

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.

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66
11 • 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

НОЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 30.10.2021.
Подписано в печать 10.11.2021.
Формат 60 × 88½.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

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

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Micrology, 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. № 11. 641–704.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), 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

11 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

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*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), 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

- Бородулина Е.А., Яковлева Е.В., Поваляева Л.В., Вдоушкина Е.С., Суханова А.Е.*
Сравнительное исследование гепсидина сыворотки крови пациентов с поражением легких при COVID-19 и пневмоцистной пневмонией. 645
- Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Петросян А.П., Сулейманов Э.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е.*
Прогностическое значение компонентов сигнальной системы VEGF и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови больных раком желудка 650
- Дудко Г.А., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Крючков А.С.*
Альтернативные и перспективные объекты биохимического анализа в спорте (обзор литературы). . . 655

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Донсков С.И., Буланов А.Ю., Симарова И.Б., Белякова В.В., Майорова О.А., Кравцова Е.А., Вакульчик И.О., Юркевич Т.Ю., Белуга М.В., Зубарева Л.М., Михайлова Н.М., Васильев Н.И., Давыдова Л.Е., Бурдинская Ю.В., Крюковский С.Б.*
Группы крови АВ0 и резус как фактор риска ОРВИ COVID-19 661

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Преснякова М. В., Загреков В.И., Костина О.В., Пушкин А.С., Кузнецова В. Л., Арефьев И.Ю.*
Влияние гипероксии на гемостазиологический статус тяжелообожженных. 666

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О., Алутина Э. Л. , Бут О. М., Пахомова А. Е.*
Этиологическая значимость штаммов *Corynebacterium spp.* в развитии заболеваний респираторного тракта. 673
- Балмасова И.П., Царев В.Н., Унаньян К.Г., Ипполитов Е.В., Царёва Т.В., Харах Я.Н., Ахмедов Г.Д., Степанова С.А., Катков И.И., Арутюнов С.Д.*
Диагностическое значение биомаркеров микробиома пародонта у пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2 678
- Чаплин А. В., Коржанова М., Коростин Д. О.*
Выявление генов антибиотикорезистентности бактерий в данных полногеномного секвенирования (обзор литературы) 684
- Шутикова А. Л., Леонова Г. Н., Попов А. Ф., Щелканов М. Ю.*
Клинико-диагностические проявления клещевой микст-инфекции в сочетании с COVID-19 689

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Резниченко М.Ф., Островский О.В., Веровский В.Е., Стаценко М.Е., Воронков А.А., Гильманов А.Ж., Соснин Д.Ю., Цвиренко С.В.*
Готовность врачей клинической лабораторной диагностики и кардиологов к выполнению рекомендаций четвертого универсального определения инфаркта миокарда 695

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Borodulina E.A., Yakovleva E.V., Povalyaeva L.V., Vdoushkina E.S., Sukhanova A.E.
Comparative study of the serum hepcidin level of patients with pneumonia in COVID-19
and *Pneumocystis pneumonia*645

Gershtein E.S., Korotkova E.A., Petrosyan A.P., Suleymanov E.A., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E.
Prognostic significance of VEGF signaling system components and matrix metalloproteinases
in blood serum of gastric cancer patients650

Dudko G.A., Dikunec M.A., Virjus E.D., Krjuchkov A.C.
Alternative and promising targets of biochemical analysis in sport (review of literature)655

HEMATOLOGY

*Donskov S.I., Bulanov A.Yu., Simarova I.B., Belyakova V.V., Mayorova O.A.,
Kravtsova E.A., Vakulchik I.O., Yurkevich T.Yu., Beluga M.V., Zubareva L.M.,
Mikhailova N.M., Vasiliev N.I., Davydova L.E., Burdinskaya Yu.V., Kryukovskiy S.B.*
Blood groups AB0 and Rh as a risk factor for ARVI COVID-19661

COAGULOGY

Presnyakova M.V., Zagrekov V.I., Kostina O.V. Pushkin A.S., Kuznetsova V.L., Arefyev I.Yu.
The effect of hyperoxia on the hemostasiological status of severely burned patients666

MICROBIOLOGY

Kharseeva G.G., Mangutov E.O., Alutina E.L., But O.M., Pakhomova A.E.
Etiological significance of *Corynebacterium* spp. in the development of diseases of the respiratory tract.673

*Balmasova I.P., Tsarev V.N., Unanyan K.G., Ippolitov E.V., Tsareva T.V.,
Kharakh Y.N., Akhmedov, Stepanova S.Y., Katkov I.I., Arutyunov S.D.*
Diagnostic value of microbiome biomarkers of the periodonite microbiome in patients
with the association of chronic periodontitis and diabetes mellitus type 2678

Chaplin A. V., Korzhanova M., Korostin D. O.
Identification of bacterial antibiotic resistance genes in next-generation sequencing data
(review of literature)684

Shutikova A. L., Leonova G. N., Popov A. F., Shchelkanov M. Yu.
Clinical and diagnostic manifestations of tick-borne mixed infection in combination with COVID-19689

ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

*Reznichenko M.F., Ostrovskij O.V., Verovsky V.E., Statsenko M.E.,
Voronkov A.A., Gilmanov A.Z., Sosnin D.Y., Tsvirenko S.V.*
Readiness of clinical laboratory diagnostics and cardiologists to implement the recommendations
of the fourth universal definition of myocardial infarction695

БИОХИМИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бородулина Е.А.¹, Яковлева Е.В.¹, Поваляева Л.В.^{1,2}, Вдоушкина Е.С.¹, Суханова А.Е.¹

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕПСИДИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПОРАЖЕНИЕМ ЛЕГКИХ ПРИ COVID-19 И ПНЕВМОЦИСТНОЙ ПНЕВМОНИИ

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

²ГБУЗ СО «Самарская городская больница №4», 443056, Самара, Россия

*В условиях пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, для пациента с респираторными симптомами и двусторонним поражением легких первым заболеванием в дифференциально-диагностическом поиске становится COVID-19. Поражение легких при COVID-19 имеет много схожих характеристик с пневмоцистной пневмонией. Одним из возможных маркеров тяжелого течения COVID-19 является гепсидин – пептидный гормон, отрицательный регулятор обмена железа. Данные о значении гепсидина в условиях воспаления, ассоциированного с *Pneumocystis jirovecii*, к настоящему времени в опубликованной научной литературе отсутствуют. Цель исследования – провести сравнительный анализ гепсидина сыворотки крови пациентов с поражением легких при COVID-19 и пневмоцистной пневмонии для уточнения их патогенетических особенностей. Проведено наблюдательное исследование по типу случай-контроль, включающее 68 пациентов с поражением легких при COVID-19 и 44 пациента с ВИЧ-инфекцией и пневмоцистной пневмонией (ПП/ВИЧ). Определение гепсидина проводили методом ИФА набором «ELISA Kit for Hepsidin». Статистическая обработка данных проводилась в программе MedCalc 19.2.6. Сравнительный анализ гепсидина в сыворотке крови изучаемых групп показал, что гепсидин статистически значимо выше при ПП/ВИЧ, чем при COVID-19 – медианное значение выше в 22 раза ($p < 0,0001$). При исследовании кривой ROC для гепсидина установлено, что данный биомаркер обладает высоким диагностическим потенциалом и указывает на большую вероятность COVID-19, чем ПП/ВИЧ при значениях $\leq 768,044$ пг/мл. В условиях пандемии COVID-19 необходимо помнить о других заболеваниях, проявляющихся схожей клинико-рентгенологической картиной. COVID-19 и ПП/ВИЧ имеют много общих черт; пептидный гормон гепсидин показал себя в качестве потенциального дифференциально-диагностического маркера между ними, в связи с чем оправдана необходимость проведения дальнейших исследований гепсидина с учетом тяжести течения COVID-19, наличия сопутствующей патологии и в сравнительном аспекте с патологиями, «мимикрирующими» под COVID-19.*

Ключевые слова: COVID-19; ВИЧ; пневмоцистная пневмония; диагностика; гепсидин.

Для цитирования: Бородулина Е.А., Яковлева Е.В., Поваляева Л.В., Вдоушкина Е.С., Суханова А.Е. Сравнительное исследование гепсидина сыворотки крови пациентов с поражением легких при COVID-19 и пневмоцистной пневмонией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 645-649. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-645-649>

Для корреспонденции: Яковлева Елена Вадимовна, аспирант каф. физиотриии и пульмонологии; e-mail: elena130894@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.07.2021

Принята к печати 25.07.2021

Опубликовано 29.11.2021

Borodulina E.A.¹, Yakovleva E.V.¹, Povalyeva L.V.^{1,2}, Vdoushkina E.S.¹, Sukhanova A.E.¹

COMPARATIVE STUDY OF THE SERUM HEPICIDIN LEVEL OF PATIENTS WITH PNEUMONIA IN COVID-19 AND PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA

¹«Samara State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 443099, Samara, Russia;

²«Samara City Hospital No. 4», 443056, Samara, Russia

In the context of a pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, for a patient with respiratory symptoms and bilateral lung damage, COVID-19 becomes the first disease in the differential diagnostic search. Pneumonia in COVID-19 shares many characteristics with Pneumocystis pneumonia. One of the possible markers of the severe course of COVID-19 is hepcidin, a peptide hormone that negatively regulates iron metabolism. There are no data on the value of hepcidin in Pneumocystis pneumonia in the published scientific literature. The purpose of this study is to conduct a comparative analysis of hepcidin in the blood serum of patients with pneumonia in COVID-19 and Pneumocystis pneumonia to clarify their pathogenetic features. A case-control observational study was conducted, including 68 patients with pneumonia in COVID-19 and 44 patients with HIV infection and Pneumocystis pneumonia (PCP/HIV). Determination of hepcidin was carried out by ELISA using the ELISA Kit for Hepsidin. Statistical data processing was carried out using the MedCalc 19.2.6 software. Results. Comparative analysis of serum hepcidin levels in the study groups showed that hepcidin is statistically significantly higher in PCP/HIV than in COVID-19 – the median value is 22 times higher ($p < 0.0001$). When examining the ROC curve for hepcidin, it was found that this biomarker has a high diagnostic potential and indicates a higher probability of COVID-19 than PCP/HIV at values ≤ 768.044 pg / ml. In the context of the COVID-19 pandemic, it is necessary to remember about other diseases that manifest themselves with a similar clinical and radiological picture. COVID-19 and PCP/HIV share many similarities; the peptide hormone hepcidin has shown itself as a potential differential diagnostic marker between them, and therefore the need for further studies of hepcidin is justified, taking into account the severity of the course of COVID-19, the presence of comorbidities and in a comparative aspect with pathologies that «mimic» under COVID-19.

