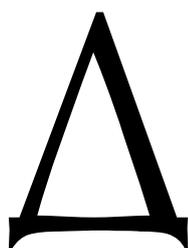


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66

9 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

СЕНТЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 10.09.2021.
Подписано в печать 25.09.2021. Формат
60 × 88½.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

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

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 7. 513-576.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 66
9 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

SEPTEMBER

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief 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*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*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

- Сергеева Н.С., Кануков К.Ю., Кармакова Т.А., Алентов И.И., Маршутина Н.В., Каприн А.Д.*
О нормировании уровня КИМ-1 на содержание креатинина в моче у больных почечно-клеточным раком 517
- Умнягина И.А., Блинова Т.В., Страхова Л.А., Иванова Ю.В., Трошин В.В., Колесов С.А., Фомина Ю.Н.*
Эндотелин-1 и метаболиты оксида азота в диагностике риска артериальной гипертензии у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда 525

ИММУНОЛОГИЯ

- Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Кузьмин Ю.Б., Булычева И.В., Козлова Е.В., Короткова Е.А., Герштейн Е.С., Кудлай Д.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Кузнецов И.Н., Сушенцов Е.А.*
Клиническая и прогностическая значимость растворимой формы контрольной точки иммунитета VISTA у больных первичными опухолями костей 533
- Пашинская К.О., Самодова А.В., Добродеева Л.К.*
Влияние содержания апоА-I в периферической крови на состояние иммунного гомеостаза у лиц, проживающих в экстремальных условиях Арктики 539
- Чельдиева Ф.А., Решетняк Т.М., Черкасова М.В., Лиля А.М.*
Исследование антифосфолипидных антител иммуноферментным и хемилюминесцентным методами у пациентов с антифосфолипидным синдромом и системной красной волчанкой (предварительные данные) 546
- Ащина Л.А., Баранова Н.И., Шкурова Н.А., Федин А.В.*
Оценка функциональной активности ней 552

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Замарина Т.В., Пименова Е.В., Храпова Н.П., Батулин А.А.*
Современное состояние лабораторной диагностики лихорадки чикунгунья (обзор литературы) 558
- Безродный С.Л., Марданлы С.Г., Затевалов А.М., Терешина Е.В., Миронов А.Ю., Помазанов В.В.*
Оценка состояния кишечного микробиоценоза на основе бактериального эндотоксина и плазмалогена у лиц старшего возраста с патологией сахарного диабета 2 типа 565

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Горбенко А.С., Столяр М.А., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Бахтина В.И., Ольховик Т.И., Мочалова Е.Е., Орлова К.Э., Ольховский И.А.*
Использование набора «BCR/ABL – мультитест» в алгоритме лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний: экономические аспекты 571

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Sergeeva N.S., Kanukoev K.Yu., Karmakova T.A., Alentov I.I., Marshutina N.V., Kaprin A.D.
On normalizing of urinary KIM-1 level to urine creatinine in patients with renal cell cancer 517

Umnyagina I.A., Blinova T.V., Strakhova L.A., Ivanova Yu.V., Troshin V.V., Kolesov S.A., Fomina Yu.N.
Endothelin-1 and nitrogen oxide metabolites in risk diagnostics of arterial hypertension in persons of young and middle ages occupied in harmful working conditions 525

IMMUNOLOGY

Kushlinskii N.E., Kovaleva O.V., Kuzmin Yu.B., Korotkova E.A., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Kozlova E.V., Kudlay D.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Kuznetsov I.N., Sushentsov E.A.
Clinical and prognostic significance of the soluble form of the VISTA immunity control point in patients with primary bone tumors 533

Pashinskaya K.O., Samodova A.V., Dobrodeeva L.K.
The effect of the content of ApoA-I in peripheral blood on the state of immune homeostasis in people living in extreme climatic conditions of the Arctic 539

Cheldieva FA, Reshetnyak T.M., Cherkasova M.V., Lila A.M.
Study of antiphospholipid antibodies by enzyme immunoassay and chemiluminescent methods in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus (preliminary data) 546

Aschina L.A., Baranova N.I., Shkurova N.A., Fedin A.V.
Evaluation of neutrophil functional activity for rhinosinusitis diagnosis 552

MICROBIOLOGY

Zamarina T.V., Pimenova E.V., Khrapova N.P., Baturin A.A.
Current state of chikungunya fever laboratory diagnosis (review of literature) 558

Bezrodny S.L., Mardarly S.G., Tereshina E.V., Pomazanov V.V.
Microbial endotoxin and plasmalogen in senile persons with pathology of diabetes mellitus type 2 565

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A., Bakhtina V.I., Olkhovik T.I., Mochalova E.E., Orlova K.E., Olkhovskiy I.A.
Use of the «BCR/ABL – multitest» kit in the algorithm of laboratory diagnostics of oncohematological diseases: economic aspects 571

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сергеева Н.С.^{1,2}, Кануков К.Ю.¹, Кармакова Т.А.¹, Алентов И.И.¹, Маршутина Н.В.¹, Каприн А.Д.^{3,4}

О НОРМИРОВАНИИ УРОВНЯ KIM-1 НА СОДЕРЖАНИЕ КРЕАТИНИНА В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 249036, Калужская обл., Обнинск, Россия;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия

KIM-1 (kidney injury molecule 1) продуцируется клетками эпителия проксимальных почечных канальцев и является маркером острого повреждения почек. Увеличение содержания KIM-1 в моче и плазме крови ассоциировано с почечно-клеточным раком (ПКР). Цель настоящей работы – сравнительная оценка информативности уровня KIM-1 в моче (uKIM-1), нормированного и не нормированного на креатинин мочи, как урологического биомаркера при ПКР. Содержание uKIM-1, креатинина мочи и их соотношения (uKIM-1/Cre) исследовано у 118 больных ПКР и 58 условно здоровых добровольцев. Медиана uKIM-1 в группе здоровых лиц составила 0,71 (1-й и 3-й квартили – 0,35; 1,23) нг/мл, в группе больных ПКР – 2,36 (1,43; 5,93) нг/мл; медианы uKIM-1/Cre – 0,77 (0,49; 1,18) и 2,42 (1,41; 4,61) нг/мг креатинина, соответственно. I стадия ПКР статистически достоверно отличалась от II-III стадий и IV стадии по величинам uKIM-1/Cre ($p=0,0056$ и $p=0,0012$, соответственно), величины uKIM-1 достоверно отличались только при сравнении I и IV стадий заболевания ($p=0,015$). У здоровых лиц и больных ПКР уровни uKIM-1/Cre в возрастных подгруппах младше 50 лет были несколько ниже, чем у лиц старше 50 лет, в то время как для uKIM-1 подобная тенденция наблюдалась только среди пациентов. У здоровых мужчин и мужчин с ПКР показатель uKIM-1 был выше, чем у женщин в соответствующих группах (отличия статистически недостоверны), а использование uKIM-1/Cre нивелировало гендерные различия. У здоровых лиц, прослеженных в течение 3-х недель в динамике, выявлена высокая корреляция между концентрациями uKIM-1 и креатинина в моче: в трех индивидуальных случаях коэффициент корреляции Спирмена составил 0,758, 0,825 и 0,933, соответственно. Полученные данные свидетельствуют в пользу необходимости нормировать uKIM-1 на содержание в моче креатинина.

Ключевые слова: KIM-1; почечно-клеточный рак; биомаркер; моча

Для цитирования: Сергеева Н.С., Кануков К.Ю., Кармакова Т.А., Алентов И.И., Маршутина Н.В., Каприн А.Д. О нормировании уровня KIM-1 на содержание креатинина в моче у больных почечно-клеточным раком. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 517-524. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-517-524>

Для корреспонденции: Кармакова Татьяна Анатольевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. отд-ния прогноза эффективности консервативного лечения; e-mail: prognoz.06@mail.ru

Sergeeva N.S.^{1,2}, Kanukov K.Yu.¹, Karmakova T.A.¹, Alentov I.I.¹, Marshutina N.V.¹, Kaprin A.D.^{3,4}

ON NORMALIZING OF URINARY KIM-1 LEVEL TO URINE CREATININE IN PATIENTS WITH RENAL CELL CANCER

¹P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Radiological Centre”, Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russia;

³Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Radiological Centre”, Ministry of Health of the Russian Federation, 249036, Kaluga reg., Obninsk, Russia;

⁴People’s friendship university of Russia, 117198, Moscow, Russia

KIM-1 (kidney injury molecule 1), a marker of acute kidney injury, is produced by epithelial cells of renal proximal tubules. Elevated KIM-1 levels in urine and plasma are associated with renal cell carcinoma (RCC). The aim of this study was to compare the significance of non-normalized uKIM-1 values and those normalized to urine creatinine, as urinary biomarkers in RCC. The uKIM-1, urine creatinine and their ratio (uKIM-1/Cre) were studied in 118 RCC patients and 58 apparently healthy subjects. The median of uKIM-1 in the healthy group was 0.71 ng/ml (1st and 3rd quartiles were 0.35 and 1.23, respectively) and in RCC patients it was 2.36 (1.43; 5.93) ng/ml. The medians of uKIM-1/Cre were 0.77 (0.49; 1.18) and 2.42 (1.41; 4.61) ng/mgCre, respectively. Stage I RCC is statistically significantly different from stages II-III and stage IV using uKIM-1/Cre values ($p = 0.0056$ and $p = 0.0012$, respectively); using uKIM-1 values significant differences occur only when comparing stages I and IV ($p = 0.015$). In both healthy individuals and RCC patients, uKIM-1/Cre levels were slightly lower in subgroups younger than 50 years than in subgroups older than 50 years, whereas a similar trend was observed for uKIM-1 only in patients. In healthy men and male patients, uKIM-1 levels were higher than in the corresponding groups of women (the differences were not statistically significant), but the use of uKIM-1/Cre values eliminated the gender differences. A high correlation was found between the concentrations of uKIM-1 and urine creatinine in three healthy subjects followed up for 3 weeks (Spearman’s correlation coefficients were 0.758,

0.825 and 0.933, respectively). The data obtained are clear evidence of the need for normalization uKIM-1 to urine creatinine in RCC patients.

Key words: KIM-1; renal cell carcinoma; urine biomarker

For citation: Sergeeva N.S., Kanukoev K.Yu., Karmakova T.A., Alentov I.I., Marshutina N.V., Kaprin A.D. On normalizing of urinary KIM-1 level to urine creatinine in patients with renal cell cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 517-524 (in Russ.).
https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-517-524

For correspondence: Karmakova T.A., Dr. Sci. Biol., Lead researcher of the Department of Predicting the Effectiveness of Conservative Therapy; e-mail: prognos.06@mail.ru

Information about authors:

Sergeeva N.S., <https://orcid.org/0000-0001-7406-9973>

Kanukoev K.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8160-2289>

Karmakova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-8017-5657>

Alentov I.I., <https://orcid.org/0000-0002-5920-5823>

Marshutina N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2997-4936>

Kaprin A.D., <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 02.06.2021
Accepted 24.06.2021

Введение. В структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований среди населения в развитых странах, включая Россию, рак почки входит в первую десятку [1]. Более чем у трети больных (36%) злокачественное поражение почки обнаруживается на распространенной – III или IV стадии заболевания, вследствие бессимптомного его течения на начальных этапах. В отличие от ряда других злокачественных опухолей, таких как, например, рак предстательной железы, рак яичников или колоректальный рак, для карциномы почки на сегодняшний день не описаны информативные опухолеассоциированные маркеры, которые могли бы быть полезными для раннего выявления опухолевого поражения, уточняющей диагностики и прогноза заболевания.

Среди гистологических вариантов рака почки наиболее часто встречается почечно-клеточный рак (ПКР), развивающийся из эпителия проксимальных почечных канальцев [2]. Одним из претендентов для использования в лабораторной диагностике и при мониторинге больных ПКР является «молекула повреждения почек 1» – KIM-1 (kidney injury molecule 1), гликопротеин, который экспрессируется в клетках эпителия проксимальных почечных канальцев [3]. Увеличение уровня KIM-1 в моче рассматривается как маркер острого ишемического или токсического поражения почек [4, 5]. Кроме того, его содержание в моче возрастает при хронических заболеваниях почек, диабетической нефропатии, сердечной недостаточности [6, 7]. Считается, что в норме основным источником KIM-1 в моче является эпителий проксимальных канальцев почек [3], при этом ПКР сопровождается повышением содержания KIM-1 как в моче [8 – 11], так и в крови [12, 13].

В литературе описаны разные подходы к оценке уровня KIM-1 в моче (uKIM-1). В одних работах наилучшие диагностические результаты получены при нормировании концентраций uKIM-1 на креатинин мочи (uKIM-1/Cre) [14 – 16], в других – наличие клинически значимых корреляций установлено только для uKIM-1, не нормированного на уровень креатинина [17] или не найде-

но различий в диагностической значимости uKIM-1 и uKIM-1/Cre [18]. В. George и соавт. [14] на основании полученных данных предположили, что для одних патологических процессов более информативным может оказаться соотношение uKIM-1/Cre, а для других – ненормированный uKIM-1. Авторы связывают это с различиями в патофизиологических механизмах, ответственных за содержание в моче KIM-1 и креатинина при разных заболеваниях. В частности, S.S. Waikar и соавт. [19] обосновывают отсутствие необходимости использования соотношения uKIM-1/Cre при мониторинге лечения почечной недостаточности и воспалительных заболеваний почек. Таким образом, вопрос о целесообразности нормирования уровня uKIM-1 на содержание в моче креатинина до настоящего времени окончательно не решен.

Цель настоящей работы – сравнительная оценка информативности uKIM-1, нормированного и не нормированного на креатинин мочи, как уронологического биомаркера при ПКР.

Материал и методы. В исследование включены 118 больных ПКР, прошедших обследование и лечение в отделении онкоурологии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

В группу вошли 76 мужчин и 42 женщины в возрасте от 28 до 79 лет (средний возраст 59,7 года). Диагноз у больных установлен на основании данных клинического и инструментального обследований и верифицирован по результатам морфологического исследования операционного материала. Первая стадия заболевания установлена у 71 пациента (в том числе, T1a – у 49; T1b – у 22 больных), II стадия – у 4, III стадия – у 27, IV стадия – у 16 больных. Контрольную группу составили 58 условно здоровых добровольцев: 24 мужчины, 34 женщины в возрасте от 22 до 79 лет (средний возраст – 43,1 года).

Объектом исследования служила средняя порция утренней мочи. У больных мочу собирали до операции и до инвазивных диагностических процедур. У здоровых лиц мочу собирали в рамках профилактического осмотра. Дополнительно у 3-х здоровых мужчин утреннюю порцию биоматериала собирали каждые 2-3 дня в течение 3-х недель.

Уровень uKIM-1 определяли иммуноферментным методом с использованием наборов EnzoLife Sciences KIM-1 ELISA (США). Преаналитическая подготовка включала центрифугирование мочи при 3000 g в течение 15 минут. Образцы мочи аликвотировали и замораживали при температуре -80°C. Срок хранения замороженных образцов не превышал 3 месяцев. Уровень креатинина в моче определяли биохимическим методом на анализаторе Beckman Coulter AU680.

Статистический анализ данных выполняли с использованием программы Statistica 10 (StatSoft. Inc., США). Сравнение групп проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни, отличия считали достоверными при $p < 0,05$. Корреляционные отношения оценивали с применением рангового критерия Спирмена.

Результаты. Результаты определения уровня uKIM-1, концентрации креатинина в моче и нормированной величины uKIM-1/Cre у здоровых доноров и в общей группе больных ПКР приведены в таблице.

Как видно из данных, представленных в таблице, уровни uKIM-1 у больных ПКР, равно как и uKIM-1/Cre, статистически достоверно отличаются от соответствующих показателей в группе здоровых лиц ($p < 0,00001$). Медиана уровня uKIM-1 в группе больных ПКР в 3,3 раза выше, чем у здоровых лиц; медиана уровня uKIM-1/Cre – выше в 3,1 раза. При этом по величинам uKIM-1 достоверно отличаются только группы больных с I и IV стадиями заболевания ($p = 0,015$), а отличия между I и II-III стадиями ПКР не достигают статистической значимости ($p = 0,06$). По величинам uKIM-1/Cre группа больных ПКР I стадии достоверно отличается от больных с II-III стадиями и больных с IV стадией заболевания ($p = 0,0056$ и $p = 0,0012$, соответственно).

Сравнительная оценка uKIM-1, не нормированного и нормированного на креатинин мочи, в зависимости от возраста обследуемых показала следующее.

Среди здоровых лиц в возрастных подгруппах младше 50 лет, 50-59 лет и 60 лет и старше, не выявлено статистически значимых отличий по уровню uKIM-1 (рис. 1, а).

У больных ПКР наблюдалась тенденция к повышению уровня uKIM-1 с возрастом (рис. 1, з), за счет по-

явления в старших возрастных подгруппах случаев с высоким значением показателя.

Как у здоровых лиц, так и у больных ПКР с возрастом наблюдалась ожидаемая тенденция к снижению содержания креатинина в моче (рис. 1, б, д). Как следствие этого, медианы uKIM-1 и uKIM-1/Cre в подгруппах лиц младше 50 лет были несколько ниже, чем показатели в подгруппах лиц старшего возраста (рис. 1, в, е; отличия статистически недостоверны). Стратификация больных в соответствии с клиническим диагнозом выявила сходные тенденции зависимости распределения показателей от возраста среди больных с I стадией заболевания и со II-IV стадиями заболевания (рис. 2).

Меньшие величины uKIM-1/Cre в младшей возрастной группе, полученные как в группе здоровых лиц, так и среди пациентов, указывают на целесообразность введения возрастного коэффициента в дискриминационный уровень при индивидуальной оценке uKIM-1/Cre у больных ПКР относительно нормы.

Следующим этапом выполнен сравнительный анализ показателей uKIM-1, креатинина мочи и uKIM-1/Cre у мужчин и женщин.

Выявлено, что средние значения uKIM-1 у мужчин выше, чем у женщин. Так, у здоровых мужчин медиана uKIM-1 составила 1,07 нг/мл (1-й и 3-й квартили – 0,31 и 1,55, соответственно), у здоровых женщин – 0,67 (0,39; 0,95) нг/мл; среди больных ПКР – 3,23 (1,71; 6,86) нг/мл и 1,66 (0,94; 3,19) нг/мл, соответственно (рис. 3, а, з). Отличия величин uKIM-1 между мужчинами и женщинами в обеих группах статистически недостоверны.

Медиана концентрации креатинина в моче у здоровых мужчин статистически достоверно выше, чем у женщин (рис. 3, б; $p = 0,008$), что, как известно, может быть связано с более интенсивным белковым и общим обменом веществ у мужчин [20]. Аналогичные достоверные отличия между мужчинами и женщинами отмечены и в группе больных ПКР (рис. 3, д; $p = 0,0002$). В то же время, соотношение uKIM-1/Cre у мужчин и женщин, как у здоровых, так и у больных ПКР, не различались (рис. 3, в, е). Подобное выравнивание статистических показателей распределения наблюдалось и в отдельно взятых группах больных с I стадией или более распространенными стадиями заболевания ПКР (данные не представлены). Таким образом, нормирование uKIM-1 на креатинин нивелирует гендерные различия, что делает возможным использование единого дискриминационного уровня uKIM-1/Cre как опухолеассоциированного маркера и у мужчин, и у женщин.

У здорового человека содержание креатинина в моче является динамическим показателем и косвенно отра-

Уровни uKIM-1, креатинина в моче и uKIM-1/Cre у здоровых доноров и больных ПКР

Показатели	n	uKIM-1, нг/мл	Креатинин, мг/мл	uKIM-1/Cre, нг/мг креатинина
Здоровые лица	58			
Мин-макс		0,03 – 2,83	0,24 – 2,11	0,05 – 3,39
Медиана (Q1;Q3)		0,71 (0,35; 1,23)	0,98 (0,55; 1,42)	0,77 (0,49; 1,18)
Больные ПКР	118			
Мин-макс		0,10 – 35,0	0,10 – 3,20	0,20 – 39,1
Медиана (Q1;Q3)		2,36 (1,43; 5,93)	1,08 (0,66; 1,60)	2,42 (1,41; 4,61)
в том числе:				
I стадия	71	1,99 (1,33; 3,84)	1,19 (0,70; 1,63)	1,94 (1,27; 3,08)
II-III стадия	31	3,23 (1,64; 6,27)	1,07 (0,67; 1,40)	4,03 (1,66; 8,78)
IV стадия	16	6,94 (2,03; 9,92)	0,89 (0,51; 1,65)	4,44 (2,88; 13,6)

Примечание. n – число обследованных; мин-макс – вариация величин; Q1 и Q3 – первый и третий квартили, соответственно.

жает ее концентрацию, которая зависит в том числе от питьевого режима. Мониторинг величин $uKIM-1$ и креатинина мочи у трех здоровых лиц в течение 3-х недель показал, что колебания данных показателей происходили синхронно, а коэффициенты корреляции между ними составили 0,758, 0,825 и 0,933, соответственно (рис. 4.). Отмечено, что за время наблюдения индивидуальные значения $uKIM-1/Cre$ колебались в более узком интервале вариативных значений, чем значения $uKIM-1$: коэффициенты вариации величин, полученные в динамике в каждом отдельно взятом случае, для $uKIM-1$ составили 29%, 46% и 54%, для $uKIM-1/Cre$ – 23%, 25% и 31%, соответственно.

Полученные данные служат свидетельством в пользу необходимости учитывать фактор концентрации мочи и нормировать $uKIM-1$ на содержание в моче креатинина при использовании $uKIM-1$ как биологического маркера ПКТР.

Обсуждение. Поиск биологических маркеров, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, в вы-

деляемой организмом больных моче осуществляется не менее интенсивно, чем изучение циркулирующих маркеров. Это обусловлено, с одной стороны, неинвазивностью и простотой получения образцов биологического материала, а с другой стороны – с разнообразным и не до конца исследованным на сегодняшний день метаболизмом мочи.

Почки регулируют водный баланс организма за счет двух разнонаправленных процессов – фильтрации первичной мочи в клубочках и реабсорбции воды и ряда веществ в канальцах. Концентрация мочи, в отличие от плазмы крови, может варьировать в сравнительно широких пределах. При определении биологических маркеров в моче их количество, как правило, нормируют на содержание в моче креатинина, тем самым учитывая разведение выделяемой жидкости. Однако такой подход не является непреложным условием. В отношении каждого из маркеров вопрос о нормировании его на концентрацию мочи обсуждается «индивидуально», а решение этого вопроса зависит от механизмов появления

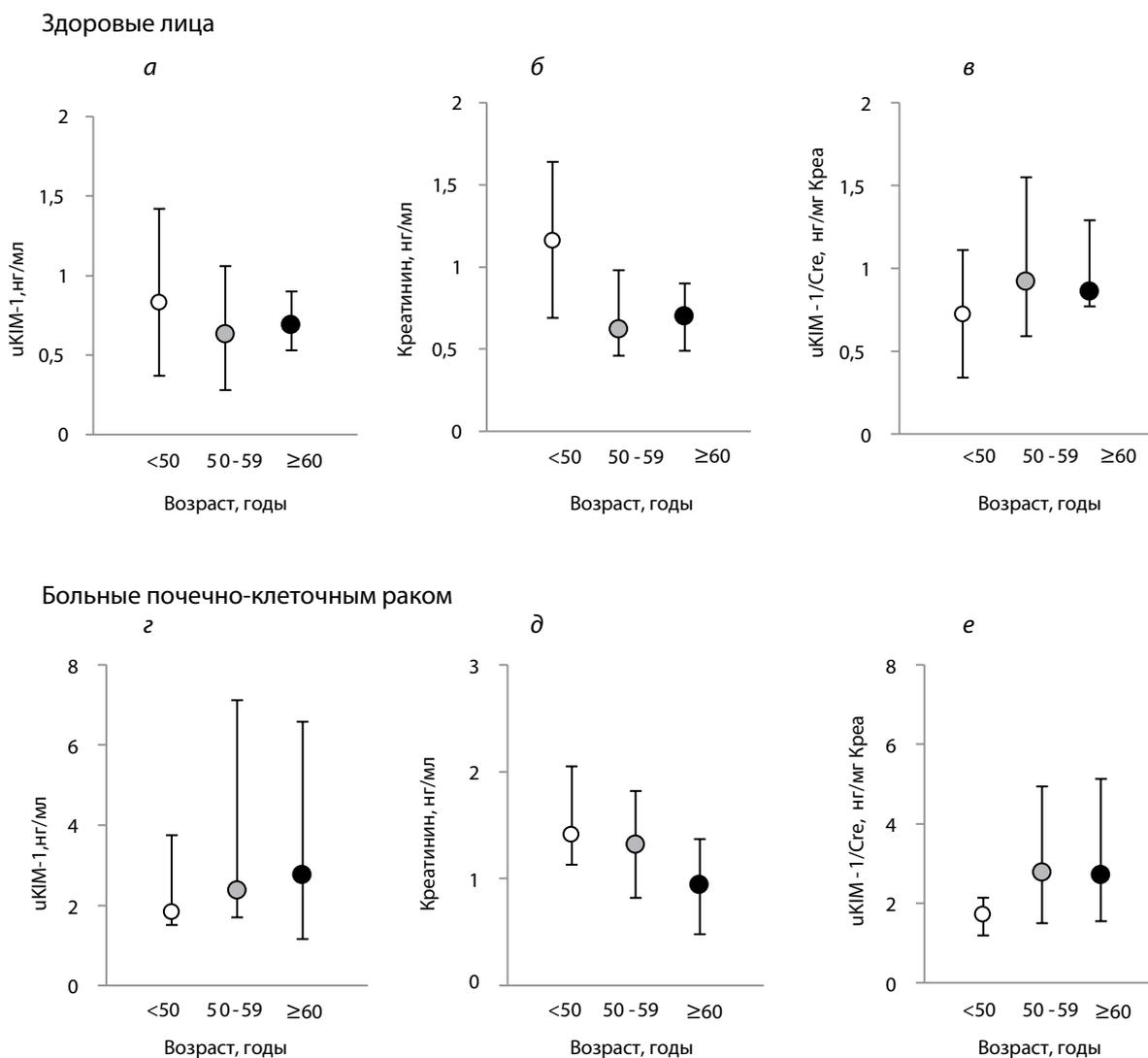


Рис. 1. Уровни $uKIM-1$, креатинина мочи и $uKIM-1$, нормированного на креатинин мочи ($uKIM-1/Cre$), у здоровых лиц (а, б, в) и больных почечно-клеточным раком (г, д, е) в зависимости от возраста. Здесь и на рис. 2, 3: представлены медианы (центральные символы), верхние и нижние квартили (границы вертикальных линий).

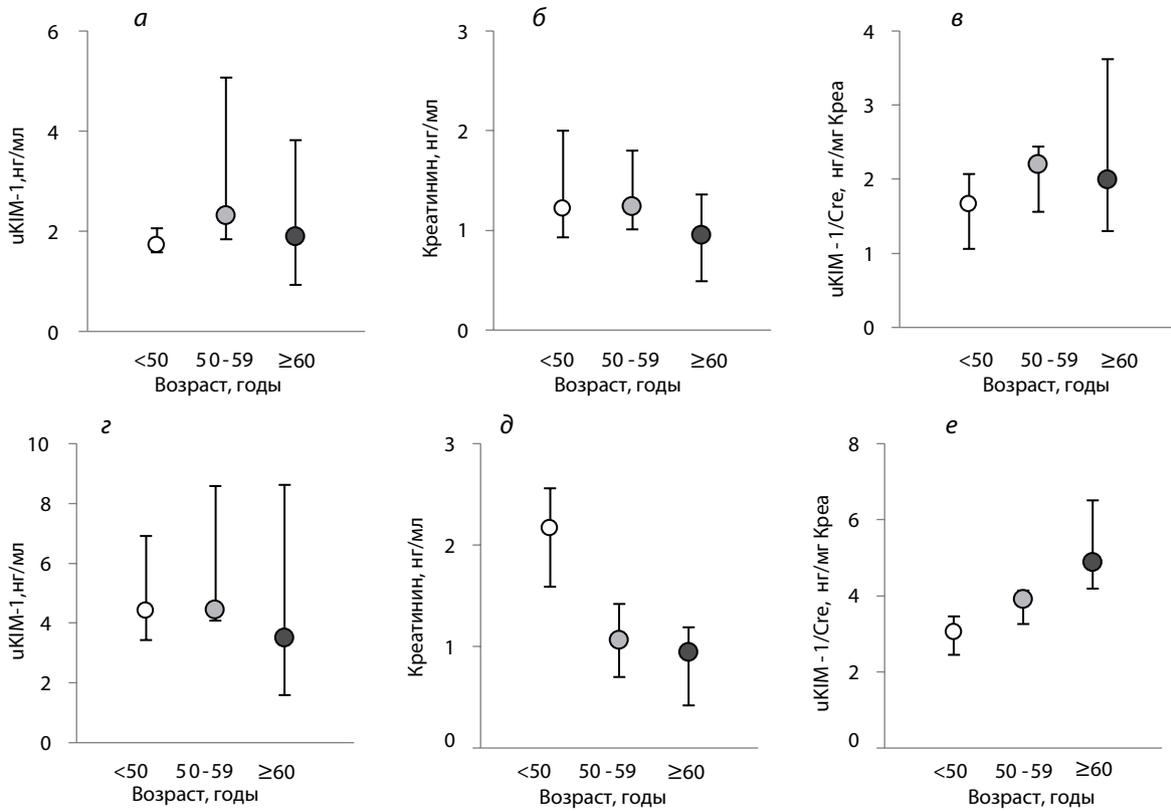


Рис. 2. Уровни uKIM-1, креатинина мочи и uKIM-1, нормированного на креатинин мочи (uKIM-1/Cr), у больных почечно-клеточным раком I стадии (а, б, в) и у больных со II, III или IV стадией заболевания (г, д, е) в зависимости от возраста.

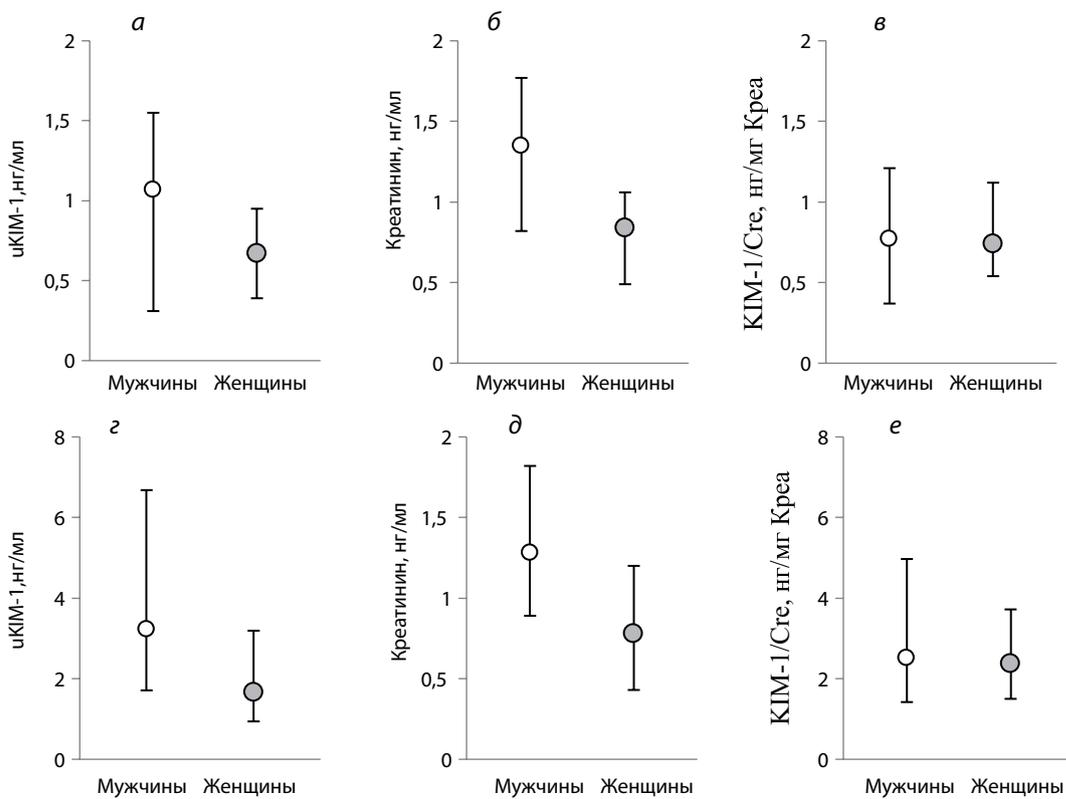


Рис. 3. Уровни uKIM-1, креатинина мочи и uKIM-1, нормированного на креатинин мочи (uKIM-1/Cr), у здоровых лиц (а, б, в) и больных почечно-клеточным раком (г, д, е) в зависимости от пола.

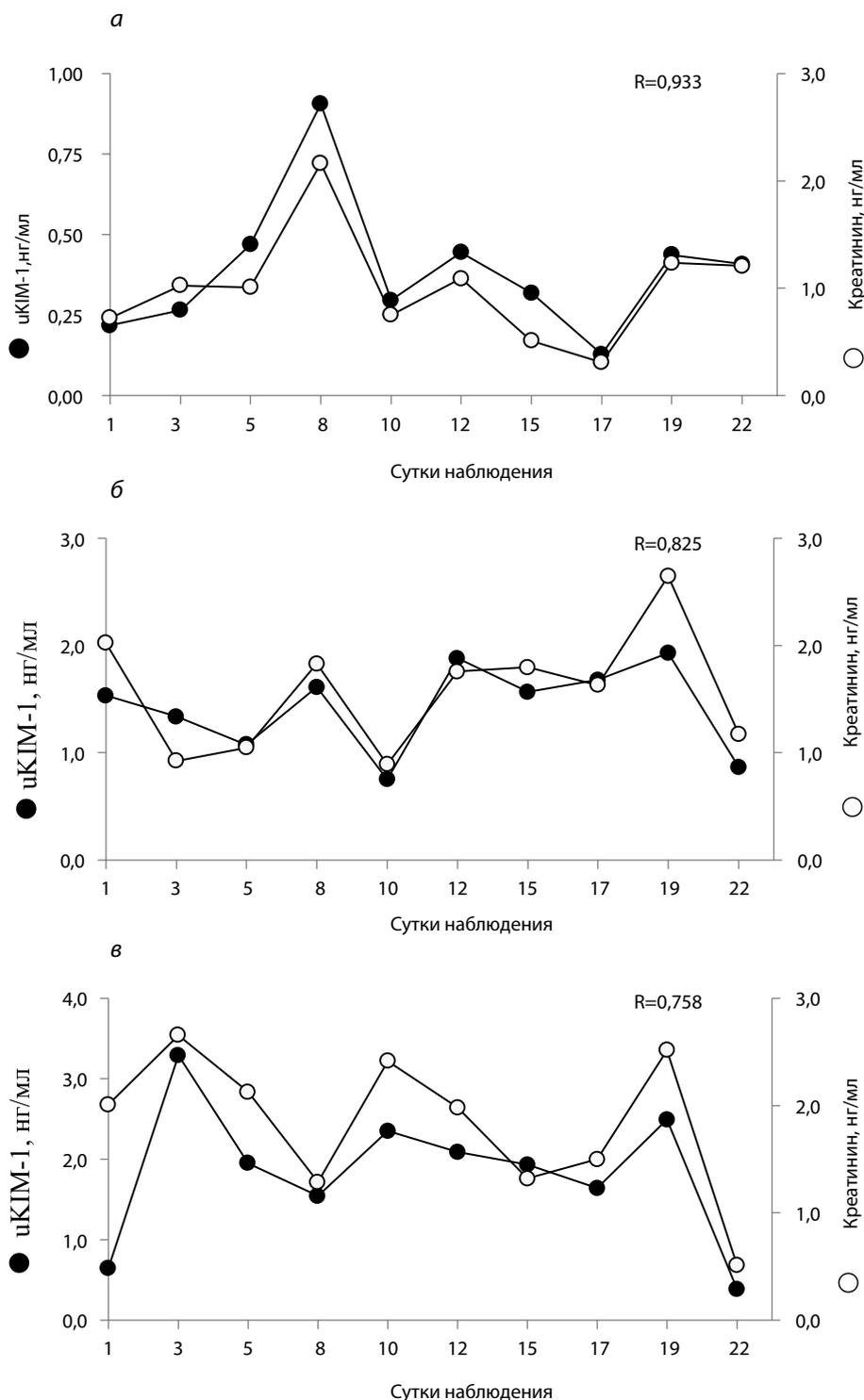


Рис. 4. Изменения концентраций КИМ-1 (темные символы) и креатинина (светлые символы) в моче здоровых лиц на протяжении 3-х недель (а, б и в – индивидуальные динамики показателей у трех добровольцев). По оси абсцисс – сутки наблюдения; по оси ординат – концентрация uKIM-1 (нг/мл) и креатинина (нг/мл). R – коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

и регуляции содержания конкретного вещества в моче. Так, S.S. Waikar и соавт. [20] считают, что нормирование необходимо, если уровень экскреции маркера и креатинина линейно связаны в норме. В частности, нормирование на креатинин используют при оценке в моче уровня альбумина или маркеров повреждения тубулярного ап-

парата почек; в то же время это не считается корректным, если гломерулярная функция почек нарушена [20].

В настоящей работе сделана попытка оценить необходимость нормирования на креатинин концентрации в моче гликопротеина КИМ-1, в аспекте его возможного использования в качестве маркера ПКР. Постановка про-

блемы обусловлена тем, что в норме содержание в моче креатинина и uKIM-1 отражают разные физиологические процессы: креатинин – клубочковую фильтрацию, а uKIM-1 – функциональное состояние проксимальных канальцев, что является основным доводом в дискуссии о целесообразности нормирования uKIM-1 на креатинин мочи [20]. Однако при разных патологических состояниях такое однозначное понимание клинического значения uKIM-1 и креатинина мочи может быть неполным.

Считается, что основным источником KIM-1 в моче при почечной недостаточности является поврежденный эпителий проксимальных канальцев [3, 22, 23], а при светлоклеточном ПКР – опухолевые клетки, производные измененного эпителия этих канальцев [8, 22]. Однако при этом нельзя исключить фильтрацию KIM-1 или его фрагментов из плазмы крови через почечные клубочки. Так, по данным отдельных исследований, при злокачественных опухолях внепочечной локализации концентрации KIM-1 повышены не только в плазме, но и в моче [18]. С другой стороны, креатинин в некоторых количествах может секретироваться в мочу эпителием канальцев, а при почечной недостаточности может реабсорбироваться в кровяной ток через поврежденный эпителий [23]. Принимая во внимание, что несколько транспортных процессов могут регулировать концентрации KIM-1 и креатинина в моче, вопрос о необходимости нормирования KIM-1 на креатинин мочи у пациентов с конкретными заболеваниями, по-видимому, наиболее правильно решать эмпирически – путем исследования его сравнительной диагностической ценности каждого отдельно взятого показателя.

В ходе исследования нами выявлено, что оценка величин uKIM-1/Cre, в отличие от uKIM-1, позволяет более достоверно дифференцировать начальную I стадию ПКР и более распространенные стадии заболевания. Анализ данных, полученных с учетом возраста и пола пациентов, также представил ряд аргументов в пользу того, что в качестве биологического маркера, ассоциированного с ПКР, показатель uKIM-1/Cre имеет определенное преимущество по сравнению с uKIM-1. Так, по данным литературы, в норме содержание KIM-1 в моче у мужчин выше, чем у женщин, и линейно увеличивается с возрастом [24, 25]. В ходе нашего исследования установлено, что нормирование uKIM-1 на креатинин увеличивает небольшие гендерные различия, имеющие место для uKIM-1, как среди здоровых лиц, так и среди больных ПКР. Кроме того, использование нормированных величин uKIM-1 позволяет уменьшить разнонаправленные вариации показателя в возрастных группах как у здоровых лиц, так и у пациентов, и воспроизвести тенденцию к повышению uKIM-1 с возрастом, описанную в литературе и подтвержденную в настоящей работе.

Самым значимым аргументом в пользу нормирования оказалось то, что у здоровых лиц в течение трех недель наблюдения индивидуальные колебания uKIM-1 и креатинина мочи происходят синхронно, то есть в равной степени зависят от одного общего параметра – концентрации разовой порции мочи. Наличие прочной взаимосвязи uKIM-1 с концентрацией креатинина в моче у здоровых людей подтверждает целесообразность нормирования uKIM-1 на креатинин мочи у больных ПКР.

