афанасьев С. С., Афанасьев М. С., Алёшкин В. А. Внешний контроль качества проведения бактериологического исследования при выделении *Corynebacterium diphtheriae. Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (8): 509-512.
DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512

Borisova O.Yu.[1], Gadua N.T.[1], Pimenova A.S.[1], Shepelin A.P.[2], Domotenko L.V.[2], Mironov A.Yu.[1], Afanasiev S.S.[1], Afanasiev M.S.[3], Aleshkin V.A.[1]

COMPARATIVE TESTS OF QUALITY OF BACTERIOLOGICAL INVESTIGATION WITH CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ISOLATION

[1]G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;
[2]State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Russian Federation;
[3]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

The results of comparative experimental studies of identification of nontoxigenic C. diphtheriae strain by three different commercial laboratories are presented. A typical nontoxigenic strain of C. diphtheriae biovar mitis was used. For the studies, three lines of ten-fold dilutions of bacterial culture were prepared, followed by control planting on the medium and counting CFU/ml. In the experiment, tampons were pooled with a 24-hour bacterial culture of a nontoxigenic C. diphtheriae strain. Tampons were provided from three different laboratories – ∑-Transwab® with Ames liquid medium (from the first and second laboratories) and a viscose tampon with coal medium (from the third laboratory). After pooled, tampons were delivered to commercial laboratories. And as a result of the experiment, Corynebacterium spp. was identified in first laboratory (10^3 CFU/tamp), S. epidermidis (10^2 CFU/ml) – in second laboratory and nontoxigenic C. diphtheriae biovar gravis – in third laboratory. The study indicates that there is a need to the supervision of bacteriological investigations conducted in various laboratories. This will improve the quality of investigations on diphtheria infection and identify of diphtheria carrier, which is a reservoir of the causative agent of diphtheria, and will contribute to the maintenance of sanitary and epidemiological well-being in our country.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae; bacteriological diagnosis.*

Для корреспонденции: *Борисова Ольга Юрьевна*, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций; e-mail: olgborisova@mail.ru

For citation: Borisova O. Yu., Gadua N. T., Pimenova A. S., Shepelin A. P., Domotenko L. V., Mironov A. Yu., Afanasiev S. S., Afanasiev M. S., Aleshkin V. A. Comparative tests of quality of bacteriological investigation with *Corynebacterium diphtheriae* isolation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 509-512 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512

Information about authors:

Borisova O. Yu., https://orcid.org/0000-0001-6316-5046;
Gadua N. T., https://orcid.org/0000-0001-6247-6176;
Pimenova A. S., https://orcid.org/0000-0002-6914-3531;
Shepelin A. P., http://orcid.org/0000-0002-8253-7527;
Domotenko L. V., http://orcid.org/0000-0002-4785-6418;
Mironov A. Yu. https://orcid.org/0000-0002-8544-5230;
Afanasiev S. S., https://orcid.org/0000-0001-6497-1795;
Afanasiev M. S., https://orcid.org/0000-0002-5860-4152;
Aleshkin V. A., https://orcid.org/0000-0002-2701-431X.

For correspondence: *Borisova O.Yu*., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections; e-mail: olgborisova@mail.ru

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*
Acknowledgment. *The work was performed within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.*

Received 25.04.2021
Accepted 21.05.2021

Введение. Дифтерия является воздушно-капельной бактериальной инфекцией, управляемой средствами массовой иммунизации, которая в России проводится с 1959 г. с целью снижения заболеваемости и летальности. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по данной инфекции [1-3].

В течение первого десятилетия XXI века заболеваемость дифтерией остаётся на спорадическом уровне с ежегодным снижением числа заболевших. Согласно данным государственной статистической отчётности, в 2017 г. заболевших дифтерией не зарегистрировано и выявлено 2 бактерионосителя, в 2018 г. – зарегистрировано 4 случая заболевания и 3 случая бактерионосительства, в 2019 г. – зарегистрировано 3 случая заболевания и 2 случая бактерионосительства. В течение последних пяти лет не регистрируются вторичные случаи в очагах инфекции и летальные исходы. В структуре клинических форм преобладают лёгкие локализованные формы дифтерии [4-6].