Key words: COVID-19; HIV; pneumocystis pneumonia; diagnostics; hepcidin.

For citation: Borodulina E.A., Yakovleva E.V., Povalyaeva L.V., Vdoushkina E.S., Sukhanova A.E. Comparative study of the serum hepcidin level of patients with pneumonia in COVID-19 and Pneumocystis pneumonia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 645-649 (in Russ.) DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-645-649

For correspondence: Yakovleva E.V., Postgraduate student, Department of Phthiisology and Pulmonology; e-mail: elena130894@mail.ru

Information about authors:

Borodulina E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>;
Yakovleva E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1858-5206>;
Povalyaeva L.V., <https://orcid.org/0000-0002-2546-1837>;
Vdoushkina E.S. <https://orcid.org/0000-0003-0039-6829>;
Sukhanova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-4402-6053>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.07.2021
Accepted 25.07.2021
Published 29.11.2021

В условиях пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, для пациента с респираторными симптомами и двусторонним поражением легких первым заболеванием в дифференциально-диагностическом поиске становится COVID-19. Пандемия продолжает распространяться и концентрирует на себе внимание медицинского сообщества, COVID-19 становится эндемичным заболеванием для многих регионов, в связи с чем существует риск пропустить другие заболевания, имеющие сходные проявления.

В литературе появляются публикации клинических случаев инфекционных и неинфекционных заболеваний, «мимикрирующих» под COVID-19 и изначально принятых за него: аденокарцинома легких [1], карциноматоз [2], отек легких как осложнение инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST [2] и пневмоцистная пневмония (ПП) у пациентов ВИЧ-инфекцией, впервые выявленной в настоящую госпитализацию на поздних стадиях [2-8]. Также описаны случаи коинфекции ПП у лиц с ВИЧ и COVID-19 [9, 10].

COVID-19 и ПП, поражение легких, вызываемое условно-патогенным возбудителем *Pneumocystis jirovecii*, имеют много схожих характеристик: жалоб, рентгенологических особенностей и лабораторных данных. Оба заболевания проявляются одышкой, лихорадкой, утомляемостью, слабостью, кашлем сухим или с небольшим количеством светлой мокроты [11-13]. По данным компьютерной томографии двусторонние затемнения по типу «матового стекла» часто выявляются как при ПП, так и при COVID-19 [14-16]. При этом для COVID-19 более характерно поражение периферических отделов легких [17, 18], тогда как ПП обычно затрагивает периферию в меньшей степени [19]. Также в литературе отмечено, что КТ-картина пневмонии, вызванной COVID-19, требует проведения дифференциальной диагностики с целым рядом инфекционных (вызванных другими вирусами или *Mycoplasma pneumoniae*) и неинфекционных (легочная эмболия, жировая эмболия, криптогенная пневмония, неспецифическая интерстициальная пневмония, десквамативная интерстициальная пневмония, острая и хроническая эозинофильная пневмония) поражений [20]. Наиболее часто ПП развивается при снижении CD4-лимфоцитов менее 200 кл/мкл [12, 21], соответственно, в общем анализе крови ожидаема лимфопения. У пациентов с COVID-19 в общем анализе крови нередко выявляется лейкопения, хотя также сообщается

о лейкоцитозе и лимфопении [22]. В биохимическом анализе крови при обоих заболеваниях выявляется повышенный уровень ЛДГ, являющийся в обоих случаях маркером худшего прогноза [21, 23, 24].

Одним из возможных маркеров тяжелого течения COVID-19 в зарубежной литературе называют гепсидин – пептидный гормон, главный отрицательный регулятор обмена железа [25-29]. Действие гепсидина основано на блокаде ферропортина, клеточного экспортера железа [30]. Еще один путь активации гепсидина осуществляется при воспалении посредством воздействия провоспалительных цитокинов, в первую очередь, интерлейкина-6. Опосредованное воспалением повышение гепсидина рассматривается как врожденная защитная иммунная реакция, направленная на ограничение доступности циркулирующего пула железа для патогенов [31]. Данные о значении гепсидина в условиях воспаления, ассоциированного с *Pneumocystis jirovecii*, к настоящему времени в доступной научной литературе отсутствуют.