Заключение. При исследовании uKIM-1 как урологического опухолеассоциированного маркера ПКР необходимо нормирование его уровня на креатинин мочи и использование показателя uKIM-1/Cre.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания № 056-00008-21-00 ПР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3–10, 12, 14–25
см. REFERENCES)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.
- Рак паренхимы почки. Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Available at: http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak_pochki_pr2018.pdf
- Кануков К.Ю., Сергеева Н.С., Кармакова Т.А., Маршутина Н.В., Солохина М.П., Нюшко К.М. и др. KIM-1 (kidney injury molecule 1) в моче больных почечно-клеточным раком. *Онкоурология*. 2020; 16(3): 21-8. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2020-16-3-21-8>
- Герштейн Е.С., Набережных Д.С., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Фролова Н.Ф., Матвеев В.Б. и др. Клиническое значение молекулы повреждения почек KIM-1 в плазме крови больных почечно-клеточным раком. *Онкоурология*. 2020; 16(4): 39-47. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2020-16-4-39-47>

REFERENCES

- Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V., eds. Malignant neoplasms in Russia in 2018. Moscow. P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Branch of NMRC of Radiology, Ministry of Health of the Russian Federation; 2019. (in Russian)
- Cancer of kidney parenchyma. Clinical guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation. Available at: http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak_pochki_pr2018.pdf. (in Russian)
- Ichimura T., Bonventre J.V., Bailly V., Wei H., Hession C.A., Cate R.L. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(7): 4135-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4135>
- Bonventre J.V. Kidney injury molecule-1: a translational journey. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2014; 125: 293-9; discussion 299.
- Griffin B.R., Faubel S., Edelstein C.L. Biomarkers of drug-induced kidney toxicity. *Ther. Drug. Monit.* 2019; 41(2): 213-26. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000589>
- Waikar S.S., Sabbiseti V., Ärnlov J., Carlsson A.C., Coresh J., Feldman H.I. et al. Relationship of proximal tubular injury to chronic kidney disease as assessed by urinary kidney injury molecule-1 in five cohort studies. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2016; 31(9): 1460-70. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw203>
- Moresco R.N., Bochi G.V., Stein C.S., De Carvalho J.A.M., Cembranel B.M., Bollick Y.S. Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin Chim Acta.* 2018; 487: 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.09.011>
- Han W.K., Alinani A., Wu C.L., Michaelson D., Loda M., McGovern F.J. et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16(4): 1126-34. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004070530>
- Morrissey J.J., London A.N., Lambert M.C., Kharasch E.D. Sensitivity and specificity of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 for the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am. J. Nephrol.* 2011; 34(5): 391-8. <https://doi.org/10.1159/000330851>
- Mijuskovic M., Stanojevic I., Milovic N., Cerovic S., Petrovic D., Maksic D. et al. Tissue and urinary KIM-1 relate to tumor characteristics in patients with clear renal cell carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* 2018; 50(1): 63-70. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1724-6>
- Kanukov K.Yu., Sergeeva N.S., Karmakova T.A., Marshutina N.V., Solohina M.P., Nyushko K.M. et al. KIM-1 (kidney injury molecule 1) in the urine of renal cell carcinoma patients. *Onkourologiya*.

- 2020; 16(3): 21–8. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2020-16-3-21-28> (in Russian)
12. Scelo G., Muller D.C., Riboli E., Johansson M., Cross A.J., Vineis P. et al. KIM-1 as a blood-based marker for early detection of kidney cancer: a prospective nested case-control study. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24(22): 5594–5601. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1496>
 13. Gershtein E.S., Naberezhnov D.S., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Frolova N.F., Matveev V.B. et al. Clinical implication of kidney injury molecule (KIM-1) in blood plasma of renal-cell cancer patients. *Onkourologiya.* 2020; 16(4):39-47. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2020-16-4-39-47> (in Russian)
 14. George B., Wen X., Mercke N., Gomez M., O'Bryant C., Bowles D.W. et al. Time-dependent changes in kidney injury biomarkers in patients receiving multiple cycles of cisplatin chemotherapy. *Toxicol. Rep.* 2020; 7: 571-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.003>
 15. Ghadrani E., Ebrahimpour S., Sadighi S., Chaibakhsh S., Jahangard-Rafsanjani Z. Evaluation of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and urinary kidney injury molecule-1 as biomarkers of renal function in cancer patients treated with cisplatin. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2020; 26(7): 1643-49. <https://doi.org/10.1177/1078155220901756>
 16. Shinke H., Masuda S., Togashi Y., Ikemi Y., Ozawa A., Sato T. et al. Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2015; 76(5): 989-96. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2880-y>
 17. Shao X., Tian L., Xu W., Zhang Z., Wang C., Qi C. et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084131>
 18. Maeda A., Ando H., Ura T., Muro K., Aoki M., Saito K. et al. Differences in urinary renal failure biomarkers in cancer patients initially treated with cisplatin. *Anticancer Res.* 2017; 37(9): 5235-9. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11947>
 19. Waikar S.S., Sabbiseti V.S., Bonventre J.V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010; 78(5): 486-94. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.165>
 20. Perucca J., Bouby N., Valeix P., Bankir L. Sex difference in urine concentration across differing ages, sodium intake, and level of kidney disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292(2):R700-5. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00500.2006>
 21. Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A., Stevens J.L., Bonventre J.V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004; 286(3): F552-F563. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2002>
 22. Zhang P.L., Rothblum L.I., Han W.K., Blasick T.M., Potdar S., Bonventre J.V. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int.* 2008; 73: 608-14. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002697>
 23. Musso C.G., Michelangelo H., Vilas M., Reynaldi J., Martinez B., Algranati L. et al. Creatinine reabsorption by the aged kidney. *Int. Urol. Nephrol.* 2009; 41(3): 727-31. <https://doi.org/10.1007/s11255-008-9508-7>
 24. Huang Y., Tian Y., Likhodii S., Randell E. Baseline urinary KIM-1 concentration in detecting acute kidney injury should be interpreted with patient pre-existing nephropathy. *Pract. Lab. Med.* 2019; 15:e00118. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00118>
 25. Pennemans V., Rigo J.M., Faes C., Reynders C., Penders J., Swennen Q. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(9): 1795-802. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0157>

Поступила 02.06.21
Принята к печати 24.06.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Умнягина И.А., Блинова Т.В., Страхова Л.А., Иванова Ю.В., Трошин В.В., Колесов С.А., Фомина Ю.Н.

ЭНДОТЕЛИН-1 И МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА В ДИАГНОСТИКЕ РИСКА АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ЛИЦ МОЛОДОГО И СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА, РАБОТАЮЩИХ ВО ВРЕДНЫХ УСЛОВИЯХ ТРУДА

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, 603105, Нижний Новгород, Россия

Артериальная гипертензия является важной проблемой общественного здравоохранения. Одна из причин, способствующих развитию артериальной гипертензии – дисфункция эндотелия, которая выражается в дисбалансе вазоактивных показателей сосудистого тонуса – оксида азота и эндотелина-1. Мониторинг показателей эндотелиальной дисфункции у работающих в условиях воздействия вредных производственных факторов позволит выявить группу риска развития производственно обусловленных заболеваний сердечно-сосудистой системы и, в частности, артериальной гипертензии, для своевременного проведения профилактических мероприятий. Цель данной работы – выявить взаимосвязь между эндотелином-1, метаболитами оксида азота и уровнем артериального давления у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда, дать оценку изученным показателям как возможным маркерам диагностики риска артериальной гипертензии. Обследованы 236 работников молодого и среднего возраста одного из металлургических заводов Нижегородской области. Для характеристики состояния тонуса сосудов был использован коэффициент, представляющий величину отношения концентрации оксида азота (мкмоль/л) к эндотелину-1 (пг/мл) (NOx/ЭТ-1). Выявлено, что у одной трети лиц с нормальным и высоким нормальным артериальным давлением величина NOx/ЭТ-1 была меньше в 2-3 раза, чем у лиц с оптимальным артериальным давлением, что говорит о явлениях эндотелиальной дисфункции и возможном развитии стойкой артериальной гипертензии. Выявлено, что вредные производственные факторы негативно влияют на сосудистый тонус – величина NOx/ЭТ-1 у лиц, подвергавшихся воздействию вредных факторов, была меньше в 3-4 раза, чем у лиц, не подвергавшихся такому воздействию. Коэффициент NOx/ЭТ-1 можно применять в качестве информативного показателя при мониторинге за состоянием здоровья при углубленном обследовании работающих лиц, он может являться критерием риска развития артериальной гипертензии.

Ключевые слова: вредные производственные факторы; эндотелин-1; метаболиты оксида азота; артериальная гипертензия

Для цитирования: Умнягина И.А., Блинова Т.В., Страхова Л.А., Иванова Ю.В., Трошин В.В., Колесов С.А., Фомина Ю.Н. Эндотелин-1 и метаболиты оксида азота в диагностике риска артериальной гипертензии у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 525-532. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-525-532>

Для корреспонденции: Блинова Татьяна Владимировна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. клинического отдела; e-mail: btvdn@yandex.ru

Umnyagina I.A., Blinova T.V., Strakhova L.A., Ivanova Yu.V., Troshin V.V., Kolesov S.A., Fomina Yu.N.

ENDOTHELIN-1 AND NITROGEN OXIDE METABOLITES IN RISK DIAGNOSTICS OF ARTERIAL HYPERTENSION IN PERSONS OF YOUNG AND MIDDLE AGES OCCUPIED IN HARMFUL WORKING CONDITIONS

FBSI «Nizhny Novgorod Research Institute for Hygiene and Occupational Pathology», Rospotrebnadzor, 603105, Nizhny Novgorod, Russia

Hypertension is a global public health problem. One of the reasons contributing to the development of arterial hypertension is endothelial dysfunction, which is expressed in the imbalance of vasoactive indicators of vascular tone – nitrogen oxide and endothelin-1. Monitoring the indicators of endothelial dysfunction in workers exposed to harmful occupational factors will help to identify a risk group for the development of occupationally caused diseases of the cardiovascular system and, in particular, arterial hypertension, for early implementation of preventive measures. This study aims to identify the relationship between endothelin-1, nitrogen oxide metabolites and blood pressure in young and middle-aged people occupied in harmful working conditions, to evaluate the studied parameters as possible markers for diagnosing the risk of hypertension. Two hundred thirty-six (236) employees of young and middle age were examined of one of the metallurgical plants of the Nizhny Novgorod region. In order to characterize the state of vascular tone, a coefficient was used that represents the ratio of the concentration of nitrogen oxide ($\mu\text{mol/L}$) to endothelin-1 (pg/ml) (NOx/ET-1). It was revealed that in one-third of people with normal and high normal blood pressure, the NOx/ET-1 value was 2-3 times less than in people with optimal blood pressure, which indicates the occurrence of endothelial dysfunction and the possible development of persistent arterial hypertension. Harmful occupational factors negatively affect vascular tone – the value of NOx/ET-1 in individuals exposed to harmful factors was 3-4 times less than in individuals not subjected to such exposure. The NOx/ET-1 coefficient can be used as an informative indicator when monitoring health conditions with an in-depth examination of working people; it can be a criterion for the risk of developing hypertension.

Key words: harmful production factors; endothelin-1; arterial hypertension; nitric oxide metabolites

For citation: Umnyagina I.A., Blinova T.V., Strakhova L.A., Ivanova Yu.V., Troshin V.V., Kolesov S.A., Fomina Yu.N. Endothelin-1 and nitrogen oxide metabolites in risk diagnostics of arterial hypertension in persons of young and middle ages occupied in harmful working conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 525-532 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-525-532>

For correspondence: Blinova T.V., Dr. Sci. Med., the leading research scientist of the clinical department; e-mail: btvdn@yandex.ru

Information about authors:

Umnyagina I.A., <http://orcid.org/0000-0002-9276-7043>
Blinova T.V., <http://orcid.org/0000-0001-5254-9378>
Strakhova L.A., <http://orcid.org/0000-0003-0672-6622>
Ivanova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0002-1251-4610>
Troshin V.V., <http://orcid.org/0000-0002-7077-0014>
Kolesov S.A., <http://orcid.org/0000-0003-4379-0228>
Fomina Yu.N., <http://orcid.org/0000-0003-0705-7379>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 21.05.2021
Accepted 21.06.2021

Эндотелий кровеносных сосудов играет ключевую роль в поддержании гомеостаза сердечно-сосудистой системы, высвобождая ряд вазоактивных факторов, которые регулируют тонус, рост, ремоделирование сосудов, поддерживают состояние сосудистой стенки и характер кровотока, а также противовоспалительные, антиоксидантные и гемостатические реакции [1, 2]. В нормальных физиологических условиях эндотелий активируется механически: напряжением сдвига, создаваемым потоком крови или растяжением сосуда под ее давлением. Эндотелиальные клетки чувствуют напряжение сдвига от циркулирующей крови с помощью механосенсорных молекул или их комплексов, присутствующих на мембране эндотелиальных клеток и передающих механосигналы в гладкомышечные клетки. Именно от различного уровня напряжения сдвига и состояния механосенсоров зависит сбалансированный синтез вазоконстрикторов и компонентов, обуславливающих расслабление сосудов и поддерживающих нормальное артериальное давление (АД). Биомеханические основы эндотелиальной дисфункции (ЭД) в настоящее время интенсивно изучаются [3]. Нарушение экспрессии или структуры механосенсоров приводят к измененной механотрансдукции и возникновению ЭД. При этом нарушаются регуляторные свойства эндотелия, происходит ослабление NO-зависимых механизмов, усиливается влияние эндотелинов, ангиотензина и других вазоконстрикторов, возникают условия для атеросклеротического изменения сосудов, повышается общее периферическое сосудистое сопротивление, что вносит существенный вклад в развитие гипертензии, ишемии, тромбозов и атеросклероза [4,5]. Дисфункция эндотелия описана при многих заболеваниях и факторах риска, способствующих развитию артериальной гипертензии (АГ), таких, как атеросклероз, сахарный диабет, ожирение, почечная недостаточность, пожилой возраст, курение, гиперхолестеринемия, гипергомоцистеинемия [6]. АГ является важной проблемой общественного здравоохранения из-за ее высокой распространенности и сопутствующего риска сердечно-сосудистых заболеваний. К настоящему времени повышенное АД констатируется все чаще у лиц молодого возраста и даже подростков [7, 8]. Несмотря на то, что в лечении гипертензии достигнуты значительные успехи, точная причина возникновения эссенциальной гипертензии остается неясной [9]. Патогенетические механизмы развития АГ и связанных с ней других заболеваний сердечно-сосудистой системы сложны, а выявление их на начальных этапах развития особенно у лиц молодого возраста, у которых компенсаторно-приспособительные механизмы достаточно высоки, является трудной задачей врача

и исследователя. В связи с чем, АГ ставится на поздних стадиях развития болезни [10, 11]. Вопрос о причинно-следственной связи между ЭД и повышением АД до настоящего времени остается нерешенным и широко обсуждается исследователями. По мнению большинства авторов, при ЭД, вызванной повреждением или активацией эндотелия, происходит избыточная продукция вазоконстрикторов, в частности эндотелина-1 (ЭТ-1), что приводит к повышению АД с последующим развитием сердечно-сосудистой патологии [12]. Широко признано, что многочисленные заболевания сердечно-сосудистой системы связаны с повышением ЭТ-1-зависимого тонуса сосудов и дисбалансом между оксидом азота (NO) и ЭТ-1. Этот дисбаланс вызывает изменения в динамической регуляции тонуса сосудов с помощью ЭТ-1, на первоочередную роль которого в изменении кровотока указывают экспериментальные и клинические исследования [13, 14]. Процессу вазоконстрикции, вызванной ЭТ-1, противодействуют вазодилататоры, к которым относится NO – один из важнейших эндотелиальных факторов релаксации [15]. Поток крови обеспечивает постоянную секрецию эндотелием небольших количеств NO [16]. Способность к продукции NO служит маркером нормального функционального состояния эндотелия: снижение концентрации NO в здоровом организме может привести к сужению сосудов и повышению уровня АД. В связи с чем многие исследователи предполагают, что ЭД и избыток вазоконстрикторов являются ранним событием в патофизиологии АГ [17, 18]. Предшествуя развитию АГ, ЭД может стать перспективной терапевтической мишенью для лечения гипертензии [4, 9, 19]. Меньшее число исследователей считает, что большую роль в поддержании тонуса сосудов и нормального АД в физиологических условиях играет постоянный выброс NO, а не содержание ЭТ-1, которое меняется в зависимости от состояния рецепторов на гладких мышцах. ЭТ-1 имеет более ограниченное влияние на регуляцию сосудистого тонуса, так как сужение сосудов уменьшается под влиянием NO, который с одной стороны ингибирует синтез ЭТ-1, с другой – непосредственно воздействует на сосуды, вызывая их дилатацию. Если бы ЭТ-1 был основным регулятором АД, то эффект его действия был бы более устойчивым и постоянным, а не динамическим [3]. В экспериментальных исследованиях было показано, что ингибирование NO синтазы и циклооксигеназы не вызывало даже минимального сужения сосудов. В результате не происходит уменьшения эндотелийзависимого расслабления артерий, опосредуемого NO, тем самым АД может сохраняться на нормальном уровне. У пациентов с АГ некоторые исследователи вообще не обнаруживали нарушений эндотелийзависимого расслабления

сосудов предплечья в ответ на ацетилхолин. Возможно, что в этом случае, ЭД является скорее следствием, чем причиной повышенного АД [20]. При тяжелой ЭД, когда продукция эндотелием NO практически полностью отсутствует, эндотелийзависимые вазодилататоры (ацетилхолин, брадикинин, серотонин и другие) начинают проявлять противоположные эффекты – вызывать так называемый «парадоксальный вазоспазм», обусловленный их прямым воздействием на гладкомышечные рецепторы. Такое состояние возникает при осложненной АГ [21]. Большой теоретический и практический интерес представляют исследования, направленные на изучение влияния вредных производственных факторов на функцию эндотелия и риск повышения АД у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда [22, 23]. Так, различного рода промышленные аэрозоли, химические вещества, с которыми контактируют в процессе профессиональной деятельности работники металлургической, машиностроительной, горнодобывающей промышленности, сельского хозяйства могут повреждать клетки эндотелия легких, нарушать баланс между выработкой вазоконстрикторов и вазодилататоров, и способствовать возникновению ЭД, следствием которой может быть повышение АД и развитие сердечно-сосудистой патологии. Результаты, полученные путем мета-анализа, убедительно показали, что производственный шум приводит через раздражение симпатической и эндокринной систем к повышению АД, частоты сердечных сокращений, увеличению уровня гормонов стресса, к более сильному окислительному стрессу и ЭД [24, 25]. Мониторинг показателей ЭД у работающих в условиях воздействия вредных производственных факторов позволит выявить группу риска развития производственно обусловленных заболеваний сердечно-сосудистой системы и, в частности, АГ, что является крайне важным для своевременного проведения профилактических мероприятий и для продления трудовой деятельности и увеличения продолжительности жизни работающих.

Цель исследования – выявить взаимосвязь между эндотелином-1, метаболитами оксида азота и уровнем артериального давления у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда, дать оценку изученным показателям как возможным маркерам диагностики риска артериальной гипертензии.

Материал и методы. Обследованы 236 работников одного из металлургических заводов Нижегородской области – мужчины в возрасте от 25 до 51 года. Стаж работы на данном производстве колебался в пределах от 5 до 10 лет. Работники проходили углубленный периодический медицинский осмотр в консультативной поликлинике ФБУН «ННИИГП» Роспотребнадзора. В зависимости от вида и характера вредных производственных факторов обследуемые были разделены на 2 группы: 1-я группа (120 человек в возрасте 38,6±8,3 лет) подвергалась воздействию производственного шума; 2-я группа (116 человек в возрасте 39,1±9,5 лет) контактировала с промышленными сварочными и кремний содержащими аэрозолями. Оценка труда проводилась в соответствии с ФЗ № 426 от 28.12.2013 г. «О специальной оценке условий труда». Согласно данной оценке уровень производственного шума на рабочем месте был выше предельно допустимого (более 80 дБА). Концентрация аэрозоля в воздухе рабочей зоны, по материалам специальной оценки, непостоянно превышала предельно допусти-

мые концентрации и находилась в пределах, соответствующих классу условий труда 3.1. Группу сравнения (3-я группа) составили мужчины (34 человека в возрасте 43,3±9,6 лет), которые в своей трудовой деятельности не подвергались воздействию вредных производственных факторов – работники рекламного агентства, менеджеры, занимающиеся размещением наружной рекламы в городе и области. По возрасту группы обследуемых не различались ($p > 0,05$). В исследование не включались лица с острыми инфекционными и воспалительными заболеваниями, злокачественными новообразованиями, сахарным диабетом (СД2), обострениями хронических заболеваний. Участники дали добровольное информированное согласие на обследование и опубликование полученных результатов. Проведенная работа не ущемляла права и не подвергала опасности обследованных лиц в соответствии с требованиями биомедицинской этики, предъявляемыми Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Оценка уровней АД проводилась согласно «Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению артериальной гипертензии»: оптимальное – систолическое АД < 120 мм рт. ст. и диастолическое АД < 80 мм рт. ст.; нормальное и высокое нормальное – 120–139 мм рт. ст. и 80–89 мм рт. ст.; высокое – 140 мм рт. ст. и более и 90 мм рт. ст. и более [26]. Концентрация эндотелина 1 (ЭТ-1) в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов для иммуноферментного анализа «Endotelin (1-21)» фирмы «Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG» (Австрия) по методике, описанной производителем. Диапазон референтных значений эндотелина-1 в сыворотки крови здоровых доноров составил 1,0 – 3,5 пг/мл. Содержание оксида азота (NO) оценивали по его стабильным метаболитам в депротенизированной сыворотке крови – суммарной концентрации нитрит- и нитрат-ионов (NOx) по реакции диазотирования сульфаниламида (с реактивом Грисса) при предварительном восстановлении нитрат-ионов в нитрит с помощью хлорида ванадия (VCl_3) методом В.А. Метельской и Н.Г. Гумановой [27]. Диапазон референтных значений концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови здоровых доноров составил 9,0 – 50,0 мкмоль/л. Кровь у обследованных лиц брали утром натощак из срединной локтевой вены, образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Сыворотки экстрагировались и хранились при температуре минус 80°C. Для оценки состояния вазоактивной системы NO – ЭТ-1 использован показатель отношения концентрации метаболитов оксида азота к концентрации Эндотелина-1: NOx (мкмоль/л)/ЭТ-1 (пг/мл) [отн. ед.]. Данный коэффициент указывает на дисбаланс между процессами вазоконстрикции и вазодилатации и возможность риска развития сердечно-сосудистой патологии [28,29]. Статистический анализ выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) и пакета R (версия 3.2.3) непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей (Med±IQR (25 – 75%)). Критический уровень значимости результатов исследования принимался при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показали, что у одной трети обследуемых лиц во всех группах констатировалось нормальное АД и у одной

трети – высокое АД. Различия в величине АД между группами обследуемых были выявлены в частоте обнаружения оптимального АД – с наибольшей частотой оптимальное давление определялось у лиц 2-й группы, контактирующих с промышленными аэрозолями (16,3%), с наименьшей – у лиц 1-й группы, работающих в условиях воздействия шума (10,0%). Следует обратить внимание на число лиц с высоким нормальным давлением, т.к. именно эти лица относятся к предгипертоникам: 23,3% лиц 1-й группы, 14,7% 2-й группы и 17,6% 3-й группы. Данные представлены в табл. 1.

Результаты исследования взаимосвязи концентрации ЭТ-1 в сыворотке крови и величины АД в группах обследуемых представлены табл. 2 и 3.

Проведенные исследования выявили достоверные различия в содержании ЭТ-1 в сыворотке крови работников, контактирующих с вредными производственными факторами (группы 1 и 2), относительно работающих в условиях отсутствия вредного фактора (группа 3) ($p_{1-3} = 0,0006$; $p_{2-3} = 0,0007$). Содержание ЭТ-1 в сыворотке крови у лиц 3-й группы было в 1,8 раза ниже относительно его уровня в первых двух группах. Не было выявлено различий в концентрациях ЭТ-1 в сыворотке крови работающих между группами 1 и 2 ($p_{1-2} = 0,23$). Анализ концентрации ЭТ-1 при разной величине АД показал, что с увеличением АД содержание ЭТ-1 в сыворотке крови увеличивалось во всех трех группах об-

следуемых. Наибольшие концентрации ЭТ-1 были выявлены при высоком АД (140 / 90 и более) – 5,84 (2,76 – 10,88); 5,52 (3,0 – 11,5); 2,61 (2,05 – 2,84) в первой, второй и третьей группах соответственно относительно его концентраций при оптимальном и нормальном уровнях АД ($p^* = 0,02$; 0,02; 0,03). Концентрация ЭТ-1 в группе сравнения при разном уровне АД была достоверно ниже его концентрации в сыворотке крови лиц 1 и 2-й групп. Различий в концентрации ЭТ-1 при разных уровнях АД между 1 и 2-й группами не было выявлено ($p > 0,05$). Выявлены различия в частоте обнаружения повышенного уровня ЭТ-1 (более 3,5 пг/мл) в сыворотке крови обследованных лиц разных групп в зависимости от величины АД (табл. 3).

Проведённые исследования показали, что у лиц, имеющих оптимальное АД, во всех трёх группах не наблюдалось повышенного содержания ЭТ-1. При высоком АД уровень ЭТ-1 более 3,5 пг/мл выявлялся с наибольшей частотой у обследуемых всех трех групп. Обращают на себя внимание лица с высоким нормальным АД: уровень ЭТ-1 превышал референсные границы у 46,4% обследуемых 1-й группы и у 35,3% 2-й группы, в то время как в группе сравнения превышение величины ЭТ-1 более 3,5 пг/мл наблюдалось только у 16,7% обследуемых. У обследуемых 1-й группы доля лиц с повышенным уровнем ЭТ-1 в сыворотке крови увеличилась с ростом уровня АД в 5,9 раз, у 2-й группы – в 2,2 раза. Ана-

Таблица 1

Частота выявления различных уровней АД у работающих в разных условиях труда, абс. (%)

Показатели	1-я группа (n=120)	2-я группа (n=116)	3-я группа (n=34)
	Частота обнаружения АД, абс. (%)		
АД (мм рт. ст.)			
менее 120 / 80	12 (10,0)	19 (16,4)	5 (14,7)
120-129 / 80-84	39 (32,5)	41 (35,3)	11 (32,3)
130-139 / 85-89	28 (23,3)	17 (14,7)	6 (17,6)
140 / 90 и более	41 (34,2)	39 (33,6)	12 (35,3)

Примечание. Здесь и в табл. 2-5: n – число обследованных.

Таблица 2

Концентрация ЭТ-1 в сыворотке крови работающих в разных условиях труда и его зависимость от величины АД, (Med±IQR (25 – 75%))

Показатели	1-я группа (n=120)	2-я группа (n=116)	3-я группа (n=34)	p
Концентрация ЭТ-1 (пг/мл)	3,00 (2,36 – 7,20)	3,21 (2,57 – 6,78)	1,80 (1,08 – 2,20)	$p_{1-2} = 0,23$; $p_{1-3} = 0,0006$; $p_{2-3} = 0,0007$
АД (мм рт. ст.)	Концентрация ЭТ-1 (пг/мл)			
менее 120 / 80	2,18 (2,08 – 3,6) n=12	2,68 (2,38 – 2,76) n=19	1,21 (0,9 – 1,4) n=2	$p_{1-2} = 0,21$; $p_{1-3} = 0,004$; $p_{2-3} = 0,003$
120-129 / 80-84	2,38 (2,24 – 3,36) n=39	3,24 (3,0 – 6,96) n=41	1,23 (1,0 – 1,4) n=11	$p_{1-2} = 0,011$; $p_{1-3} = 0,0005$; $p_{2-3} = 0,0006$
130-139 / 85-89	5,68 (2,38 – 6,06) n=28	4,12 (2,64 – 5,24) n=17	2,25 (1,9 – 2,71) n=6	$p_{1-2} = 0,19$; $p_{1-3} = 0,005$; $p_{2-3} = 0,004$
140 / 90 и более	5,84 (2,76 – 10,88) n=41	5,52 (3,0 – 11,5) n=39	2,61 (2,05 – 2,84) n=12	$p_{1-2} = 0,26$; $p_{1-3} = 0,006$; $p_{2-3} = 0,003$
p*	$p^*_{1-4} = 0,02$ $p^*_{2-4} = 0,02$ $p^*_{2-3} = 0,04$	$p^*_{1-4} = 0,02$ $p^*_{2-4} = 0,02$ $p^*_{3-4} = 0,002$	$p^*_{1-4} = 0,02$ $p^*_{2-4} = 0,02$ $p^*_{2-3} = 0,03$	

Примечание. p – достоверность различий в концентрациях ЭТ-1 между группами работающих в разных условиях труда; p* – достоверность различий в концентрациях ЭТ-1 в каждой группе работающих в зависимости от величины АД (представлены только $p^* < 0,05$).

логичная тенденция была выявлена в группе сравнения, однако увеличение частоты повышенного уровня ЭТ-1 с ростом АД было незначительным – на 7,6%. Анализ концентрации NOx в сыворотке обследуемых групп показал достоверные различия в содержании оксида азота между группами (табл. 4).

Исследования показали, что в сыворотке крови лиц, контактирующих с промышленными аэрозолями, концентрация NOx превышала его содержание у работающих в условиях воздействия шума и группы сравнения ($p_{1,2} = 0,0005$; $p_{2,3} = 0,0003$). Подобные различия в содержании NOx сохранялись между группами при разной величине АД. Следует отметить, что концентрация NOx в сыворотке крови обследуемых лиц внутри каждой группы сохранялась на одном уровне при разной величине АД. Различий в содержании NOx между 1-й и 3-й группами выявлено не было. Выявлены различия в частоте обнаружения повышенного

уровня NOx (более 50 мкмоль/л) в сыворотке крови обследованных лиц разных групп в зависимости от величины АД (табл. 5).

Исследования показали, что с наибольшей частотой повышенный уровень NOx выявлялся у лиц с нормальным и высоким нормальным АД в 1-й и 2-й группах: (23,1% и 17,9%) и (39,0% и 35,3%) соответственно. При высоком АД доля лиц с повышенным содержанием оксида азота в обеих группах снижалась до 9,8% в 1-й группе и до 23,1% во 2-й группе. При оптимальном АД частота обнаружения повышенного уровня оксида азота была наименьшей во всех группах обследуемых лиц. Корреляционный анализ, проведенный между показателями ЭТ-1 и NOx в 1-й и 2-й группах выявил наличие прямой положительной связи ($p = 0,027$). Прямая положительная связь средней силы была выявлена между ЭТ-1 и NOx в группе лиц с нормальным и высоким АД: $p=0,023$ и $p=0,028$ соответственно. Для характеристики

Таблица 3

Частота выявления повышенного содержания ЭТ-1 у работающих в разных условиях труда в зависимости от величины АД, абс. (%)

Группы обследуемых	АД (мм рт. ст.)			
	менее 120 / 80 (n=36)	120-129 / 80-84 (n=91)	130-139 / 85-89 (n=51)	140 / 90 и более (n=92)
	Частота выявления ЭТ-1 (более 3,5 пг/мл), абс. (%)			
1-я (n=120)	0 из 12 (0)	4 из 39 (10,3)	13 из 28 (46,4)	25 из 41 (60,9)
2-я (n=116)	0 из 19 (0)	15 из 41 (36,6)	6 из 17 (35,3)	31 из 39 (79,5)
3-я (n=34)	0 из 5 (0)	1 из 11 (9,1)	1 из 6 (16,7)	2 из 12 (16,7)

Таблица 4

Концентрация метаболитов NOx в сыворотке крови работающих в разных условиях труда и их зависимость от величины АД, (Med±IQR (25 – 75%))

Показатели	1-я группа (n=120)	2-я группа (n=116)	3-я группа (n=34)	p
Концентрация NOx (мкмоль/л)	25 (15 – 45)	39 (25 – 55)	24 (12 – 30)	$p_{1,2} = 0,0005$; $p_{2,3} = 0,0003$; $p_{1,3} = 0,282$
АД (мм рт. ст.)	Концентрация NOx (мкмоль/л)			
Менее 120 / 80	20 (9 – 37)	32 (20 – 35)	21 (10 – 32,5)	$p_{1,2} = 0,11$; $p_{2,3} = 0,09$; $p_{1,3} = 0,382$
120-129 / 80-84	27 (15 – 45)	40 (24 – 55)	24 (12 – 38)	$p_{1,2} = 0,025$; $p_{2,3} = 0,018$; $p_{1,3} = 0,336$
130-139 / 85-89	24 (10 – 43)	45 (32 – 49)	22 (9 – 40)	$p_{1,2} = 0,002$; $p_{2,3} = 0,0018$; $p_{1,3} = 0,424$
140 / 90 и более	25 (17 – 38)	40 (25 – 45)	22 (14 – 38)	$p_{1,2} = 0,011$; $p_{2,3} = 0,009$; $p_{1,3} = 0,482$

Примечание. p – достоверность различий в концентрациях метаболитов NOx между группами работающих в разных условиях труда.

Таблица 5

Частота выявления повышенного содержания оксида азота у работающих в разных условиях труда в зависимости от величины АД, абс. (%)

Группы обследуемых	АД (мм рт. ст.)			
	менее 120 / 80 (n=36)	120-129 / 80-84 (n=91)	130-139 / 85-89 (n=51)	140 / 90 и более (n=92)
	Частота выявления повышенного уровня оксида азота, абс. (%)			
1-я (n=120)	1 из 12 (8,3)	9 из 39 (23,1)	5 из 28 (17,9)	4 из 41 (9,8)
2-я (n=116)	2 из 19 (10,5)	16 из 41 (39,0)	6 из 17 (35,3)	9 из 39 (23,1)
3-я (n=34)	0 из 5 (0)	2 из 11 (18,2)	1 из 6 (16,7)	2 из 12 (16,7)

Величина коэффициента NOx/ЭТ-1 у работающих в разных условиях и его зависимость от величины АД, (Med±IQR (25 – 75%))

Показатели	Группы обследуемых		
	1-я (n=120)	2-я (n=116)	3-я (n=34)
NOx/ЭТ-1	7,25 (4,8 – 9,6)	10,4 (7,4 – 11,8)	12,8 (11,6 – 24,8)
АД (мм рт. ст.)	NOx/ЭТ-1		
Менее 120 / 80	9,1 (4,3 – 10,3)	11,1 (8,4 – 12,7)	17,3 (11,1 – 23,2)
120-129 / 80-84	11,3 (6,7 – 13,4)	12,3 (8,0 – 13,9)	19,5 (12,0 – 25,1)
130-139 / 85-89	4,2 (4,1 – 7,1)	7,9 (6,3 – 10,1)	9,8 (9,0 – 13,1)
140 / 90 и более	4,4 (4,2 – 7,5)	7,2 (3,9 – 8,3)	8,4 (5,3 – 10,6)

состояния тонуса сосудов был использован коэффициент, представляющий величину отношения концентрации оксида азота (мкмоль/л) к эндотелину-1 (пг/мл) (NOx/ЭТ-1). Величина коэффициента у обследуемых разных групп при различном уровне АД представлена в табл. 6.

Проведённые исследования показали, что величина отношения NOx/ЭТ-1 у работающих 1-й и 2-й групп была ниже в 1,8 и 1,2 раза соответственно по сравнению с данной величиной в группе 3 ($p_{1-2} = 0,008$; $p_{2-3} = 0,03$). Подобная разница в величине коэффициента NOx/ЭТ-1 сохранялась между группами при разной величине АД. Наименьший коэффициент был выявлен при нормальном высоком и высоком АД в 1-ой группе обследуемых, подвергающихся воздействию производственного шума (4,2 (4,1 – 7,1) и 4,4 (4,2 – 7,5) соответственно). Использование данного коэффициента позволило выявить дисбаланс в продукции NO и ЭТ-1. Уменьшение величины данного показателя, что вызвано увеличением ЭТ-1 или уменьшением содержания NO в сыворотке крови, может говорить о наличии выраженных изменений в функциональном состоянии сосудистого эндотелия, т.е. о ЭД и увеличении риска АГ. Увеличение данного коэффициента, вызванного увеличением содержания NO или уменьшением ЭТ-1 в сыворотке крови, может говорить о тенденции к уменьшению ЭД и снижению риска АГ. Полученные результаты показали, что у 95,4% здоровых доноров при оптимальном и нормальном АД величина NOx/ЭТ-1 лежит в диапазоне от 10,00 до 25,00. Если NOx/ЭТ-1 < 10,00 – это говорит о преобладании процессов вазоконстрикции, что провоцирует развитие гипертонии. Если NOx/ЭТ-1 > 25,00, то рассматривается возможное преобладание процессов вазодилатации, что приводит к снижению АД и возможному развитию гипотонии. Можно предложить использовать данный коэффициент в качестве информативного показателя состояния сосудистого тонуса и риска АГ при мониторинге за состоянием здоровья при углубленном обследовании работающих лиц.

Заключение. Таким образом, полученные результаты выявили различные взаимоотношения показателей ЭД с величиной АД. С повышением уровня АД увеличивалась концентрация ЭТ-1 в сыворотке крови обследуемых лиц всех групп. При высоком АД доля лиц с повышенным уровнем ЭТ-1 была наибольшей и превышала на 50%-70% частоту обнаружения повышенной концентрации ЭТ-1 у лиц с нормальным АД. Содержание NOx в сыворотке обследуемых лиц всех трех групп не изменялось в зависимости от величины АД, а доля лиц с повышенным содержанием NOx при высоком

АД имела тенденцию к снижению и была наименьшей относительно его концентрации у лиц с нормальным и высоким нормальным АД. Более чем у одной трети лиц с нормальным и высоким нормальным АД наблюдались признаки ЭД, проявляющиеся в избыточном образовании ЭТ-1 и метаболитов NOx. Регулирование тонуса сосудов осуществляется динамическим балансом между повышенным синтезом и высвобождением ЭТ-1 и ингибированием его синтеза под действием NO, вырабатываемого в избыточном количестве. Можно предположить, что у лиц с повышенным содержанием ЭТ-1 нормальное и высокое нормальное АД поддерживается благодаря процессу расслабления сосудов под действием NO и на донозологическом этапе процесс периодического повышения АД может быть обратимым. У обследуемых с высоким АД синтез ЭТ-1 усиливается, количество высвобожденного NO уменьшается и ингибирования синтеза ЭТ-1 не происходит, что может приводить к выраженной вазоконстрикции и стойкой гипертонии. Большую информацию о ЭД может дать коэффициент NOx/ЭТ-1. У работающих в условиях воздействия производственного шума и контактирующих с промышленными аэрозолями, имеющих высокое нормальное АД, данный коэффициент был значительно снижен относительно его величины у лиц с оптимальным и нормальным АД и не отличался от его значения у лиц с высоким АД. Выявлены особенности взаимоотношений маркеров эндотелия в зависимости от вида вредного производственного фактора. Различий в содержании ЭТ-1 в группах, работающих в условиях воздействия производственного шума и контактирующих с промышленными аэрозолями, не было выявлено. В то же время выявлялись достоверные различия в содержании в сыворотке крови обследуемых метаболитов NOx. У лиц, контактирующих с промышленными аэрозолями, величина NOx в 1,5 – 2 раза превышала таковую у лиц, работающих в условиях воздействия производственного шума. Эти различия сохранялись во всех группах с разным уровнем АД, что обусловлено, по-видимому, воздействием промышленных аэрозолей, образующихся при производстве металлоизделий. Пылевые частицы, индуцируя фагоцитоз, способствуют активации индуцибельной синтазы, которая продуцирует NO в 1000 раз быстрее, чем другие виды синтазы [30]. Поэтому у лиц, контактирующих с промышленными аэрозолями, концентрация метаболитов NOx превышала их содержание у работающих в условиях производственного шума. Это объясняет менее выраженное повышение АГ у лиц, контактирующих с промышленными аэрозолями: при высоком нормальном и высоком АД коэффициент NOx/ЭТ-1 в группе 2 не из-

менялся и в 1,7 раза превышал его величину у работающих 1-й группы. Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать использовать показатели эндотелиальной дисфункции ЭТ-1 и NO как маркеры риска АГ. При периодических медицинских осмотрах работающих следует обратить повышенное внимание на лиц с нормальным и высоким нормальным АД, в сыворотке которых выявлено повышенное содержание ЭТ-1 и NOx, а величина коэффициента NOx/ЭТ-1 менее 10, поскольку данные лица находятся в зоне риска развития стойкой АГ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 6, 9 – 15, 19 – 21, 24, 25, 28, 30 см. REFERENCES)

1. Попов Е.В. Эндотелины: происхождение, физиологические эффекты и возможная роль в патологии. *Туберкулез и болезни легких*. 2010; 5 (87): 3-13.
4. Пушкарева Т.А., Корякина Л.Б., Рунович А.А., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. Критерии оценки дисфункции эндотелия артерий и пути ее коррекции (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 5: 1-8.
5. Тарасов А.А., Бабаева А.Р., Гордеева М.А., Резникова Е.А. Клиническое и прогностическое значение патогенетических маркеров поражения сосудистой стенки при бессимптомном атеросклерозе. *Медицинский алфавит*. 2017; 1 (13): 28-34.
7. Маянская С.Д., Антонов А.Р., Попова А.А., Гребенкина И.А. Ранние маркеры дисфункции эндотелия в динамике развития артериальной гипертензии у лиц молодого возраста. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90 (1): 32-7.
8. Ушакова С.А. Оценка альбуминурии и циркулирующих маркеров вазомоторной дисфункции эндотелия у детей подросткового возраста с избыточной массой тела и ожирением в сочетании с различными вариантами повышенного артериального давления. *Медицинская наука и образование Урала*. 2018; 19 (2): 31-5.
16. Мелькумянц А.М., Балашов С.А. Механочувствительность артериального эндотелия. Тверь: Триада; 2005.
17. Федин А.И., Старых Е.В., Баранова О.А., Чеканов А.В., Цой И.В. Дисфункция эндотелия, сосудистое воспаление и окислительный стресс у пациентов с хронической ишемией мозга при стенозах внутренних сонных артерий. *Лечебное дело*. 2018; 1: 66-71.
22. Булаева Н.И., Голухова Е.З. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии кардиоваскулярной патологии. *Креативная кардиология*. 2013; 1: 14-22.
23. Дзугкоев С.Г., Можалева И.В., Маргиева О.И., Отиев М.А., Телтоева А.И., Дзугкоева Ф.С. Влияние L-аргинина и его комбинации с L-карнитином на метаболические и функциональные показатели дисфункции эндотелия в условиях интоксикации никеля хлоридом. *Астраханский медицинский журнал*. 2017; 12 (1): 44-9.
26. Шишкина Т.А., Тривно Н.Н., Мажитова М.В., Доброславская О.А. Морфологические проявления вазомоторной дисфункции эндотелия на фоне хронического воздействия сероводородсодержащего газа. *Морфология*. 2009; 136 (4): 157b-157b.
27. Чазова И.Е., Жернакова Ю.В. от имени экспертов. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. *Системные гипертензии*. 2019; 16 (1): 6-31.
29. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; 6: 15-8.
31. Екимовских А.В., Данцигер Д.Г., Чурляев Ю.А., Епифанцева Н.Н., Херингсон Л.Г., Золоева О.С., Быкова Е.В., Редкокаша Л.Ю. Содержание маркеров дисфункции сосудистого эндотелия у шахтеров. *Политравма*. 2012; 1: 59-64.