В условиях единичных случаев сохраняется актуальность проблемы дифтерийной инфекции [4-6]. Поддержанию эпидемического процесса при дифтерии способствует наличие скрытых источников инфекции, когорты восприимчивых лиц, бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя инфекции и поддерживает его существование как биологического вида [2, 3, 4-6]. Существует риск завоза дифтерии с неблагополучных территорий в результате сезонной миграции туристов [7-9] и трансграничной трудовой миграции, что может привести к ухудшению эпидемиологической ситуации за счёт распространения возбудителя инфекции среди восприимчивых лиц. В условиях спорадической заболеваемости и роста числа непривитых лиц, главная роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*.

Система лабораторной диагностики дифтерии, используемая на территории России, создавалась и разрабатывалась на протяжении многих лет несколькими поколениями исследователей и практических микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Согласно СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», культуральное исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерии, выявления источников инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за распространением токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Качество лабораторной диагностики зависит как от преаналитического этапа – взятие и доставка патологического материала, так и от аналитического этапа – культуральное исследование, проводимое в микробиологических лабораториях. Учитывая, что на территории России исследования на дифтерийную инфекцию проводятся бактериологическими лабораториями различных форм собственности (государственными, коммерческими), расширяется рынок транспортных сред, применяются автоматизированные бактериологические комплексы, целесообразно оценить эффективность выделения и идентификации *C. diphtheriae* при исследовании микрофлоры ротоголотки.

Цель работы – провести внешний контроль качества по выделению и идентификации нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* различными лабораториями.

Материал и методы. В исследовании использован типовой нетоксигенный штамм *C. diphtheriae* биовара mitis B-7816, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК». Восстановление жизнеспособности лиофилизированной бактериальной культуры осуществлено в соответствии с инструкцией, предоставленной правообладателем. *C. diphtheriae* выращивали на кровяно-теллуритовом агаре (КТА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ЛейТран, Москва) и 0,02% теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре 37° С в течение 24 и 48 часов.

В качестве контаминируемого субстрата использованы транспортные системы ∑-Transwab® с жидкой средой Эймса и пластиковым аппликатором с тонким удлинённым тампоном ∑-Swab® из пенистого полиуретана на конце для отбора проб из узких полостей (Medical Wire, Англия) и сухие стерильные одноразовые тампон-зонды из вискозы с пластиковым аппликатором в индивидуальной упаковке (Copan, Италия) в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём.

Подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ) осуществляли с помощью счётчика колоний Scan® 500

(Interscience, Франция) с использованием полуавтоматического режима.

Результаты. С целью оценки эффективности выделения и идентификации *C. diphtheriae* нами в трёх различных коммерческих лабораториях взяты тампоны для забора материала из ротоглотки. Две лаборатории (лаборатория 1 и лаборатория 2) предоставили транспортные системы ∑-Transwab®, состоящие из пластикового аппликатора с тонким удлинённым тампоном ∑-Swab® из ячеистого пенополиуретана на конце и пробирки с резьбовой крышкой оранжевого цвета и коническим дном с юбкой устойчивости, содержащей 1,0 мл жидкой среды Эймса, предназначенные для отбора проб из узких полостей (уретра, носоглотка) и для отбора проб биологического материала у детей. Третья лаборатория (лаборатория 3) предложила сухой стерильный одноразовый тампон-зонд из вискозы с пластиковым аппликатором в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём.