Цель исследования – провести сравнительный анализ гепсидина сыворотки крови пациентов с поражением легких при COVID-19 и пневмоцистной пневмонией для уточнения их патогенетических особенностей.

Материал и методы. Проведено наблюдательное исследование по типу случай-контроль на базе городского пульмонологического центра г. Самара, включающее 68 пациентов (случаи, группа 1) с поражением легких при новой коронавирусной инфекции (60,3%, $n=41$ – КТ-1; 33,8%, $n=23$ – КТ-2; 5,9%, $n=4$ – КТ-3), подтвержденное положительным результатом ПЦР-теста, и 44 пациента (группа 2, контрольная) с ВИЧ-инфекцией и ПП (ПП/ВИЧ). Пациентам 2-й группы ПП диагностирована по клинико-рентгенологическим и анамнестическим данным и по выраженному положительному эффекту от назначенной эмпирически специфической терапии (триметоприм-сульфаметоксазол). ВИЧ-инфекция на стадии 4В у 72,7% ($n=32$) и 5 – у 27,3% ($n=12$). Длительность анамнеза по ВИЧ: медиана 8,5 (7,5; 11) лет, при этом 9% пациентов ($n=4$) впервые узнали о наличии ВИЧ-инфекции в настоящую госпитализацию.

Для исследования сывороточного гепсидина производилось взятие крови на 1-3 сутки госпитализации. Определение гепсидина проводили методом ИФА набором «ELISA Kit for Hcpidin (Hepc)» (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Лазурит»

производства «Вектор-Бест» (Россия). Референсные значения по инструкции производителя 600-23300 пг/мл.

Статистическая обработка данных проводилась в программе MedCalc 19.2.6. statistical software. Нормальность распределения признаков оценена при помощи критерия Шапиро-Уилки. Признаки с нормальным распределением представлены в виде среднего арифметического и среднего квадратичного отклонения $M \pm \sigma$. Признаки с распределением, отличным от нормального, в виде медианы и квартилей $Me (Q1; Q3)$. Оценка статистической значимости различий в группах проводилась при помощи t -критерия Стьюдента или U -критерия Манна-Уитни для количественных показателей и хи-квадрата Пирсона – качественных. Статистически значимыми считали различия между группами при вероятности случайного различия $p < 0,05$. Для графического отображения значения показателей были построены ROC-кривые и рассчитаны площади под кривыми (area under the curve, AUC) для количественной интерпретации кривых; далее в скобках указаны 95%-ые доверительные интервалы, т.е. диапазоны значений, внутри которых с вероятностью 95% находится истинное значение показателя.

Результаты. В 1-ю группу вошли 16,2% ($n=11$) мужчин и 83,8% ($n=57$) женщин, во вторую – 63,6% ($n=28$) мужчин и 36,3% ($n=16$) женщин, $p=0,0042$. Медиана возраста в 1-й группе 58 (49; 66,5) лет, во 2-й группе – 40 (39; 41) лет, $p < 0,0001$.

Ведущими жалобами, предъявляемыми при поступлении пациентами обеих групп, была слабость, одышка, кашель, выделение мокроты, повышение температуры тела (табл. 1). Выделение мокроты статистически значимо чаще встречается при ПП, чем при COVID-19.

Помимо вышеуказанных жалоб, 23,5% ($n=16$) пациентов 1-й группы предъявляли жалобу на потерю обоняния, что не наблюдалось ни у кого из пациентов 2-й группы, $p=0,001$. При этом пациенты 2-й группы нередко предъявляли жалобу на чувство жжения и дискомфорта

в ротовой полости, появление белого налета на языке и щеках – у 72,7% ($n=32$) из них был диагностирован орофарингеальный кандидоз. Среди пациентов 1-й группы орофарингеальный кандидоз не наблюдался, $p=0,0026$.

В общем анализе крови, выполненном пациентам обеих групп в первые сутки госпитализации, выявлены отличия по показателям красной крови: медианные значения эритроцитов и гемоглобина в 1,3 раза больше при COVID-19, чем при ПП, $p < 0,0001$ (табл. 2).

В сыворотке крови пациентов обеих групп определен уровень гепсидина: медиана 474,8 (381,7; 565,1) пг/мл при COVID-19 и 10442,5 (7505,0; 14175,0) при ПП, $p < 0,0001$. Построена ROC-кривая для гепсидина, в качестве классификационной переменной принят COVID-19 (см. рисунок).

Обсуждение. При обследовании пациентов с подозрением на COVID-19 встречаются случаи, требующие проведения дифференциальной диагностики с ПП, что подчеркивается многими авторами [2-10]. В клиническом течении COVID-19 и ПП выявляется много общих черт: жалоб, данных физического обследования, рентгенологических проявлений. Дифференциация между этими двумя заболеваниями трудна, особенно в условиях высокой распространенности ВИЧ, когда ПП часто диагностируется по клинико-anamnestическим данным из-за ограниченных возможностей проведения бронхоскопии и лабораторной диагностики пневмоцист. Кроме того, диагностическое тестирование может дать ложноотрицательные результаты при обоих заболеваниях [9]. Ситуация также осложняется тем, что некоторые пациенты с ПП узнают о своем ВИЧ-статусе только на поздних стадиях ВИЧ. В нашем исследовании каждый десятый пациент с ПП узнал о наличии ВИЧ впервые в настоящей госпитализации по поводу ПП. Важность тестирования на ВИЧ при госпитализации по поводу COVID-19 отмечена Британской ассоциацией по борьбе с ВИЧ [5]. На наш взгляд, проводить исследование на

Таблица 1

Основные жалобы пациентов при поступлении.