REFERENCES

1. Popov E.V. Endothelins: origin, physiological effects and possible role in pathology. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2010; 5 (87): 3-13. (in Russian)
2. Xu S. Therapeutic potential of blood flow mimetic compounds in preventing endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 2020; 155: 104737.
3. Rapoport R.M., Merkus D. Endothelin-1 regulation of exercise-induced changes in flow: dynamic regulation of vascular tone. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 517.
4. Pushkareva T.A., Koryakina L.B., Runovich A.A., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Yu.I. Criteria for evaluating arterial endothelial dysfunction and ways to correct it (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 5: 1-8. (in Russian)
5. Tarasov A.A., Babaeva A.R., Gordееva M.A., Reznikova E.A. Clinical and prognostic value of pathogenetic markers of vascular wall damage in asymptomatic atherosclerosis. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 1 (13): 28-34. (in Russian)
6. Musini V.M., Nazer M., Bassett K., Wright J.M. Blood pressure-lowering efficacy of monotherapy with thiazide diuretics for primary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; 5: CD003824. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003824.pub2>
7. Mayanskaya S.D., Antonov A.R., Popova A.A., Grebenkina I.A. Early markers of endothelial dysfunction in the dynamics of the development of arterial hypertension in young people. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 90 (1): 32-7. (in Russian)
8. Ushakova S.A. Evaluation of albuminuria and circulating markers of endothelial vasomotor dysfunction in overweight and obese adolescent children in combination with various options for high blood pressure. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2018; 19 (2): 31-5. (in Russian)
9. Shi H., Yang D., Qiao J., Sun R., Li R., Zhu C. et al. Effects of sang-qi granules on blood pressure and endothelial dysfunction in stage I or II hypertension: study protocol for a randomized double-blind double-simulation controlled trial. *Trials*. 2020; 21: 12.
10. Nwankwo T., Yoon S.S., Burt V., Gu Q. Hypertension among adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 2011–2012. *NCHS Data Brief*. 2013; 133: 1–8.
11. Kearney P.M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P.K., He J. Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365 (9455): 217–23.
12. Widmer R.J., Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014; 3: 291-308. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.43>
13. Hearon C.M.Jr., Dinenna F.A. Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise in ageing humans. *J. Physiol.* 2016; 594: 2261–73.
14. Beer V.J., Graaff H.J., Hoekstra M., Duncker D.J., Merkus D. Integrated control of pulmonary vascular tone by endothelin and angiotensin II in exercising swine depends on gender. *J. Physiol.* 2010; 298: 1976–85.
15. Mey J.G., Vanhoutte P.M. End o' the line revisited: moving on from nitric oxide to CGRP. *Life Sci.* 2014; 118 (2): 120-8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.012>
16. Mel'kumyants A.M., Balashov S.A. Механочувствительность артериального эндотелия [Mekhanochuvstvitel'nost' arterial'nogo endoteliya]. Tver': Triada; 2005. (in Russian)
17. Fedin A.I., Staryh E.V., Baranova O.A., Chekanov A.V., Coj I.V. Endothelial dysfunction, vascular inflammation and oxidative stress in patients with chronic cerebral ischemia with stenosis of the internal carotid arteries. *Lechebnoe delo*. 2018; 1: 66-71. (in Russian)
18. Bulaeva N.I., Goluhova E.Z. Endothelial dysfunction and oxidative stress: a role in the development of cardiovascular pathology. *Kreativnaya kardiologiya*. 2013; 1: 14-22. (in Russian)
19. Zhao Y., Zhu J., Liang H., Yang S., Zhang Y., Han W. et al. Kang le xin reduces blood pressure through inducing endothelial-dependent vasodilation by activating the AMPK-eNOS Pathway. *Front Pharmacol.* 2020; 10: 1548. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01548>
20. Zhang F., Xu Y., Pan Y., Sun S., Chen A., Li P. et al. Effects of angiotensin-(1-7) and angiotensin II on acetylcholine-induced vascular

- relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Oxid Med. Cell Longev.* 2019; 2019: 6512485. <https://doi.org/10.1155/2019/6512485>
21. Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerosis coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 1046–51.
 22. Dzugkoyev S.G., Mozhayeva I.V., Margiyeva O.I., Otiyev M.A., Tedtoyeva A.I., Dzugkoyeva F.S. The effect of L-arginine and its combination with L-carnitine on the metabolic and functional indicators of endothelial dysfunction under conditions of nickel chloride intoxication. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2017; 12 (1): 44-9. (in Russian)
 23. Shishkina T.A., Trizno N.N., Mazhitova M.V., Dobroslavskaya O.A. Morphological manifestations of vasomotor dysfunction of the endothelium against the background of chronic exposure to hydrogen sulfide-containing gas. *Morfologiya.* 2009; 136 (4): 157b-157b. (in Russian)
 24. Münzel T., Schmidt F., Herzog J., Daiber A., Sørensen M. Environmental noise and the cardiovascular system. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018; 71 (6): 688-97.
 25. Daiber A., Kröller-Schön S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Vujacic-Mirski K., et al. Environmental noise induces the release of stress hormones and inflammatory signaling molecules leading to oxidative stress and vascular dysfunction-signatures of the internal exposome. *Biofactors.* 2019; 45 (4): 495-506.
 26. Chazova I.E., Zhernakova Yu.V. Clinical guidelines. Diagnosis and treatment of arterial hypertension. *Sistemnye gipertenzii.* 2019; 16 (1): 6–31. (in Russian)
 27. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. The screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2005; 6: 15–8. (in Russian)
 28. Kurita A., Matsui T., Ishizuka T. Significance of plasma nitric oxide/endothelial-1 ratio for prediction of coronary artery disease. *Angiology.* 2005; 56 (3): 259-64.
 29. Yekimovskikh A.V., Dantsiger D.G., Churlyayev Y.A., Yepifantseva N.N., Kheringson L.G., Zoloeva O.S., Bykova E.V., Redkokasha L.Y. Contents of markers of dysfunction of vascular endothelium in miners. *Politравма.* 2012; 1: 59-64 (in Russian)
 30. Changjian Feng. Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions. *Coord Chem. Rev.* 2012; 256 (3-4): 393-411.

Поступила 21.05.21

Принята к печати 21.06.21

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Кузьмин Ю.Б., Короткова Е.А., Герштейн Е.С., Булычева И.В., Козлова Е.В., Кудлай Д.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Кузнецов И.Н., Сушенцов Е.А.

КЛИНИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА VISTA У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

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

Представлены данные сравнительного иммуноферментного анализа содержания растворимой формы контрольной точки иммунитета VISTA в сыворотке крови 30 здоровых доноров (группа контроля), 79 больных первичными злокачественными (остеосаркома – 30, хондросаркома – 31, хордома – 14) и 14 пограничными (гигантоклеточная опухоль) новообразованиями костей. В общей группе больных злокачественными новообразованиями костей медиана содержания sVISTA в сыворотке крови статистически значимо ниже по сравнению с контролем ($p=0,040$). У больных опухолями костей и здоровых доноров старше 18 лет отмечено снижение с возрастом уровней sVISTA в сыворотке крови. Не выявлено значимых различий концентрации sVISTA между больными остеосаркомой, хондросаркомой и здоровыми донорами. Только у больных хордомой кости уровни sVISTA были статистически значимо ниже, чем в контроле ($p=0,013$). В группах больных хондросаркомой и остеосаркомой кости не отмечено значимых ассоциаций между содержанием sVISTA в сыворотке крови и основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания. У больных остеосаркомой не выявлено связи между уровнями sVISTA и показателями общей выживаемости, тогда как у пациентов с хондросаркомой кости отмечена тенденция к благоприятному прогнозу при высоком содержании маркера в сыворотке крови.

Ключевые слова: опухоли костей; sVISTA; остеосаркома; хондросаркома; хордома; сыворотка крови; прогноз

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Кузьмин Ю.Б., Булычева И.В., Козлова Е.В., Короткова Е.А., Герштейн Е.С., Кудлай Д.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Кузнецов И.Н., Сушенцов Е.А. Клиническая и прогностическая значимость растворимой формы контрольной точки иммунитета VISTA у больных первичными опухолями костей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 533-538. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-9-533-538>

Для корреспонденции: Ковалева Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. регуляции клеточных и вирусных онкогенов; e-mail: ovkovaeva@gmail.com

Kushlinskii N.E., Kovaleva O.V., Kuzmin Yu.B., Korotkova E.A., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Kozlova E.V., Kudlay D.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Kuznetsov I.N., Sushentsov E.A.

CLINICAL AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE SOLUBLE FORM OF THE VISTA IMMUNITY CONTROL POINT IN PATIENTS WITH PRIMARY BONE TUMORS

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

The data of a comparative enzyme-linked immunosorbent assay of the content of the soluble form of the immunity checkpoint VISTA in the blood serum of 30 healthy donors (control group), 79 patients with primary malignant (osteosarcoma – 30, chondrosarcoma – 31, chordoma – 14) and 14 borderline (giant cell tumor) bone neoplasms are presented. In the general group of patients with malignant neoplasms of bones, the median sVISTA content in blood serum is statistically significant lower than in the control ($p = 0.040$). In patients with bone tumors and healthy donors over 18 years of age, there was a decrease with age in serum sVISTA levels. There were no significant differences in sVISTA concentration between patients with osteosarcoma, chondrosarcoma and healthy donors. Only in patients with chordoma were sVISTA levels statistically significant lower than in controls ($p = 0.013$). In the groups of patients with chondrosarcoma and osteosarcoma of the bone, there were no significant associations between the serum sVISTA content and the main clinical and morphological characteristics of the disease. In patients with osteosarcoma, no relationship was found between sVISTA levels and overall survival rates, while in patients with bone chondrosarcoma, there was a tendency towards a favorable prognosis with a high content of the marker in the blood serum.

Key words: bone tumors; sVISTA; osteosarcoma; chondrosarcoma; chordoma; blood serum; prognosis

For citation: Kushlinskii N.E., Kovaleva O.V., Kuzmin Yu.B., Korotkova E.A., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Kozlova E.V., Kudlay D.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Kuznetsov I.N., Sushentsov E.A. Clinical and prognostic significance of the soluble form of the VISTA immunity control point in patients with primary bone tumors. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 533-538 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-533-538>

For correspondence: Kovaleva Olga Vladimirovna, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes; e-mail: ovkovaeva@gmail.com

Information about authors:

Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>
Kovaleva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

Kuzmin Yu.B., <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>
Korotkova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-2509-5232>
Gershtein E.S., <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>
Boulytcheva I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249>
Kozlova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-2484-020X>
Kudlay D.A., <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>
Podlesnaya P.A., <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>
Gratchev A.N., <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>
Kuznetsov I.N., <https://orcid.org/0000-0003-0866-5561>
Sushentsov E.A., <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>

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

Acknowledgment. *The study was performed without external funding.*

Received 02.06.2021
Accepted 25.06.2021

Введение. Первичные злокачественные новообразования костей являются относительно редкими и гетерогенными опухолями, чаще встречаются у детей и молодых людей, характеризуются крайне агрессивным клиническим течением, ранним гематогенным метастазированием, в большинстве наблюдений низкой чувствительностью к химиотерапии и неблагоприятным прогнозом [1].

Остеосаркома является наиболее частой злокачественной опухолью кости (36%), за ней следуют хондросаркома (20-25%) и саркома Юинга (16%) [2]. Частота выявления сарком костей связана с возрастной заболеваемостью и варьирует в зависимости от гистологического типа новообразования. Так, например, хондросаркома чаще встречается в возрасте третьего и четвертого десятилетий, пик заболеваемости остеосаркомой наблюдается в период пубертата в возрасте от 16 до 18 лет, когда начинают активно функционировать половые железы.

В связи с низкой чувствительностью злокачественных опухолей костей к различным схемам химиотерапии, активно осуществляется поиск новых мишеней лекарственной терапии. В настоящее время особый интерес представляют различные виды иммунотерапии, направленной на активацию противоопухолевого иммунного ответа, и которые активно внедряются в повседневную клиническую практику.

Современные успехи иммунотерапии опухолей с применением ингибиторов контрольных точек CTLA-4, PD-1/PD-L1 усиливают интерес исследователей к изучению других членов семейства B7. Одной из таких «контрольных точек иммунитета» является белок семейства B7 – VISTA (B7-H5), который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и регулирует активность Т-лимфоцитов. Наряду со своими близкими гомологами PD-1 и CTLA-4, VISTA способен как активировать, так и подавлять иммунореактивность Т-клеток. У человека наиболее высокая экспрессия этого белка наблюдается в моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках, промежуточный уровень экспрессии VISTA отмечен в CD4+ и CD8+ Т-клетках, а в NK- и В-клетках данный белок не экспрессируется [3]. VISTA является трансмембранным белком I типа с одним N-концевым доменом IgV. Имеет консервативный SH2-связывающий мотив в цитоплазматическом участке, потенциально способный связывать белки семейства STAT. Накопленные данные позволяют предположить, что в контексте иммунной регуляции VISTA может действовать и в качестве лиганда, и в качестве рецептора.

В последние годы проводятся исследования растворимых форм контрольных точек иммунитета у больных саркомами костей, которые в литературе представлены единичными публикациями [4, 5].

Помимо мембранно-связанной формы VISTA, описана также растворимая форма данного белка (sVISTA), способная подавлять пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов [6]. Экспрессию VISTA на различных типах клеток активно изучают в качестве прогностического маркера в онкологии, в то время как о его растворимой форме известно крайне мало.

Цель данного исследования – сравнительная оценка содержания растворимой формы VISTA в сыворотке крови практически здоровых доноров, больных пограничными и злокачественными опухолями костей различных гистологических типов, а также анализ взаимосвязи уровня данного маркера с основными клиническими и морфологическими особенностями опухолей костей и их прогнозом.

Материал и методы. В исследование включены 79 больных злокачественными новообразованиями костей в возрасте от 19 до 73 лет (средний возраст 40,8 лет), 14 больных пограничными опухолями костей (гигантоклеточная опухоль) в возрасте от 24 до 43 лет (средний возраст 32,7 года) и 30 практически здоровых доноров в возрасте от 22 до 76 лет (средний возраст 36,4 года), составивших группу контроля. Все пациенты прошли обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. Новообразование кости у всех больных выявлено впервые и подтверждено данными гистологического исследования согласно Международной классификации опухолей костей (ВОЗ, 2013).

Группу злокачественных новообразований костей составили три гистологических типа: остеосаркома ($n=34$), хондросаркома ($n=31$), хордома ($n=14$). Данные о больных злокачественными опухолями костей представлены в табл. 1.

Имуноферментный анализ. Концентрацию белка sVISTA определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике с использованием ЭДТА до начала специфического лечения, с помощью набора реактивов для прямого иммуноферментного анализа (Human VISTA/B7-H5/PD-1H ELISA Kit; RayBiotech, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркера выражали в нанogramмах (нг) на 1 мл сыворотки крови.

Таблица 1

Характеристика больных злокачественными новообразованиями костей

Критерии	Остеосаркома (n=34)	Хондросаркома (n=31)	Хордома (n=14)
Возраст, годы	34,6 (19-60)	41,9 (20-60)	53,9 (31-73)
Стадия:			
I-II	25	25	13
III-IV	9	6	1
Степень дифференцировки опухоли:			
G1-G2	31	24	2
G3	3	7	12
Тип пораженной опухолью кости:			
трубчатая (Тр)	22	14	-
губчатая (Г)	12	17	14

Таблица 2

Уровни sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров, больных пограничными и злокачественными опухолями костей

Группы обследованных	Число наблюдений	Уровни sVISTA, нг/мл		
		Медиана	Квартили	p
Контроль ¹	30	4,64	0,88-14,39	-
Пограничные опухоли костей ²	14	0,77	0,34-5,97	1vs2 p=0,064
Злокачественные новообразования костей ³	79	1,21	0,4-8,57	1vs3 p=0,040*

Примечание. Здесь и в табл. 3 надстрочными цифрами обозначены группы сравнения для статистического анализа. * – здесь и в табл. 3 обозначает статистически значимое отличие.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Для анализа выживаемости группы были сформированы относительно медианы содержания sVISTA. Анализ выживаемости проводили с помощью построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Сравнение статистической значимости различий выполняли при использовании логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Данные сравнительного анализа уровней sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров (группа контроля), больных пограничными и злокачественными опухолями костей представлены в табл. 2.

В группе больных первичными злокачественными новообразованиями костей медиана содержания sVISTA в сыворотке крови статистически значимо ниже по сравнению с таковой в контроле ($p=0,040$). Показатели маркера у пациентов с пограничными опухолями костей также ниже, чем в контрольной группе, однако данные не достигали статистической значимости ($p=0,064$). Проведенный анализ диагностической информативности sVISTA в сыворотке крови с помощью оценки его чувствительности и специфичности методом построения ROC кривых и вычисления площади под ними (AUC) не выявил их значимости. Результаты представлены на рис. 1.

Сравнительный анализ концентрации sVISTA в сыворотке крови больных различными гистологическими типами опухолей костей показал, что наименьшие уровни маркера обнаружены при хордоме (медиана 0,46 нг/мл),

а наибольшие – при остеосаркоме (медиана 1,78 нг/мл). Результаты представлены в табл. 3. Только у больных хордомой кости уровни sVISTA в сыворотке крови статистически значимо отличались от таковых в контрольной группе ($p=0,013$).

Представленные в литературе данные свидетельствуют о том, что содержание в крови белков «контрольных точек иммунитета» может изменяться с возрастом. Так как опухоли костей часто встречаются у пациентов молодого возраста, для анализа данного раздела исследования нами были исключены пациенты моложе 18 лет, а группы сравнения максимально возможно уравнили по возрасту. Так как минимальное содержание sVISTA наблюдали в группе хордом, а максимальное – в группе остеосарком, необходимо отметить, что средний возраст пациентов в группе хордом составил 53,9 года, а в группе остеосарком – 34,6 года и это подтверждает наше предположение о том, что на уровни sVISTA в сыворотке крови может влиять не только гистологический тип опухоли, но и возраст пациентов.

Провели анализ клинической и прогностической значимости sVISTA в сыворотке крови пациентов с различными гистологическими типами опухолей костей. Для группы больных хордомой кости проведение такого анализа оказалось невозможным, так как подавляющее большинство пациентов находилось в одной стадии заболевания и на этапе наблюдения все пациенты были живы. На рис. 3 представлены результаты анализа прогностической и клинической значимости содержания sVISTA в группах больных хондросаркомой и остеосаркомой кости.

Из представленных графиков следует, что в группах больных хондросаркомой и остеосаркомой кости не отмечено значимых ассоциаций между содержанием sVISTA в сыворотке крови с основными клиническими и мор-

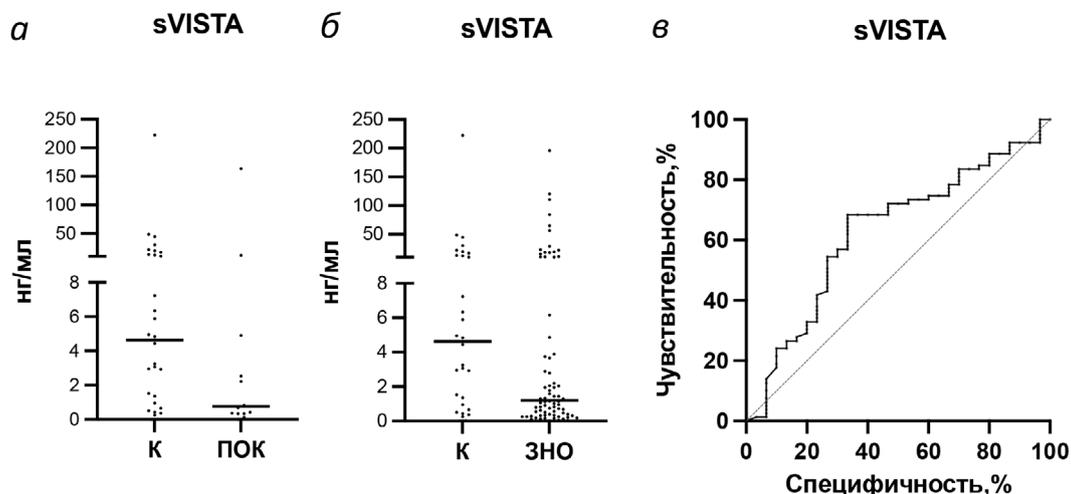


Рис. 1. Сравнительный анализ содержания sVISTA у пациентов с пограничными опухолями костей (ПОК) (а), злокачественными новообразованиями костей (ЗНО) (б) и здоровыми донорами (контроль). ROC-анализ для sVISTA у больных ЗНО (в). Площадь под ROC-кривой составляет 0,6274.

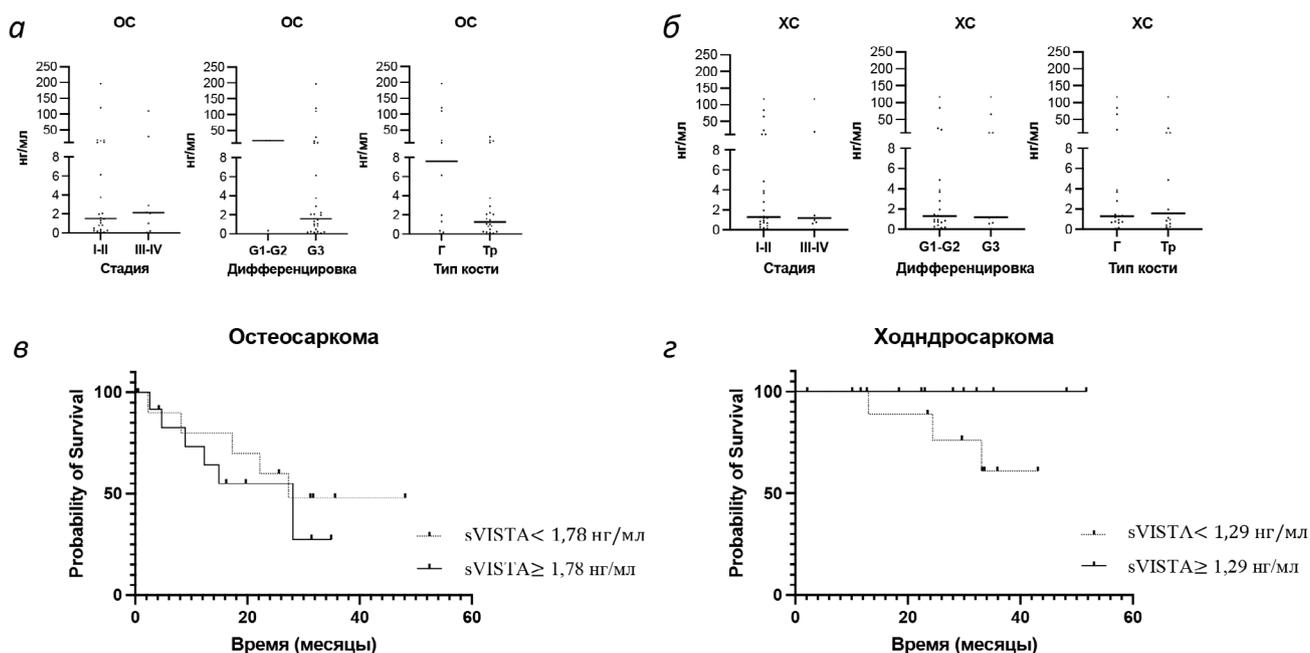


Рис. 2. Ассоциация содержания sVISTA в сыворотке крови с клинично-морфологическими характеристиками остеосаркомы (ОС) (а) и хондросаркомы (ХС) (б) кости. Прогностическая значимость sVISTA в сыворотке крови больных ОС (в) и ХС (г).

Таблица 3

Уровни sVISTA в сыворотке крови больных первичными злокачественными опухолями костей различных гистологических типов

Группы обследованных	Число наблюдений	Возраст, годы	Уровни sVISTA, нг/мл		
			Медиана	Квартили	p
Контроль ¹	30	36,4	4,64	0,88-14,39	-
Остеосаркома ²	34	34,6	1,78	0,32-10,38	1vs2 p=0,1743
Хондросаркома ³	31	41,9	1,29	0,68-8,57	1vs3 p=0,1391
Хордома ⁴	14	53,9	0,46	0,30-1,31	1vs4 p=0,013*

фологическими характеристиками заболевания (рис. 2, а, б). В группе больных остеосаркомой анализ отдаленных результатов лечения показал отсутствие связи между уровнями sVISTA в сыворотке крови до начала лечения и показателями общей выживаемости (рис. 2, в). Тогда как, у больных хондросаркомой отмечена тенденция к благоприятному прогнозу при высоком исходном содержании sVISTA в сыворотке крови (рис. 2, з).

Ввиду достигнутых успехов современной иммунотерапии предпринимаются попытки расширить сферу ее применения у онкологических больных и повысить эффективность. Одним из потенциальных способов улучшения результатов лечения является сочетание различных препаратов схожего механизма действия. Именно поэтому поиском новых мишеней иммунотерапии опухолей занимаются научные коллективы по всему миру. VISTA является одной из молекул так называемых «контрольных точек иммунитета», негативно регулирующих функции Т-клеток. Интересной особенностью данного белка является его способность функционировать как в качестве рецептора, так и в качестве лиганда. Известно, что VISTA в норме экспрессируется на гематопоэтических клетках (лимфоидного и миелоидного ряда), а также в клетках гематопоэтических органов (селезенка, тимус). Кроме того, у VISTA обнаружено два партнера для связывания PSGL-1 [7] и VSIG3 [8]. PSGL-1 является достаточно хорошо изученной молекулой адгезии, экспрессирующейся преимущественно на лейкоцитах. В нормальных физиологических условиях данная молекула при связывании с Р-селектином способствует выходу лейкоцитов из кровотока в ткани. Однако при снижении рН среды (5,85-6,5) PSGL-1 приобретает способность взаимодействовать с белком VISTA, экспрессирующимся на различных типах клеток (Т-клетках, макрофагах, опухолевых клетках). В любом случае все эти взаимодействия приводят к подавлению активации и пролиферации Т-клеток.

Показано, что VSIG3 является членом суперсемейства Ig, преимущественно экспрессирующийся в яичниках и яичках, а также в более низком количестве в почках, скелетных мышцах и некоторых других тканях. Показана его экспрессия в опухолевых клетках рака желудка. Обнаружено, что, VSIG3, экспрессирующийся на опухолевых клетках при нейтральном рН среды, может связываться с VISTA на Т-клетках и подавлять их активность. Таким образом, VISTA в качестве рецептора взаимодействует с VSIG3 при нейтральном рН, однако в кислых условиях среды VISTA в качестве лиганда, экспрессирующегося на различных типах клеток, может связываться с PSGL-1 на Т-клетках. Оба этих взаимодействия приводят к ингибированию Т-клеток и, соответственно, локальной иммуносупрессии. Необходимо отметить, что лимфатические узлы, участки заживления ран, а также опухолевое микроокружение имеют кислый рН, что обеспечивает возможность взаимодействия VISTA с PSGL-1 [9].

Экспрессия белков контрольных точек иммунитета часто повышается при возникновении злокачественных новообразований. Среди опухолей человека наиболее высокий уровень экспрессии VISTA выявлен в мезотелиомах (как в опухолевых клетках, так и в воспалительном инфильтрате). Высокая экспрессия VISTA ассоциирована с благоприятным прогнозом данного заболевания, тогда как для PD-L1 результаты были противоположными [10]. В большинстве солидных опухолей

VISTA преимущественно экспрессируется на иммунных клетках микроокружения, хотя его экспрессия на опухолевых клетках описана для рака легкого, почек, толстой кишки, эндометрия и яичников [11-13].

Прогностическая значимость VISTA показана для меланомы и протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. При этом для меланомы высокая экспрессия данного маркера ассоциирована с плохим прогнозом [14], в то время как для поджелудочной железы результаты противоположны [15]. Также благоприятная прогностическая значимость VISTA отмечена при колоректальном раке. Экспрессию маркера анализировали как в опухолевых клетках, так и в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках. Авторы показали, что высокая экспрессия VISTA в иммунных клетках коррелирует с ранней стадией заболевания, дефицитом системы MMR (mismatch repair) и благоприятным прогнозом [16].

По аналогии с PD-1/PD-L1 для VISTA также описана растворимая форма белка, которую можно обнаружить в плазме или сыворотке крови [17]. Однако если для sPD-L1 показана прогностическая и клиническая значимость для многих солидных опухолей, то для sVISTA таких данных практически не опубликовано. Данное исследование посвящено изучению содержания растворимой формы белка VISTA у пациентов с различными вариантами опухолей костей.

На первом этапе исследования нами показано, что содержание sVISTA в сыворотке крови здоровых доноров выше, чем у пациентов с доброкачественными или злокачественными образованиями костей. Кроме того, было замечено, что содержание sVISTA в сыворотке крови зависит от возраста пациентов с различными типами опухолей костей. Поэтому для дальнейших исследований группы сравнения были скорректированы по возрасту. Различий в содержании исследованного маркера в группах больных основными гистологическими вариантами опухолей костей выявлено не было. Вероятно, это обусловлено тем, что образование любой из выше исследованных сарком костей приводит к системному снижению содержания sVISTA в крови. В целом и для других белков контрольных точек иммунитета данные по содержанию в крови их растворимых форм при солидных опухолях достаточно противоречивы. Так, например, содержание растворимых форм белков системы PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных, почечно-клеточным раком повышается [18], в то время как при колоректальном раке их содержание чаще понижается [19]. Это свидетельствует в пользу того, что системная концентрация исследуемых белков в крови может не отражать их локальное содержание. Далее для двух самых распространенных вариантов опухолей костей (остеосаркома и хондросаркома) у взрослых был проведен анализ прогностической и клинической значимости содержания sVISTA в сыворотке крови. Ни для хондросарком, ни для остеосарком не удалось выявить значимых ассоциаций с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. Анализ прогностической значимости показал отсутствие таковой в группе пациентов с остеосаркомами, однако в группе хондросарком отмечена тенденция к благоприятному прогнозу при высоком содержании sVISTA. Возможно, при расширении выборки, данная тенденция достигнет статистической значимости. Таким образом, в целом развитие опухолей костей вызывает системное снижение концентрации sVISTA в сыворотке крови, но данное изменение не ас-

социировано с клиническими и морфологическими характеристиками сарком костей.

Из данных литературы известно, что белок VISTA ассоциирован с иммуносупрессивным фенотипом микроокружения опухоли, оказывая подавляющее действие на активацию Т-клеток и стимулируя созревание Treg [20]. С одной стороны, накопленные результаты послужили основанием для использования этого белка в качестве новой мишени для иммунотерапии опухолей. В настоящее время проводят клинические испытания монотерапии с использованием моноклональных антител или малых молекул направленных против VISTA (NCT04475523, NCT02812875). Однако данное исследование показывает, что клиническая и прогностическая значимость содержания растворимой формы sVISTA не всегда соответствует таковой непосредственно в опухоли. Именно поэтому для перехода в будущем к персонализированной терапии необходим тщательный анализ экспрессии VISTA как в локальной опухоли, так и системно в сыворотке крови. Сочетание этой информации поможет подобрать эффективную комбинированную терапию для каждого пациента.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5–17, 20
см. REFERENCES)

4. Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Тимофеев Ю.С., Герштейн Е.С., Бульчева И.В., Бондарев А.В. и др. Ключевые компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови при опухолях костей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170 (7):79–83.
18. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д. и др. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019; 15(1):15–22.
19. Ковалева О.В., Рашидова М.А., Грачев А.Н., Масленников В.В., Бульчева И.В., Герштейн Е.С. и др. Факторы иммуносупрессии PD-1, PD-L1, IDO1 и колоректальный рак. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2021; 497:160–4.

REFERENCES

1. Unni K.K., Inwards C.Y. Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 10165 cases – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. Group ESESNW. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014; 25(3):113–23.
3. Deng J., Le Mercier I., Kuta A., Noelle R.J. A New VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade. *J. Immunother. Cancer*. 2016; 4:86.
4. Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Timofeev Yu.S., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Bondarev A.V. et al. Key components of the signaling pathway of the PD-1 / PD-L1 immunity checkpoint in blood serum in bone tumors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020; 170 (7): 79–83. (in Russian)

5. Huang H.F., Zhu H., Yang X.T., Guo X.Y., Li S.S., Xie Q. et al. Progress in Research on Tumor Immune PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Malignant Bone Tumors. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2019; 41(6): 410–4.
6. Wang L., Le Mercier I., Putra J., Chen W., Liu J., Schenk A.D., Nowak E.C., Suriawinata A.A., Li J., Noelle R.J. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111(41):14846–51.
7. Johnston R.J., Su L.J., Pinckney J., Critton D., Boyer E., Krishnakumar A. et al. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature*. 2019; 574(7779): 565–70.
8. Wang J., Wu G., Manick B., Hernandez V., Renelt M., Erickson C. et al. VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology*. 2019; 156(1):74–85.
9. Yuan L., Tatineni J., Mahoney K.M., Freeman G.J. VISTA: A Mediator of Quiescence and a Promising Target in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2021; 42(3): 209–27.
10. Muller S., Victoria Lai W., Adusumilli P.S., Desmeules P., Frosina D., Jungbluth A., V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation (VISTA), a potentially targetable immune checkpoint molecule, is highly expressed in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *Mod. Pathol.* 2020; 33(2): 303–11.
11. Villarreal-Espindola F., Yu X., Datar I., Mani N., Sanmamed M., Velcheti V. et al. Spatially Resolved and Quantitative Analysis of VISTA/PD-1H as a Novel Immunotherapy Target in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24(7):1562–73.
12. Hong S., Yuan Q., Xia H., Zhu G., Feng Y., Wang Q. et al. Analysis of VISTA expression and function in renal cell carcinoma highlights VISTA as a potential target for immunotherapy. *Protein Cell*. 2019; 10(11): 840–5.
13. Xie S., Huang J., Qiao Q., Zang W., Hong S., Tan H. et al. Expression of the inhibitory B7 family molecule VISTA in human colorectal carcinoma tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 2018; 67(11):1685–94.
14. Choi J.W., Kim Y.J., Yun K.A., Won C.H., Lee M.W., Choi J.H. et al. The prognostic significance of VISTA and CD33-positive myeloid cells in cutaneous melanoma and their relationship with PD-1 expression. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 14372.
15. Hou Z., Pan Y., Fei Q., Lin Y., Zhou Y., Liu Y. et al. Prognostic significance and therapeutic potential of the immune checkpoint VISTA in pancreatic cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2021; 147(2): 517–31.
16. Zong L., Yu S., Mo S., Zhou Y., Xiang Y., Lu Z., Chen J. High VISTA Expression Correlates With a Favorable Prognosis in Patients With Colorectal Cancer. *J. Immunother.* 2021; 44(1): 22–8.
17. Yasinska I.M., Meyer N.H., Schlichtner S., Hussain R., Siligardi G., Casely-Hayford M. et al. Ligand-Receptor Interactions of Galectin-9 and VISTA Suppress Human T Lymphocyte Cytotoxic Activity. *Front. Immunol.* 2020; 11: 580557.
18. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryacheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D. et al. Soluble forms of the PD-1 checkpoint receptor and its ligand PD-L1 in the blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and morphological correlations. *Onkourologiya* 2019; 15(1):15–22. (in Russian)
19. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Grachev A.N., Maslennikov V.V., Boulytcheva I.V., Gershtein E.S. et al. Immunosuppressive factors PD-1, PD-L1, IDO1 and colorectal cancer. *Doklady Rossiyskoy akademii nauk. Nauki o zhizni*. 2021; 497:160-4. (in Russian)
20. Popovic A., Jaffee E.M., Zaidi N. Emerging strategies for combination checkpoint modulators in cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 2018; 128(8): 3209–18.

Поступила 02.06.21
Принята к печати 25.06.21

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Пашинская К.О., Самодова А.В., Добродеева Л.К.

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АПОА-I В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ АРКТИКИ

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН, 163000, г. Архангельск, Россия

В работе представлены данные о влиянии содержания апоА-I в периферической крови на состояние иммунного гомеостаза у лиц, проживающих в экстремальных климатических условиях Арктики. Обследованы 191 человек поселка Ревда Мурманской области, 160 женщин и 31 мужчина, в возрасте от 21 до 55 лет. Анализ результатов проведен в зависимости от уровня содержания апоА-I: у 111 обследованных установлено низкое содержание апоА-I (менее 115 мг/дл) и у 80 человек концентрация апоА-I – в пределах физиологической нормы (115-220 мг/дл). Показано, что дефицит апоА-I ассоциирован с повышением концентрации в плазме общего холестерина в 37,5% и триглицеридов в 62,5% случаев. Низкое содержание апоА-I взаимосвязано со снижением содержания нейтрофильных гранулоцитов, увеличением концентрации малых лимфоцитов, IL-10 и IgE. Дефицит апоА-I ассоциирован с увеличением содержания в крови фенотипов лимфоцитов CD45RA+, CD16+, CD56+. Низкие концентрации апоА-I ассоциированы с низкой активностью экспрессии гена L-селектина и свободного лиганда L-селектина. При дефиците содержания апоА-I не установлено значимых различий в содержании трансферрина, свободного рецептора к трансферрину, гаптоглобина, свободного кальцийзависимого белка клеточной адгезии, а также свободного пула рецепторов, участвующих в процессе апоптоза. Таким образом, дефицит апоА-I в плазме крови ассоциирован с активизацией миграции нейтрофилов в ткани и клеточно-опосредованной цитотоксичности лимфоцитов и происходит под влиянием снижения активности уровня антиоксидантной защиты, изменения структуры клеточных мембран и участия молекул адгезии.

Ключевые слова: ОТХ; липидный профиль крови; апоА-I; апоВ; оЛПНП; нейтрофильные лейкоциты; малые лимфоциты; IgE; IL-10; sL-селектин; Арктика

Для цитирования: Пашинская К.О., Самодова А.В., Добродеева Л.К. Влияние содержания апоА-I в периферической крови на состояние иммунного гомеостаза у лиц, проживающих в экстремальных условиях Арктики. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021;66 (9): 539-545. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-539-545>

Для корреспонденции: Пашинская Ксения Олеговна, мнс лаб. регуляторных механизмов иммунитета Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН; e-mail: nefksu@mail.ru
Pashinskaya K.O., Samodova A.V., Dobrodeeva L.K.