Готовились три линейки серийных десятикратных разведений 24-часовой бактериальной культуры типового нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара mitis B-7816 в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида в соответствии со стандартным образцом 10 ЕД мутности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ, Москва). Каждое приготовленное разведение контролировалось путём высева в трёх повторностях по 100 мкл на чашки Петри с плотными питательными средами двух видов – КТА на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и Коринебакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировались при 37° С в течение 24-48 ч и подсчитывалось число выросших колоний (КОЕ/мл) (табл. 1).

На каждый из трёх тампонов, предложенных лабораториями частной формы собственности, стерильным наконечником с аэрозольным барьером наносилось по 100 мкл бактериальной взвеси с концентрацией 10^6 м.к./мл. Контаминированные и помещённые в транспортные среды тампоны доставлялись в лабораторные центры медицинских коммерческих организаций.

Одновременно, с целью контроля качества пулирования бактериальной суспензией тампонов, из каждого разведения (от -1 до -7) по 100 мкл пулировали на аппликатор с тонким удлинённым тампоном ∑-Swab® на конце (Medical Wire, Англия) и на сухой тампон-зонд из вискозы (Copan, Италия). Потом материал, нанесённый на субстраты различного типа, одновременно засевали на КТА и на Коринебакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), которые широко используются при проведении лабораторной диагностики дифтерийной инфекции. Через 24 и 48 ч подсчитывалось число выросших колоний (КОЕ/тампон) (табл. 2).

Как следует из табл. 2, при посеве материала с зонд-тампона из вискозы (Copan, Италия) вне зависимости от используемой питательной среды рост колоний зафик-

Таблица 1

Приготовление разведений и учёт КОЕ/мл нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара mitis B-7816

Разведение	Количество м.к. в 1 мл	Среднее количество КОЕ в 1 мл			
		Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар	
		24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
–1	10^8	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
–2	10^7	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
–3	10^6	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий
–4	10^5	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий
–5	10^4	$8{,}23\times10^3$	$8{,}55\times10^3$	$5{,}73\times10^3$	$5{,}95\times10^3$
–6	10^3	$6{,}50\times10^2$	$6{,}53\times10^2$	$4{,}33\times10^2$	$4{,}51\times10^2$
–7	10^2	5×10	5×10	2×10	2×10

Таблица 2

Высевы бактериальной суспензии с тампонов различных видов

Количество м.к. в 100 мкл суспензии	КОЕ/тампон							
	Тупфер ∑-Transwab®				Тампон-зонд из вискозы			
	Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар		Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
10^7	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бакте-рий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
10^6	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий
10^5	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	2 100	2 400	1 600	1 920
10^4	100	120	97	127	4	4	4	4
10^3	10	11	4	9	2	2	1	2
10^2	3	5	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 3

Результаты идентификации нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара mitis B-7816

Лаборатория	Лаборатория 1	Лаборатория 2	Лаборатория 3
Вид тампона	Тупфер ∑-Transwab® для отбора проб из узких полостей	Тупфер ∑-Transwab® для отбора проб из узких полостей	Тампон-зонд из вискозы
Длительность	2 суток (48 ч)	5 суток (120 ч)	8 суток (192 ч)
Результат	*Corynebacterium spp.* (не менее 10^3 КОЕ/тамп)	*S. epidermidis* (10^2 КОЕ/мл)	*C. diphtheriae* биовар gravis нетоксигенный

сирован с тампонов, содержащих не меньше 10^3 м.к.. При работе с тонким удлинённым тампоном ∑-Swab® из транспортной системы ∑-Transwab® (Medical Wire, Англия) рост колоний отмечался с тампонов, содержащих не меньше 10^2 м.к..

Проанализированы результаты исследования контаминированного материала, полученные из различных коммерческих лабораторий, которые предоставили результаты с различной продолжительностью выполнения (табл. 3).