Жалобы	Группа 1		Группа 2		p^*
	n	%	n	%	
Одышка	60	88,2	38	90,5	0,512
Слабость	65	95,6	40	95,2	0,827
Кашель	52	76,5	37	88,1	0,203
Выделение мокроты	12	17,6	35	83,3	0,024
Лихорадка	68	100	41	97,6	0,84
Всего	68		44		-

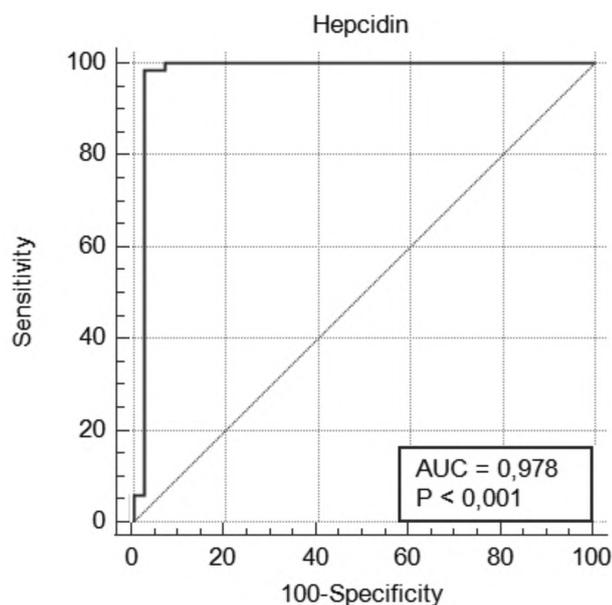
Примечание. n – число больных; * – уровень значимости $\alpha=0,05$. Расчет p произведен по методу хи-квадрат. Здесь и в табл. 2: жирным шрифтом выделены значения $p < 0,05$, указывающие на статистическую значимость различий.

Таблица 2

Показатели общего анализа крови в группах

Показатели	Группа 1	Группа 2	p^*
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,49 (4,1; 4,87)	3,34 (3,0; 3,89)	<0,0001
Гемоглобин, г/л	137,5 (122,5; 147,5)	109 (89; 177)	<0,0001
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,7 (4,9; 8,4)	6,8 (4,65; 9,1)	0,756
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	199 (156,5; 239,5)	221,5 (180; 242)	0,064
СОЭ, мм/ч	27 (18; 39)	28 (23,5; 41)	0,190

Примечание. * – уровень значимости $\alpha=0,05$. Значение p определено согласно U -критерию Манна-Уитни.



Кривая ROC для гепсидина. ROC AUC 0,978 (95% ДИ 0,931-0,996), что соответствует высокому диагностическому потенциалу. Пороговое значение гепсидина для выявления COVID-19 $\leq 768,044$ пг/мл, чувствительность 98,5%, специфичность 97,7%.

ВИЧ необходимо всем пациентам с поражением легких и подозрением на COVID-19.

В обследованных нами группах основными жалобами и при COVID-19, и при ПП были одышка, слабость, кашель, лихорадка. При этом выделение мокроты чаще встречалось при ПП ($p=0,024$). Наиболее важными отличиями стала возможная потеря обоняния при COVID-19 и отсутствие данной жалобы при ПП ($p=0,001$), а также частое выявление орофарингеального кандидоза при ПП, что не встречалось при COVID-19 ($p=0,0026$). Данное отличие также было отмечено в работе других авторов [4].

Медиана гепсидина при COVID-19 в нашем исследовании составила 474,8 (381,7; 565,1) пг/мл, что не является повышенным значением данного показателя. В литературе представлены высокие значения гепсидина при COVID-19. Так, в исследовании С. Zhou и соавт. [25] методом логистической регрессии установлена высокая вероятность тяжелого течения COVID-19 при гепсидине в сыворотке крови более 32,7 нг/мл. В исследовании А. Nai и соавт. [27] повышенный уровень гепсидина у пациентов с COVID-19, нуждающихся в интенсивной терапии (средний уровень гепсидина 361,9 нг/мл), рассматривается как предиктор летального исхода. Мы предполагаем, что выявленные отличия могут быть связаны с тяжестью состояния обследованных пациентов и с методикой определения гепсидина. В работах С. Zhou и А. Nai [25, 27] внимание уделено прогнозированию тяжелого течения и летального исхода, в то время как в нашем исследовании участвовали пациенты, не нуждавшиеся в лечении в условиях ОАРИТ и имевшие поражение легких не более 50% (КТ 1-2 у 94,1%, $n=64$). Отсутствие повышения гепсидина в сыворотке крови при коронавирусной инфекции также показано в работе S. Yagci и соавт. [26]: $603,26 \pm 244.37$

пг/мл при тяжелом течении COVID-19. Авторы объясняют полученный результат двумя причинами. Во-первых, между фрагментами SARS-CoV-2 и белка гепсидина имеются структурные сходства, что ранее было указано S. Ehsani [26], следовательно, вирус SARS-CoV-2 может имитировать действие гепсидина и подавлять его синтез в печени. Во-вторых, синтез гепсидина подавляется при гипоксии [29].