THE EFFECT OF THE CONTENT OF APOA-I IN PERIPHERAL BLOOD ON THE STATE OF IMMUNE HOMEOSTASIS IN PEOPLE LIVING IN EXTREME CLIMATIC CONDITIONS OF THE ARCTIC

Federal State Budgetary Institution of Science N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 163000, Arkhangelsk, Russia

The paper presents data on the impacts of the content of ApoA-I in peripheral blood on the state of immune homeostasis in people living in extreme climatic conditions of the Arctic. From the village of Revda, Murmansk region, 191 people were examined, 160 women and 31 men, aged from 21 to 55 years. The analysis of the results was carried out depending on the level of ApoA-I content: 111 examined people had a low content of ApoA-I (< 115 mg/dl) and 80 people had a concentration of ApoA-I – within the physiological norm (115-220 mg/dl). Deficiency of ApoA-I is associated with an increase in plasma concentrations of total cholesterol in 37.5% and triglycerides in 62.5% of cases. Low content of ApoA-I is associated with a decrease in the content of neutrophilic granulocytes and an increase in the concentration of small lymphocytes, IL-10 and IgE. Deficiency of ApoA-I is associated with an increase in the content of CD45RA+, CD16+, CD56+ lymphocyte phenotypes in blood. Low concentrations of ApoA-I are associated with low expression activity of L-selectin gene and free L-selectin ligand. Due to deficiency of ApoA-I, no significant differences were detected in the content of transferrin, free transferrin receptor, haptoglobin, free calcium-dependent cell adhesion protein, and free pool of receptors involved in apoptosis. Conclusion: deficiency of ApoA-I in blood plasma is associated with increased migration of neutrophils into the tissue and cell-mediated cytotoxicity of lymphocytes and occurs because of the effect of decreased activity of the level of antioxidant defense, changes in the structure of cell membranes and the participation of adhesion molecules.

Key words: RCT; blood lipid profile; ApoA-I; ApoB; oLDLP; neutrophilic leukocytes; small lymphocytes; IgE; IL-10; sL-selectin; Arctic

For citation: Pashinskaya K.O., Samodova A.V., Dobrodeeva L.K. The effect of the content of ApoA-I in peripheral blood on the state of immune homeostasis in people living in extreme climatic conditions of the Arctic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (9): 539-545 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-539-545>

For correspondence: Pashinskaya Ksenia Olegovna, junior researcher of the laboratory regulatory mechanism of immunity of the Institute of physiology of natural adaptations of the FECIAR UrB RAS; e-mail: nefksu@mail.ru

Information about authors:

Pashinskaya K.O., <http://orcid.org/0000-0001-6774-4598>
Samodova A.V., <http://orcid.org/0000-0001-9835-8083>
Dobrodeyeva L.K., <http://orcid.org/0000-0003-3211-7716>

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

Acknowledgment. *Work is performed under the program of fundamental scientific research on the topic of the laboratory of regulatory mechanisms in immunity, Institute of physiology of natural adaptations, «the Role of the extracellular pool of adhesion molecules and short peptides in the formation and outcome of adaptive reactions to changing light conditions» (№ AAAA-A17-117033010123-0).*

Received 15.07.2020
Accepted 09.04.2021

Введение. Нарушение метаболических регуляторных механизмов становятся для современного человека серьезнейшей проблемой. Растет число «наеденных» синдромов, возрастает угроза несовместимых пищевых продуктов и утраты толерантности к пищевым антигенам. Метаболические проблемы человека становятся главной причиной и лежат в основе этиологических факторов социально значимых болезней сердечно-сосудистой, эндокринной систем и заболеваний органов пищеварения. Метаболический синдром является одной из широко обсуждаемых проблем современной медицины. По статистическим данным в России метаболическим синдромом страдает более 30% взрослого населения. Основными проявлениями метаболического синдрома являются артериальная гипертония, ожирение и гипергликемия. Известно, что у пациентов с метаболическим синдромом в 3 раза быстрее развивается атерогенез, что ведет к развитию сердечно-сосудистых заболеваний и через 5-7 лет приводит к развитию сахарного диабета II типа [1].

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) способствуют удалению холестерина (ХС), который клетки синтезируют и/или поглощают в составе хиломикрон (ХМ), липопротеинов очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП). Связывание апоА-I ЛПВП с рецепторами клеток внепочечных тканей обеспечивает переход свободного холестерина в оболочку ЛПВП, под действием лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) холестерин этерифицируется до сложных эфиров ХС (ЭХС) и перемещается в сердцевину, образуя липидное ядро ЛПВП [2]. Постоянному поглощению свободного ХС частицами ЛПВП для осуществления обратного транспорта холестерина (ОТХ) способствует снижение концентрации ХС на поверхности ЛПВП. Нарушение ОТХ связано с дисфункцией ЛПВП. К дисфункции ЛПВП приводит изменение состава протеома и/или липидома ЛПВП и проявляется нарушением антиоксидантной и противовоспалительной функций [3 – 5]

В структуре ЛПВП может содержаться от одной до пяти молекул апоА-I. В условиях окислительного стресса, инфекции или воспаления изменение в структуре апоА-I несомненно влияет на функциональность ЛПВП. Так, в очаге воспаления миелопероксидаза (МПО) индуцирует окисление аминокислотных остатков апоА-I в положениях 143-165 и процессы нитрирования и хлорирования специфических остатков апоА-I, что приводит к нарушению активации ЛХАТ [3, 4, 6]. При сахарном диабете II типа в структуре апоА-I происходит гликозилирование остатков лизина [1], при атеросклерозе ЛПВП обогащены апоС-III и сывороточным амилоидом А (SAA) [5]. SSA является членом семейства амилоидов и обладает высокой тропностью к апоА-I ЛПВП [1,7,8]. Провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6, TNF- α) способствуют синтезу SAA, при воспалении дисфункция ЛПВП связана с замещением апоА-I до 80% SAA и проявляется снижением содержания апоА-I и более низкой

способностью ЛПВП обеспечивать обратный транспорт холестерина [1, 3, 4, 9]

При развитии острого воспаления дисфункция ЛПВП и изменение ориентации апоА-I происходит в результате повышения полярности липидных доменов ЛПВП вследствие гидролиза фосфолипидов ферментом секреторная фосфолипаза A2 группы IIА (sPLA₂), экспрессия которого индуцируется провоспалительными цитокинами. В период острой фазы воспаления повышенное содержание триглицеридов (ТГ) в крови может способствовать реорганизации липидных компонентов ЛПВП и привести к нарушению стабильности ЛПВП и усилению катаболизма апоА-I [6].

Начальный этап биологической реакции воспаления во внутрисосудистой среде индуцируется окислением ЛПНП, которые имеют нарушенную конформацию апоВ-100 активными формами кислорода (АФК). Секрция нейтрофилами H₂O₂ и NO предназначена для окисления апоВ-100, с последующим формированием афизиологичных эпитопов, определяя которые, toll-подобные рецепторы признают безлигандные ЛПНП как «не свои», подлежащие удалению из пула внутрисосудистой среды [2,10]. Повышенное содержание в межклеточной среде ненасыщенных жирных кислот, ТГ, ЛПНП, окисленно модифицированных ЛПНП (оЛПНП) или аномальное содержание иных субстанций обуславливает через toll-рецепторы активизацию митогензависимых протеинкиназ, синтез первичных и вторичных медиаторов реакции превентивного воспаления (хемокины, молекулы адгезии, белки острой фазы, цитокины) [11,12]. Известно, что аутофагия может развиваться в ответ на клеточный стресс под влиянием оЛПНП [13].

Безлигандные ЛПНП, удаленные из внутрисосудистой среды путем транцитоза в интиму артерий, утилизируются макрофагами. Макрофаги воспринимают ЛПНП как денатурированные макромолекулы белка и подвергают их гидролизу. Накопление поли-ЭХС в макрофагах с последующим формированием афизиологичных пенистых клеток обусловлено низкой активностью кислых гидролаз для поли-ЭХС [2,14]. Развитие превентивного воспаления в стенке сосуда с последующим включением иммунного компонента лежит в основе патогенеза атеросклероза.

Наряду с профилактикой, лечением и диагностикой осложнений атеросклероза важен вопрос выявления достоверных маркеров риска формирования атеросклероза в ситуации повышения уровня заболеваемости атеросклерозом в России и в мире.

Поскольку апо-белки являются структурными компонентами липопротеинов (ЛП), то соотношение апоВ/апоА-I характеризует баланс между атерогенными и антиатерогенными ЛП в крови и может быть ранним потенциальным маркером риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

Увеличение показателя апоВ/апоА-I связано с высоким риском развития ССЗ, в частности атеросклероза

сонных артерий и периферических артерий нижних конечностей [15,16]. В отличие от липидных компонентов аполипопротеины апоВ и апоА-I не покидают молекулы липопротеинов, в формировании которых они участвуют. В связи с этим апоВ и апоА-I являются маркерами нарушений липидного профиля крови наряду с традиционными параметрами липидного обмена.

По данным Федеральной службы государственной статистики продолжает увеличиваться уровень заболеваемости населения болезнями системы кровообращения (2015-2019 гг.). В национальном проекте «Здравоохранение» один из восьми федеральных проектов посвященный снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, начиная с профилактики, включая популяционную профилактику [17]. Так, в структуре общей смертности населения Российской Федерации на долю ССЗ приходится 56% [18]. Развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых и цереброваскулярных событий у больных с клиническими проявлениями атеросклероза является ведущей причиной инвалидизации и смертности населения всех развитых стран. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) существует угроза смертности для более 23,3 млн человек в 2030 г. от сердечно-сосудистых заболеваний [19]. У жителей, проживающих на арктических территориях, по сравнению со средней полосой России, выше риск появления сердечно-сосудистых катастроф [20].

В связи с вышеизложенным, целью работы является выявление влияния содержания апоА-I в периферической крови на состояние иммунного гомеостаза у лиц, проживающих в экстремальных климатических условиях Арктики.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить порядок липидных фракций крови у жителей Арктики в зависимости от уровня содержания апоА-I
2. Определить взаимосвязь содержания апоА-I в периферической крови и активности иммунокомпетентных клеток у лиц, проживающих в Арктике.
3. Установить взаимосвязь содержания апоА-I периферической венозной крови и внеклеточного пула рецепторов sCD71, sCD324, sCD62L, sApo-1/Fas, sFasL у людей, проживающих на арктической территории.
4. Выяснить механизм активного транспорта апоА-I под влиянием противовоспалительного (IL-10) и провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-6, INF- γ) у жителей Арктики.
5. Изучить соотношение содержания апоА-I в периферической венозной крови и сывороточных иммуноглобулинов IgA, M, G, E у лиц, проживающих в Арктике.

Материал и методы. Проведено иммунологическое обследование 191 жителя поселка Ревда Мурманской области, 160 женщин и 31 мужчины, в возрасте от 21 до 55 лет. Поселок Ревда (67°56'13"с.ш.) Мурманской области находится в центральной части Кольского полуострова, за полярным кругом и относится по природным условиям к экстремально дискомфортной зоне проживания [21].

Критериями включения в исследование были: 1) проживание в арктической зоне РФ: Мурманская область; 2) заполнение информированного согласия на обследование; 3) возраст от 20 до 55 лет. Критерии исключения определяли в ходе первичного статистического анализа результатов исследования. Все исследования проводи-

лись с согласия волонтеров и в соответствии с требованиями Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000 г.).

У обследованных лиц определяли содержание ЛПНП, апоВ-100 в составе частиц ЛПНП (апоВ), ЛПВП, апоА-I в составе частиц ЛПВП (апоА-I), оЛПНП, ТГ, ФЛ, общего холестерина (ОХС) в сыворотке крови иммуноферментным методом реактивами «Bender MedSystems» (Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Evolis» фирмы «Bio-Rad» (Германия).

Комплекс иммунологического исследования включал изучение гемограммы, фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови. Количество и соотношение клеток гемограммы подсчитывали в мазках крови, окрашенных по методу Романовского-Гимзе. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли с помощью тест-набора «Реакомплекс» (Россия). Изучены фенотипы лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD10+, CD16+, CD19+, CD23+, CD25+, CD45RA+, CD56+, CD62L+, CD71+, CD95+, HLA-DR+) методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител («Сорбент», г. Москва). Содержание IgA, IgM, IgG, IgE, цитокинов IL-2, IL-6, INF- γ , трансферрина, свободного рецептора трансферрина sCD71, молекул межклеточной адгезии sCD324, sCD62L, белка апоптоза sApo-1/Fas и лиганда к Fas sFasL в сыворотке крови изучали методом иммуноферментного анализа. Реакции оценивали с помощью фотометра Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) и автоматического иммуноферментного анализатора «Evolis» фирмы «Bio-RAD» (Германия).

Анализ результатов был проведен в зависимости от уровня содержания апоА-I: у 111 обследованных людей выявлено низкое содержание апоА-I (менее 115 мг/дл) и у 80 человек концентрация апоА-I – в пределах физиологической нормы (115-220 мг/дл). На основе первичного статистического анализа для оценки влияния содержания апоА-I на состояние иммунного гомеостаза был проведен отбор в группы сравнения и контроля на основе распределения значений содержания апоА-I: ниже Q_1 (25%-квартиль: апоА-I <90 мг/дл; $n=48$) и выше Q_3 (75%-квартиль: апоА-I >120 мг/дл; $n=48$). В результате в группу сравнения были включены наблюдения с низким содержанием (дефицитом) апоА-I, а в группу контроля – наблюдения с содержанием апоА-I в пределах нормы, не превышая уровень референсного значения. Критерий исключения: распределение значений содержания апоА-I между Q_1 - Q_3 (от 90 мг/дл до 120 мг/дл). Данный отбор в группы сравнения и контроля обеспечил их репрезентативность и равномерность, дополнительный отбор по показателям липидного обмена (содержание ОХС, ТГ, ФЛ, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП) не проводили с учетом цели исследования. Исследование нерандомизированное контролируемое.

Распределение значений количественных показателей в группах сравнения и контроля подчинялись закону нормального распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). В качестве описательной статистики использовали среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm \delta$). Для оценки различий количественных показателей группы сравнения по отношению к группе контроля применяли критерий t-Стьюдента для независимых выборок. Критерием статистической достоверности разницы считали уровень $p < 0,05$. Полученные резуль-

таты обработаны с применением прикладных программ прикладных программ «Microsoft Excel 2010» (США) и «Statistica 21.0» («StatSoft», США).

Результаты и обсуждение. Среднее содержание apoA-I ($110,30 \pm 3,28$ мг/дл) в крови у жителей поселка Ревда Мурманской области ниже референсного предела содержания, в 58% случаях выявлена пониженная концентрация apoA-I. У лиц с низким содержанием apoA-I средние концентрации ТГ, ХС и oЛПНП выше по сравнению с таковыми в группе лиц с содержанием apoA-I в пределах нормы. В группе сравнения (apoA-I < 90 мг/дл) наблюдается повышение концентраций ТГ в 62,5% и ХС в 37,5% случаев. Одновременное повышение содержания ХС и ТГ характеризуется как III тип гиперлипидемии.

При дефиците apoA-I отмечается повышение содержания ЛПНП и понижение содержания apoB. При увеличении триглицеридов в крови (>2,2 ммоль/л) повышение показателей липидных фракций затрудняет их интерпретацию, уровень ЛПНП будет завышен [14]. Порядок липидных фракций крови у жителей пос. Ревда Мурманской области в зависимости от уровня содержания apoA-I представлен в таблице.

Снижение apoA-I и ЛПВП ассоциировано со снижением поглощения клетками ЛПОНП, ЛПНП по причине нарушения формирования apoE/B-100 и apoB-100-лигандов. Безлигандные ЛПНП не поглощаются клетками и в крови происходит накопление ЖК в форме ТГ, сочетающееся с повышением в крови ЖК в форме ЭХС. При длительной циркуляции в кровотоке безлигандные ЛПНП подвержены окислению, в результате происходит образование афизиологичных эпитопов путем денатурации apoB с последующей опсонизацией безлигандных ЛПНП компонентами комплемента и распознаванием toll-подобными рецепторами. [2, 14]. В результате биологической реакции трансцитоза клетки монослоя эндотелия выводят из внутрисосудистой среды физиологично денатурированные, безлигандные ЛПНП в интиму артерий эластического типа [22].

Повышенное содержание ТГ в крови может привести к дисфункции ЛПНП из-за реорганизации липидных компонентов, вызванной повышенной активностью БПЭХс. В условиях гипертриглицеридемии высокая активность БПЭХс способствует повышенному переносу ЭХС из ЛПВП в обмен на ТГ из ЛПНП, в результате в ЛПВП происходит изменение соотношения ЭХС/ТГ, что приводит к формированию дисфункциональных ЛПВП, в которых 50% ХС заменено на ТГ. Обогащение ТГ частиц ЛПВП и изменение соотношения ЭХС/ТГ важно для антиоксидантной активности и циркуляции ЛПВП. При преобладании в крови пальмитиновых ЛПНП, переходящих ЭХС, оказывается недостаточным для формирования лигандных ЛПНП [2 – 4].

Более высокие значения показателя apoB/apoA-I у лиц с низким содержанием apoA-I (<90 мг/дл) свидетельствует о риске развития сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза, а также о снижении антиоксидантной активности ЛПВП, что проявляется в увеличении oЛПНП, которые играют ключевую роль в развитии атеросклероза, выступая в роли индуктора атерогенеза в сосудистой стенке [23]. При низком содержании apoA-I установлено более высокое значение oЛПНП ($r = -0,936$; $p = 0,019$).

При снижении изучаемого транспортного белка показатель apoB/apoA-I находится в пределах физиологической нормы (до 1,0 усл. ед.). Однако, есть данные, что значения apoB/apoA-I > 0,57 усл. ед. применяется для выявления атеросклероза сонных артерий [15]. При значении apoB/apoA-I > 0,46 усл. ед. можно предположить, что у лиц с ожирением и артериальной гипертензией имеются начальные стадии атеросклероза [24]. Следовательно, при каких значениях apoB/apoA-I можно судить о развитии атеросклероза, еще требует дальнейшего изучения.

Окисленные ЛПНП (oЛПНП), первичные провоспалительные цитокины активируют эндотелий артерий для привлечения воспалительных клеток из кровотока внутрь сосудистой стенки [25]. Для распознавания эндотелиальных воспалительных сигналов на цитоплазматической мембране решающее значение имеют PS-GL-1 и L-селектин. Ингибирование процесса шеддинга L-селектина на нейтрофилах увеличивает их адгезию к очагам воспаления. Повышение адгезивных свойств нейтрофилов приводит к перераспределению из циркулирующего пула в маргинальный [26].

Дефицит содержания apoA-I ассоциирован со снижением содержания нейтрофилов в периферической венозной крови (с $5,56 \pm 0,81$ до $4,63 \pm 0,72 \times 10^9$ кл/л; $p < 0,05$) преимущественно с 2 и 3 сегментами ядер (соответственно с $1,71 \pm 0,21$ до $1,50 \pm 0,15 \times 10^9$ кл/л; $p < 0,05$) без существенных различий со стороны содержания лимфоцитов ($2,61 \pm 0,28$ и $2,53 \pm 0,25 \times 10^9$ кл/л), моноцитов ($0,69 \pm 0,15$ и $0,65 \pm 0,10 \times 10^9$ кл/л) и эозинофилов ($0,11 \pm 0,03$ и $0,15 \pm 0,03 \times 10^9$ кл/л). Снижение содержания нейтрофилов в крови при низком уровне apoA-I свидетельствует об их перераспределении из внутрисосудистого пула, возможно, в ответ на развитие сосудистого воспаления. Показатели гемограммы в зависимости от содержания apoA-I у жителей пос. Ревда Мурманской области представлены на рис. 1.

В структуре лимфоцитогаммы при дефиците apoA-I установлено увеличение содержания малых лимфоцитов (с $0,44 \pm 0,12$ до $0,58 \pm 0,17 \times 10^9$ кл/л; $p < 0,01$), являющихся в основном рециркулирующими [27], форма которых является наиболее экономичной для сохранения информации. Поскольку лимфоцит несет информацию о неблагоприятии, то и увеличение малых лимфоцитов при дефиците apoA-I связано с повышением содержания ТГ в крови. Повышение в крови уровня содержания ТГ

Порядок липидных фракций крови в зависимости от содержания apoA-I у жителей пос. Ревда Мурманской области

Показатели	Уровни референсных значений	Группы сравнения в зависимости от уровня содержания apoA-I	
		apoA-I < 90 мг/дл, n=48	apoA-I > 120 мг/дл, n=48
ОХС, ммоль/л	2,09-6,2	$6,03 \pm 0,57^*$	$4,92 \pm 0,44$
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0-3,3	$3,13 \pm 0,17$	$1,66 \pm 0,11$
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,9-1,9	$1,52 \pm 0,12$	$2,56 \pm 0,21$
oЛПНП, мкг/мл	0,8-10	$8,72 \pm 0,69^*$	$5,27 \pm 0,43$
ТГ, ммоль/л	0,5-2,2	$3,05 \pm 0,36^{**}$	$1,77 \pm 0,17$
ФЛ, ммоль/л	2-3	$1,94 \pm 0,09$	$1,88 \pm 0,06$
apoB, мг/дл	52-138	$61,30 \pm 2,94^*$	$69,27 \pm 3,17$
apoA-I, мг/дл	115-220	$82,53 \pm 2,29^{***}$	$138,91 \pm 3,59$
apoB/apoA-I, усл.ед.	до 1,0	$0,65 \pm 0,03^*$	$0,54 \pm 0,02$

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – достоверность различия по сравнению с контрольной группой (apoA-I > 120 мг/дл).

>2,2 ммоль/л является неблагоприятным и существенно повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний.

В средних значениях относительного и абсолютного содержания фенотипов лимфоцитов в периферической крови при дефиците апоА-I не наблюдали изменений в уровнях содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), активированных Т-клеток с рецепторами к трансферрину (CD71+), IL-2 (CD25+) и с антигенами Главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR+), а также Т-хелперов (CD4+) и В-клеток (CD19+). Статистически значимые различия установлены относительно уровня содержания в крови наивных Т-лимфоцитов с фенотипом CD45RA+, натуральных киллеров (CD16+), молекул межклеточной адгезии (CD56+) и клеток с Fc-рецептором к IgE, концентрации которых у лиц с дефицитом содержания апоА-I были выше ($p < 0,01-0,001$) и представлены на рис. 2. Активизация клеточно-опосредованной цитотоксичности на фоне гиперлипидемии III типа опосредовано, на наш взгляд, повышением содержания в крови ТГ, ХС и оЛПНП.

Низкие концентрации апоА-I ассоциированы с низкой активностью экспрессии гена L-селектина, что проявляется тенденцией снижения содержания фенотипа CD62L⁺ (с $0,65 \pm 0,09$ до $0,53 \pm 0,08 \times 10^9$ кл/л; $p < 0,05$) и соответственно свободного лиганда L-селектина (sL-селектина) (с $12,55 \pm 0,83$ до $7,95 \pm 0,97$ нг/мл; $p < 0,01$). Известно, что L-селектин закрепляет связь молекул ад-

гезии и лейкоцита, участвует в формировании маргинального пула лейкоцитов и их миграции в ткани. Более низкие уровни sL-селектина наблюдаются у пациентов с риском ишемической болезни сердца [26].

У группы лиц с низким содержанием апоА-I в крови выявлено снижение содержания в крови INF- γ (с $71,74 \pm 4,92$ до $52,25 \pm 4,59$ пг/мл; $p < 0,05$) и повышение концентрации в 3 раза IL-10 (с $8,52 \pm 0,71$ до $21,78 \pm 0,88$ пг/мл; $p < 0,05$), без изменений со стороны содержания IL-6 и IL-2 (рис. 3).

Физиологической ролью IL-10 является обеспечение адекватного уровня реакций иммунитета за счет подавления чрезмерного синтеза цитокинов и иммуноглобулинов, в том числе, секреторных IgA и IgE [28 – 30]. При этом происходит снижение функциональной активности Th1 и продукции ими провоспалительных цитокинов, таких как INF- γ , TNF- α и IL-12. Подобное происходит и под влиянием катехоламинов и глюкокортикоидов, которые способствуют повышению активности Th2 и продукции IL-10, а также секреции IgE [30]. IL-10 снижает экспрессию адгезивных молекул на эндотелиальных клетках [31].

При дефиците апоА-I статистически значимо повышается концентрация IgG и IgE (рис. 4). Повышенные концентрации IgE (>100 МЕ/мл) отмечаются в 17% случаев. Превышение относительно нормативных уровней содержания IgE в крови возможно среди условно здоровых жителей высоких широт в диапазоне 16–40%. Известна связь повышения содержания IgE с сокращением светового периода и напряжением иономагнитной обстановки [32].

Повышение концентраций IgG и IgE при низком содержании апоА-I, возможно, является результатом на повышение содержания оЛПНП в крови из-за снижения антиоксидантной функции ЛПВП. Модификация липопротеинов, в том числе оЛПНП, придает липопротеинам аутоантигенность. Гуморальный ответ на подобные антигены проявляется синтезом аутоантител классов IgM и IgG [25].

Следует отметить, что в анализируемой выборке выявлена относительно высокая частота регистрации (в 43% наблюдений) пониженных концентраций IgG. У жителей заполярного пос. Ревда Мурманской области ранее были выявлены признаки ингибции переключе-

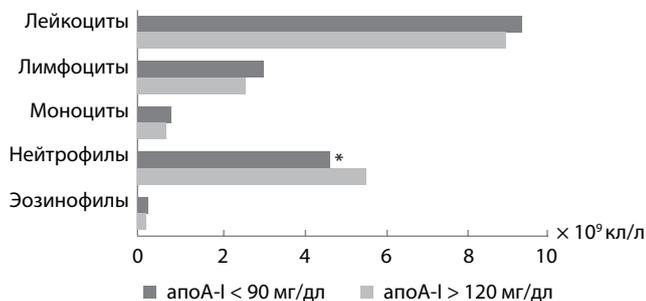


Рис. 1. Показатели гемограммы у жителей пос. Ревда Мурманской области в зависимости от содержания апоА-I.

* – $p < 0,05$ – достоверность различия.

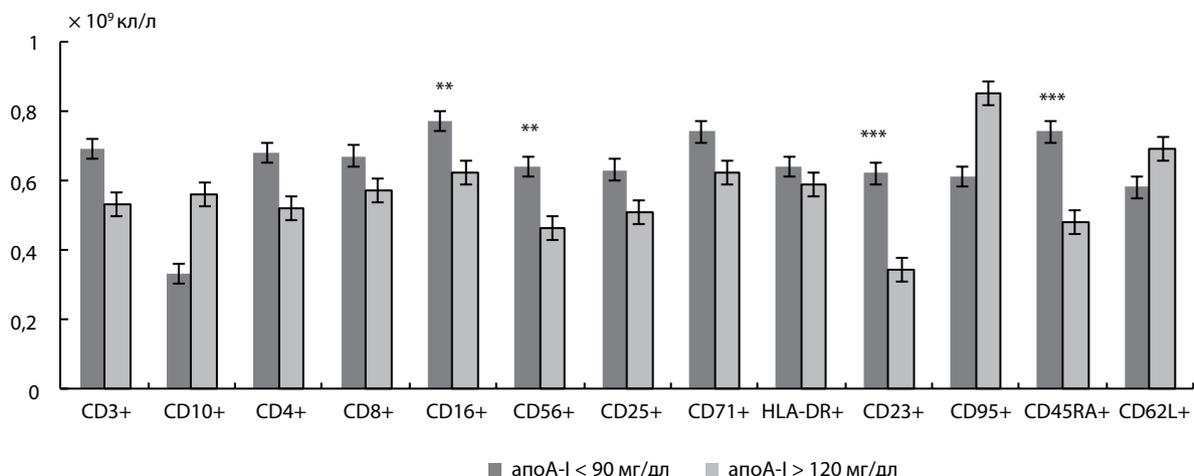


Рис. 2. Уровни фенотипов лимфоцитов у жителей пос. Ревда Мурманской области в зависимости от содержания апоА-I.

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – достоверность различия.

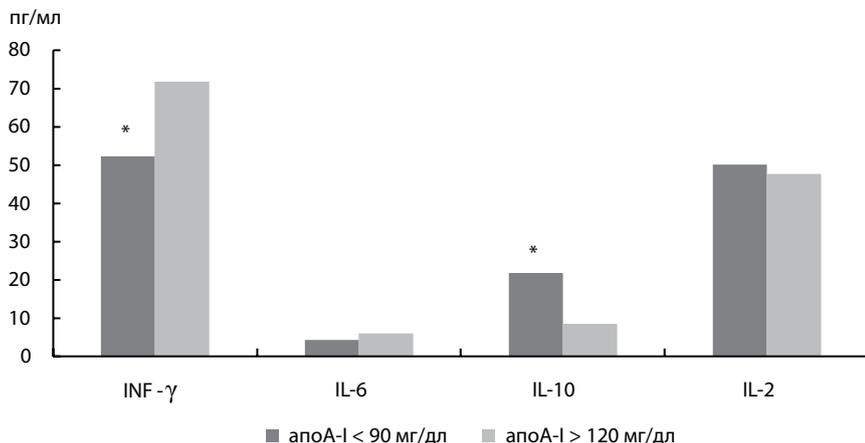


Рис. 3. Содержание цитокинов у жителей пос. Ревда Мурманской области в зависимости от содержания apoA-I.

* – $p < 0,05$ – достоверность различия.

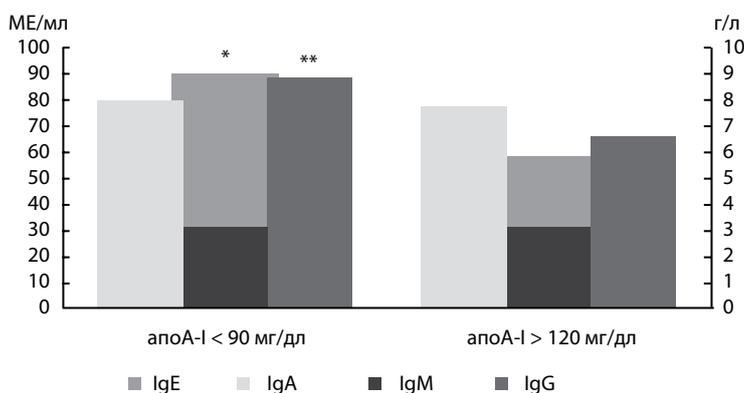


Рис. 4. Уровень сывороточных иммуноглобулинов у жителей пос. Ревда Мурманской области в зависимости от содержания apoA-I.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0, 01$; - достоверность различия.

ния IgM на IgG. Возможен прямой путь переключения синтеза с IgM, минуя синтез IgG, на IgE. IgE участвуют в презентации антигена, которая осуществляется через FcεRI или CD23 на поверхности антиген-распознающих клеток. IgE могут активировать макрофаги, в результате чего они становятся цитотоксическими. Цитотоксичность активированных макрофагов обеспечивается за счет активных форм кислорода и азота [33].

При дефиците содержания apoA-I не установлено статистически значимых различий в содержании трансферрина, свободного рецептора к трансферрину (sCD71), свободного кальций-зависимого белка клеточной адгезии (sCD324), а также свободного пула рецепторов, участвующих в процессе апоптоза: белка sAPO-1Fas и лиганда к апоптозу (sFasL).

Заключение. Для арктических территорий, по сравнению со средней полосой России, характерен более высокий уровень заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями. В проведенном исследовании представлены результаты влияния apoA-I на состояние иммунного гомеостаза у лиц, проживающих в экстремальных климатических условиях Арктики на примере Мурманской области. Показана вероятность применения показателя apoB/apoA-I в оценке риска развития ССЗ. Несмотря на то, что в Мурманской области отмечается тен-

денция снижения общей заболеваемости населения ССЗ, число пациентов с ССЗ остается на довольно высоком уровне.

Установлено, что у жителей пос. Ревда Мурманской области регистрируется низкое содержание в крови apoA-I с дефицитом в 58% случаев. Снижение уровня содержания apoA-I и ЛПВП связано с усилением катаболизма apoA-I и реорганизацией липидных компонентов ЛПВП при повышенном содержании ТГ в крови. Обогащение триглицеридами ЛПВП и изменение соотношения ЭХС/ТГ важно для антиоксидантной активности и циркуляции ЛПВП [2,3]. В условиях гипертриглицеридемии изменение соотношения ЭХС/ТГ в составе ЛПВП уменьшает эффективность антиоксидантной защиты с повышением концентраций oЛПНП ($r = -0,622$; $p = 0,031$). О снижении антиоксидантной

функции ЛПВП свидетельствует повышение показателя apoB/apoA-I. Увеличение значения apoB/apoA-I в группе лиц с дефицитом apoA-I также отражает повышение риска атерогенных изменений.

Дефицит apoA-I ассоциирован с увеличением содержания в крови фенотипов лимфоцитов CD45RA+, CD16+, CD56+. Увеличение активности миграции нейтрофилов в ткани и клеточно-опосредованной цитотоксичности лимфоцитов, на наш взгляд, происходит под влиянием снижения активности уровня антиоксидантной защиты, изменения структуры клеточных мембран и участия молекул адгезии. CD56 является типичной молекулой адгезии, участвующей в цитотоксичности. Цитотоксичность клеток CD56+ отличается тем, что она реализуется в отсутствии молекул гистосовместимости I класса, антител и комплемента. Контактный цитотоксический процесс обеспечивается с участием цитотоксических гранул: после контактного синапса между NK и клеткой, цитотоксические агенты проникают в атакуемую клетку через отверстие в мембране, образуемого перфорином.

Финансирование. Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований по теме лаборатории регуляторных механизмов иммунитета Института физиологии природных адаптаций «Роль внеклеточного пула молекул адгезии и коротких пептидов в формировании и исходе адаптивных реакций человека на изменение светового режима» (№ АААА-А17-117033010123-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–9, 11–13, 15, 16, 19, 26, 28–30 см. REFERENCES)

1. Добродеева Л.К. Регуляция метаболических процессов при сахарном диабете II типа. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2014.
2. Титов В.Н. Атеросклероз – проблема биологии: нарушение биологических функций питания и эндоэкологии. *Успехи современной биологии*. 2009; 129(2): 124-43.
3. Гуцол Л.О., Егорова И.Э., Коршунова Е.Ю. Механизмы формирования дисфункции липопротеинов высокой плотности (сообщение 1). *ЭНИ Забайкальский медицинский вестник*. 2019; 3: 72-81.
4. Гуцол Л.О., Егорова И.Э., Коршунова Е.Ю. Механизмы формирования дисфункции липопротеинов высокой плотности (сообщение 2). *ЭНИ Забайкальский медицинский вестник*. 2019; 4: 171-80.

10. Герасимова Е.В., Попкова Т.В., Новикова Д.С. Проатерогенные нарушения обмена липидов крови у больных ревматоидным артритом. *Научно-практическая ревматология*. 2017; 3: 311-20.
14. Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Рожкова Т.А. Иной взгляд на диагностику гиперлипотеинемии, холестерин липопротеинов низкой плотности и действие статинов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 1: 27-37.
17. Глушченко В.А., Иркиенко Е.К. Сердечно-сосудистая заболеваемость – одна из важнейших проблем здравоохранения. *Медицина и организация здравоохранения*. 2019; 4(1): 56-63.
18. Иванов Д.О., Орел В.И., Александрович Ю.С., Пшенисннов К.В., Ломовцева Р.Х. Заболевания сердечно-сосудистой системы как причина смертности в Российской Федерации: пути решения проблемы. *Медицина и организация здравоохранения*. 2019; 4(2): 4-12.
20. Ревич Б.А. Влияние глобальных климатических изменений на здоровье населения Российской Арктики. М.: Представительство ООН в РФ; 2008.
21. Виноградова В.В. Природно-климатические и биоклиматические условия жизни населения Мурманской области. *Известия РАН. Серия географическая*. 2015; 6: 90-9.
22. Титов В.Н., Дыгай А.М., Котловский М.Ю., Курдюк Е.В., Якименко А.В., Якимович И.Ю. и др. Пальмитиновая, олеиновая кислоты их роль в патогенезе атеросклероза. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 13(5): 149-59.
23. Жилиева Ю.А., Михин В.П., Жилиева О.А., Панченко Г.В., Громнацкий Н.И. Состояние параметров перекисного окисления липидов крови и эластических свойств сосудистой стенки у больных ишемической болезнью сердца на фоне терапии дженерическими статинами. *Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье»*. 2013; 4: 66-72.
24. Кадомцева Л.В., Зуфаров А.А., Поликарпова Н.В. Аполипопротеины В и А1 – как маркеры риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. *Вестник экстренной медицины*. 2019; XII (5): 67-70.
25. Миролюбова О.А., Добродеева Л.К. Иммунологические аспекты атеросклероза: учебное пособие. Архангельск: ИЦ СГМУ; 2005.
27. Нежаев С.Г., Григорьев С.Г. Полиморфноядерные лимфоциты как система антиэндоотоксикационной защиты организма. *Иммунология*. 2010; 3: 116-8.
31. Бережная Н.М. Цитокиновая регуляция при патологии: стремительное развитие и неизбежные вопросы. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6(2): 26-34.
32. Добродеева Л.К. Содержание иммуноглобулина Е в сыворотке крови у людей, проживающих на европейской территории России. *Экология человека*. 2010; 6: 3-10.
33. Добродеева Л.К., Самодова А.В., Крякина О.Е. Взаимосвязи в системе иммунитета. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2014.
11. Jansen O., Sanzenbacher R., Kabelitz D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte population. *Cell and Tissue Research*. 2000; 301: 85-99.
12. Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 93: 275-83.
13. Dodson M., Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine*. 2013; 63: 207-21.
14. Titov V.N., Amelyushkina V.A., Rozhkova T.A. Other view on the diagnosis of hyperlipoproteinemia, low-density lipoprotein cholesterol and the effect of statins. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 1:27-37. (in Russian)
15. Ji Eun Jun, Young Ju Choi, Yong-Ho Lee et al. ApoB/ApoA-I ratio is independently associated with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus with well-controlled LDL cholesterol levels. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2018; 33(1): 138-47.
16. Forte F., Calcaterra L., Lupoli R., Orsini R.C., Chiurazzi M., Trippaldella M. et al. Association of apolipoprotein levels with peripheral arterial disease: a meta-analysis of literature studies. *European Journal of Preventive Cardiology [Internet]*. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwaa0292020>
17. Glushchenko V.A., Irklienko E.K. Cardiovascular morbidity is one of the most important health problems. *Meditsina I organizatsiya zdoravookhraneniya*. 2019; 4(1): 56-63. (in Russian)
18. Ivanov D.O., Orel V.I., Alexandrovich Yu.S., Pshenisnov K.V., Lomovtseva R.H. Diseases of the cardiovascular system as a cause of mortality in the Russian Federation: ways to solve the problem. *Meditsina I organizatsiya zdoravookhraneniya*. 2019; 4(2): 4-12. (in Russian)
19. Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine*. 2006; 3(11): 42.
20. Revich B.A. The impact of global climate change on the health of the population of the Russian Arctic. Moscow: UN Representative Office in the Russian Federation; 2008. (in Russian)
21. Vиноградова В.В. Natural climatic and bioclimatic living conditions of population of Murmansk Region. *Izvestiya RAN. Geograficheskaya seriya*. 2015; 6: 90-9. (in Russian)
22. Titov V. N., Dygai A. M., Kotlovsky Y. M., Kurdak E. V., Yakimenko V. A., Yakimovich I. Y. et al. Palmitic and oleic acids; their role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Bulleten Sibirskoy meditsiny*. 2014; 13(5): 149-59. (in Russian)
23. Zhilyaeva Yu.A., Mikhin V.P., Zhilyaeva O.A., Panchenko G.V., Gromnatsky N.I. The state of the parameters of blood lipid peroxidation and elastic properties of the vascular wall in patients with ischemic heart disease during therapy with generic statins. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek I ego zdorov'e"*. 2013; 4: 66-72. (in Russian)
24. Kadomtseva L.V., Zufarov A.A., Polikarpova N.V. Apolipoproteins B and A1 – as markers of the risk of developing cardiovascular diseases. *Vestnik ekstremnoy meditsiny*. 2019; XII (5): 67-70. (in Russian)
25. Mirolyubova O.A., Dobrodeyeva L.K. Immunological aspects of atherosclerosis: a textbook [Uchebnoye posobie]. Arkhangelsk: SGMU Publishing Center; 2005. (in Russian)
26. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behavior. *Cell and Tissue Research*. 2018; 371: 437-53.
27. Nekhayev S.G., Grigoryev S.G. Polymorphonuclear lymphocytes as a system of anti-endotoxic defense of the body. *Immunologiya*. 2010; 3: 116-8. (in Russian)
28. Hill D.A., Arris D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2010; 28: 623-67.
29. Macpherson A.J., Geuking M.B., MacCoy K.D. Homeland security: IgA at the frontiers of the body. *Trends in immunology*. 2012; 33: 160-7.
30. Hebeda C.B., Teixeira S.A., Tamura E.K., Muscara M.N., de Mello S.B.V., Marcus R.P. et al. Nitric oxide modulates lipopolysaccharide-induced endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule expression via interleukin-10. *Clinical and experimental immunology*. 2011; 2: 172-6.
31. Berezhnaya N.M. Cytokine regulation in pathology: onrush development and inevitable issues. *Tsitokiny I vospalenie*. 2007; 6(2): 26-34. (in Russian)
32. Dobrodeyeva L.K. The content of IgE immunoglobulin E in blood serum in people living in the European territory of Russia. *Ekologiya cheloveka*. 2010; 6:3-10. (in Russian)
33. Dobrodeyeva L.K., Samodova A.V., Kryakina O. E. The relationships in the immune system. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2014. (in Russian)

REFERENCES

1. Dobrodeyeva L.K. Regulation of metabolic processes in diabetes mellitus type II. Yekaterinburg: RIO UrO RAN; 2014. (in Russian)
2. Titov V.N. Atherosclerosis is a problem of general biology: of the biological functions of nutrition and endoecology. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2009; 129(2): 124-43. (in Russian)
3. Gutsol L.O., Yegorova I.E., Korshunova E. Yu. Formation mechanisms of high-density lipoproteins dysfunction (message 1). *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2019; 3: 72-81. (in Russian)
4. Gutsol L.O., Yegorova I.E., Korshunova E. Yu. Formation mechanisms of high-density lipoproteins dysfunction (message 2). *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2019; 4: 171-80. (in Russian)
5. Emiel P.C. High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. *Part of the Subcellular Biochemistry book series*. 2020; 94: 399-420.
6. Rosenson R.S., Bryan B., Benjamin J.A., Philip B., John C. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2016; 13(1): 48-60.
7. Banka C.L., Yuan T., Debeer M.C., Kindy M., Curtiss L., Debeer F.C. Serum amyloid A (SAA): effect on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *Lipid Research Journal*. 1995; 36: 1058-64.
8. Yamada T., Miida T., Itoh Y., Kawai T., Benson M. Characterization of serum amyloid A as a plasma apolipoprotein. *Clinica Chimica Acta*. 1996; 252: 105-12.
9. Kumon Y., Suehiro T., Ikeda Y., Yoshida K., Hashimoto K., Ohno F. Effect of serum amyloid A protein on high-density lipoprotein in chronic inflammatory disease. *Clinical Biochemistry*. 1993; 26: 505-11.
10. Gerasimova E.V., Popkova T.V., Novikova D.S. Proatherogenic disorders of blood lipid metabolism in patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2017; 3: 311-20. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Чельдиева Ф.А.^{1,2}, Решетняк Т.М.^{1,2}, Черкасова М.В.¹, Ли́ла А.М.^{1,2}

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДАМИ У ПАЦИЕНТОВ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», лаборатория сосудистой ревматологии, 115522 Москва, Россия;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, кафедра ревматологии, 123995, Москва, Россия

Антифосфолипидные антитела (аФЛ) – это семейство различных аутоантител, которые приводят к рецидивирующим тромбозам сосудов любой локализации и калибра, и/или акушерской патологии – потере плода. К серологическим маркерам антифосфолипидного синдрома (АФС) отнесены только три вида аФЛ – волчаночный антикоагулянт (ВА), антитела к кардиолипину (аКЛ) классов IgG и IgM, антитела к β2-гликопротеину1 (аβ2ГП1) классов IgG и IgM. Средние и высокие уровни аКЛ и аβ2ГП1 (IgG и/или IgM) были выбраны в качестве серологических маркеров в АФС классификационных критериях 2006 г. Порог значений, используемый от низких до умеренных и высоких уровней не был стандартизирован. Вопросы стандартизации аФЛ до сих пор остаются нерешенными, что приводит к получению неоднородных результатов проводимых исследований. Целью исследования была оценка сопоставимости исследования IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 иммуноферментным и хемилюминесцентным анализами у пациентов с АФС с системной красной волчанкой (СКВ) и без нее. Материалом для исследования служила периферическая кровь 70 пациентов (49 женщин и 21 мужчин) с АФС, из которых 21 (30%) – были с первичным АФС (пАФС) и 49 (70%) – с АФС в сочетании с СКВ. Всем участникам исследования проводилось определение IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 методом иммуноферментного анализа. Методом хемилюминесцентного анализа было проведено исследование: IgG/IgM-аКЛ – у 70 пациентов; IgG/IgM-аβ2ГП1 – у 69 пациентов. Результаты предварительных данных таковы: определение IgG-аКЛ и IgG-аβ2ГП1 хемилюминесцентным анализом информативнее согласно уровням позитивности по данным фирмы-производителя, по сравнению с иммуноферментным анализом ($p < 0,05$). Однако, при учете уровней позитивности антител, определяемых по результатам иммуноферментного анализа, уровень положительных значений по данным хемилюминесцентного анализа был гораздо выше показателей фирмы-производителя.