Обсуждение. Результат, полученный в лаборатории 1, на наш взгляд, является недостаточно полным, поскольку у специалистов, проводивших исследования, не возникло настороженности в отношении выделенного микроорганизма. К роду *Corynebacterium* относится вид *C. diphtheriae*, среди штаммов которых имеются и токсигенные, являющиеся возбудителями дифтерийной инфекции. Такие штаммы могут быть выделены в лаборатории как при проведении микробиологического исследования с диагностической целью, так и случайно – при проведении профилактических обследований, которые мы имитировали в данном исследовании.

Результат, полученный в лаборатории 2, является абсолютно неприемлемым, поскольку в тупфер пулировали чистую культуру *C. diphtheriae*. Данный результат идентификации выделенной чистой культуры полностью дезориентирует, как врача-клинициста, так и эпидемиолога.

Результат, полученный в лаборатории 3, свидетельствует о том, что специалисты, проводившее исследование, имеют настороженность в отношении выделения *C. diphtheriae*. Они провели полную идентификацию выделенной чистой культуры, однако допустили ошибку при определении биовара штамма *C. diphtheriae*.

Заключение. Проведённое исследование свидетельствует о необходимости усилить надзор за исследованиями, проводимыми в различных лабораториях, в том числе необходимость прохождения специалистами, осуществляющими исследования мазков из ротоглотки и носа, тематического усовершенствования по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции и внешнего контроля качества бактериологических исследований на дифтерийную инфекцию. Усиление надзора позволит повысить не только качество исследований на дифтерийную инфекцию, но и, самое главное, выявлять скрытое бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя дифтерийной инфекции, и будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения России в отношении дифтерии.

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

Финансирование. *Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7-9 см. REFERENCES)

1. Маркина С.С., Максимова Н.М., Котова Е.А., Жилина Н.Я. Заболеваемость дифтерией в России в 1993-1995 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1997; 4: 8-10.
2. Максимова Н.М., Маркина С.С., Яцковский К.А, Черкасова В.В., Корженкова М.П., Сафронова А.В. и др. Дифтерия в России в 2005-2009 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 3(52): 31-6.
3. Максимова Н.М., Якимова Т.Н., Маркина С.С., Яцковский К.А., Адугюзелов С.Э. Дифтерия в России в 21 веке. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(5(96)): 4-15.
4. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 29.09.2017 г. № 01/13216-17-27.
5. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 19.12.2018 г. № 01/16590-2018-27.
6. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 10.10.2019 г. № 02/14390-2019-27.

REFERENCES

1. Markina S. S., Maximova N. M., Kotova E. A., Zhilina N. Ya. The incidence of diphtheria in Russia in 1993-1995. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni.* 1997; 4: 8-10. (in Russian)
2. Maksimova N.M., Markina S.S., Yatskovsky K.A., Cherkasova V.V., Korzhenkova M.P., Safronova A.V. at al. Diphtheria in Russia in 2005-2009. *Epidemiologiya I vaktsinoprofilaktika.* 2010; 3(52): 31-6. (in Russian)
3. Maksimova N.M., Yakimova T. N., Markina S. S., Yatskovsky K.A., Aduguzelov S. E. Diphtheria in Russia in the 21st century. *Epidemiologiya I vaktsinoprofilaktika*. 2017; 16(5(96)): 4-15. (in Russian)
4. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 29.09.2017. No. 01/13216-17-27. (in Russian)
5. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 19.12.2018. №. 01/16590-2018-27. (in Russian)
6. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 10.10.2019. №. 02/14390-2019-27. (in Russian)
7. World Health Organization (2021). 2020 global summary. *WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system*. Available at: https://apps.who.int/immunization_ monitoring/globalsummary (accessed 5 April 2021).
8. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Chapter 1: Diphtheria. *Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases*. Available at: https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.html (accessed 5 April 2021).
9. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Chapter 4: Travel-related infectious diseases. Diphtheria. *Yellow Book 2020: health information for international travel*. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/diphtheria (accessed 5 April 2021).

Поступила 25.04.21
Принята к печати 21.05.21