Сравнительный анализ гепсидина в сыворотке крови в изучаемых нами группах показал, что гепсидин статистически значимо выше при ПП/ВИЧ, чем при COVID-19 – медианное значение выше в 22 раза ($p<0,0001$). При исследовании кривой ROC для гепсидина установлено, что данный биомаркер обладает высоким диагностическим потенциалом и указывает на большую вероятность COVID-19, чем ПП/ВИЧ при значениях $\leq 768,044$ пг/мл.

Заключение. В условиях пандемии COVID-19 необходимо помнить о других заболеваниях, проявляющихся схожей клинико-рентгенологической картиной. COVID-19 и ПП/ВИЧ имеют много общих черт; пептидный гормон гепсидин показал себя в качестве потенциального дифференциально-диагностического маркера между ними, в связи с чем оправдана необходимость проведения дальнейших исследований гепсидина с учетом тяжести течения COVID-19, наличия сопутствующей патологии и в сравнительном аспекте с патологиями, «мимикрирующими» под COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8-11, 13-30 см. REFERENCES)

1. Аверьянов А.В., Сотникова А.Г., Лесняк В.Н. Пневмоцистная пневмония, мимикрирующая под COVID-19. *Клиническая практика*. 2020; 11 (2): 87-92.
2. Михайлова Н.Р., Ермак Т.Н., Михайловский А.М. Пневмоцистная пневмония и генерализованный туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией. *Терапевтический архив*. 2013; 85(11): 67-8.
31. Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г., Герасимов Л.Н. Выраженность системного воспалительного ответа у больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией. *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 95 (6): 36-40.

REFERENCES

1. Rigamonti E., Salera D., Gheorghiu A.C., Fratila C., Gianella P. The many faces of interstitial pneumonia: a case of presumed SARS-CoV-2 infection. *Swiss Med. Wkly*. 2020; Jul 11; 150: w20312. doi: 10.4414/smww.2020.20312. eCollection 2020 Jun 28.
2. Zieda A., Sbardella S., Patel M., Smith R.W. Diagnostic Bias in the COVID-19 Pandemic: A Series of Short Cases. *Eur. J. Case Rep. Intern Med*. 2021; May 11; 8(5): 002575. doi: 10.12890/2021002575. eCollection 2021.
3. Bhat P., Noval M., Doub J.B., Heil E. Concurrent COVID-19 and Pneumocystis jirovecii pneumonia in a severely immunocompromised 25-year-old patient. *Int. J. Infect. Dis*. 2020; 99: 119-121. doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.061.
4. Choy C.Y., Wong C.S. It's not all about COVID-19: pneumocystis pneumonia in the era of a respiratory outbreak. *J. Int. AIDS Soc*. 2020; 23 (6): e25533. doi: 10.1002/jia2.25533.
5. Kelly S., Waters L., Cevik M., Collins S., Lewis J., Wu M.S., Blanchard T.J., Geretti A.M. Pneumocystis pneumonia, a COVID-19 mimic, reminds us of the importance of HIV testing in COVID-19. *Clin. Med. (Lond)*. 2020; 20 (6): 590-2. doi: 10.7861/clinmed.2020-0565.
6. Borchmann O., Hansen A.E. Pneumocystis pneumonia and HIV infection in two patients suspected with COVID-19. *Ugeskr Laeger*. 2021; 25; 183 (4): V09200673.