Ключевые слова: антифосфолипидные антитела; антифосфолипидный синдром; системная красная волчанка; иммуноферментный анализ; хемилюминесцентный анализ; антитела к β2 гликопротеину 1; антитела к кардиолипину

Для цитирования: Чельдиева Ф.А., Решетняк Т.М., Черкасова М.В., Ли́ла А.М. Исследование антифосфолипидных антител иммуноферментным и хемилюминесцентным методами у пациентов с антифосфолипидным синдромом и системной красной волчанкой (предварительные данные). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 546-551. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-546-551>

Для корреспонденции: Решетняк Татьяна Магомедовна; д-р мед.наук, проф., зав. лаб. сосудистой ревматологии НИИР им. В.А. Насоновой, проф. каф. ревматологии РМАНПО; e-mail: t_reshetnyak@yahoo.com

Cheldieva F.A.^{1,2}, Reshetnyak T.M.^{1,2}, Cherkasova M.V.¹, Lila A.M.^{1,2}

STUDY OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES BY ENZYME IMMUNOASSAY AND CHEMILUMINESCENT METHODS IN PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (PRELIMINARY DATA)

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Laboratory of Vascular Rheumatology, 115522, Moscow, Russia;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Department of Rheumatology, 123995, Moscow, Russia

Antiphospholipid antibodies (aPL) are a family of different autoantibodies that lead to recurrent vascular thrombosis of any localization and caliber, and/or obstetric pathology – fetal loss. Serological markers of antiphospholipid syndrome (APS) include only three types of aPL – lupus anticoagulant (VA), antibodies to cardiolipin (aCL) classes IgG and IgM, antibodies to β2-glycoprotein 1 (aβ2GPI) classes IgG and IgM. Medium and high levels of aCL and aβ2GPI (IgG and / or IgM) were selected as serological markers of APS in the 2006 classification criteria. However, the threshold of values used from low to moderately high levels has not been standardized. aPL standardization issues are still unresolved, resulting in heterogeneous results of the ongoing studies. The aim of the study was to assess the comparability IgG/IgM-aCL and IgG/IgM-aβ2GPI by enzyme-linked immunosorbent assay and chemiluminescent analysis in patients with APS with and without (systemic lupus erythematosus) SLE. The study included 70 patients (49 women and 21 men) with APS, of which 21 (30%) were with primary APS (pAPS) and 49 (70%) with APS in combination with SLE. All study participants underwent determination of IgG/IgM-aCL and IgG/IgM-aβ2GPI by enzyme-linked immunosorbent. A study was performed by the chemiluminescent analysis: IgG/IgM-aCL – in 70 patients; IgG/IgM-aβ2GPI – in 69 patients. Results. According to preliminary data, the determination of IgG-aCL and IgG-aβ2GPI by the chemiluminescent analysis is informative in assessing positivity according to the manufacturer, compared with the enzyme-linked immunosorbent ($p < 0.05$). However, when taking into account the levels of antibody positivity determined by enzyme-linked immunosorbent, the level of positive values according to chemiluminescent analysis was much higher than the performance of the manufacturer.

Key words: antiphospholipid antibodies; antiphospholipid syndrome; systemic lupus erythematosus; enzyme immunoassay; chemiluminescent analysis; antibodies to β2 glycoprotein 1; antibodies to cardiolipin

For citation: Cheldieva FA, Reshetnyak T.M., Cherkasova M.V., Lila A.M. Study of antiphospholipid antibodies by enzyme immunoassay and chemiluminescent methods in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus (preliminary data). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 546-551. (in Russ.) <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-546-551>

For correspondence: Reshetnyak T.M., MD, PhD, professor, head of the Laboratory of Vascular Rheumatology at the V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, professor of the Department of Rheumatology at the Russian Medical Academy of Postgraduate Education; e-mail: t_reshetnyak@yahoo.com

Information about authors:

Cheldieva F.A., <https://orcid.org/0000-0001-5217-4932>
Reshetnyak T.M., <https://orcid.org/0000-0003-3552-2522>
Cherkasova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3246-1157>
Lila A.M., <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 05.05.2021
Accepted 21.05.2021

Введение. Антифосфолипидные антитела (аФЛ) – это семейство различных аутоантител, которые взаимодействуют с фосфолипидными детерминантами клеточных мембран, фосфолипидно-белковыми комплексами, фосфолипид-связывающими белками, белками свертывающей системы [1]. Наличие этих антител ассоциируется с развитием определенного клинического симптомокомплекса, именуемого антифосфолипидным синдромом (АФС). АФС – аутоиммунная патология сосудов, клинически проявляющаяся рецидивирующими тромбозами сосудов любой локализации и калибра, и/или акушерской патологией – рецидивирующими потерями плода [2, 3]. К серологическим маркерам АФС, согласно Международным классификационным критериям [2], отнесены только три вида аФЛ, обнаруживаемые вместе или по отдельности – это волчаночный антикоагулянт (ВА), IgG и IgM антитела к кардиолипину (аКЛ), а также IgG и IgM антитела к β 2-гликопротеину1 (β 2ГП1). Для диагностики АФС уровень этих антител должен быть средне- и высокопозитивным в двух последовательных определениях с промежутком не менее 12 недель. Это позволяет исключить транзиторное их повышение на фоне инфекций.

Средние и высокие уровни аКЛ (IgG и / или IgM) ассоциированные с клиническими проявлениями АФС были выбраны в качестве серологических критериев в 2006 году [2]. Однако порог, используемый от низких до умеренных и высоких уровней не был стратифицирован [2], и, обычно, используемые в клинических условиях анализы, особенно иммуноферментный, не имеют стандартизированных наборов, что приводит к существенным различиям в оценке позитивности антител между различными лабораториями [4–7].

Хемилюминесцентный анализ был использован для тестирования аутоантител [8–10], а полностью автоматизированная панель анализа HemosIL AcuStar показала сходные характеристики с коммерческими наборами для иммуноферментного анализа [8]. F. Van Hoeske и соавт. [11] оценили уровни аКЛ и β 2ГП1 в автоматизированном хемилюминесцентном анализаторе для диагностики АФС и пришли к выводу, что хемилюминесцентный анализ сравним с иммуноферментным. Преимущества первого метода, по мнению авторов, в более простом (автоматизированном) использовании. S. Zhang и соавт. [12] установили, что хемилюминесцентный анализ показал хорошие результаты в измерении β 2ГП1 и аКЛ, особенно для выявления IgG- β 2ГП1, и может быть более чувствительным в лабораторной диагностике АФС.

Цель исследования – оценить сопоставимость исследования IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1 иммуноферментным и хемилюминесцентным анализами у пациентов с АФС с системной красной волчанкой (СКВ) и без нее.

Материал и методы. В исследование были включены 70 пациентов (49 женщин и 21 мужчина) с АФС, из которых у 21 (30 %) пациентов был первичный АФС (пАФС) и у 49 (70%) – АФС в сочетании с СКВ. Характеристика пациентов приведена в табл. 1.

Критериями включения в исследование служили наличие информированного согласия пациента, достоверность диагноза АФС [2], пациенты с «вероятным» АФС (наличие позитивных аФЛ в сочетании с одним из признаков: тромбоцитопения, livedo reticularis, патология клапанного аппарата сердца и др.), а также пациенты с достоверным диагнозом СКВ (ACR, 1997 г.) [13]. Критерии исключения: выраженная хроническая сердечно-легочная недостаточность, хроническая болезнь почек V стадии, печеночная недостаточность декомпенсированная, хронические инфекции, способные привести к органной недостаточности, онкологические заболевания.

Всем пациентам проводилось определение IgG/IgM-аКЛ, IgG/IgM- β 2ГП1 методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе для лабораторной диагностики аутоиммунных заболеваний Alegria (фирма «Orgentec Diagnostika GmbH», Германия) с набором реагентов для определения антител фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). IgG-аКЛ измерялись в фосфолипидсвязывающей активности IgG-аКЛ на 1 мкг/мл в единицах GPL (IgG phospholipid binding units (GPL Ед/мл), а IgM-аКЛ – в фосфолипидсвязывающей активности IgM-аКЛ на 1 мкг/мл в MPL (IgM phospholipid binding units (MPL Ед/мл). IgG/IgM-ab2ГП1 измеряли в Ед/мл. Уровни позитивности для IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1 приведены в табл. 2.

Методом хемилюминесцентного анализа было проведено исследование IgG/IgM-аКЛ у 70 пациентов, IgG/IgM- β 2ГП1 – у 69 пациентов. Хемилюминесцентный анализ проводили на автоматизированном хемилюминесцентном анализаторе BioFlash (фирма «Biokit S.A.», Испания). Набор реагентов для определения IgG/IgM-ab2ГП1 и IgG/IgM-аКЛ – AcuStar, Испания. Все антитела, определяемые хемилюминесцентным анализом, измерялись в относительных световых единицах (relative light units – RLU). Позитивными, согласно фирме изготовителя, считались уровни ≥ 20 RLU для IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1.

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	IgG/IgM-aКЛ, n=70	IgG/IgM-aβ2ГП1, n=69
Возраст, годы (M ± SD)	38,8 ± 9,6	38,8 ± 9,6
Число пациентов с СКВ+АФС / пАФС	48 / 22	48 / 21
Продолжительность АФС, Ме [25-75%], годы	9,9 [3,5-16,0]	9,9 [3,2-16,5]
Продолжительность СКВ, Ме [25-75%], годы	10,0 [3,8-20,0]	10,9 [3,4-20,2]
Пол: жен./муж., абс. (%)	49/21	48/21
Тромбоз в анамнезе, абс. (%)	Венозный	21 (30)
	Артериальный	17 (24)
	Сочетанный	16 (23)
Акушерская патология*, абс. (%)	26/20 (77)	25/20 (80)
Преднизолон, абс. (%)	38 (54)	38 (55)
Антикоагулянты, абс. (%)	НМГ	12 (17)
	Варфарин	15 (21)
	ПОАК	25 (36)
	Без а/к терапии	18 (26)
Низкие дозы ацетилсалициловой кислоты, абс. (%)	25 (36)	25 (36)
Гидроксихлорохин, абс. (%)	55 (79)	54 (78)

Примечание. SD – стандартное отклонение, Ме – медиана и в квадратных скобках дан интерквартильный 25%-75% разброс, НМГ – низкомолекулярные гепарины, ПОАК – пероральные антикоагулянты. * – акушерская патология рассчитана из числа женщин, имевших беременность на фоне заболевания, процент указан из числа женщин, имевших беременность на фоне заболевания. В числителе – число женщин, имевших беременность на фоне заболевания, в знаменателе – число женщин с акушерской патологией.

Таблица 2

Границы степеней позитивности при оценке результатов определения aКЛ и ab2ГП1 [14]

Степень позитивности	aКЛ		ab2ГП1	
	IgG-aКЛ (GPL)	IgM-aКЛ (MPL)	IgG-ab2ГП1, Ед/мл	IgM-ab2ГП1, Ед/мл
Высокопозитивные	≥ 65,0	≥ 45,0	≥ 60,0	≥ 60,0
Среднепозитивные	35,0-65,0	35,0-45,0	30,0-60,0	30,0-60,0
Низкопозитивные	25,0-35,0	24,7-35,0	15,3-30,0	17,0-30,0
Негативные	< 25,0	< 24,7	< 15,3	< 17,0

Примечание. aКЛ – антитела к кардиолипину, ab2ГП1 – антитела к β2-гликопротеину 1.

Статистический анализ результатов исследований проводился с использованием программ Statistica и Epi Info. Применялись методы описательной статистики и непараметрические методы. Статистическая значимость показателей была определена с вероятностью ложноположительных результатов $p < 0,05$. При описании центральных моментов количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, использовались среднее значение (M) и среднее квадратичное отклонение (SD), при описании признаков, не имеющих нормального распределения, применялись медиана (Me) и интерквартильный размах [между 25-й и 75-й перцентильями]. При сравнении по количественному признаку двух независимых групп использовались критерии Манна-Уитни. Качественные показатели в 2-х несвязанных группах сравнивались в таблице сопряженности 2x2 с помощью теста χ^2 . При количестве наблюдений менее 5 достоверность (P) оценивалась в программе Statistica и указывалась с поправкой по Йетесу. При количестве наблюдений более 5, статистическая обработка данных производилась в программе Epi Info, χ^2 оценивался при достоверном p , указывалось отношение шансов с 95% доверительным интервалом.

Результаты. У 50 (71%) из 70 пациентов выявлялись позитивные IgG-aКЛ при исследовании методом иммуноферментного анализа и у 61 (87%) – методом хемиллюминесцентного анализа (табл. 3). Преобладало число пациентов с высоко-позитивными уровнями IgG-aКЛ по

результатам иммуноферментного анализа, медиана этих антител по данным хемиллюминесцентного анализа составила 704,8 [461,9-2024,0]. Уровни антител при исследовании хемиллюминесцентным методом были разделены на высокопозитивные, среднепозитивные и низкопозитивные в соответствии их степени позитивности по данным иммуноферментного анализа. Высокопозитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе, соответствовавшие высокопозитивным значениям в иммуноферментном, были достоверно выше по сравнению со значениями средних уровней по данным хемиллюминесцентного анализа ($p = 0,009$). Среднепозитивные и низкопозитивные уровни IgG-aКЛ хемиллюминесцентным анализом между собой не различались. У 15 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgG-aКЛ по данным обоих методов определения: 13 из них с отрицательными уровнями IgG-aКЛ по результатам иммуноферментного анализа имели позитивные значения по данным хемиллюминесцентного анализа, и их медиана составила 100,2 RLU [38,1-183,4]. По градации фирмы-изготовителя они соответствовали позитивности (>20 RLU) по этим антителам, однако по градации по уровням позитивности в соответствии со значениями в иммуноферментном анализе у 5 пациентов из этих 13 выявлялись уровни IgG-aКЛ выше 108,0 RLU, что соответствовало низко-позитивным уровням по данным иммуноферментного анализа. Медиана низкопозитивных уровней IgG-aКЛ методом хемиллюминесцентного анализа составила 294,5 [108,7-480,4]. Восемь из 13 пациентов с

отрицательными уровнями IgG-аКЛ по результатам иммуноферментного анализа при исследовании хемиллюминесцентным анализом имели уровни этих антител менее 108,0 RLU. Два пациента в иммуноферментном анализе имели высокопозитивные уровни IgG-аКЛ (>120 GPL), которые были отрицательными в хемиллюминесцентном методе.

Позитивные уровни IgM-аКЛ были зарегистрированы у 19 (27%) из 70 пациентов иммуноферментным анализом и у 22 (31%) – хемиллюминесцентным. Значения IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе, в соответствии с уровнями позитивности по данным иммуноферментного метода, между собой не различались, несмотря на высокопозитивные значения IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе – 190,1 [20,3-248,1] RLU (табл. 3). Как видно из табл. 3, медиана низкопозитивных значений в хемиллюминесцентном анализе была 24,5 [22,4-26,7] RLU, чуть выше позитивных значений по данным фирмы-изготовителя. У 13 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgM-аКЛ по данным обоих методов исследования. У 8 пациентов, IgM-аКЛ отрицательных по результатам иммуноферментного анализа, отмечались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе. У двух из них уровни IgM-аКЛ были ≥ 50 RLU, у оставшихся 6 они колебались в пределах 22,0 – 33,2 RLU. У 3 из 5 пациентов с отрицательными IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе эти показатели в иммуноферментном анализе были выше 100,0 MPL и соответствовали высокопозитивным уровням. У оставшихся двух – уровни IgM-аКЛ в иммуноферментном анализе составили 49,8 и 30,6 MPL соответственно.

IgG-а β 2ГП1 были выявлены у 56 (80%) из 69 пациентов в иммуноферментном анализе и у 64 (93%) – в хемиллюминесцентном анализе (см. табл. 3). Высокопозитивные уровни IgG-а β 2ГП1 были у 38 (68%) из 56 позитивных пациентов по результатам иммуноферментного анализа. Медиана высокопозитивных, среднепозитивных и низкопозитивных значений IgG-а β 2ГП1 хемиллюминесцентным анализом была 190,1 [20,3-248,1] и 43,5 [4,5-82,5], 24,5 [22,4-26,7], соответственно. Медиана высокопозитивных уровней IgG-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном анализе у этих пациентов была достоверно выше по сравнению с низкопозитивными уровнями ($p = 0,001$), а среднепозитивные уровни были выше по сравнению с низкопозитивными уровнями ($p = 0,005$). Высокопозитивные и среднепозитивные значения IgG-а β 2ГП1 между собой в хемиллюминесцентном анализе были сопоставимы. У 11 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgG-а β 2ГП1 при исследовании обоими методами определения. У 10 пациентов IgG-а β 2ГП1 отрицательных в иммуноферментном анализе регистрировались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе согласно значениям фирмы-изготовителя, но уровень IgG-а β 2ГП1 только у одного (830,1 RLU) из них превышал 420,4 RLU (значение, соответствующее низкопозитивному уровню в иммуноферментном анализе). У 7 из этих 10 пациентов значения IgG-а β 2ГП1 колебались в пределах 27,7 – 189,8 RLU (значения соответствовали отрицательным уровням в иммуноферментном анализе) и у оставшихся двоих – они составили 211,8 и 356 RLU, которые так же были отрицательными в иммуноферментном анализе. У 1 пациента с негативными уровнями IgG-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном методе они в иммуноферментном были 100 Ед/мл, что соответствовало высокопозитивному уровню по результатам иммуноферментного анализа.

Позитивные уровни IgM-а β 2ГП1 были зарегистрированы у 18 (26%) пациентов и у 17 (25%) из 69 пациентов при определении иммуноферментным и хемиллюминесцентным анализами соответственно. Высокопозитивные уровни в иммуноферментном анализе были выявлены у 9 (50%) из 18 больных, их медиана в хемиллюминесцентном анализе была достоверно выше по сравнению с медианой низкопозитивных уровней ($p=0,003$) и по сравнению с медианой среднепозитивных уровней ($p=0,02$) (табл. 3). Среднепозитивные и низкопозитивные уровни IgM-а β 2ГП1 по данным хемиллюминесцентного анализа между собой не различались. У 9 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgM-а β 2ГП1 по результатам обоих методов определения. У 4 пациентов, IgM-а β 2ГП1 отрицательных в иммуноферментном анализе, отмечались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе и колебались от 31,1 RLU до 61 RLU. У 5 пациентов с отрицательными значениями IgM-а β 2ГП1 хемиллюминесцентным анализом, значения этих антител в иммуноферментном анализе были позитивными и колебались от 18,2 до 54,9 Ед/мл. Отрицательные уровни IgM-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном анализе у 2 из этих 5 пациентов соответствовали среднепозитивным значениям в иммуноферментном анализе.

Обсуждение. В настоящее время определено более 30 различных аФЛ, некоторые из которых непосредственно связываются с отрицательно заряженными фосфолипидами (например, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин), а другие реагируют с фосфолипидсвязывающими белками (например, отдельные домены β 2ГП1, протромбина, аннексина-V) [15, 16]. Исторически иммуноферментный анализ был ведущим методом определения аФЛ к β 2-гликопротеину 1 (β 2GPI) и его комплексу с кардиолипином (КЛ) из-за специфических иммунохимических свойств полистироловой поверхности в качестве твердой фазы для адсорбции основных аутоантигенов [17]. Альтернативой иммуноферментного анализа является автоматизированный хемиллюминесцентный метод с рядом преимуществ: высокий уровень автоматизации, что потенциально может привести к улучшению воспроизводимости и снижению межлабораторных вариаций [11, 18, 19]. Системы хемиллюминесцентного анализа сокращают время ручного труда по сравнению с трудоемкими системами иммуноферментного анализа. Тестирование хемиллюминесцентным анализом основано на двухфазном методе иммуноанализа: вначале специфические антитела, присутствующие в образце, связываются с твердой фазой, содержащей магнитные частицы, покрытые антигеном, а затем, после добавления реагентов, запускающих реакцию хемиллюминесценции, излучаемый свет детектируется оптической системой. Результаты обычно представляются в RLU, которые прямо пропорциональны концентрации аФЛ в образце [11, 20, 21]. По данным литературы хемиллюминесцентный анализ имеет более низкую чувствительность в целом, по сравнению с иммуноферментным, но более специфичен, чем иммуноферментный анализ для идентификации пациентов с АФС [8]. Это связано с тем, что системы хемиллюминесцентного анализа отличаются от систем иммуноферментного анализа наличием антигенных и фосфолипид-протеиновых комплексов на магнитных частицах, а не на поверхности микротитровальных углублений. Важным является связывание β 2GPI с твердой фазой, поскольку это связывание влияет как на плотность антигена, так и на ориентацию и конформацию белка. Системы покрытий, используемые методом хемиллюминесцентно-

Частота положительных значений IgG/IgM-аКЛ, IgG/IgM-аβ2ГП1 в иммуноферментном и хемилюминесцентном анализах

Показатель	ИФА		ХМА		χ ² ; p
	Число позитивных пациентов, n (%)	Уровни позитивности в GPL/MPL Ме [25-75%]	Число позитивных пациентов, n (%)	Уровни позитивности в RLU Ме [25-75%]	
IgG-аКЛ, n = 70	50 (71)	109,0 [67,1-120,0]	61 (87)	480,4 [205,0-1810,8]	5,2; 0,02
Низкопозитивные	2 (4)	30,2 [28,9-31,5]		294,5 [108,7-480,4]	
Среднепозитивные	10 (20)	48,5 [43,6-50,7]		316,9 [205,0-386,5]	
Высокопозитивные	38 (76)	120,0 [90,1-120,0]		704,8 [461,9-2024,0]*	
IgM-аКЛ, n = 70	19 (27)	66,8 [49,7-80,0]	22 (31)	67,6 [30,1-236,0]	НД; 0,6
Низкопозитивные	2 (10,5)	25,7 [24,9-26,5]		24,5 [22,4-26,7]	
Среднепозитивные	2 (10,5)	36,0 [30,6-41,5]		43,5 [4,5-82,5]	
Высокопозитивные	15 (79)	80,0 [30,1-82,4]		190,1 [20,3-248,1]	
IgG-аβ2ГП1, n = 69	56 (80)	100,0 [52,3-100,0]	64 (93)	1733,1 [529,3-6100,0]	4,0; 0,04
Низкопозитивные	6 (11)	24,0 [21,1-27,9]		529,3 [420,4-705,9]	
Среднепозитивные	12 (21)	45,0 [40,8-52,3]		1726,2 [1214,4-2093,5]***	
Высокопозитивные	38 (68)	100,0 [100,0-100,0]		3117,6 [1043,4-6100,0]**	
IgM-аβ2ГП1, n = 69	18 (26)	58,5 [27,2-98,8]	17 (25)	144,5 [64,1-194,3]	НД; 0,8
Низкопозитивные	5 (28)	26,0 [25,0-26,8]		15,5 [10,2-64,1]	
Среднепозитивные	4 (22)	46,0 [39,0-52,9]		42,6 [4,7-117,8]	
Высокопозитивные	9 (50)	98,8 [88,3-100,0]		194,3 [152,3-258,2]****	
IgG+IgM-аКЛ	13 (19)		20 (29)		НД; 0,2
IgG+IgM-аβ2ГП1	17 (24)		15 (21)		НД; 0,7

Примечание. ИФА – иммуноферментный анализ, ХМА – хемилюминесцентный анализ, аКЛ – антитела к кардиолипину, аβ2ГП1 – антитела к β2-гликопротеину 1, Ме – медиана, [25%-75%] – интерквартильный размах, p – сравнение частоты встречаемости по таблице сопряженности; НД – не достоверно; *p = 0,009 по сравнению со среднепозитивными уровнями в ХМА; **p = 0,008 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА; ***p = 0,005 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА; ****p = 0,003 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА и p=0,03 по сравнению со среднепозитивными уровнями в ХМА.

го анализа, обеспечивают принципиальную разницу по сравнению с иммуноферментным анализом, и вместе с реакцией амплификации по хемилюминесцентному принципу объясняют значительно более высокие уровни аФЛ (особенно аКЛ), которые выявляются с помощью автоматизированных систем. Таким образом, в диагностике АФС хемилюминесцентные анализаторы демонстрируют чувствительность, достигающую 100% при специфичности составляющей 72,3% [22]. По данным К. Оку и соавт., исследование аФЛ хемилюминесцентным анализом является более полным (так как этим методом помимо стандартных аФЛ исследуются такие антитела как: IgA-аКЛ, IgM-аβ2ГП1, антитела к домену I β2ГП1), быстрым и менее трудоемким процессом [23]. Проанализировав чувствительность и специфичность IgG/IgM-аКЛ и IgM-аβ2ГП1, авторы пришли к выводу, что эти характеристики схожи в обоих методах исследования. По данным исследования А. Carozzi и соавт. [24], проведенного на 314 пациентах, было выявлено, что определение аКЛ хемилюминесцентным и иммуноферментным анализами не отличалось. Напротив, у 30,13% пациентов с отрицательным ВА, отрицательными аβ2ГП1 и положительными аКЛ по данным иммуноферментного анализа, значения аβ2ГП1 были положительными в хемилюминесцентном анализе. По результатам нашей работы, позитивные значения IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 антител (см. табл. 2) выше в хемилюминесцентном методе, по сравнению с уровнями антител в иммуноферментном анализе. Однако, по литературным данным, не проводилось сопоставление уровней позитивности антител по данным обоих методов исследования. В нашей работе при проведении оценки уровней позитивности (низко-, средне- и высокопозитивные) в иммуноферментном анализе и при сопоставлении их с уровнями в хеми-

люминесцентном анализе было выявлено, что данные фирмы-производителя, а именно позитивные значения (>20 RLU), не соответствуют уровням позитивности антител, определяемых иммуноферментным анализом. Медиана низко-позитивных значений IgG-аКЛ при оценке хемилюминесцентным анализом составила 294,5 RLU с разбросом от 108,7 до 480,4 RLU, что соответствовало отрицательным значениям по градации на уровни позитивности в иммуноферментном методе. При анализе 13 пациентов с IgG-аКЛ в хемилюминесцентном анализе (по уровню фирмы-изготовителя > 20 RLU), которые были негативными в иммуноферментном анализе, у 8 пациентов значения IgG-аКЛ были ниже нижней границы (< 108,7 RLU) в соответствии с градацией позитивности в иммуноферментного анализа. И только у 5 из 13 пациентов уровни IgG-аКЛ были выше 108,7 RLU.

Кроме несоответствия уровней позитивности в обоих методах исследования выявлено большое количество расхождений при сопоставлении хемилюминесцентного с иммуноферментным анализом по позитивным значениям. Так, у 2 IgG-аКЛ отрицательных пациентов в хемилюминесцентном анализе их уровни в иммуноферментном анализе соответствовал высокопозитивным уровням. У 3 из 5 пациентов с IgM-аКЛ отрицательными в хемилюминесцентном анализе в иммуноферментном анализе их уровень был высокопозитивным (более 100,0 MPL), у двух из этих 5 пациентов – среднепозитивным. У одного пациента отрицательного по IgG-аβ2ГП1 в хемилюминесцентном анализе в иммуноферментном анализе уровень составил 100 Ед/мл, что соответствовало высокопозитивным значениям. У 2 из 5 пациентов с отрицательным значением IgM-аβ2ГП1 в хемилюминесцентном анализе эти антитела в иммуноферментном анализе отмечались в среднепозитивных уровнях, у 3 из 5 – в низкопозитивных.

На результаты значений аКЛ и аβ2ГП1 при исследовании иммуноферментным анализом могут влиять множество факторов: свойства стандартных и контрольных сывороток (специфичность, avidность, стабильность), технология иммуноферментного анализа, аналитические характеристики используемых тест-систем, способ построения калибровочной кривой для количественной оценки полученных данных, наличие интеркуррентной инфекции и др. [14].

Наша работа является предварительной и приведены описательные методы статистики, без анализа отрицательной и положительной предсказательной ценности, а также ROC-кривых.

Заключение. Таким образом, наши предварительные результаты по сопоставимости двух методов исследования аФЛ (аКЛ и аβ2ГП1) показали, что при оценке позитивности по данным фирмы-производителя (> 20 RLU) определение IgG-аКЛ и IgG-аβ2ГП1 методом хемилуминесцентного анализа информативнее, чем иммуноферментным анализом ($p < 0,05$), что согласуется с литературными данными [11, 12, 21, 22-24]. Но при учете уровней позитивности по данным иммуноферментного анализа, уровень положительных значений по результатам хемилуминесцентного анализа был гораздо выше показателей фирмы-производителя, что указывает на необходимость дальнейшего исследования и набора контроля для вычисления уровней позитивности IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 методом хемилуминесцентного анализа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках темы ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой «Разработка методов персонализированной терапии ревматических заболеваний с коморбидной патологией» (AAAA-A19-119021190151-3, 0514-2019-0020).

ЛИТЕРАТУРА (pp. 2-13, 15, 16, 18, 20-24
см. REFERENCES)

1. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: диагностика и клинические проявления (лекция). *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(1):56-71.
3. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. Монография. Москва: Литтера; 2004.
14. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Решетняк Т.М., Ключкина Н.Г., Решетняк Д.В., Насонов Е.Л. и соавт. Антитела к β2-гликопротеину I и антитела к кардиолипину при антифосфолипидном синдроме: анализ чувствительности и специфичности. *Клиническая медицина*. 2003;9: 25-31.
17. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И., Роггенбук Д. Антифосфолипидные антитела: современные представления о патогенетическом действии и лабораторной диагностике. *Вестник ВГМУ*. 2015;3: 6-15.
19. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А. и соавт. Сравнительный анализ информативности тест-систем разных производителей для определения антифосфолипидных антител для диагностики антифосфолипидного синдрома. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(1): 40-4.

REFERENCES

1. Reshetnyak T.M. Antiphospholipid syndrome: diagnosis and clinical manifestation (a lecture). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(1): 56-71. (in Russian)
2. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006;4(2):295-306.
3. Nasonov E.L. Antiphospholipid syndrome [Antifosfolipidnyi sindrom. Monografiya]. Moscow: Littera; 2004. (in Russian)
4. Devreese K.M. Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? *Lupus*. 2012;21:718-21.

5. Ruffatti A., Olivieri S., Tonello M., Bortolati M., Bison E., Salvani E. et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6:1693-6.
6. Forastiero R., Papalardo E., Watkins M., Nguyen H., Quirbach C., Jaskal K. et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin. Chim. Acta*. 2014;428: 99-105.
7. Reber G., Boehlen F., de Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? *Semin. Thromb. Hemost.* 2008;34(4): 340-6.
8. De Moerloose P., Reber G., Musial J., Arnout J. Analytical and clinical performance of a new, automated assay panel for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(7):1540-6.
9. Chung Y., Kim J.E., Lim H.S., Kim H.K. Clinical performance of anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies using a new automated chemiluminescent assay: Superior thrombotic prediction of combined results measured by two different methods. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2014;25:10-5.
10. Meneghel L., Ruffatti A., Gavasso S., Tonello M., Mattia E., Spiezia L. et al. The clinical performance of a chemiluminescent immunoassay in detecting anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies. A comparison with a homemade ELISA method. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015;53:1083-9.
11. Van Hoeske F., Persijn L., Decavele A-S., Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012;34(6): 630-40.
12. Zhang S., Wu Z., Li P., Bai Y., Zhang F., Li Y. Evaluation of the clinical performance of a novel chemiluminescent immunoassay for detection of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Medicine*. 2015;94:e2059.
13. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 1997;40(9):1725.
14. Alexandrova E.N., Novikov A.A., Reshetnyak T.M., Klukvina N.G., Reshetnyak D.V., Nasonov E.L. et al. Antibodies to beta2-glycoprotein I and antibodies to cardiolipin in antiphospholipid syndrome: sensitivity and specificity analysis. *Klinicheskaya meditsina*. 2003;9: 25-31. (in Russian)
15. Volkov I., Seguro L., Leon E.P., Kovacs L., Roggenbuck D., Schierack P. et al. Profiles of criteria and non-criteria antiphospholipid autoantibodies are associated with clinical phenotypes of the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun. Highlights*. 15;11(1): 8.
16. Mekinian A., Bourrienne M.C., Carbillon L., Benbara A., Noemie A., Chollet-Martin S. et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin. Arthritis Rheum*. 2016;46(2): 232-7.
17. Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov A.I., Roggenbuk D. Antiphospholipid antibodies: modern ideas about pathogenetic action and laboratory diagnosis. *Vestnik VGMU*. 2015;3:6-15. (in Russian)
18. Devreese K., Hoylaerts M.F. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur. J. Haematol.* 2009;83(1):1-16.
19. Tkachenko O.Y., Lapin S.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovieva L.N., Bondareva E.A. et al. Comparative analysis of the informativeness of test systems from different manufacturers to determine antiphospholipid antibodies for diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017;62(1):40-4. (in Russian)
20. Sciascia S., Amigo M-C., Roccatello D., Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(9): 548-60.
21. Persijn L., Decavele A-S., Schouwers S., Devreese K. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res*. 2011;128(6): 565-9.
22. Noubouossie D., Valsamis J., Corazza F., Rozen L., Debaugnies F., Demulder A. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. *Acta Clin. Belg.* 2012;67(3):184-9.
23. Oku K., Amengual O., Kato M., Bohgaki T., Horita T., Yasuda S. et al. Significance of fully automated tests for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Research*. 2016;146:1-6.
24. Capozzi A., Lococo E., Grasso M., Longo A., Garofalo T., Misasi R. et al. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *J. Immunol. Methods*. 2012;379(1-2): 48-52.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Ащина Л.А.¹, Баранова Н.И.¹, Шкурова Н.А.^{1,2}, Федин А.В.^{1,2}

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РИНОСИНУСИТА

¹Пензенский институт усовершенствования врачей - филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 440060, Пенза, Россия;

²ГБУЗ «Клиническая больница № 6 имени Г.А. Захарьина», 440060, Пенза, Россия

Бактериальный риносинусит (БРС) является осложненной формой риносинусита, характеризуется острым течением и тенденцией к хронизации процесса. Значимую роль в патогенетических механизмах БРС играет функциональное состояние нейтрофилов, ответственных за развитие воспаления при БРС. Исследование метаболической активности нейтрофилов на внешние стимулы методом хемилюминесценции у больных с острой и хронической формами заболевания позволит разработать способ дифференциальной диагностики форм БРС. Проведено обследование 65 пациентов с БРС, которые были разделены на больных с острой формой (n=35) и с хронической формой заболевания (n=30). Контрольную группу составили 30 здоровых людей. Функциональную активность нейтрофилов изучали в цельной крови методом хемилюминесценции с двойной стимуляцией (форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ)).

У больных с острой формой БРС установлено повышение показателей удельной максимальной интенсивности свечения нейтрофилов, светосуммы спонтанной и стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции и снижение времени выхода на максимум. У пациентов с хронической формой БРС выявлено снижение светосуммы спонтанной, стимулированной продукции нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения. На основе достоверно значимых различий по показателям хемилюминесценции нейтрофилов разработан способ дифференциальной диагностики форм БРС. Полученные результаты свидетельствуют о повышенной продукции нейтрофилами активных форм кислорода (АФК) в процессе киллинга у больных с острой формой БРС и об истощении функции и резерва клеток у больных с хронической формой. Разработанный на основе изученных показателей способ диагностики форм БРС методом хемилюминесценции, позволит дифференцировать острую и хроническую формы заболевания, что повысит эффективность лечения пациентов.