7. Aver'yanov A.V., Sotnikova A.G., Lesnyak V.N. Pneumocystis pneumonia mimicking COVID-19. *Klinicheskaya praktika*. 2020; 11 (2): 87-92. (in Russian)
8. Sajjad M.M., Yousaf S., Ullah S. A Diagnostic Challenge in COVID-19 Pandemic: PCP or COVID-19. *J. Coll. Physicians Surg. Pak*. 2020; 30 (10): 144. doi: 10.29271/jcsp.2020.supp2.144.
9. Broadhurst A.G.B., Lalla U., Taljaard J.J., Louw E.H., Koegelenberg C.F.N., Allwood B.W. The diagnostic challenge of pneumocystis pneumonia and COVID-19 co-infection in HIV. *Respirol. Case Rep*. 2021; 22; 9 (4): e00725. doi: 10.1002/rcr2.725. eCollection 2021 Apr.
10. Mang S., Kaddu-Mulindwa D., Metz C., Becker A., Seiler F., Smola S., Mabmann A., Becker S.L., Papan C., Bals R., Lepper P.M., Danziger G. Pneumocystis jirovecii Pneumonia and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Coinfection in a Patient With Newly Diagnosed HIV-1 Infection. *Clin. Infect. Dis*. 2021; 26; 72 (8): 1487-1489. doi: 10.1093/cid/ciaa906.
11. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J. et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020; 323(11):1061-1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
12. Mikhaylova N.R., Ermak T.N., Mikhaylovskiy A.M. Pneumocystis pneumonia and generalized tuberculosis in patients with HIV infection. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 85 (11): 67-8. (in Russian)
13. Kales C.P., Murren J.R., Torres R.A., Crocco J.A. Early predictors of in hospital mortality for Pneumocystis carinii pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med*. 1987; 147(8): 1413-7.
14. Shi H., Han X., Jiang N., Cao Y., Alwalid O., Gu J. et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis*. 2020; 20 (4): 425-34. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30086-4.
15. Zhao W., Zhong Z., Xie X., Yu Q., Liu J. Relation between chest CT findings and clinical conditions of coronavirus disease (COVID-19) pneumonia: a multicenter study. *Am. J. Roentgenol*. 2020; 214 (5): 1072-1077. doi: 10.2214/AJR.20.22976.
16. Crans C.A., Boiselle P.M. Imaging features of Pneumocystis carinii pneumonia. *Crit. Rev. Diagn. Imaging*. 1999; 40 (4): 251-84.
17. Salehi S., Abedi A., Balakrishnan S., Gholamrezanezhad A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review of imaging findings in 919 patients. *Am. J. Roentgenol*. 2020; 215 (1): 87-93. doi: 10.2214/AJR.20.23034.
18. Hanfi S.H., Lalani T.K., Saghir A., McIntosh L.J., Lo H.S., Kotecha H.M. COVID-19 and its Mimics: What the Radiologist Needs to Know. *J. Thorac. Imaging*. 2021; 36 (1): W1-W10. doi: 10.1097/RTI.0000000000000554.
19. Fujii T., Nakamura T., Iwamoto A. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. *J.Infect. Chemotherapy*. 2007; 13 (1) :1-7. doi: 10.1007/s10156-006-0484-5.
20. Hochegger B., Zanon M., Altmayer S., Mandelli N.S., Stüker G., Mohammed T.L. et al. COVID-19 mimics on chest CT: a pictorial review and radiologic guide. *Br. J. Radiol*. 2021; 94 (1118): 20200703. doi: 10.1259/bjr.20200703. Epub 2020 Dec 9.
21. Omene A.A., Ferguson R.P. Absolute lymphocyte count as a predictor of Pneumocystis pneumonia in patients previously unknown to have HIV. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect*. 2012; 2 (1). doi: 10.3402/jchimp.v2i1.15696.
22. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 497-506. – doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
23. Zaman M.K., White D.A. Serum lactate dehydrogenase levels and Pneumocystis carinii pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. *Am. Rev. Respir Dis*. 1988; 137 (4): 796-800.
24. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395 (10229): 1054-62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
25. Zhou C., Chen Y., Ji Y., He X., Xue D. Increased Serum Levels of Hepcidin and Ferritin Are Associated with Severity of COVID-19. *Med. Sci. Monit*. 2020; 26: e926178. doi: 10.12659/MSM.926178.
26. Ehsani S. COVID-19 and iron dysregulation: distant sequence similarity between hepcidin and the novel coronavirus spike glycoprotein. *Biol. Direct*. 2020; 16; 15 (1): 19. doi: 10.1186/s13062-020-00275-2.
27. Nai A., Lorè N.I., Pagani A., De Lorenzo R., Di Modica S., Saliu F. et al. Hepcidin levels predict Covid-19 severity and mortality in a cohort of hospitalized Italian patients. *Am. J. Hematol*. 2021; 96 (1): E32-E35. doi: 10.1002/ajh.26027.
28. Sukhomlin T. Hepcidin is a friend rather than a foe in COVID19-induced complications. *Acta Biomed*. 2020; 5; 91 (4): e2020138. doi: 10.23750/abm.v91i4.10768.
29. Yagci S., Serin .E, Acicbe O., Zeren M.I., Odabasi M.S. The relationship between serum erythropoietin, hepcidin, and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID-19. *Int. J. Lab. Hematol*. 2021; 7: 10.1111/ijlh.13479. doi: 10.1111/ijlh.13479. Online ahead of print.
30. Ganz T., Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2015; 15 (8): 500-510. doi: 10.1038/nri3863.
31. Abdullaev R.Yu., Komissarova O.G., Gerasimov L.N. The severity of the systemic inflammatory response in patients with tuberculosis associated with HIV infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2017; 95 (6): 36-40. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Петросян А.П., Сулейманов Э.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ VEGF И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Представлен анализ отдаленных результатов лечения 77 первичных больных раком желудка I-IV стадии, прослеженных на протяжении от 1 до 41 месяца (медиана – 6,4 мес) от начала специфического лечения, с учетом исходных уровней VEGF, растворимых форм его рецепторов (sVEGFR1, sVEGFR2) и матриксных металлопротеиназ (ММП-2, 7, 9) в сыворотке крови. В качестве критерия прогноза использовали показатель общей выживаемости, оцененный методом Каплана-Майера, а также многофакторный анализ на основе регрессионной модели Кокса. Установлено, что при высоких уровнях VEGF (≥ 420 пг/мл) в сыворотке крови общая выживаемость больных раком желудка статистически значимо ниже, чем при более низких уровнях маркера ($p=0,011$): 3-летняя выживаемость при высоких и низких показателях VEGF составила соответственно $46,3\pm 12,5\%$ и $88,2\pm 7,8\%$. Медиана выживаемости больных с высоким уровнем маркера составила 21,7 месяца, с низким – не достигнута за весь период наблюдения. Уровни sVEGFR1, sVEGFR2, MMP-2, 7 и 9 в сыворотке крови не были значимо связаны с общей выживаемостью пациентов, включенных в данное исследование. По данным многофакторного анализа, значимым независимым фактором прогноза длительности жизни больных раком желудка является только индекс M и уровень VEGF в сыворотке крови ($p=0,036$). Таким образом, показано, что сигнальный путь VEGF играет важную роль при раке желудка, а его компоненты, в первую очередь, VEGF A, являются значимыми факторами прогноза заболевания, а также могут быть полезны для мониторинга эффективности проводимого лечения.