Ключевые слова: бактериальный риносинусит; хронический риносинусит; хемилюминесцентный анализ; нейтрофилы

Для цитирования: Ащина Л.А., Баранова Н.И., Шкурова Н.А., Федин А.В. Оценка функциональной активности нейтрофилов для диагностики риносинусита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 552-557. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-552-557>

Для корреспонденции: Ащина Людмила Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Aschina L.A.¹, Baranova N.I.¹, Shkurova N.A.^{1,2}, Fedin A.V.^{1,2}

EVALUATION OF NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY FOR RHINOSINUSITIS DIAGNOSIS

¹Penza Institute for Further Training of Physicians – Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuing Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 440060, Penza, Russia;

²State budgetary institution of health care «Clinical hospital № 6 named after G.A. Zakharyin», 440060, Penza, Russia

Bacterial rhinosinusitis (BRS) is a complicated form of rhinosinusitis, characterized by its acute course and tendency to chronicity. A significant role in pathogenetic mechanisms of HRS is played by functional state of neutrophils responsible for inflammation development at HRS. Investigation of neutrophils metabolic activity on external stimuli by chemiluminescence method in patients with acute and chronic forms of the disease will enable to develop method of differential diagnostics of BRS forms. The examination of 65 patients with BRS which were divided into patients with acute form (n=35) and chronic form of the disease (n=30) was carried out. The control group consisted of 30 healthy subjects. Functional activity of neutrophils was studied in whole blood by chemiluminescence with double stimulation (phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)). In patients with the acute form of BRS we found an increase in parameters of specific maximum intensity of neutrophils luminescence, light sum of spontaneous and stimulated luminol-dependent chemiluminescence and a decrease in time to maximum output. Patients with the chronic form of BRS revealed a decrease in the luminescence of spontaneous, stimulated neutrophil production and maximum luminescence intensity. On the basis of significant differences in chemiluminescence indices of neutrophils, a method of differential diagnosis of the BRS forms was developed. The results obtained testify to increased production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils in the process of killing in patients with acute form of LRS and depletion of cell function and reserve in patients with the chronic form. Developed on the basis of the studied indicators method of diagnosing the forms of BRS by chemiluminescence will allow to differentiate acute and chronic forms of the disease, which will increase the effectiveness of treatment of patients.

Key words: bacterial rhinosinusitis; chronic rhinosinusitis; chemiluminescence analysis; neutrophils

For citation: Aschina L.A., Baranova N.I., Shkurova N.A., Fedin A.V. Evaluation of neutrophil functional activity for rhinosinusitis diagnosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 552-557 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-552-557>

For correspondence: Aschina Ludmila Andreevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Central Research Laboratory; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Information about authors:

Aschina L.A., <http://orcid.org/0000-0002-4445-5619>
Baranova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-2991-0898>
Shkurova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-0434-1972>
Fedin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0765-6657>

Acknowledgment. *The study was carried out with the financial support of the state assignment AAAA-A20-120031090059-8.*

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

Received 09.03.2021
Accepted 13.03.2021

Введение. Риносинусит – один из самых распространенных инфекций верхних дыхательных путей, заболеваемость которым не имеет тенденции к снижению [1,2]. В современной оториноларингологии данная проблема не перестает быть актуальной из-за существенного снижения качества жизни пациентов трудоспособного возраста [3-5].

Острый бактериальный риносинусит (ОБРС) – это осложненная форма риносинусита (РС), причиной возникновения которого является бактериальная инфекция [1]. В последние годы отмечена тенденция затяжного течения ОБРС, что увеличивает риск перехода заболевания в хроническую форму [3].

Совершенствование методов диагностики и лечения больных с данной патологией не привело к снижению их количества, напротив, с каждым годом наблюдается рост числа пациентов с хронической формой бактериального риносинусита [6], а использование иммунотропных препаратов у данных больных до сих пор не нашло широкого применения [7-11].

Доказано, что важную роль в патогенезе острого воспаления, рецидивов и хронизации ОБРС играет иммунная система и при снижении ее функционального состояния происходит инвазия патогенных микроорганизмов в клетки верхних дыхательных путей [6].

Нейтрофилы относятся к клеткам врожденного иммунитета и выполняют роль первой линии защиты в борьбе с бактериальной инфекцией [12-15]. Их патогенное действие связано главным образом с фагоцитозом и генерацией активных форм кислорода (АФК) [16]. Одним из наиболее простых и чувствительных методов исследования активности нейтрофилов является хемилуминисцентный (ХЛ) метод, который позволяет за счет использования различных ХЛ-зондов и клеточных индукторов оценивать синтез всего спектра и конкретных форм АФК нейтрофилами [17-19].

Изучению нейтрофильного звена иммунитета при остром бактериальном и хроническом риносинусите было посвящено немало работ [20-22]. Была показана повышенная спонтанная и зимозан-индуцированная продукция нейтрофилов периферической крови и угнетение фагоцитарной активности данной клеточной популяции в смывах из гайморовых пазух у больных ОБРС [23]. У больных хроническим риносинуситом (ХРС) наблюдалось увеличение спонтанной и стимулированной продукции нейтрофильных гранулоцитов, что отражало повышенные резервные способности клеток у данных больных [24]. Однако, при хронизации ОБРС было показано снижение функциональной активности нейтрофилов, которую оценивали по РСС-тесту [25].

Таким образом, многочисленные исследования свидетельствуют о неоспоримом значении нейтрофилов в патогенетических механизмах развития риносинуситов, а изучение функциональных особенностей данной кле-

точной популяции у пациентов с БРС позволит назначать обоснованную иммунотерапию, которая повысит эффективность лечения.

Целью настоящего исследования явилось создание способа дифференциальной диагностики форм БРС на основе изучения функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов методом хемилуминесценции.

Материал и методы. Были обследованы 65 пациентов с БРС (30 мужчин и 35 женщин), которые находились на лечении в оториноларингологическом отделении «Клиническая больница № 6 имени Г.А. Захарьина», г. Пенза в период с 2019 по 2020 год. Проведено клиническое, открытое, перспективное, рандомизированное исследование. Критериями включения больных в исследование явились: острая форма БРС, хроническая форма БРС, возраст от 18 до 60 лет, информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были: риносинусит небактериальной этиологии, психические заболевания, онкологические заболевания, туберкулез в активной фазе, беременность, период лактации. Средний возраст больных составил 42 ± 15 года. Пациенты были разделены на 2 группы. Первую группу составили 35 пациентов с острой формой БРС, вторую группу составили 30 пациентов с хронической формой БРС, в стадии обострения. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей, сопоставимые по полу и возрасту с группами больных.

Иммунологические исследования были проведены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Пензенского института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проводимые исследования, оформленное в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Клиническое обследование больных БРС включало сбор анамнеза и оториноларингологический осмотр. Были выполнены наружный осмотр ЛОР-органов, передняя, задняя риноскопия, отоскопия, мезофарингоскопия, осмотр и пальпация области проекции околоносовых пазух, пальпация мест выхода тройничного нерва, пальпация, перкуссия козелка, сосцевидного отростка, рентгенография или компьютерная томография околоносовых пазух и височных костей.

Взятие крови на исследование у пациентов осуществляли утром, натощак из кубитальной вены в объеме 5 мл в вакутейнеры с Li-гепарином и доставляли в лабораторию в термомоноконтейнере в течение 2 часов.

Функциональную активность нейтрофилов изучали с помощью хемилуминесцентного анализа по методике, предложенной И.В. Образцовым [19], которая заключается в последовательной стимуляции нейтрофи-

лов двумя стимулами (форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) с последующей регистрацией ХЛ на аппарате Lum-1200 (ДИСофт, Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3.0. В качестве активатора ХЛ использовали люминол (Sigma-Aldrich), что позволило охарактеризовать синтез нейтрофилами первичных и вторичных форм АФК. В качестве объекта была использована цельная кровь, поскольку выделение фагоцитов в градиенте плотности активирует клетки и усложняет процедуру анализа. Используемый в качестве стимула ФМА (Sigma-Aldrich), выполняет роль праймирующего стимула - активирует нейтрофилы, при этом не происходит полноценного ответа, но запускаются процессы, ведущие к усиленному отклику, а фМЛФ (Sigma-Aldrich) является основным стимулом для люминолзависимой хемилюминесценции.

Определяли следующие показатели ХЛ: нормированная светосумма спонтанной и ФМА+фМЛФ-стимулированной продукции нейтрофилов ($S_{\text{спонт}}$, $S_{\text{стим}}$), показатель светосуммы, деленный на абсолютное количество нейтрофилов в образце крови, нормированная максимальная интенсивность свечения нейтрофилов (I_{max}) (максимальная интенсивность, деленная на абсолютное количество нейтрофилов в образце крови), коэффициент активации (K_a), равный отношению показателя нормированной светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов к показателю нормированной светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов. Единицы измерения показателей светосуммы и максимальной интенсивности свечения выражали в PPs (количество импульсов света в секунду времени в пересчете на миллион нейтрофилов).

Статистический анализ данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (США), SPSS (США) и Microsoft Excel (США). Описание полученных в исследовании результатов производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Вследствие того, что анализируемые показатели не имели нормального распределения (применяли критерий Шапиро-Уилко), сравнительный анализ групп оценивали по критерию Манна-Уитни. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для достоверно значимых показателей был проведен ROC-анализ и определены их пороговые значения. Многофакторный анализ включал в себя корреляционный анализ и пошаговый регрессионный ана-

лиз, при помощи которого с использованием нескольких достоверно значимых показателей была получена математическая модель дифференциальной диагностики форм БРС у больных. Статистическую значимость математической модели оценивали по F-критерию Фишера и констатировали при $p < 0,05$.

Результаты. Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови позволил установить, что у больных с острой формой БРС наблюдался повышенный уровень нормированной светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов по сравнению с контрольной группой. Кроме того, показатели нормированной светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов и нормированная максимальная интенсивность свечения нейтрофилов также были повышены у больных по сравнению со значениями в группе здоровых лиц. Время выхода на максимум стимулированной продукции нейтрофилами у больных с острой формой БРС было снижено, однако коэффициент активации не имел достоверно значимых различий между больными и здоровыми пациентами (см. таблицу).

В группе больных с хронической формой БРС в стадии обострения отмечался более низкий уровень нормированной светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов по сравнению с показателями контрольной группы. Также наблюдалось снижение уровней нормированной светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов и нормированной максимальной интенсивности свечения нейтрофилов у пациентов данной группы. При этом коэффициент активации и время выхода на максимум у больных с хронической формой БРС не имел достоверно значимых различий по сравнению с группой контроля.

Проведенный сравнительный анализ 1-й и 2-й групп пациентов показал достоверно повышенные уровни изучаемых показателей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в группе больных с острой формой БРС. А именно, показатель удельной светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов был выше в 5,6 раз, показатель удельной светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов был выше в 7,9 раз, а уровень удельной максимальной интенсивности свечения нейтрофилов превышал в 5,8 раз уровень данного показателя у больных с хронической формой БРС. Коэффициент активации и время выхода на максимум не различался между сравниваемыми группами больных (см. таблицу).

Показатели функциональной активности нейтрофилов у больных с острой и хронической формами БРС

Показатели	Контроль (n=30)	БРС		Тест Манна-Уитни, p		
		Острая (n=35)	Хроническая (n=30)	Контроль vs острая	Контроль vs хроническая	Острая vs хроническая
$S_{\text{спонт}}$, PPs	7,5 (4,2-13,1)	23,7 (9,6-45,1)	4,2 (2,97-6,8)	0,00013*	0,002*	0,0001*
$S_{\text{стим}}$, PPs	180,6 (70,4-210,1)	363,8 (181,8-473,2)	46,2 (36,6-66,7)	0,00037*	0,000147*	0,000001*
I_{max} , PPs	0,13 (0,09-0,2)	0,345 (0,2-0,5)	0,06 (0,04-0,11)	0,00007*	0,000296*	0,000001*
T_{max} , с	2760 (2200-3350)	1980 (1920-2100)	2200 (2040-2280)	0,0047*	0,185	0,287
K_a	15,7 (9,6-24,5)	11,8 (5,9-22,4)	10,0 (6,8-19,5)	0,28	0,185	0,66

Примечание. Значения показателей представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$, n – число больных.

Далее, для дифференциальной диагностики форм БРС методом пошагового регрессионного анализа была построена математическая модель (1) ($F = 5,199032$, $p = 0,00046$) на основе полученных достоверно значимых показателей, которая имела вид:

$$y = 0,000391 \cdot x_1 + 0,389649 \cdot x_2 + 0,000827 \cdot x_3 + 0,358001, \quad (1)$$

где: y – форма БРС, x_1 – $S_{\text{стим}}$ (PPs), x_2 – I_{max} (PPs), x_3 – $S_{\text{спонт}}$ (PPs).

Интерпретация полученных результатов у пациентов заключается в следующем: при значениях y от 0 до 0,4, диагностируют хроническую форму БРС, а при значениях y от 0,6 и выше диагностируют острую форму БРС. Однако, у некоторых больных полученные в математической формуле значения могут попадать в промежуток от 0,41 до 0,59, и тогда стоит руководствоваться пороговыми значениями для изучаемых показателей, которые были получены методом ROC-анализа. Так, для показателя нормированной светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов пороговое значение составило – 7,631 PPs (чувствительность теста 91,3% и специфичность теста 80,0%), для показателя нормированной светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированной продукции нейтрофилов – 82,158 PPs (чувствительность теста 100,0% и специфичность теста 93,3%), а для показателя нормированной максимальной интенсивности свечения нейтрофильных гранулоцитов – 0,136 PPs (чувствительность теста 91,3%, специфичность теста 93,3%).

Обсуждение. Доказано, что нейтрофилы способны быстро перемещаться в очаг воспаления и осуществлять фагоцитоз, который является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов [26-28]. При этом кислородзависимая микробицидность фагоцитов осуществляется за счет синтеза АФК. Под действием индуктора фагоцит активируется, что сопровождается респираторным взрывом – процессом активной краткосрочной выработки АФК, направленной на окисление и разрушение молекулярных структур чужеродного агента. На сегодняшний день понятие АФК включает широкий спектр реакционно-активных форм соединений кислорода, связанных с первичным синтезом супероксид-радикала. Первичные АФК обладают регуляторным и умеренным бактерицидным действием, а вторичные – выраженной бактерицидной активностью [27]. Поэтому, хемилуминисцентный анализ дает возможность оценки влияния различных регуляторных факторов на функцию фагоцитов [29].

В проведенном исследовании в качестве зонда ХЛ был применен люминол. Молекулы люминола способны при определенных концентрациях проходить через клеточные мембраны и вступать в хемилуминисцентную реакцию, как с первичными, так и вторичными АФК, и отражать внеклеточные и внутриклеточные процессы образования АФК [17].

В работе было установлено повышение продукции первичных и вторичных АФК нейтрофилами, находящимися в состоянии покоя (спонтанная люминол-зависимая ХЛ) у больных с острой формой БРС по сравнению с контрольными значениями, что согласуется с данными литературы [23]. При бактериальных инфекциях часто наблюдается избыточная продукция АФК гиперстимулированными нейтрофилами, направленная на фагоцитоз патогенных агентов. Кроме того, у данной группы больных спонтанная люминолзависимая ХЛ была выше по сравнению с пациентами с хронической

формой воспаления БРС. Данный показатель ХЛ у больных с хронической формой БРС был значительно ниже контрольных значений, что можно объяснить тем, что длительная бактериальная нагрузка приводит к подавлению активности клеток.

Для изучения стимулированной продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами была применена современная методика двойной стимуляции клеток, суть которой заключается в использовании двух стимулов для продукции АФК нейтрофилами. В исследовании ФМА обладал праймирующим действием, а основным активатором дыхательного взрыва явился синтетический аналог полипептидов бактериального происхождения – фМЛФ.

У больных с острой формой БРС на фоне базовой (спонтанной) повышенной функциональной активности дополнительная стимуляция нейтрофилов ФМА и фМЛФ приводила к соответствующему увеличению продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами крови по сравнению с контрольными значениями. Это выразилось в повышенной нормированной светосумме стимулированных ФМА и фМЛФ нейтрофилов, а также повышенной нормированной максимальной интенсивности свечения нейтрофилов у больных с острой формой БРС.

В данном случае нормированная светосумма нейтрофилов характеризовала весь комплекс АФК, вырабатываемый нейтрофилами за исследуемый период. А максимальная интенсивность хемилуминисценции определяла максимальную активность синтеза АФК клеткой [27]. Полученные данные свидетельствуют о повышенной функциональной активности нейтрофилов у больных с острой формой БРС.

Однако, индекс активации, который вычисляется через отношение светосуммы индуцированной хемилуминисценции к светосумме спонтанной хемилуминисценции, и характеризует наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва [27], у пациентов не отличался от контрольных значений, что может свидетельствовать о нормальных резервных возможностях нейтрофильных гранулоцитов у больных с острой формой БРС.

При этом у больных с хронической формой БРС на фоне сниженной спонтанной функциональной активности нейтрофилов, дополнительная стимуляция респираторного взрыва фМЛФ также показала более низкую продукцию АФК по сравнению с показателями в контрольной группе, что отражает снижение функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов. Это может свидетельствовать о дисфункции фагоцитарного звена у больных с хронической формой воспаления БРС, которая могла быть вызвана повышенной антигенной нагрузкой нейтрофилов. В результате нарушаются процессы захвата и киллинга бактерий. Данные процессы формируют порочный круг хронизации заболевания, а также его рецидивирующее течение. Кроме того, деактивация нейтрофилов при хронической форме БРС может быть следствием не только нарушения функционирования фагоцитов, но и недостаточностью гуморальных активирующих или избытком супрессорных факторов сыворотки [6].

Сравнительный анализ показал существенные различия функциональной активности между больными с острой и хронической формами БРС. Была установлена повышенная функциональная активность нейтрофиль-

ных гранулоцитов в состоянии покоя и повышенная стимулированная продукция первичных и вторичных АФК под действием ФМА и ФМЛФ у больных с острой формой БРС.

Полученные различия в показателях функциональной активности нейтрофилов между исследуемыми группами пациентов и легли в основу математической модели, при помощи которой можно производить дифференциальную диагностику форм БРС. Данными показателями явились нормированная светосумма спонтанной продукции нейтрофилов, нормированная светосумма ФМА+ФМЛФ-стимулированной продукции и нормированная максимальная интенсивность свечения нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, для данных показателей были определены пороговые величины, которые позволяют дифференцировать острую и хроническую формы БРС.

Выводы:

1. Острая форма БРС характеризовалась повышенной спонтанной и стимулированной продукцией АФК нейтрофилами, и сокращенным временем максимальной интенсивности свечения нейтрофилов, что свидетельствует об участии нейтрофилов в кислород-зависимом киллинге микробов при данной форме заболевания.

2. Хроническая форма БРС характеризовалась снижением спонтанной и стимулированной выработки АФК нейтрофилами, что свидетельствовало об истощении функциональных и резервных возможностей клеток.

3. Разработанный способ диагностики форм БРС методом хемилуминесценции позволит дифференцировать острую и хроническую формы данного заболевания, что повысит эффективность лечения пациентов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания АААА-А20-120031090059-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5, 13-16, 21-22
см. REFERENCES)

1. Кривопапов А.А. Осложненные формы острого бактериального риносинусита у взрослых: этиология, патогенетические принципы и организация лечения. *Медицинский совет*. 2015; 4: 20-4.
2. Пшеничников Д.С., Анготоева И.Б. Принципы медикаментозного лечения острого бактериального риносинусита: от доказательной медицины к практике. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2018; 26 (1): 106-16. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2018261106-116>
3. Сакович А. Р. Острый риносинусит. Учебно-методическое пособие. М.: БГМУ; 2007.
4. Кочетков П.А., Фатьянова Е.И. Острый риносинусит: современные подходы к диагностике и лечению. *Медицинский совет*. 2017; 8: 130-6. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-8-130-136>
6. Федин А.В., Баранова Н.И., Дружинина Т.А., Починина Н.К. Иммунологические аспекты патогенеза острого бактериального риносинусита: выявление критериев хронизации процесса. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2014; 4: 56-60. <https://doi.org/10.14427/jirai.2014.4.56>
7. Арефьева Н.А., Азнабаева Л.Ф. Особенности иммунотропной терапии при воспалении верхних дыхательных путей: результаты 30-летних исследований. *Вестник оториноларингологии*. 2012; 6: 30-2.
8. Стагниева И.В., Симбирцев А.С. Эффективность иммуномодулирующей терапии у больных риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (5): 423-30.

9. Глушкова Е.Ф., Суровенко Т.Н. Иммуномодулирующая терапия у пациентов с инфекциями верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. *Медицинский совет*. 2016; 16: 80-6.
10. Кривопапов А.А., Рязанцев С.В., Шаталов В.А., Шервашидзе С.В. Эффективность бактериальных иммуностимуляторов в терапии и профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов. *Российский медицинский журнал*. 2017; 25 (11): 797-804.
11. Кривопапов А.А., Щербань К.Ю. Роль современных иммуномодуляторов в лечении и профилактике заболеваний верхних дыхательных путей и уха. *Медицинский совет*. 2017; 16: 68-72. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-16-68-72>
12. Дружинина Т.А., Федин А.В., Баранова Н.И. Оценка показателей нейтрофильного звена фагоцитоза у больных риносинуситом. *Врач-аспирант*. 2013; 5: 85-8.
17. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилуминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341-88.
18. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилуминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. *Молекулярная медицина*. 2013; 4: 3-9.
19. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилуминесцентному анализу. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(4): 418-25.
20. Варюшина Е.А., Котов А.Ю., Пигарева Н.В., Синева С.А., Демьянов А.В., Минаева Е.Н., и др. Изучение особенностей продукции цитокинов и функций нейтрофилов в очаге воспаления при хроническом гнойном риносинусите. *Цитокины и воспаление*. 2018; 17(1-4): 102-7.
23. Коленчукова О.А. Функциональная и метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов при остром бактериальном риносинусите. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(3): 269-74. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-3-269-274>
24. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности люминисцентно-зависимой хемилуминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2010; 12(4-5): 437-40.
25. Федин А.В. Роль оценки иммунного статуса в определении критериев хронизации бактериального риносинусита. *Российская ринология*. 2013; 21(2): 82.
26. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И. и др. Взаимосвязь содержания Th- и T-регуляторных клеток в крови и хемилуминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом. *Медицинская иммунология*. 2018; 20(1): 61-72. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-1-61-72>
27. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 327-40. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-327-340>
28. Солодовникова О.Н., Молочный В.П. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012; 1: 118-22.
29. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозировании абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом. *Медицинская иммунология*. 2016; 18(5): 475-82. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-475-482>

REFERENCES

1. Krivopalov A.A. Complicated forms of acute bacterial rhinosinusitis in adults: etiology, pathogenetic principles and organization of treatment. *Meditsinskiy sovet*. 2015; 4: 20-4. (in Russian)
2. Pshennikov D.S., Angotoeva I.B. Principles of drug treatment for acute bacterial rhinosinusitis: from evidence-based medicine to practice. *Rossiyskiy mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2018; 26 (1): 106-16. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2018261106-116> (in Russian)

3. Sakovich A. R. Acute rhinosinusitis. Uchebno-metodicheskoe posobie. Moscow: BGMU; 2007. (in Russian)
4. Kochetkov P.A., Fat'yanova E.I. Acute rhinosinusitis: modern approaches to diagnosis and treatment. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 8: 130-6. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-8-130-136> (in Russian)
5. Gómez Gabaldón N., Manzanares Arnaiz C., Noguero Cánovas L., Juan Armas J. Management of Rhinosinusitis in Primary Care. *Semergen*. 2018; 44(7): 492-9. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2017.11.008>
6. Fedin A.V., Baranova N.I., Druzhinina T.A., Pochinina N.K. Immunological aspects of the pathogenesis of acute bacterial rhinosinusitis: identification of criteria for the chronicity of the process. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2014; 4: 56-60. <https://doi.org/10.14427/jipai.2014.4.56> (in Russian)
7. Aref'eva N.A., Aznabaeva L.F. Features of immunotropic therapy for inflammation of the upper respiratory tract: the results of 30 years of research. *Vestnik otorinolaringologii*. 2012. 6: 30-2. (in Russian)
8. Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S. The effectiveness of immunomodulatory therapy in patients with rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17 (5): 423-30. (in Russian)
9. Glushkova E.F., Surovenko T.N. Immunomodulatory therapy in patients with infections of the upper respiratory tract and ENT organs. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 16: 80-6. (in Russian)
10. Krivopalov A.A., Ryazantsev S.V., Shatalov V.A., Shervashidze S.V. The effectiveness of bacterial immunostimulants in the treatment and prevention of infectious and inflammatory diseases of the ENT organs. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 25 (11): 797-804. (in Russian)
11. Krivopalov A.A., Shcherban' K.Yu. The role of modern immunomodulators in the treatment and prevention of diseases of the upper respiratory tract and ear. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 16: 68-72. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-16-68-72> (in Russian)
12. Druzhinina T.A., Fedin A.V. Baranova N.I. Assessment of parameters of the neutrophilic link in phagocytosis in patients with rhinosinusitis. *Vrach-aspirant*. 2013; 5: 85-8. (in Russian)
13. Hefin R. Jones, Calum T. Robb, Mauro Perretti, Adriano G. Rossi. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin. Immunol*. 2016; 28(2): 137-45. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.007>
14. Harry L. Malech, Frank R. DeLeo, Mark T. Quinn. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. *Methods Mol. Biol*. 2020; 2087: 3-10. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_1
15. Carlos Rosales. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol*. 2020; 108(1): 377-96. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
16. Samia Bedouhène, Farida Moulti-Mati, Margarita Hurtado-Nedelec, Pham My-Chan Dang, Jamel El-Benna. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am. J. Blood Res*. 2017; 7(4): 41-8.
17. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E. V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341-88. (in Russian)
18. Obraztsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory, practice. *Molekulyarnaya meditsina*. 2013; 4: 3-9. (in Russian)
19. Obraztsov I.V., Godkov M.A., Polimova A.M., Demin E.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. Evaluation of the functional activity of whole blood neutrophils by the method of two-stage stimulation: a new approach to chemiluminescence analysis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2015; 9(4): 418-25. (in Russian)
20. Varyushina E.A., Kotov A.Yu., Pigareva N.V., Sineva S.A., Dem'yanov A.V., Minaeva E.N. et al. To study the characteristics of cytokine production and neutrophil functions in the inflammatory focus in chronic purulent rhinosinusitis. *Tsitokiny i vospalenie*. 2018; 17(1-4): 102-7. (in Russian)
21. Hai Wang, Li Pan, Zheng Liu. Neutrophils as a protagonist and target in chronic rhinosinusitis. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol*. 2019; 12(4): 337-47. <https://doi.org/10.21053/ceo.2019.00654>
22. Sun G.H., Li D.W., Guo S., Zhang D.M., Cui S.H. The role of neutrophil in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Lin Chung E. Bi Yan Hou To Jing Wa. K. Z. Zhi*. 2019; 33(8): 789-792. <https://doi.org/10.13201/j.issn.1001-1781.2019.08.028>
23. Kolenchukova O.A. Functional and metabolic activity of neutrophilic granulocytes in acute bacterial rhinosinusitis. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3(3): 269-74. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-3-269-274> (in Russian)
24. Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V. Features of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophilic granulocytes in patients with chronic rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2010; 12(4-5): 437-40. (in Russian)
25. Fedin A.V. The role of assessing the immune status in determining the criteria for the chronicity of bacterial rhinosinusitis. *Rossiyskaya rinologiya*. 2013; 21(2): 82. (in Russian)
26. Savchenko A.A., Kasparov E.V., Arutyunyan S.S., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I. et al. The relationship between the content of Th- and T-regulatory cells in the blood and the chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20(1): 61-72. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-1-61-72> (in Russian)
27. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Assessment methods and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(4): 327-40. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-327-340> (in Russian)
28. Solodovnikova O.N., Molochnyy V.P. "Oxygen burst" of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of the inflammatory reaction in purulent infections in children. *Dal'nevostochniy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 1: 118-22. (in Russian)
29. Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Gvozdev I.I. Features of the cytokine regulation of the respiratory burst of blood neutrophils in predicting abdominal sepsis in patients with widespread purulent peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2016; 18(5): 475-82. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-475-482> (in Russian)

Поступила 09.03.21
Принята к печати 13.03.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Замарина Т.В.^{1,2}, Пименова Е.В.^{1,2}, Храпова Н.П.¹, Батурин А.А.^{1,2}

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ЧИКУНГУНЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград, Россия;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 400131, г. Волгоград, Россия

В статье описаны методы лабораторной диагностики лихорадки чикунгуны. Приведен алгоритм исследования биологического материала на наличие антител к вирусу чикунгуны и антигенов вируса в зависимости от срока от начала заболевания. В обзоре представлены данные о производимых в настоящее время гено- и иммунодиагностических тест-системах, даны их подробные характеристики. Представленная в обзоре информация будет полезна для врачей клинической лабораторной диагностики в плане выбора метода исследования и приемлемой тест-системы для лабораторного подтверждения диагноза лихорадки чикунгуны, а также проведения дифференциальной диагностики с другими лихорадками, имеющими схожие симптомы, общее географическое распределение и переносчиков инфекции.

Ключевые слова: вирус чикунгуны; лабораторная диагностика арбовирусных инфекций; ОТ-ПЦР; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Замарина Т.В., Пименова Е.В., Храпова Н.П., Батурин А.А. Современное состояние лабораторной диагностики лихорадки чикунгуны (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 558-564. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-558-564>

Для корреспонденции: Замарина Татьяна Валерьевна, ст. науч. сотр. лаб. иммунодиагностики Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Zamarina T.V.^{1,2}, Pimenova E.V.^{1,2}, Khrapova N.P.¹, Baturin A.A.^{1,2}

CURRENT STATE OF CHIKUNGUNYA FEVER LABORATORY DIAGNOSIS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation;

²The Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

The article is about methods of chikungunya fever laboratory diagnosis. An algorithm for the study of biological material for the presence of antibodies against chikungunya virus and virus antigens is presented. The overview describes the information about commercial immunodiagnostic and genodiagnostic kits and their detailed specifications. The information presented in the review will be useful for doctors of clinical laboratory diagnostics to choose a method and an acceptable test system for laboratory confirmation of Chikungunya fever diagnosis, as well as differential diagnosis with other fevers, which have similar symptoms, common geographical distribution and carriers of infection.

Key words: chikungunya virus; laboratory diagnostics of arbovirus infections; RT-PCR; ELISA

For citation: Zamarina T.V., Pimenova E.V., Khrapova N.P., Baturin A.A. Current state of chikungunya fever laboratory diagnosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 558-564 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-558-564>

For correspondence: Zamarina T.V., senior fellow in the Laboratory of immudiagnosics, Volgograd Research Anti-Plague Institute, 400131; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Information about authors:

Zamarina T.V., <https://orcid.org/0000-0002-2965-0555>

Pimenova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-8632-203X>

Khrapova N.P., <https://orcid.org/0000-0002-9782-6866>

Baturin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

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

Acknowledgment. This work was supported by Federal budget of Russia.

Received 07.04.2021

Accepted 30.04.2021

Введение. Лихорадка чикунгуны представляет собой арбовирусную инфекцию, передающуюся преимущественно через укусы комаров рода *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*). Болезнь характеризуется лихорадочным синдромом, поражением суставов и кожной сыпью. Большин-

ство пациентов полностью выздоравливают без перехода острой формы инфекции в хроническую, но в некоторых случаях артралгии могут продолжаться в течение нескольких месяцев или даже лет, существенно влияя на качество жизни, физическую активность и трудоспособность.

Эпидемические проявления лихорадки чикунгунья регистрируются более чем в 60 странах Азии, Африки и Америки [1]. Существует вероятность дальнейшего расширения ареала инфекции в связи с потенциальной возможностью заноса вируса чикунгунья на территории эпидемиологического риска, где имеется специфический переносчик. Быстрое распространение инфекции может повлечь серьезные проблемы для общественно-го здравоохранения во всем мире, что привлекло к ней внимание и вызвало резонанс среди медицинского и научного сообщества [2].

До настоящего времени местных случаев заражения лихорадкой чикунгунья в Российской Федерации не зарегистрировано, но обнаружение *Ae. albopictus* на Черноморском побережье страны [3] не исключает возникновения сезонных вспышек заболевания в случае завоза инфекции, как это произошло в Италии и Франции [4, 5].

Граждане России подвергаются риску заражения лихорадкой чикунгунья во время выездов в страны, где происходит передача вируса. С 2006 по 2018 г. было зарегистрировано 13 случаев завоза инфекции на территорию нашей страны (за 2019 г. официальных данных нет) [6, 7].

Клиническая диагностика инфекции, вызванной вирусом чикунгунья, основана на таких проявлениях, как высокая температура, полиартралгия, сыпь. В дополнение к диагностическим критериям учитывают эпидемиологический анамнез (пациент проживает на эндемичной территории или путешествовал в эндемическую зону за 15 дней до появления первых симптомов [8]). Окончательный диагноз устанавливают только после лабораторного подтверждения. Рядом отечественных авторов были опубликованы данные относительно частоты этиологической расшифровки завозных случаев острых лихорадочных заболеваний, импортированных в РФ, которая составляла до 50 %, что указывает на необходимость

совершенствования лабораторной диагностики арбовирусных лихорадок, в частности, лихорадки чикунгунья, с помощью высокоспецифичных тест-систем [6, 9, 10].

Необходимо проводить дифференциальную диагностику лихорадки чикунгунья с лихорадками Зика и денге, так как они имеют схожие симптомы, общее географическое распределение и переносчиков инфекции. Нужно учитывать тот факт, что эти вирусные инфекции могут циркулировать совместно. Например, сообщалось об одновременном присутствии в организме пациентов двух (вируса денге и чикунгунья) [11], а также трех вирусов (возбудителей лихорадок Зика, денге и чикунгунья) у пациента из Колумбии [12].

Лихорадку чикунгунья необходимо дифференцировать от заболеваний, вызванных не только арбовирусами (лихорадка денге, Зика), но и другими вирусами (аденовирус, энтеровирус), бактериями (лептоспироз), возбудителями паразитарных заболеваний (малярия), аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка), а также от хронических воспалительных ревматических заболеваний (ревматоидный артрит) [13–15].

Представлена схема дифференциальной лабораторной диагностики лихорадок чикунгунья, Зика и денге.

Таким образом, широкий диапазон сходных патогенетических и клинических признаков лихорадки чикунгунья с вышеперечисленными заболеваниями предполагает обязательное проведение уточняющих лабораторных тестов (см. схему) для постановки диагноза.

Лабораторная диагностика лихорадки чикунгунья включает в себя прямое обнаружение вируса с помощью вирусологических и молекулярно-генетических методов, определение антигенов вируса и вирусоспецифических антител серологическими методами. Алгоритм диагностического исследования биологического материала от пациентов, предположительно инфицированных вирусом чикунгунья, с использованием вышеперечисленных методов, был предложен Центром по



Схема дифференциальной лабораторной диагностики лихорадок чикунгунья, Зика и денге [16].

контролю и профилактике заболеваний (CDC) и рядом исследователей [17–19].

Выбор метода исследования биологического материала на наличие антител к вирусу чикунгунья или антигенов вируса зависит как от типа самого образца (сыворотка, плазма крови, цельная кровь), так и от времени, которое прошло с момента инфицирования. Инкубационный период в среднем составляет 2 – 4 дня, затем наступает непродолжительный период виремии (не более 7 дней), при котором вирусная нагрузка достигает 10^9 копий вирусного генома на мл. На данном этапе для диагностики целесообразно использовать прямые методы детекции вируса (изоляция вируса, ОТ-ПЦР, иммунодиагностические методы для определения антигена). Иммуноглобулины М (IgM) выявляются в сыворотке крови с 5 дня с момента начала лихорадки чикунгунья и сохраняются от 3 до 6 месяцев. Ig G к вирусу появляются к 7-10 дню от начала болезни и определяются довольно продолжительное время [20–22].

В табл. 1 приведены основные методы лабораторной диагностики лихорадки, вызванной вирусом чикунгунья, перечислен материал, необходимый для исследования, указаны сроки проведения диагностики с помощью конкретного метода, а также их преимущества и недостатки.

Рассмотрим подробнее каждый из методов, приведенных в табл. 1.

При вирусологическом методе изоляция вируса чикунгунья проводится в первые 7 дней от начала заболевания

из сыворотки крови и цельной крови инфицированного человека, а также из секционного материала с использованием различных культур клеток, интрацеребрального заражения мышей, введения инфицированного материала комарам [24]. В лабораторной практике этот метод применяют редко, так как он требует длительного времени исполнения (1-2 нед) и наличия специально обученного персонала. Вирусологический метод для диагностики лихорадки чикунгунья является высокоспецифичным (100 %), но недостаточно чувствительным [25]. Вирус чикунгунья способен инфицировать и размножаться в большинстве известных перевиваемых клеточных линий, однако, так как данный вирус передается комарами *A. aegypti*, оптимальной для его выделения считают линию клеток комаров C6/36. По данным ряда авторов, хорошей чувствительностью в отношении вируса обладают не только перевиваемые клеточные линии различного происхождения, такие как ВНК-21, HeLa, Vero, Huh7, SVG-A, HepG2, RD, A549, C2C1, но и первичные (дермальные фибробласты). Присутствие вируса в культуре клеток учитываются через одну-две недели после заражения с помощью электронной микроскопии, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресцентного анализа [26].

Молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени – ОТ-ПЦР) позволяют выявлять вирус чикунгунья в биологическом материале в первые 7 дней

Таблица 1

Преимущества и недостатки различных методов лабораторной диагностики лихорадки чикунгунья [23]

Метод диагностики	Материал для исследования	Рекомендуемый срок проведения исследования	Преимущества	Недостатки
Вирусологический метод	Сыворотка крови, цельная кровь, секционный материал	0-7 день с момента инфицирования	Высокая специфичность метода	Требуется соблюдение режима биобезопасности, длительность анализа (1-2 недели)
Определение РНК вируса с помощью молекулярно-генетических методов	Цельная кровь, секционный материал	0-7 день с момента инфицирования	Высокая чувствительность и специфичность	Методы недоступны для ряда лабораторий за счет высокой стоимости реагентов и оборудования
Определение антигена с помощью ИФА, МФА	Сыворотка крови	0-7 день с момента инфицирования	Низкая стоимость анализа, альтернатива ПЦР (при отсутствии возможности ее проведения)	Чувствительность и специфичность наборов не удовлетворяют требованиям, необходимо соблюдение режима биобезопасности
Серологические методы для определения антител IgM и IgG (ИФА)	Сыворотка крови	IgM – 5-7 день с момента инфицирования IgG - 7-10 день заболевания	Широко доступны, просты в исполнении, множество производимых и зарегистрированных тест-систем	Кросс-реактивность в отношении гетерологичных вирусов, чувствительность варьируется. Наличие IgM не всегда говорит об острой инфекции, необходимы дополнительные подтверждающие тесты
Иммунохроматографические экспресс-тесты для качественного определения антител	Сыворотка крови, цельная кровь	IgM – 5-7 день с момента инфицирования IgG – 7-10 день заболевания	Быстрота (10 мин) и доступность	Результаты теста дают только первичную информацию, поэтому полученные положительные результаты необходимо уточнить другими альтернативными методами (например, ИФА, ПЦР)
Определение антител в МФА	Сыворотка крови	IgM – 5-7 день с момента инфицирования IgG – 7-10 день заболевания	Высокая чувствительность и специфичность	Метод не позволяет количественно определять антитела, субъективен, трудоемок в исполнении, требует сложного оборудования

с момента инфицирования, Данный метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью и позволяет определять вирусную нагрузку.

Во время вспышки в Малайзии в 1998 г. F. Nasebe и соавт. [27] разработали ОТ-ПЦР анализ на основе последовательностей генов nsP1 и E1 и успешно проверили его на образцах сыворотки крови, взятых у пациентов с подозрением на лихорадку чикунгунья. Последующие варианты ОТ-ПЦР были предложены уже в формате реального времени [28, 29].

Другим методом молекулярной диагностики, адаптированным для выявления вируса чикунгунья, является NASBA-Real-Time (Nucleic acid sequence based amplification), представляющая собой реакцию транскрипционной изотермической амплификации в режиме реального времени. NASBA имеет существенные преимущества по сравнению с ОТ-ПЦР. Во-первых, NASBA позволяет амплифицировать непосредственно молекулы РНК без предварительного проведения реакции обратной транскрипции. Во-вторых, NASBA является более чувствительным методом по сравнению с обычной ПЦР. По данным J.N. Telles и соавт. [30], сконструированная ими экспериментальная тест-система для выявления вируса чикунгунья методом NASBA имела предел обнаружения 200 геномных копий на реакцию.

Еще одним перспективным методом выявления вируса чикунгунья является петлевая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот в режиме реального времени – RT-LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). При совмещении с обратной транскрипцией LAMP может с высокой эффективностью амплифицировать последовательности вирусных РНК. RT-LAMP является менее затратным методом, поскольку для него требуется только один тип ДНК-полимеразы с активностью смещения цепи [31]. Кроме того, RT-LAMP существенно сокращает время получения результата до 30 минут.

На сегодняшний день разработано множество коммерческих наборов реагентов для выявления РНК вируса, на этапе регистрации находится отечественная тест-система «АмплиСенс® Chikungunya virus-F1» для выявления вируса чикунгунья методом ОТ-ПЦР-РВ.

Иммунодиагностические методы позволяют на ранней стадии заболевания определить в сыворотке крови вирусный период с помощью иммуноферментного анализа и иммунохроматографических тестов. В настоящее время разработан и зарегистрирован ряд иммунодиагностических тест-систем для отслеживания репликации вируса в образце. Для конструирования большинства из этих тест-систем авторы использовали поликлональные антитела, выделенные от реконвалесцентов или от животных, иммунизированных цельным вирусом. Данные тест-системы обладают высокой чувствительностью, но низкой специфичностью за счет поликлонального сырья в своей основе. Остается открытым вопрос создания диагностических препаратов на основе моноклональных антител, существуют экспериментальные тест-системы, но они имеют различный уровень чувствительности (30-90 %) к разным генотипам вируса чикунгунья [32].

Поиск специфических антител в сыворотке крови проводят с помощью твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ), метода флуоресцирующих антител (МФА), а также иммунохроматографических экспресс-методов, которые позволяют получить результат реакции в течение нескольких часов (до 2,5 часов). Поиск

IgM целесообразно проводить в период с 5 по 7 день с момента инфицирования, при этом необходимо учитывать, что они циркулируют в крови до нескольких месяцев. Определение антител этого класса является самым используемым лабораторным тестом для диагностики острой инфекции, вызванной вирусом чикунгунья, и часто проводится в комбинации с молекулярно-генетическими методами [33]. Антитела IgG появляются в крови инфицированного человека приблизительно на 7-10 день заболевания и детектируются в течение длительного периода времени (до нескольких лет) [34]. Поиск IgG в основном применяют для обследования реконвалесцентов.

Иммуноферментный анализ наиболее часто используется в двух вариантах: ТИФМ с захватом иммуноглобулинов IgM (MAC-ELISA) и непрямой вариант иммуноферментного анализа для выявления антител классов IgM и IgG [35]. Метод иммуноферментного анализа при условии правильного выбора иммунодоминантного антигена, адсорбированного на твердой фазе, как правило, высоко специфичен и чувствителен, однако, возможно появление ложноположительных результатов из-за перекрестной активности антител с эпитопами, расположенными на поверхности гетерологичных вирусов [8, 35]. Низкая диагностическая чувствительность ТИФМ (от 4 до 20 %) наблюдалась рядом исследователей при обследовании сывороток больных, с момента инфицирования которых прошло 5-7 дней, то есть в тот период, когда титр антител еще не достигал необходимых для обнаружения значений [36, 37].

В 2015 г. была проведена независимая оценка десяти производимых коммерческих наборов для обнаружения IgM к вирусу чикунгунья. Только три набора MAC-ELISA и один для НМФА имели точность 96 - 100%, у остальных она была менее 50% [19]. Вероятно, причиной низкой точности являлась перекрестная реактивность по отношению к другим альфавирусам, а также разнообразие эпитопов, представленных на поверхности антигенов различных изолятов вируса чикунгунья. M. Khan и соавт. [38] и J.N. Erasmus и соавт. [39] в качестве антигена захвата были взяты рекомбинантные белки вируса E1, E2 и компоненты вируса чикунгунья вместо традиционного использования целого вируса. В результате проведенного исследования и с учетом отсутствия эффективного средства для иммунодиагностики лихорадки чикунгунья, CDC был разработан диагностический алгоритм, согласно которому образцы с положительными или пограничными результатами MAC-ELISA должны быть дополнительно подтверждены в тесте нейтрализации бляшкообразования (PRNT) [19], который является золотым стандартом для подтверждения инфекции, вызванной вирусом чикунгунья. Тем не менее, данный метод имеет существенные недостатки. Во-первых, он подразумевает использование живого вируса, что ограничивает его доступность [40]. Во-вторых, он очень трудоемкий и требует хорошо обученного персонала [35, 40].

Метод флуоресцирующих антител в непрямом варианте (НМФА) позволяет детектировать антитела к вирусу чикунгунья, а прямой вариант метода - присутствие вирусных антигенов в инфицированных клетках [35]. Метод флуоресцирующих антител чувствительный и специфичный, но имеет ряд ограничений: не позволяет количественно определять антитела, субъективный, трудоемкий в исполнении, требует оборудования, которое

Средства иммунодиагностики лихорадки чикунгуныя

Название набора реагентов, производитель	Чувствительность и специфичность (по данным производителя)	Уровень внедрения
Зарубежные		
Набор реагентов Chikungunya IgG capture NovaLisa, Набор реагентов Chikungunya IgM p-capture NovaLisa, Германия	Чувствительность более 90 %, специфичность более 90 %	Зарегистрирован на территории РФ ФСЗ 2011/10431
Тест для быстрой диагностики лихорадки чикунгуныя SD BIOLINE Chikungunya IgM SD Diagnostics, Корея	Данные о чувствительности и специфичности производитель не приводит	Зарегистрирован на территории РФ ФСЗ 2007/00653
Определение антител методом иммунофлуоресценции Anti-Chikungunya virus IFT (IgG), Anti-Chikungunya virus IFT (IgM) Евроиммун, Германия	Чувствительность 96 %, специфичность – 100 % для определения IgG чувствительность 96 %, специфичность 95% для IgM	Зарегистрирован на территории РФ № ФСЗ 2010/07322
Отечественные		
Набор реагентов для дифференциального определения IgM антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и чикунгуныя в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА- IgM Зика, денге, ЗН, Чик»	Данные производитель не приводит	Зарегистрирован на территории РФ РЗН 2018/7810
Наборы реагентов для выявления антигенов, IgM и IgG к вирусу чикунгуныя – БИОСЕРВИС (Россия)	-	Только для научных исследований

может быть недоступно для части лабораторий [37, 40].

Экспресс-тесты для иммунохроматографического определения IgM к вирусу чикунгуныя в сыворотке или плазме крови человека были предложены производителем из Кореи Standard Diagnostics «SD Biotline Chikungunya IgM» и из США СТК Biotech «OnSite Chikungunya IgM Combo Rapid Test». Они разрешены к использованию на территории РФ. Время проведения анализа занимает 10 минут. Исследование, проведенное учеными из Биомедицинского научно-исследовательского института Вооруженных сил Франции (French Armed Forces Biomedical Research Institute – IRBA; Франция), показало, что вышеупомянутые коммерческие диагностические экспресс-тесты имеют более низкие параметры чувствительности и специфичности по сравнению с иммуноферментными тест-системами, одобренными для диагностики лихорадки чикунгуныя Комиссией Европейского союза [41]. Таким образом, результат, полученный с помощью экспресс-тестов, считается предварительным и требует обязательного подтверждения другими методами.

Два набора реагентов для иммунодиагностики лихорадки, вызванной вирусом чикунгуныя, были предложены отечественными производителями. Специалистами «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» в 2018 г. зарегистрирован набор реагентов для дифференциального определения IgM антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и чикунгуныя в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА- IgM Зика, денге, ЗН, Чик» (РЗН 2018/7810, 28.11.18 г.). Наборы реагентов для выявления антигенов, IgM и IgG к вирусу чикунгуныя производства БИОСЕРВИС (Россия) находятся на стадии испытаний и в настоящее время рекомендуются для использования только в научных целях.

В табл. 2 приведены разрешенные на территории РФ в настоящее время иммунодиагностические наборы для определения антител к вирусу чикунгуныя, описаны их характеристики.

Из приведенного в табл. 2 материала видно, что в настоящее время список коммерческих препаратов для

иммунодиагностики лихорадки чикунгуныя широко представлен зарубежными тест-системами, чувствительность и специфичность которых хорошо изучена и описана в литературе.

Из отечественных тест-систем, только один набор для иммунодиагностики лихорадки чикунгуныя зарегистрирован на сегодняшний день. В литературе нет данных о диагностической значимости отечественных наборов.

Заключение. Несмотря на то, что распространение лихорадки чикунгуныя в настоящее время не создает чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, безусловно, оно является глобальной проблемой и требует особой настороженности. Важно отметить, что во многих эндемичных по лихорадке чикунгуныя регионах в условиях ограниченных ресурсов местных лабораторных служб, точная и своевременная диагностика данной вирусной инфекции находится на неудовлетворительном уровне или вовсе отсутствует, что создает предпосылки для ее дальнейшего распространения. Представленная в обзоре информация содержит перечень коммерческих препаратов для лабораторной диагностики лихорадки чикунгуныя, что будет полезно для врачей клинической лабораторной диагностики в плане выбора метода исследования и приемлемой тест-системы для лабораторного подтверждения диагноза лихорадка чикунгуныя, а также проведения дифференциальной диагностики с другими лихорадками, имеющими схожие симптомы, общее географическое распространение и переносчиков инфекции.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансировании из Федерального бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4-5, 8, 11-12, 14-21, 23-40 см. REFERENCES)

1. Чикунгуныя [Электронный ресурс]. Информационные бюллетени. Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>

- Львов Д.К. Лихорадка чикунгунья. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 707–10.
- Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; 1: 35–8.
- Число выявленных при пересечении границы России инфекционных больных за последние пять лет выросло втрое [Электронный ресурс]. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=12167&sphrase_id=1743987 (26.06.2019).
- Бахметьева С.В., Пуховская Н.М., Здановская Н.И., Иванов Л.И., Белозерова Н.Б., Уткина О.М. и др. Этиологическая расшифровка завозных случаев тропических лихорадок в дальневосточном регионе. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 25:91-3.
- Плясунова И.В., Баяндин Р.Б., Чаусов Е.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Семенцова А.О. и др. Завозные случаи лихорадки Денге, Чикунгунья, Зика в Российской Федерации. Молекулярная диагностика 2017: Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва, 18–20 апреля 2017 года. – Москва: ООО фирма «Юлис», 2017. – С. 166-167.
- Белов Б.С., Буханова Д.В., Тарасова Г.М. Лихорадка чикунгунья: ревматологические аспекты. *Современная ревматология*. 2018; 12(3): 29–33.
- Молекулярные методы в диагностике ряда инфекционных заболеваний: традиции и инновации. Карань Л.С. [Электронный ресурс]. Образовательный портал docplayer. Режим доступа: <https://docplayer.ru/68301036-Molekulyarnye-metody-v-diagnostike-ryada-infekcionnyh-zabolevaniy-tradicii-i-innovacii-karan-l-s-fbunsnii-epidemiologii-2017.html> (12.2007).
- LabMedica. Новости лабораторной медицины. Произведена оценка тестов для серологической диагностики вируса чикунгунья (электронный ресурс). <https://ru.labmedica.com/microbiology/articles/294756910.html> Опубликовано 27 Jan 2015.
- Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoy patologii*. 2014; 25:91-3. (in Russian)
- Plyasunova I.V., Bayandin R.B., Chausov E.V., Protopopova E.V., Kartashov M. Yu., Sementsova A.O. et al. Imported cases of Dengue, Chikungunya, and Zika fevers in the Russian Federation. Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation [Sbornik trudov IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]. Moscow, April 18-20, 2017. - Moscow: LLC firm “Yulis”, 2017. - p. 166-167. (in Russian)
- LeRoy E.M., Nkoghe D., Ollomo B., Nze-Nkoghe C., Becquart P., Grard G. et al. Concurrent Chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks Gabon 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 591-3. <https://doi.org/10.3201/eid1504.080664> PMID: 19331740; PMCID: PMC2671412.
- Villamil-Gomez W.E., Gonzalez-Camargo O., Rodriguez-Ayubi J., Zapata-Serpa D, Rodriguez-Morales A.J. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J. Infect. Public Health*. 2016; 9: 684–6.
- Belov B. S., Bukhanova D. V., Tarasova G. M. Chikungunya fever: rheumatological aspects. *Sovremennaya revmatologiya*. 2018; 12(3): 29-33. (in Russian)
- Marques C.D.L., Duarte A.L.B.P., Ranzolin A., Dantas A.T., Cavalcanti N.G., Gonçalves R.S.G. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 –Diagnosis and special situations. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.* 2017; 57 (Suppl. 2):421-37. <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.05.006> Epub. 2017 Jul 25.
- Essackjee K., Goorah S., Ramchurn S.K., Cheeneebash J., Walker-Bone K.. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. *Postgrad. Med. J.* 2013; 89 (1054): 440-7. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2012-131477>
- Beltrán-Silva S.L., Chacón-Hernández S.S., Moreno-Palacios E., Pereyra-Molina J.á. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2018;81(3):146-53. <https://doi.org/10.1016/j.gmx.2016.09.011>
- CDC. Is it Chikungunya or Dengue? Available from: <https://www.cdc.gov/grand-rounds/pp/2015/20150519-pdf-dengue-chikungunya-508.pdf>
- Reddy V., Ravi V., Desai A., Parida M., Powers A.M., Johnson B.W. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J. Med. Virol.* 2012; 84: 1771–8.
- Johnson B.W., Goodman C.H., Holloway K., de Salazar P.M., Valadere A.M., Drebot M.A. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016; 95: 182–92.
- Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:1231-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035> PMID: 25806915.
- Staikowsky F., Talarmin F., Grivard P., Souab A., Schuffenecker I., Le Roux K. et al. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island o La Réunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS One*. 2009 Oct 28;4(10):e7603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007603> PMID: 19893613; PMCID: PMC2764049.
- Molecular methods in the diagnosis of a number of infectious diseases: traditions and innovations. Karan L. S. [Electronic resource]. Educational portal docplayer. Access mode: <https://docplayer.ru/68301036-Molekulyarnye-metody-v-diagnostike-ryada-infekcionnyh-zabolevaniy-tradicii-i-innovacii-karan-l-s-fbunsnii-epidemiologii-2017.html> (12.2007). (in Russian)
- Dash M., Mohanty I., Padhi S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: Do we really need it? *Indian J. Med. Sci.* 2011; 65: 83-91.
- Schwartz O., Albert M.L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
- Panning M., Grywna K., van Esbroeck M., Emmerich P., Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 416–22. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>
- Roberts G.C., Zothner C., Remenyi R., Merits A., Stonehouse N. J.,

REFERENCES

- Chikungunya [Electronic resource]. Newsletters. World Health Organization. Access mode: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/chikungunya> (in Russian)
- Morrison T.E. Reemergence of chikungunya virus. *J. Virol.* 2014; 88:11644-7.
- L'vov D. K. Chikungunya fever. In book: L'vov D. K., ed. Guide to Virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
- Grandadam M., Caro V., Plumet S., Thiberge J., Souarès Y., Failloux A. et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(5):910-913. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- Rezza G. Chikungunya and West Nile virus outbreaks: what is happening in north-eastern Italy? *Eur. J. Publ. Hlth.* 2009;. 19(3): 236–7.
- Larichev V.F., Saifullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. Imported cases of arbovirus infections in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2012; 1: 35–8. (in Russian)
- The number of infectious patients detected when crossing the border of Russia has tripled over the past five years [Electronic resource]. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare [Rosпотребнадзор]. Access mode: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=12167&sphrase_id=1743987 (26.06.2019). (in Russian)
- Burt F.J., Rolph M.S., Rulli N.E., Mahalingam S., Heise M.T. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet.* 2012; 379: 662-71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X) Epub 2011 Nov 17. PMID: 22100854.
- Bakhmet'yeva S.V., Pukhovskaya N.M., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., Belozeroва N.B., Utkina O.M. et al. Etiological interpretation of imported cases of tropical fevers in the Far Eastern region.

- Harris M.. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Scientific Reports*. 2011; 7, Article number: 14641 (2017)) (PLoS One. 2011; 6(12): e28923. Published online 2011 Dec 19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028923> PMID: 22205980.
27. Hasebe F., Parquet M.C., Pandey B.D., Mathenge E.G., Morita K., Balasubramaniam V. et al. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 2002; 67(3):370-4. <https://doi.org/10.1002/jmv.10085> PMID: 12116030.
28. Pastorino B., Bessaud M., Grandadam M., Murri S., Tolou H.J., Peyrefitte C.N. et al. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J. Virol. Methods*. 2005; 124(1-2): 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.002> Epub 2004 Dec 15. PMID: 15664052.
29. Edwards C.J., Welch S.R., Chamberlain J., Hewson R., Tolley H., Cane P.A. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *J. Clin. Virol.* 2007; 39(4):271-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.05.008> Epub 2007 Jul 12. PMID: 17627877.
30. Telles J.N., Le Roux K., Grivard P. Vernet G., Michault A. Evaluation of real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of Chikungunya virus in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(9):1168-72. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010736-0> Epub 2009 Jun 15. PMID: 19528148.
31. Parida M.M., Santhosh S.R., Dash P.K., Tripathi N.K., Lakshmi V., Mamidi N. et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(2):351-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01734-06> Epub. 2006 Nov 29. PMID: 17135444; PMID: PMC1829040.
32. Okabayashi T., Sasaki T., Masrinoul P., Chantawat N., Yoksan S., Nitattattana N., et al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53: 382-388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02033-14>
33. Johnson B.W., Russell B.J., Goodman C.H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J. Infect. Dis.* 2016; 214: S471-S474. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>
34. Wenxi An, Ningning Ge, Yilin Cao, Jin Sun, Xia Jin. Recent progress on chikungunya virus research. *Virologica sinica*. 2017, 32(6) : 441-53.
35. Gaibani P., Landini M.P., Sambri V. Diagnostic methods for CHIKV based on serological tools. *Methods in Molecular Biology*. 2016; 1426, https://doi.org/10.1007/9778-1-4939-3618-2_6
36. Blacksell S.D., Tanganuchitcharnchai A., Jarman R.G., Gibbons R.V., Paris D.H., Bailey M.S. et al. Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the diagnosis of acute Chikungunya infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18:1773-5. <https://doi.org/10.1128/CVI.05288-11> Epub 2011 Aug 24. PMID: 21865416; PMID: PMC3187043.
37. Yap G., Pok K.Y., Lai Y.L., Hapuarachchi H.C., Chow A., Leo Y.S. et al. Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;Dis 4:e753. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000753> PMID: 20651930; PMID: PMC2907414.
38. Khan M., Dhanwani R., Kumar J.S., Rao P.V., Parida M. Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. *J. Med. Virol.* 2014; 86: 1169-75. <https://doi.org/10.1002/jmv.v86.7>
39. Erasmus J.H., Needham J., Raychaudhuri S., Diamond M.S., Beasley D.W., Morkowski S. et al. Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, 9: e0004119. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004119>
40. Staples J.E., Breiman R.F., Powers A.M. Chikungunya ever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Emerg. Infect.* 2009; 49:942-8. <https://doi.org/10.1086/605496> PMID: 19663604.
41. LabMedica. Laboratory medicine news. Tests for serological diagnosis of chikungunya virus were evaluated (electronic resource). <https://ru.labmedica.com/microbiology/articles/294756910.html> Published 27 Jan 2015. (in Russian)

Поступила 07.04.21
Принята к печати 30.04.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Безродный С.Л.^{1,4}, Марданлы С.Г.^{1,2,3}, Затевалов А.М.⁴, Терёшина Е.В.⁶, Миронов А.Ю.^{4,5}, Помазанов В.В.¹

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА И ПЛАЗМАЛОГЕНА У ЛИЦ СТАРШЕГО ВОЗРАСТА С ПАТОЛОГИЕЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

¹ЗАО «Эколаб», 142530, Электрогорск, Россия;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 142611, Московская область, г.Орехово-Зуево, Россия;

³ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

⁴ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России; 125371, Москва, Россия;

⁶ММП «Международная медицинская помощь», 6317, Обервилл, Цуг, Фушлох, 6А, Швейцария

Исследована концентрация бактериальных плазмалогена 18а и эндотоксина в крови лиц старшего возраста 45-90 лет с патологией сахарного диабета 2 типа (СД 2) – основная группа и без сахарного диабета – группа сравнения. Концентрации как плазмалогена 18а, так и эндотоксина в крови лиц с патологией СД 2 статистически значимо больше, чем в крови лиц без патологии СД 2. Для оценки состояния микробиоценоза и прогнозирования СД 2 типа определены решающие правила, в виде пороговых значений концентраций плазмалогена 18а и эндотоксина в крови пожилых лиц с предполагаемым или установленным диагнозом СД 2 типа. С помощью ROC-анализа выявлено, что значения выше 20,66 мкг/мл для плазмалогена 18а, и 0,48 нмоль/мл – для эндотоксина, определяют наличие патологии СД 2 типа в возрастной группе 45-90 лет.

Ключевые слова: бактериальный эндотоксин и плазмалоген 18а; газовая хроматография масс-спектрометрия; микробные компоненты; сахарный диабет 2 типа; старший возраст

Для цитирования: Безродный С.Л., Марданлы С.Г., Затевалов А.М., Терешина Е.В., Миронов А.Ю., Помазанов В.В. Оценка состояния кишечного микробиоценоза на основе бактериального эндотоксина и плазмалогена у лиц старшего возраста с патологией сахарного диабета 2 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 565-570. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-565-570>

Для корреспонденции: Безродный Святослав Леонидович, ЗАО «Эколаб»; e-mail: frebiotik@mail.ru

Bezrodny S.L.^{1,4}, Mardanly S.G.^{1,2,3}, Zatevalov A.M.⁴, Tereshina E.V.⁶, Mironov A.Yu.^{4,5}, Pomazanov V.V.¹

ASSESSMENT OF THE STATE OF INTESTINAL MICROBIOCENOSIS BASED ON BACTERIAL ENDOTOXIN AND PLASMALOGEN IN ELDERLY PERSONS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATHOLOGY

¹CJSC «Ecolab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²The «State Humanitarian and Technological University», 142611, Moscow region, Orekhovo-Zuevo, Russia;

³FGAOU VO «First MG MU named after I.M. Sechenov» Ministry of Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

⁴G.N. Gabricheskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

⁵Federal research and clinical center of specialized medical care and medical technologies FMBA of Russia, 125371, Moscow, Russia;

⁶WWMA «World Wide Medical Assistance», 6317, Oberwill, Zug, Fuschloch, 6A, Switzerland

The concentration of bacterial plasmalogen 18a and endotoxin in the blood of elderly people 45-90 years old with the pathology of type 2 diabetes mellitus (DM 2) – the main group and without diabetes mellitus – the comparison group was investigated. The concentration of both plasmalogen 18a and endotoxin in the blood of individuals with DM 2 pathology is statistically significantly higher than in the blood of individuals without DM 2 pathology. To assess the state of microbiocenosis and predict type 2 diabetes mellitus, decisive rules have been determined in the form of threshold values of plasma concentrations 18a and endotoxin in the blood of elderly people with a suspected or established diagnosis of type 2 diabetes. Using ROC analysis, it was found that values above 20.66 µg / ml for plasmalogen 18a, and 0.48 nmol / ml for endotoxin, determine the presence of type 2 diabetes mellitus pathology in the 45-90 age group.

Key words: bacterial endotoxin and plasmalogen; gas chromatography mass spectrometry of microbial components; intestinal microbiocenosis; pathology of type 2 diabetes; older age

For citation: Bezrodny S.L., Mardanly S.G., Tereshina E.V., Pomazanov V.V. Microbial endotoxin and plasmalogen in senile persons with pathology of diabetes mellitus type 2. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 565-570 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-565-570>

For correspondence: Bezrodny Svyatoslav Leonidovith; e-mail: frebiotik@mail.ru

Information about authors:

Bezrodny S.L., <https://orcid.org/0000-0001-5869-2503>

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>

Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>

Tereshina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-9022-044X>

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>
Pomazanov V. V., <https://orcid.org/0000-0002-9811-9450>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 31.05.2021
Accepted 29.06.2021

Введение. Сахарный диабет – одна из серьёзных проблем здравоохранения XXI века. По данным Международной федерации диабета, в мире насчитывается более 425 млн людей, больных диабетом, к 2045 г. прогнозируется рост до 629 миллионов [1]. Несмотря на то, что сахарный диабет 2 типа (СД 2) встречается во всех возрастных группах, включая детей и подростков [2], он по-прежнему считается заболеванием, характерным для людей старшего возраста [3]. Число новых случаев СД 2 скачкообразно увеличивается после 45 лет [4]. Особое внимание уделяется исследованиям взаимосвязи возрастных нарушений системного метаболизма и микробиома кишечника [5–11].

Термин «микробиом» введен в 2001 году молекулярным биологом и генетиком Джошуа Ледербергом [12]. В современных представлениях, микробиом – совокупность всех микробов и их генов, находящихся в различных биотопах организма [13]. Взрослый человек колонизирован примерно 100 триллионами микробов, основное количество (более 600 родов, более 2 кг биомассы) которых локализуется преимущественно в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) [14, 15]. В кишечнике человека присутствуют бактерии, археи, вирусы, грибы. Подавляющее большинство микробного разнообразия (90%) кишечника представлено бактериальными филлами *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (семейства *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*), при этом 50-80% бактерий филогенетически принадлежат к типу *Firmicutes*, родам *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*. Другие типы микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека, представлены *Actinobacteria* (3-15%), *Proteobacteria* (1-20%), *Verrucomicrobia* (0,1%), *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Spyrochaetes*, *Lentisphaerae* [16–18].

Нарушения микробиологии кишечника отражаются изменениями в соотношении бактериальных типов, родов, видов. Основным источником эндотоксина в организме являются грамотрицательные патогенные и оппортунистические бактерии, в первую очередь, энтеробактерии и бактероиды, широко представленные в составе фекальной микробиоты; их количество увеличивается с возрастом и развитием возраст-ассоциированных патологий [19]. При старении увеличивается кишечная проницаемость, ослабевает барьерная функция кишечника, бактериальные эндотоксины транслоцируются через кишечную стенку в кровотоки и способствуют хроническому системному воспалению [20, 21]. Хроническое системное воспаление связано с развитием возрастных метаболических нарушений и патологических процессов, которым часто сопутствует дисбиоз кишечника, сопровождающийся развитием эндотоксемии [19, 22, 23].

Эндотоксин – термостабильный компонент наружной мембраны клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов, т. е. липополисахарид (ЛПС), состоящий из частей: гидрофобного липида А – гликолипида Ре-хемотипа, гидрофильного ядра и полисахарида [24, 25].

Образ-распознающие рецепторы – белки, присутствующие на поверхности иммунокомпетентных

клеток, способные распознавать стандартные молекулярные паттерны, такие как липополисахарид (ЛПС), пептидогликан, липопептиды и липотейхоевые кислоты, флагеллин, бактериальную и вирусную ДНК, вирусная двухцепочечную РНК [22, 26]. Липотейхоевые кислоты являются важными компонентами клеточной стенки грамположительных, липополисахариды (ЛПС) – грамотрицательных бактерий. Они высвобождаются при лизисе бактериальных клеток, распознаются клетками организма через Toll-подобные рецепторы (TLR) 2 и 4, что вызывает синтез провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли TNF- α , интерлейкин IL-1, IL-6), которые путём рекрутирования макрофагов и эозинофилов вызывают воспаление и боль, затем, полный бактериальный лизис и клиренс [27, 28]. Образ-распознающие рецепторы TLR₄, TLR₂, TLR₉ взаимодействуют с лигандами кишечной микробиоты и осуществляют функции защиты от инфекции и поддержания тканевого гомеостаза [29, 30]. Комплекс TLR₄ является ключевым элементом клеточной связи для распознавания ЛПС. Биологические эффекты обусловлены взаимодействием ЛПС с рецептором TLR₄, который распознает эндотоксин в кооперации с внеклеточными белками MD₂, CD₁₄, LBP [31].

Системное воспаление связано с ионными каналами с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP), которые являются значимыми в воспалительных реакциях не только посредством нейровозмущения, но и через функции эндотелиальных, эпителиальных и провоспалительных иммунокомпетентных клеток [32]. TRP-каналы являются белковыми рецепторами, которые ответственны за ряд физиологических процессов – сенсорных функций: трансдукция вкуса и запаха, термочувствительность, ноцицепция; гомеостатических функций: проницаемость катионов Ca²⁺ и реабсорбция катионов Mg²⁺, осморегуляция; подвижных функций: сокращение мышц и вазомоторика [33, 34, 35].

Исследование, посвящённое распознаванию эндотоксина через TRP-каналы, привело к открытию ионного канала с транзиторным рецепторным потенциалом анкиринового подсемейства, представитель 1 (TRPA₁), как первого эндотоксинового сенсора [36]. Показано, что активация ЛПС в сенсорных нейронах не зависит от TLR₄, а связана с функциональной экспрессией TRPA₁ [36]. TRPA₁ является не единственным сенсором чувствительным к ЛПС, отмечается чувствительность других TRP-каналов подсемейств: ванилоидного – представитель 1 (TRPV₁), меластатинового – представитель 3 (TRPM₃) и представитель 8 (TRPM₈) [37]. TLR₄-опосредованные эффекты в различных типах клеток требуют введения ионов Ca²⁺ путём активации других представителей семейства каналов TRP, а именно, TRPC₆ и TRPM₇ [38, 39]. В эндотелиальных клетках ЛПС связывается с TLR₄-ассоциированной комплексной молекулой CD₁₄ [40], что вызывает гидролиз фосфатидилхолина с последующим образованием диацилглицерола (ДАГ) [41, 42]. Впоследствии ДАГ

активирует TRPC₆, что ведёт к увеличению концентрации внутриклеточного Ca²⁺, и к взаимодействию с адапторным белком первичного ответа миелоидной дифференциации 88 (MyD88), индукции воспаления и активации пути NF-κB [39]. Вместе с нарушением Ca²⁺-зависимого эндотелиального барьера [43, 44, 45], TRPC₆-опосредованное увеличение Ca²⁺ связано с воспалительными реакциями.

Цель исследования: определить концентрации бактериального плазмалогена 18a и эндотоксина в крови лиц старшего возраста с патологией СД 2 типа и без неё.

Материал и методы. Объектом исследования являлись 168 человек в возрасте 45-90 лет, отобранных методом случайной выборки в НКЦ геронтологии из различных клинических отделений. Постановка диагноза СД 2 типа осуществлялась врачами-специалистами на основании клинико-anamnestических данных и результатов лабораторных исследований. На основании поставленного диагноза сформированы основная группа (СД 2) – 105 пациентов и группа сравнения (ГС) – 63 пациента. Средний возраст пациентов в основной группе составил 68±11,3 лет, в группе сравнения 68±11,5 лет. Группы сопоставимы по возрасту. Гендерные различия не учитывались.

Материалом для исследования служила цельная кровь из вены, которую отбирали в пробирку с ЭДТА, хранили при 2-8° С и/или незамедлительно транспортировали в лабораторию в течение 30-60 мин. для анализа. Кровь отбирали согласно Методическим указаниям «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» МУ 4.2.2039-05 пункт 3. Доставленные пробы подвергали анализу на состав микробных маркёров. Определение концентрации бактериального плазмалогена 18a и эндотоксина в крови проводили методом ГХ-МС. Анализ состоял в прямом извлечении с помощью экстракции жирно-кислотных соединений из образцов. Разделение проводили на хроматографе МАЭСТРО 7820А, совмещённым с квадрупольным селективным масс-спектрометром Agilent Technologies 5975 с диапазоном масс 2-1000 а.е.м., имеющем разрешающую способность 0,5 а.е.м. во всём рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг (пикограмм) по метилстеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг в режиме селективных ионов, на

капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0.2 мм. Режим анализа 120° С – 2 мин, далее программированное изменение температуры – 5 град/мин до 300-320°С градусов. При определении состава основных липидных компонентов, карбоновых, фенилкарбоновых кислот и спиртов пробы использован режим полного сканирования [12, 47].

Статистическую обработку результатов одноименных показателей в каждой группе сравнения проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, построение диаграмм осуществлялось с помощью программы Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0.

Результаты. Для выбора критерия оценки статистической значимости отличия выборок проведена оценка нормальности распределения с помощью критериев Шапиро-Уилка (W) и Колмогорова-Смирнова (K-S) с модификацией Лиллиефорса (Лилл). Значения критериев для концентрации плазмалогена 18a в крови составили K-S d=0,1636, p<0,01; Лилл p<0,01 и W=0,9198, p=0,000001. Для концентрации эндотоксина в крови значения критериев составили K-S d=0,0744, p>0,20; Лилл p<0,05 W=0,9499; p=0,00001. Из представленных данных следует, что распределение значений концентраций плазмалогена и эндотоксина в крови не соответствует нормальному. Для проверки статистически значимых различий двух независимых групп, распределение значений в которых не является нормальным, использован U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в табл. 1.

Содержание плазмалогена 18a в крови в основной группе статистически значимо выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Концентрация бактериального эндотоксина в крови в основной группе статистически значимо выше, чем в группе сравнения. Значения концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена 18a в крови пациентов можно использовать в качестве дополнительного параметра прогноза развития СД 2 типа.

Для расчёта решающих правил – пороговых значений концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена 18a в крови пациентов использовали ROC-анализ. Результаты ROC-анализа для концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови пациентов представлены в табл. 2.

Таблица 1

Концентрация бактериального плазмалогена 18a и эндотоксина в крови в опытной и контрольной группе

Показатель	Значения в группах		Уровень значимости, p<0,05
	СД 2, n=105	ГС, n=63	
Концентрация плазмалогена 18a в крови, мкг/мл	25,6 (13,2-38,0)	14,1 (7,2-16,3)	0,000002
Концентрация эндотоксина в крови, нмоль/мл	0,52 (0,38-0,71)	0,37 (0,22-0,50)	0,000048

Примечание. Результат представлен в виде медианы, 25 и 75 процентиля в скобках.

Таблица 2

Результаты ROC-анализа для концентраций бактериального плазмалогена 18a и эндотоксина в крови пациентов исследуемых групп

Параметры	Значения для	
	плазмалогена 18a	эндотоксина
AUC (Площадь ограниченная ROC-кривой)	0,74	0,75
CutOff (Порог отсечения)	0,39	0,46
Пороговая концентрация	20,66 мкг/мл	0,48 нмоль/мл

Таблица 3

Качественная характеристика прогностической модели при СД 2 типа по концентрациям бактериального плазмалогена 18а и эндотоксина

Параметры	Значения для	
	плазмалогена 18а	эндотоксина
Чувствительность, %	89,38	80,52
Специфичность, %	54,90	52,75
Прогностическая точность, %	68,45	65,48

В табл. 2 показано, что значения AUC для представленных параметров выше 0,5, что указывает на возможность классификации диагноза СД 2 типа по значениям концентраций бактериального плазмалогена 18а и эндотоксина в крови, используя пороговые значения 20,66 мкг/мл плазмалогена 18а в крови и 0,48 нмоль/мл эндотоксина. Концентрации бактериального плазмалогена 18а и эндотоксина в крови обладают одинаковой прогностической точностью, на что указывает равенство значений AUC.

Для оценки прогностических характеристик решающих правил определим их прогностическую точность, специфичность и чувствительность для пациентов исследуемых групп. Результаты представлены в табл. 3.

В табл. 3 показано, что концентрация плазмалогена 18а в крови 20,66 мкг/мл может с 68,45% точностью прогнозировать СД 2 типа. Для концентрации эндотоксина 0,48 нмоль/мл прогностическая точность ниже и составляет 65,48%. Два исследуемых параметра обладают более высокой чувствительностью, чем специфичностью.

Обсуждение. Методом ГХ-МС крови концентрацию плазмалогена 18а (мкг/мл) определяют по концентрации октадеценowego альдегида (18:1а), который входит в состав клеточной стенки микроорганизмов, представителей индигенной нормобиоты, родов *Bifidobacterium spp.* и *Eubacterium spp.* [49, 50]. Повышенная концентрация октадеценowego альдегида может указывать на высокую интенсивность обсеменённости кишечника микроорганизмами родов *Bifidobacterium spp.* и *Eubacterium spp.*, что является показателем присутствия представителей нормобиоценоза в физиологически достаточном количестве.

В толстокишечном микробиоценозе пациентов в возрасте 18-22 года с предрасположенностью к СД 2 обнаружено увеличение на несколько порядков количества лактозонегативных *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.* и *Candida albicans* на фоне снижения уровня представителей нормобиоценоза – *Lactobacillus spp.*, по сравнению с толстокишечным микробиоценозом лиц без предрасположенности к СД 2, количество *Bifidobacterium spp.* практически одинаково в обеих группах [57], что подтверждается увеличением количества плазмалогена 18а в нашем исследовании, который входит в состав клеток некоторых представителей рода *Bifidobacterium spp.*, что может указывать на наличие повышенной кишечной проницаемости.

Плазмалогены представляют собой глицерофосфолипиды с алкенильной связью в положении sn-1 глицериновой основной цепи [51]. Алифатические фрагменты в положении sn-1 в основном представляют собой C_{16:0}, C_{18:0} или C_{18:1} жирные кислоты. В положении sn-2 в основном расположены полиненасыщенные жирные кислоты, такие как арахидоновая кислота (C_{20:4}) или докозагексаеновая кислота (C_{22:6}) [52]. Плазмалогены об-

наруживаются почти во всех тканях млекопитающих и составляют около 20% от общего количества фосфолипидов [51]. Наличие плазмалогенов в клетках грибов и растений не установлено [55]. Плазмалогены встречаются у ряда бактерий кишечного биоценоза. Плазмалогены обнаружены у некоторых видов *Clostridium spp.*, штаммов *Bifidobacterium longum* [53, 54, 56].

Плазмалогены важны для управления выбросом холестерина из клеток, поскольку они являются протектором окисления полиненасыщенных жиров, и поддержания нормальной нервной деятельности. Плазмалогены стимулируют нервные клетки и осуществляют межклеточные функции. Увеличение концентрации плазмалогена 18а является положительным фактором и отражает количество представителей нормобиоценоза. Симбионтная микробиота является резервуаром плазмалогенов, которые входят в состав мембран анаэробных бактерий. Увеличение концентрации плазмалогена 18а в крови лиц с патологией СД 2 может указывать на увеличение проницаемости кишечной стенки.

Для определения концентрации эндотоксина в крови методом ГХ-МС суммируют концентрации компонентов липида А – гидроксикислот: 3h12, 2h12, hi13, 3h13, 3h14, 2h14, 2hi15, 3hi15, h16, 3hi17, h18, h15, ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий: *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides hypermegas*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori* [49, 50]. Увеличение концентрации бактериального эндотоксина в крови свидетельствует об увеличении количества условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов в микробиоценозе лиц с патологией СД 2 по сравнению с микробиоценозом лиц без СД 2. Умеренная активация клеток при низких дозах эндотоксина с увеличением дозы переходит в гиперактивацию, которая сопровождается усиленной продукцией воспалительных цитокинов, активацией системы комплемента и факторов свертывания крови, что способствует развитию системного воспаления.

Заключение. Микробиота кишечника принимает участие в патогенезе СД 2 типа. Более высокие значения концентрации фосфолипида-плазмалогена 18а и ЛПС при СД 2 типа указывают на то, что при СД 2 типа в микробиоценозе преобладают представители нормобиоценоза и условно-патогенные микроорганизмы, продуцирующие эндотоксин. Более высокие концентрации плазмалогена 18а и эндотоксина в системном кровотоке указывают на увеличение кишечной проницаемости для грамотрицательных микроорганизмов, нарушение функции колонизационной резистентности и выраженный дисбиоз у пациентов основной группы. Для оценки состояния микробиоценоза и прогнозирования СД 2 типа определены решающие правила, в виде пороговых значений концентраций плазмалогена 18а и эндотоксина в крови пожилых лиц с предполагаемым или установленным диагнозом СД 2 типа. С помощью ROC-анализа выявлено, что значения выше 20,66 мкг/мл для плазмалогена 18а и 0,48 нмоль/мл – для эндотоксина, определяют наличие патологии СД 2 типа, при сопутствующих клинико-anamnestических данных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-18, 20, 23, 25-45, 49-56
см. REFERENCES)

19. Безродный С.Л., Шендеров Б.А. Кишечная микробиота как источник новых биомаркеров старения. *Вестник восстановительной медицины*. 2015; 2: 40-7.
21. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации. *Журнал микробиологии*. 2010; 1: 92-100.
22. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Роль эндотоксина кишечной микрофлоры в физиологии и патологии человека. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*, 2012; 3: 2-7.
24. Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин и воспаление. *Национальное руководство по дерматовенерологии*. М.: ГЭОТАР-медиа; 2011; 8: 99-414.
46. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. Патент РФ № 2086642; 1997.
47. Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Новикова В.П. и др. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Учебно-методическое пособие. СПб: Изд-во «Левша». 2013; 60(2): 54-95.
48. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. *Химический анализ в медицинской диагностике*. М.: Наука; 2010: 293-368.
57. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Мурашова Л.А., Чаркова А.Р., Миронов А.Ю. Влияние уровня глюкозы в крови на микробиоценоз кишечника и качество жизни людей с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (12): 857-60.
12. Lederberg J., McCray A. 'Ome sweet 'omics – A genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001; 15: 8.
13. Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012 Aug; 70 Suppl 1: S38-44.
14. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J., Darzi Y., Faust K. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016 Apr 29; 352 (6285): 560-4.
15. De Vos W.M., de Vos E.A. Role of the intestinal microbiome in health and disease: From correlation to causation. *Nutr. Rev*. 2012; 70 (Suppl. 1): S45-56.
16. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10; 308(5728): 1635-8.
17. Mahowald M.A., Rey F.E., Seedorf H., Turnbaugh P.J., Fulton R.S. et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 2009 Apr 7; 106(14): 5859-64.
18. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13; 486(7402): 207-14.
19. Bezrodny S.L., Shenderov B.A. Intestinal microbiota as a source of new biomarkers of aging. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2015; 2: 40-7. (in Russian)
20. Tran L., Greenwood-Van Meerveld B. Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci* (2013) 68: 1045-56.
21. Bondarenko V.M., Ryabichenko E.V. The role of intestinal barrier dysfunction in maintaining a chronic inflammatory process of various localization. *Zhurnal mikrobiologii*. 2010; 1: 92-100. (in Russian)
22. Bondarenko V.M., Likhoded V.G. The role of intestinal microflora endotoxin in human physiology and pathology. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronnyi zhurnal)* 2012; 3: 2-7. (in Russian)
23. Hayes C.L., Dong J., Galipeau H.J., Jury J., McCarville J., Huang X. et al. Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep*. 2018 Sep 21; 8(1): 14184.
24. Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin and inflammation. National Dermatovenerology Manual [Natsional'noe rukovodstvo po dermatovenerologii]. Moscow: GEOTAR-Media; 2011; 8: 99-414. (in Russian)
25. Whitfield C., Trent M.S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem*. 2014; 83(0): 99-128.
26. Mahla R.S., Reddy M.C., Prasad D.V., Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol*. 2013 Sep 2; 4: 248.
27. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier Philadelphia, PA, USA*: 2014; 64(3): 487-505.
28. Akira S. & Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2004; 4: 499-511.
29. Rakoff-Wahoum S., Paglino J., Esmali-Varzaeh F. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004; 118 (2): 229-41.
30. Abreu M.T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol*. 2010 Feb; 10(2): 131-44.
31. Park B.S., Lee J.O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med*. 2013 Dec 6; 45: e66.
32. Sousa-Valente J., Brain S.D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. *Semin. Immunopathol*. 2018; 40: 229-36.
33. Alonso-Carbajo L., Kecskes M., Jacobs G., Pironet A., Syam N., Talavera K., Vennekens R. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2017; 66: 48-61.
34. Laing R.J., Dhaka A. ThermoTRPs and pain. *The Neuroscientist*. 2016; 22: 171-87.
35. Mulier M., Vriens J., Voets T. TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium*. 2017; 66: 19-24.

REFERENCES

1. Haltbakk J., Graue M., Harris J., Kirkevold M., Dunning T., Sigurdardottir A.K. Integrative review: Patient safety among older people with diabetes in home care services. *J. Adv. Nurs*. 2019 Mar 5; 44(3): 11-9.
2. Fazeli Farsani S., van der Aa M.P., van der Vorst M.M., Knibbe C.A., de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *A. Diabetologia*. 2013 Jul; 56 (7): 1471-88.
3. Medina Escobar P, Moser M, Risch L, Risch M, Nydegger UE, Stanga Z. Impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in apparently healthy senior citizens. *Swiss Med. Wkly*. 2015 Nov 23; 145: w14209.
4. National Diabetes Statistics Report, 2014-CDC www.cdc.gov/diabetes/pubs/statsreport14/national-diabetes-report-web.pdf
5. Sekirov I, Russell S.L., Antunes L.C., Finlay B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul; 90 (3): 859-904.
6. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Doudinskaya E.N., Strazhesko I.D., Kotovskaya Y.V., Popenko A.S. et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018 Sep 25; 6(4): 3-4.
7. Lippert K., Kedenko L., Antonielli L., Kedenko I., Gemeier C., Leitner M. et al. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef. Microbes*. 2017 Aug 24; 8(4): 545-56.
8. Navab-Moghadam F, Sedighi M, Khamseh ME, Alaei-Shahmiri F, Talebi M, Razavi S et al. The association of type II diabetes with gut microbiota composition. *Microb Pathog*. 2017 Sep; 110: 630-6.
9. Salamon D., Sroka-Oleksiak A., Kapusta P., Szopa M., Mrozińska S., Ludwig-Słomczyńska A.H. et al. Characteristics of gut microbiota in adult patients with type 1 and type 2 diabetes based on next-generation sequencing of the 16S rRNA gene fragment. *Pol. Arch. Intern. Med*. 2018 Jun 30; 128(6): 336-43.
10. Karlsson F.H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergström G., Behre C.J., Fagerberg B. et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6; 498(7452): 99-103.
11. Medlock G.L., Carey M.A., McDuffie D.G., Mundy M.B., Giallourou N., Swann J.R. et al. Inferring Metabolic Mechanisms of Interaction

MICROBIOLOGY

36. Meseguer V., Alpizar Y.A., Luis E. Tajada S., Denlinger B., Fajardo O. et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3125.
37. Boonen B., Alpizar Y.A., Sanchez A., Lopez-Requena A., Voets T., Talavera K. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium.* 2018; 73: 72-81.
38. Schappe M.S., Sztejn K., Stremaska M.E., Mendu S.K., Downs T.K., Seegren P.V. et al. Chanzyme TRPM7 mediates the Ca²⁺ influx essential for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 endocytosis and macrophage activation. *Immunity.* 2018; 48: 59-74.
39. Tauseef M., Knezevic N., Chava K.R., Smith M., Sukriti S., Gianaris N. et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J. Exp. Med.* 2012; 209: 1953-68.
40. Andonegui G., Goyert S.M., Kubes P. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: A role for CD14 versus Toll-like receptor 4 within microvessels. *J. Immunol.* 2002; 169: 2111-9.
41. Sands W.A., Clark J.S., Liew F.Y. The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN-gamma and LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 199: 461-6.
42. Zhang L., Li H.Y., Li H., Zhao J., Su L., Zhang Y., Zhang S.L., Miao J.Y. Lipopolysaccharide activated phosphatidylcholine-specific phospholipase c and induced IL-8 and MCP-1 production in vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 2011; 226: 1694-701.
43. Mehta D., Malik A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 2006; 86: 279-367.
44. Kini V., Chavez A., Mehta D. A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca²⁺ entry, endothelial permeability, and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:33082-91.
45. Weissmann N., Sydykov A., Kalwa H., Storch U., Fuchs B., Mederos y Schnitzler M et al. Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nat. Commun.* 2012; 3: 649.
46. Osipov G.A. The method for determining the generic (species) composition of the association of microorganisms. [Sposob opredeleniya rodovogo vidovogo sostava assotsiatsii mikroorganizmov]. Patent RF № 2086642; 1997. (in Russian)
47. Osipov G.A., Boyko N.B., Novikova V.P. et al. Mass spectrometry techniques for microbial markers as a way to evaluate a parietal intestinal microbiota in diseases of the digestive organs [Metodika mass-spektrometrii mikrobn'ykh markerov kak sposob otsenki pristenochnoy kishhechnoy mikrobioty' pri zabolevaniyakh organov pishchevareniya]. Uchebnoe posobie. St. Petersburg: "Levsha"; 2013; 60 (2): 54-95. (in Russian)
48. Osipov G.A. Chromato-mass spectrometric analysis of microorganisms and their communities in clinical samples with infections and dysbiosis. Chemical analysis in medical diagnostics [Khimicheskiy analiz v meditsinskoj diagnostike]. Moscow: Nauka; 2010; 293-368. (in Russian)
49. Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 1992; 72: 315-21.
50. Moss C.W., Dees S.R. Identification of microorganisms by gas chromatographic – mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatogr.* 1985; 12: 595-604.
51. Nagan N., Zoeller R.A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* 2001; 40: 199-229.
52. Braverman N.E., Moser A.B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1822: 1442-52.
53. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature.* 2013; 500: 232-6.
54. Ventura M., Turroni F., Lugli G.A., van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94: 163-8.
55. Goldfine H. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Prog. Lipid Res.* 2010; 49: 493-8.
56. Řezanka T., Křesinová Z., Kolouchová I., Sigler K. Lipidomic analysis of bacterial plasmalogens. *Folia Microbiol.* 2012; 57: 463-72.
57. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Belyaeva E.A., Murashova L.A., Charkova A.R., Mironov A.Yu. The effect of glucose level in blood on microbiocenosis of intestine and quality of life of people with predisposition to diabetes mellitus type II. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2016; 61 (12): 857- 60. (in Russian)

Поступила 31.05.21
Принята к печати 30.06.21

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Васильев Е.В.³, Михалёв М.А.⁴, Бахтина В.И.^{3,5}, Ольховик Т.И.⁴, Мочалова Е.Е.⁵, Орлова К.Э.⁵, Ольховский И.А.^{1,2}

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАБОРА «BCR/ABL – МУЛЬТИТЕСТ» В АЛГОРИТМЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

¹Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

²ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

³КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, Красноярск, Россия;

⁴КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница №7, 660003, Красноярск, Россия;

⁵ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия

Аномальные мРНК гибридного гена BCR/ABL в подавляющем числе случаев в зависимости от точки слияния генов иницируют синтез протеинов с массой 210 кДа (p210), 190 кДа (p190) и 230 кДа (p230). Экспрессия варианта p210 наиболее часто встречается при ХМЛ (95% случаев), в то время как варианты p190 и p230 при этом заболевании встречаются гораздо реже (1–4%). Напротив, при ОЛЛ преобладает транскрипт p190 – до 80% всех BCR/ABL позитивных ОЛЛ. Определение экспрессии гена BCR/ABL регламентируется клиническими рекомендациями по диагностике ХМЛ и ОЛЛ как последовательные тесты в соответствии с частотой их встречаемости. Вместе с тем, в условиях первичного тестирования пациентов с подозрением на онкогематологические заболевания при низкой распространенности в когорте обследуемых лиц BCR/ABL позитивных пациентов последовательное тестирование сопряжено с низкой экономической эффективностью.

Цель: апробация параллельного алгоритма одновременного выявления основных вариантов химерных транскриптов BCR/ABL (p210, p190 и p230) с использованием мультиплексного формата ОТ-ПЦР, реализованного в наборе «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». В работе использовались обезличенные пробы крови пациентов, направленных в лабораторию с подозрением на наличие ХМЛ, а также пробы пациентов с ОЛЛ. Тестирование проб крови проводили с использованием двух вариантов алгоритма: последовательного определения отдельных транскриптов BCR/ABL и параллельного выявления всех трех вариантов транскриптов с помощью разработанного набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». Для детекции транскрипта p210, использовали коммерческий набор «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Одновременно применяли тест выявления всех трех вариантов транскриптов BCR/ABL с использованием набора реактивов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», основанного на монохромной мультиплексной реакции «в одной пробирке». Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора реактивов «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Показано, что при использовании наборов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» наблюдается высокий уровень корреляции количественных результатов определения химерного транскрипта BCR/ABL p210 ($r = 0,99$). При использовании предлагаемого параллельного алгоритма с первичным использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» из 95 пациентов с подозрением ХМЛ было выявлено 9 проб с транскриптом p210, один с p190 BCR/ABL и также в одном случае был обнаружен вариант транскрипта, характерный для хронического нейтрофильного лейкоза – p230 BCR/ABL. Расчетная стоимость выявления одного позитивного случая BCR/ABL при использовании параллельного алгоритма диагностики с набором «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» при сложившемся потоке исследований сокращается примерно в 2 раза за счет уменьшения количества используемого лабораторного пластика и объема реакционной смеси, а также отсутствия необходимости повторных отдельных тестов для выявления p190 и p230.

Использование мультиплексной тест-системы ПЦР-РВ «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», позволяет выявлять «в одной пробирке» все три основных варианта транскриптов BCR/ABL – p210, p190, p230 и достигать существенной экономии ресурсов при обследовании когорты пациентов с подозрением на ХМЛ и ОЛЛ и низкой встречаемостью позитивных образцов

Ключевые слова: ПЦР-РВ; BCR/ABL; ХМЛ; ОЛЛ

Для цитирования: Горбенко А.С., Столяр М.А., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Бахтина В.И., Ольховик Т.И., Мочалова Е.Е., Орлова К.Э., Ольховский И.А. Использование набора «BCR/ABL – мультитест» в алгоритме лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний: экономические аспекты. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(9): 571-576. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576>

Для корреспонденции: Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, дир. Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Gorbenko A.S.^{1,2}, Stolyar M.A.^{1,2}, Vasiliev E.V.³, Mikhalev M.A.⁴, Bakhtina V.I.^{3,5}, Olkhovik T.I.⁴, Mochalova E.E.⁵, Orlova K.E.⁵, Olkhovskiy I.A.^{1,2}

USE OF THE «BCR/ABL – MULTITEST» KIT IN THE ALGORITHM OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES: ECONOMIC ASPECTS

¹Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Krasnoyarsk city clinical Hospital №7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abnormal mRNAs of the hybrid BCR-ABL gene in the majority of cases initiate the synthesis of proteins with a mass of 210 kDa (p210), 190 kDa (p190), and 230 kDa (p230). Expression of the p210 variant is most common in CML (95% of cases), while the p190 and p230 variants are less common (1-4%). On the contrary, p190 predominates in ALL. Measurement of BCR/ABL gene expression is included in clinical guidelines for the diagnosis of CML and ALL as sequential tests in accordance with their occurrence. At the same time, in the context of primary patients testing with suspected hematological malignancies with a low prevalence of BCR-ABL positive patients in the cohort of examined individuals, sequential testing is associated with low cost-effectiveness.

Purpose: approbation of a parallel algorithm for detecting all three (p210, p190 and p230) using the multiplex RT-PCR format implemented in the «BCR/ABL-MULTITEST» reagent kit.

We used anonymized blood samples from patients with suspected CML, as well as samples from ALL patients before starting therapy. Testing of blood samples was carried out using two variants of the algorithm: sequential determination of individual BCR-ABL transcripts and parallel determination using the developed set of reagents «BCR/ABL-MULTITEST». To detect the p210 transcript, a commercial kit «AmpliSens® Leukemia Quantum M-bcr-FRT» (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) was used. Simultaneously, a test was used to detect all three variants of BCR-ABL transcripts using the «BCR/ABL – MULTITEST» reagent kit based on a monochrome multiplex reaction «in one test tube». Reverse transcription were carried out using the REVERTA-L reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) in accordance with the manufacturer's instructions.

Using the reagent kits «BCR/ABL-MULTITEST» and «AmpliSens® Leukemia Quantum M-bcr-FRT» there is a high level of correlation of quantitative results of determining the chimeric transcript BCR-ABL p210 ($r = 0.99$). When using the proposed parallel algorithm with the primary use of the «BCR/ABL-MULTITEST» reagent kit, out of 95 patients with suspected CML, 9 samples with p210 transcript were identified, one with p190 BCR / ABL, and in one case a transcript variant characteristic of chronic neutrophilic leukemia – p230 BCR / ABL.

The estimated cost for detecting one positive case of BCR-ABL when using the parallel diagnostic algorithm «BCR/ABL-MULTITEST» with a focused flow of studies is reduced by about 2 times due to a decrease in the amount of laboratory plastic used and the volume of the reaction mixture, as well as the absence of the need for repeated separate tests to detect p190 and p230.

The use of the multiplex PCR-RT test system «BCR/ABL-MULTITEST» allows detecting in one test tube all three main variants of BCR-ABL transcripts – p210, p190, p230 and achieving significant resource savings when examining a cohort of patients with suspected CML and ALL and low frequency of positive samples.

Key words: JAK2 mRNA; CLL; CML; multiple myeloma

For citation: Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A., Bakhtina V.I., Olkhovik T.I., Mochalova E.E., Orlova K.E., Olkhovskiy I.A. Use of the «BCR/ABL – multitest» kit in the algorithm of laboratory diagnostics of oncohematological diseases: economic aspects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 571-576 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576>

For correspondence: Olkhovskiy I.A., PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Information about authors:

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>
Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>
Mikhalev M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>
Olkhovik T.I., <https://orcid.org/0000-0002-4526-1920>
Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>
Mochalova E.E., <https://orcid.org/0000-0001-8439-2854>
Orlova K.E., <https://orcid.org/0000-0002-5190-9316>
Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>

Acknowledgment. *This study was carried out within the framework of the state order «Development of diagnostic reagent kits for molecular genetic detection of oncogenic transcripts for the purpose of early diagnosis and monitoring of minimal residual disease in acute leukemia No. RK AAAA-A20-120021890163-5».*

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

Received 07.04.2021
Accepted 25.06.2021

Введение. Филадельфийская хромосома (Ph-хромосома) образуется в результате транслокации t(9;22)(q34;q11), при которой части двух хромосом (9-й и 22-й) меняются местами. В результате часть гена BCR из хромосомы 22 сливается с геном ABL на хромосоме 9. На матрице образовавшегося гибридного гена BCR-ABL в зависимости от локализации точки разрыва хромосом могут формироваться свыше 16 разных вариантов химерных РНК транскриптов BCR-ABL. В подавляющем большинстве случаев образуются транскрипты e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2), реже e1a2, e13a3 и e19/a2. Аномальные мРНК гибридного гена инициируют синтез соответствующих белков с массой 210 кДа (p210), 190 кДа (p190) и 230 кДа (p230). Белковые продукты гена BCR /ABL обладают аномальной тирозинкиназной активностью, неадекватно влияющей на пролиферацию, дифференцировку, активацию, адгезию и апоптоз клеток. Именно избыточная активность химерной BCR-ABL-тирозинкиназы определяет развитие хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и также вовлечена в патогенез отдельных вариантов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Транскрипты BCR /ABL выявляются также при остром миелоидном лейкозе и остром лейкозе смешанного фенотипа [1–3]. Следует отметить, что BCR-ABL – ключевой диагностический маркер всех случаев ХМЛ. BCR-ABL-положительный вариант ОЛЛ выявляется у детей не чаще 5-7 %, но его частота в дебюте заболевания возрастает до 40 % к сократительному возрасту пациентов, а затем увеличивается на 10% в течение каждого последующего десятилетия жизни. При ОЛЛ с Ph-хромосомой примерно в одной четверти случаев экспрессируется p210 и примерно три четверти случаев характеризуются экспрессией p190 [4]. Протеин p230, образующийся на матрице транскрипта e19/a2, проявляет более низкую внутреннюю тирозинкиназную активность, чем p210 и p190 и связан с вялотекущим миелопролиферативным заболеванием, называемым хроническим нейтрофильным лейкозом [4] и лишь однажды был описан при ОЛЛ [5].

На молекулярно-генетическом уровне транскрипт BCR-ABL чаще всего выявляется посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и выполнение данного исследования регламентируется клиническими рекомендациями при первичной диагностике ХМЛ, а в количественном формате для мониторинга эффективности терапии ХМЛ и BCR-ABL (оценка молекулярного ответа). Отрицательный результат теста на BCR-ABL учитывается также при диагностике Ph-негативных миелопролиферативных неоплазий (МПН) – эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе [6].

Следует отметить, что для первичного выявления ХМЛ клиническими рекомендациями [3] предлагается последовательный алгоритм выявления отдельных транскриптов BCR-ABL: вначале определение экспрессии химерного транскрипта BCR-ABL p210, а при его отсутствии показано определение более редких транскриптов BCR-ABL (p190, p230). Учитывая поток направляемых в нашу лабораторию проб крови первичных пациентов и невысокую долю (менее 10-15%) среди них положительных результатов тестирования на BCR-ABL, нами предлагается параллельный алгоритм тестирования одновременно на все основные варианты BCR/AL, так как необходимость последовательной постановки тестов на p190 и p230 при отрицательном тесте на p210 существенно снижает экономическую эффективность

работы лаборатории и увеличивает время постановки окончательного диагноза.

Целью настоящей работы явилось апробация параллельного алгоритма выявления трех вариантов (p210, p190 и p230) BCR-ABL с использованием мультиплексного формата ОТ-ПЦР, реализованного в наборе «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ».

Материал и методы. Дизайн настоящего исследования заключался в сравнительном использовании двух вариантов алгоритма тестирования образцов венозной крови: последовательного определения отдельных транскриптов BCR-ABL и параллельного с помощью разработанного набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». В работе использовались обезличенные пробы крови пациентов с подозрением на наличие ХМЛ, а также пробы пациентов с ОЛЛ, поступившие в лабораторию с 01.01 по 31.03 2021 г.

Выявление вариантов слияния химерного гена BCR-ABL проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для выделения РНК, выполнения обратной транскрипции и детекции транскрипта p210, использовали коммерческий набор «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Транскрипты p190 и p230 определяли в пробах кДНК с отрицательным результатом на p210 также методом ПЦР-РВ в соответствии с описанными методиками [7] и [8].

Одновременно с традиционным последовательным алгоритмом применяли тест выявления всех трех вариантов BCR-ABL с использованием набора реактивов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», основанного на монокромной мультиплексной реакции «в одной пробирке». В этом случае выделение РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции, обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

В соответствии с разработанной нами методикой, при использовании набора реагентов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 100 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 0,5 М КСl; 0,8% Nonidet P-40; 2 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого из дНТФ; 10 мкл кДНК; по 0,3 мкМ каждого праймера и TaqMan зонда; 1 единицу активности SynTaq ДНК-полимеразы (ООО «НПО Синтол», Россия). Использовали следующую программу амплификации: предварительный прогрев при 95°C — 5 мин, далее 50 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 60 с, детекция флуоресцентного сигнала проводилась по каналу FAM в ходе ПЦР-РВ. Для нормализации получаемых данных в качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген ABL1.

В наборе использовали следующие праймеры и олигонуклеотидные зонды:

ENF501: TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
ENR561: CACTCAGACCCTGAGGCTCAA
ENF402: CTGGCCCAACGATGGCGA
E19: TGGAGGAGGTGGGCATGAC
ENP541: FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-BHQ1.

При оценке экономического эффекта ориентировались на стоимость реактивов коммерческих наборов (<https://www.helicon.ru/catalog/>; <https://genetechnology.ru>) в расчете на одно исследование в качественном формате реакции. Стоимость затрат на реактивы при альтер-

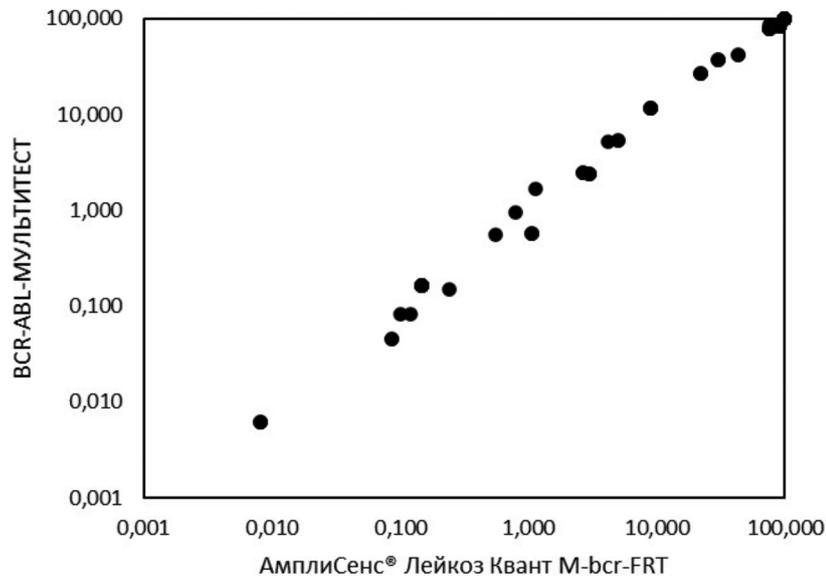


Рис. 1. Корреляция результатов тестирования образцов крови пациентов с подозрением на ХМЛ при использовании набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и коммерческого набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT».

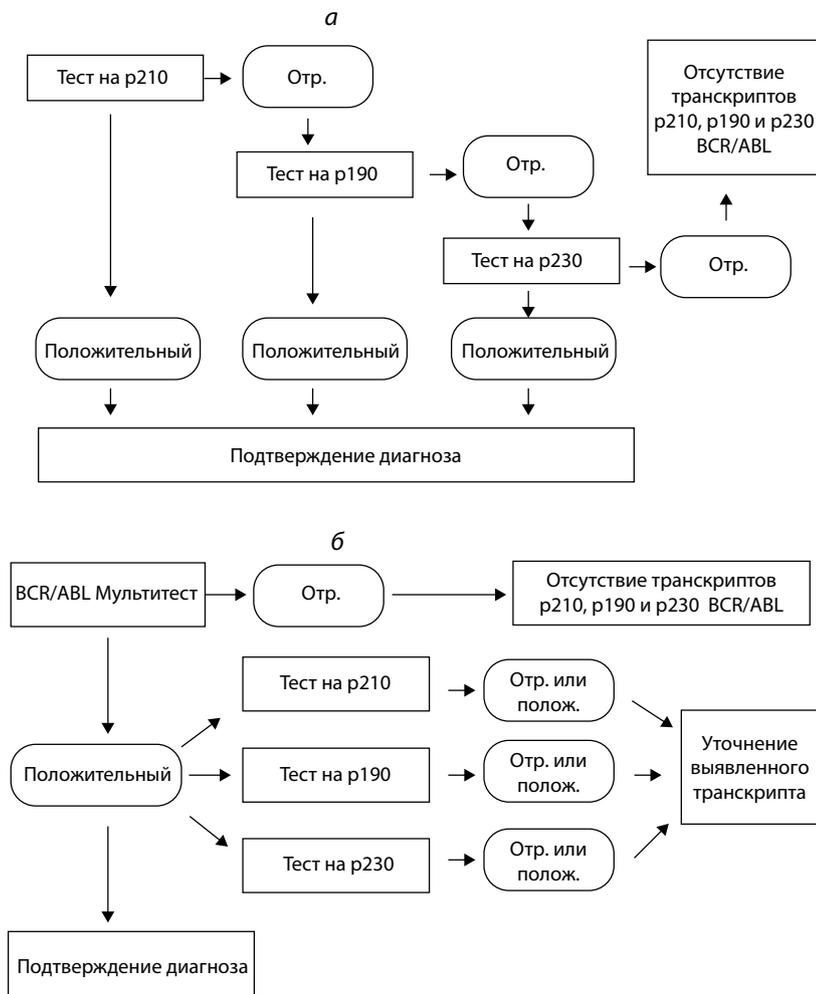


Рис. 2. Последовательный алгоритм выявления транскриптов BCR-ABL (а) и алгоритм с первичным использованием мультиплексного теста (б).

нативном алгоритме определялась исходя из стоимости коммерческих наборов на выделение РНК и обратную транскрипцию, а также реактивов, входящих в состав набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ».

Результаты. На рис. 1 представлен график корреляции результатов количественного определения уровня BCR-ABL p210 при параллельном тестировании образцов крови пациентов с подозрением на ХМЛ с использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и коммерческого набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). В 86 пробах крови BCR-ABL p210 не выявлялись обоими тест-системами. Высокий уровень корреляции позитивных значений BCR-ABL p210 в диапазоне от 0,008 до 100% у 27 пациентов с ХМЛ ($r=0,998$) демонстрирует полное совпадение полученных результатов при использовании данных наборов при выявлении транскрипта p210.

При выполнении параллельного анализа поступающих в лабораторию проб пациентов с подозрением на ХМЛ и использованием сравнимых алгоритмов (рис. 2, а, б) различий в выявляемости отдельных транскриптов также не наблюдалось. Среди 95 проб было выявлено 9 случаев с позитивной реакцией на BCR-ABL (p210), в одной пробе определено присутствие изолированного варианта p190 BCR-ABL и в еще одном случае был обнаружен вариант транскрипта, характерный для хронического нейтрофильного лейкоза – p230 BCR-ABL. У трех пациентов, в последующем был выявлен генетический маркер Ph-негативной миелопролиферации – JAK2 V617F. При тестировании 8 взрослых пациентов с острым лейкозом с использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» также как и в альтернативном варианте тестирования на трех отдельных наборах было выявлено всего 2 случая BCR-ABL позитивного ОЛЛ (p190) (табл.1).

В табл. 2 представлены результаты оценки расчетной экономической эффективности внедрения алгоритма с первичным использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» при тестировании в сложившемся в нашей лаборатории потоке проб крови пациентов, направляемых врачами гематологами в связи с подозрением на ХМЛ. Расчетная стоимость выявления одного позитивного случая BCR-ABL при использовании предлагаемого алгоритма диагностики в нашей лаборатории сокращается в примерно в 2 раза – с 7,0 до 3,6 тыс. руб.

Обсуждение. За более чем 30-летнюю историю тестирования пациентов на BCR-ABL разработано множество методов обнаружения и количественной оценки уровней транскриптов BCR-ABL: от оценки кривых плавления до секвенирования нового поколения [1]. Вместе с тем, с целью практического использования наиболее приемлемы

Таблица 1

Частота выявления отдельных транскриптов BCR-ABL в пробах крови при проведении сравнительного исследования эффективности двух алгоритмов.

Всего поступило первичных проб для подтверждения диагноза	Всего	Из них положительные		
		p210	p190	p230
ХМЛ	95	9	1	1
ОЛЛ (взрослые)	8	0	2	0

тесты, характеризующиеся надежностью, простотой выполнения, максимальной экономичностью и минимизацией трудозатрат. Следует также признать, что необходимость противодействия пандемии коронавирусной инфекции вызвала взрывное развитие лабораторий, использующих методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), существенно обновился соответствующий парк оборудования, что определяет целесообразность использования накопленной мощности ПЦР-лабораторий и для диагностики онкологических заболеваний.

В настоящее время в Российской Федерации регистрационные удостоверения Росздравнадзора изделий медицинского назначения имеют лишь единичные наборы для выявления только самого распространённого транскрипта p210 BCR-ABL, которые можно использовать в форматах как качественной, так и количественной оценки результатов. Вместе с тем, включение в диагностические критерии утвержденных клинических рекомендаций результатов выявления всех трех транскриптов BCR-ABL актуализирует необходимость разработки соответствующих стандартизованных коммерческих наборов.

Описано достаточно много вариантов тестов на основе ОТ-ПЦР для одновременного выявления трех самых распространенных химерных транскриптов BCR-ABL. Хотя эти мультиплексные тесты не являются строго соответствующими требованиям к количественным результатам идентификации каждого из транскриптов, преимущество их использования неоспоримо при обследовании когорт пациентов с низкой вероятностью наличия BCR-ABL, например при первичном скрининге пациентов с подозрением на ХМЛ.

Известна методика мультиплексного анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения BCR-ABL, которая допускает количественную оценку конкретного химерного транскрипта, включает использование праймера к ABL, меченного на 5'-конце флуоресцентным красителем NED (Applied Biosystems) [9] Метка NED, не

мешая сигналу флуоресцентного зонда TaqMan, позволяет впоследствии идентифицировать химерный транскрипт с помощью дополнительного выполнения капиллярного электрофореза высокого разрешения. Однако её использование не получило широкого распространения ввиду необходимости дополнительного дорогостоящего зонда и трудоемкого этапа капиллярного электрофореза.

Алгоритм, предложенный О.В. Никулиной и соавт. [10], основанный на выполнении двух последовательных реакций «гнездовой» ПЦР, позволяет идентифицировать наряду с основными вариантами при последующем секвенировании также и более редкие варианты транскриптов BCR-ABL, выявляемые менее чем у 1,0% всех обследованных пациентов с ХМЛ. Вместе с тем, его использование может быть эффективно с экономической точки зрения при тестировании когорты пациентов с очень высокой вероятностью наличия ХМЛ, как правило с выраженными клиническими и гематологическими проявлениями заболевания.

Наиболее простой и доступной по стоимости мультиплексной технологией выявления химерных транскриптов могла бы быть признана методика, основанная на оценке значения температур плавления полученных продуктов реакции ПЦР в присутствии флуоресцентного красителя SYBR Green I [5]. Однако описанная авторами методика позволяет выявлять только два варианта BCR-ABL – p210 и p190 и часто нуждается в последующей верификации ОТ-ПЦР.

Недавно описанный [11] мультиплексный метод ОТ-ПЦР с использованием пяти праймеров и одного зонда для количественной оценки BCR-ABL позволяет одновременно выявлять до 14 различных вариантов слияния, включая редкие подтипы. В комбинации с последующим капиллярным электрофорезом, методика также позволяет идентифицировать конкретные подтипы генов слияния BCR-ABL.

В отличие от описанных выше технологий, в своем наборе для классической ПЦР в реальном времени мы используем смесь одного специфического зонда и праймеров, что позволяет в одной пробирке детектировать нарабатываемые ампликоны любого из этих транскриптов. Кроме того, при разработке дизайна специфических праймеров мы учли также вероятность присутствия последовательностей генетических полиморфизмов, влияющих на специфичность получаемых результатов [12].

Предлагаемый алгоритм позволяет надеяться на выявление не менее 97% всех случаев присутствия в пробах крови пациентов основных вариантов BCR-ABL и является наиболее оптимальным с точки зрения соот-

Таблица 2

Сравнительная экономическая эффективность последовательного и параллельного алгоритмов выявления BCR-ABL при диагностике ХМЛ в условиях сформированного в лаборатории потока проб и контингента пациентов

Варианты алгоритма молекулярного скрининга при подозрении на ХМЛ	Выполнено тестов с учетом позитивности (9,5% p210, 1,1% p190 и 1,1% p230)			Всего тестов	Всего затрат (тыс. руб.) реактивы (услуги)	Стоимость (тыс. руб.) выявления одного случая реактивы (услуги)
	p210	p190	p230			
Стандартный последовательный алгоритм	1000	905	895	2800	820,0 (8120)	7,0 (69,4)
С использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ»		1000		1000	420,0 (3100)	3,6 (26,5)

Примечание. При расчете стоимости затрат при использовании коммерческих реактивов и услуг в стандартном алгоритме использовали данные преискуранта ООО «Генотехнология»: <https://genetechnology.ru/?q=ru/node/99> и <https://genetechnology.ru/?q=ru/node/28>.

ношения экономической и диагностической эффективности первичного тестирования пациентов с подозрением на онкогематологические заболевания. Наличие выраженных клинических и гематологических проявлений позволяющих подозревать ХМЛ, несмотря на отрицательный результат тестирования предлагаемым нами набором, будет являться показанием для более эффективного использования дорогостоящих методов при редких вариантах слияния генов BCR-ABL.

В настоящей работе показана высокая корреляция количественных результатов тестирования при использовании наборов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и «Ампли-Сенс® Лейкоз Квант М-bcг-FRT», что может свидетельствовать о перспективной возможности использования нашего набора и для количественной идентификации транскрипта p210.

Безусловно, конкретная экономическая эффективность использования разных диагностических алгоритмов зависит от многих факторов кроме непосредственной стоимости реактивов: распространенность заболевания среди направляемых на обследование пациентов, сложившийся объем исследований, организация внутрилабораторной логистики и т.д. Включение набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» в диагностический алгоритм тестирования в нашей лаборатории при обследовании пациентов с подозрением на ХМЛ и острый лейкоз позволило достоверно выявлять более редкие транскрипты (p190 и p230) и существенно снизить стоимость выявления одного случая подтвержденного заболевания ХМЛ.

В связи с небольшой выборкой результатов тестирования пациентов с ОЛ провести корректные аналогичные финансовые расчеты не представляется возможным. Вместе с тем учитывая, что соотношение p190 и p210 транскриптов при Ph-позитивном ОЛЛ составляет примерно 75% и 25%, соответственно [4], а общая доля BCR-ABL-позитивных вариантов ОЛЛ у взрослых пациентов составляет менее 40%, использование мультиплексного теста перед выполнением количественных анализов на каждый из транскриптов также обуславливает более экономичный режим тестирования.

Организационные аспекты включения мультиплексных ПЦР-тестов в меню лабораторных исследований в дополнении стандартному гематологическому анализу уже на первичном этапе диагностики при подозрении на онкогематологические заболевания требуют дополнительного изучения.

Заключение. В результате проведенной работы нами был апробирован диагностический алгоритм с использованием тест-системы, позволяющей в формате мультиплексного ПЦР-РВ выявлять одновременно все три основных варианта транскриптов BCR-ABL – p210, p190 и p230. Предложен параллельный алгоритм лабораторного исследования, позволяющий снизить стоимость выявления одного позитивного случая BCR-ABL при тестировании проб крови пациентов с подозрением на миелопролиферативные заболевания и острый лейкоз.

Финансирование. Настоящее исследование проведено в рамках государственного заказа «Разработка диагностических наборов реагентов для молекулярно-генетического выявления онкогенных транскриптов с целью ранней диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах № РКАААА-А20-120021890163-5».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4 – 5, 7-12 см. REFERENCES)

2. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Гаврилина О.А., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых. (редакция 2018) [электронный документ]. Доступно по: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf Ссылка активна на 30.03.2021.
3. Туркина А.Г., Зарицкий А.Ю., Шуваев В.А., Челышева Е.Ю., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2017;10(3): 294–316. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2017-10-3-294-316>
6. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Шуваев В.А., Морозова Е.В., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (редакция 2020 г.). *Клиническая онкогематология*. 2021;14(2): 262–98.

REFERENCES

1. Kang Z.J., Liu Y.F., Xu L.Z., Long Z.J., Huang D., Yang Y. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin. J. Cancer*. 2016;35:48. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>
2. Savchenko V. G., Parovichnikova E. N., Afanasyev B. V., Troitskaya V. V., Gavrilina O. A., Sokolov A. N. et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemias in adults. [Internet] Available from: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf (accessed 30.03.2021) (In Russian)
3. Turkina A.G., Zaritskii A.Yu., Shuvaev V.A., Chelysheva E.Yu., Lomaia E.G., Morozova E.V. et al. Clinical Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2017;10(3):294–316. (in Russian)
4. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.
5. Gutiérrez M.I., Timson G., Siraj A.K., Bu R., Barbhaya S., Banavali S. et al. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification, and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. *J. Mol. Diagn.* 2005;7(1):40-7. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60007-4](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60007-4)
6. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Shuvaev V.A., Morozova E.V., Lomaia E.G. et al. National Clinical Guidelines on Diagnosis and Treatment of Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms (Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis) (Edition 2020). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2021;14(2):262–98. (in Russian)
7. Tsuchiya K., Tabo Y., Ai T., Ohkawa T., Usui K., Yuri M. et al. Eprobe mediated RT-qPCR for the detection of leukemia-associated fusion genes. *PLoS One*. 2018;13(10):e0202429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202429>
8. Jinawath N., Norris-Kirby A., Smith B.D., Gocke C.D., Batista D.A., Griffin C.A. et al. A rare e14a3 (b3a3) BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia: diagnostic challenges in clinical laboratory practice. *J. Mol. Diagn.* 2009;11(4):359-63. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.090008>
9. Luthra R., Sanchez-Vega B., Medeiros L.J. TaqMan RT-PCR assay coupled with capillary electrophoresis for quantification and identification of BCR-ABL transcript type. *Mod. Pathol.* 2004;17(1):96-103. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800026>
10. Никулина О.В., Цаур Г.А., Ригер Т.О., Яковлева Ю.А., Демина А.С., Семенихина Е.Р. и др. Тактика выявления частых и редких типов химерного транскрипта BCR-ABL при хроническом миелоидном лейкозе. *Клиническая онкогематология*. 2015;8(2):161–8.
11. Tong Y.Q., Zhao Z.J., Liu B., Bao A.Y., Zheng H.Y., Gu J. et al. New rapid method to detect BCR-ABL fusion genes with multiplex RT-qPCR in one-tube at a time. *Leuk. Res.* 2018;69:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.001>
12. Saussele S., Weisser A., Müller M.C., Emgi M., La Rosée P., Paschka P. et al. Frequent polymorphism in BCR exon b2 identified in BCR-ABL positive and negative individuals using fluorescent hybridization probes. *Leukemia*. 2000;14(11):2006-10. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401929>