Ключевые слова: рак желудка; VEGF; sVEGFR1; sVEGFR2; матриксные металлопротеиназы; сыворотка крови; прогноз.

Для цитирования: Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Петросян А.П., Сулейманов Э.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Прогностическое значение компонентов сигнальной системы VEGF и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови больных раком желудка. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 650-654.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-650-654>

Для корреспонденции: Герштейн Елена Сергеевна, д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клин. биохимии; e-mail: esgershtein@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 04.09.21

Принята к печати 04.10.21

Опубликовано 29.11.2021

Gershtein E.S., Korotkova E.A., Petrosyan A.P., Suleymanov E.A., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF VEGF SIGNALING SYSTEM COMPONENTS AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD SERUM OF GASTRIC CANCER PATIENTS

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115522, Moscow, Russia

Analysis of long-term treatment results of 77 primary gastric cancer patients at stage I-IV of the tumor process followed during 1 – 41 months (median – 6.4 months) from the onset of specific treatment are presented depending on the basal levels of VEGF, soluble forms of its receptors (sVEGFR1, sVEGFR2) and matrix metalloproteinases (MMP-2, 7, 9) in blood serum. Overall survival assessed by Kaplan-Meier analysis and with the help of Cox multiparametric regression model was applied as the criterion of prognostic value. It was found that at high (≥ 420 pg/ml) serum VEGF, the overall survival of patients with gastric cancer was statistically significantly lower than at the marker's levels below 420 pg/ml ($p<0.011$): 3-year's survival comprised $46,3\pm 12,5\%$ and $88,2\pm 7,8\%$ respectively. Median survival of patients with high VEGF level comprised 21.7 months, of those with low VEGF was not achieved during the whole follow-up period. Serum sVEGFR1, sVEGFR2, MMP-2, 7 and 9 levels were not significantly associated with the overall survival of patients included in this study. Only index M of TNM system and serum VEGF level demonstrated an independent prognostic value in multiparametric model ($p=0.036$). Thus, it was confirmed that VEGF signaling pathway plays an important role in gastric cancer, and its components – in the first place, VEGF A – are substantial factors of disease prognosis, and can also be useful for monitoring of treatment efficiency.

Key words: gastric cancer; VEGF; sVEGFR1; sVEGFR2; matrix metalloproteinases; blood serum; prognosis.

For citation: Gershtein E.S., Korotkova E.A., Petrosyan A.P., Suleymanov E.A., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. Prognostic significance of VEGF signaling system components and matrix metalloproteinases in blood serum of gastric cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 650-654 (in Russ.).
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-650-654>

For correspondence: Gershtein Elena Sergeyevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: esgershtein@gmail.com

Information about authors:

Gershtein E.S., <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>;
Korotkova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-2509-5232>;
Petrosyan A.P., <https://orcid.org/0000-0002-2149-4236>;
Suleymanov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5140-0245>;
Stilidi I.S., <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

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

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

Received 04.09.21

Accepted 04.10.21

Published 29.11.2021

Введение. Широкая распространенность, неуклонный рост показателей заболеваемости (в основном запущенных форм) и смертности от рака желудка – одна из важнейших проблем современной клинической онкологии. Радикальное хирургическое удаление опухоли по-прежнему остается главной гарантией успешного лечения и длительного безрецидивного периода у этих пациентов. По данным ведущих специалистов России, крайне неудовлетворительные результаты лечения рака желудка связаны с его поздней диагностикой, как правило – в III-IV стадиях опухолевого процесса [1]. К основным сложностям, мешающим внедрению в повседневную клиническую практику массовых профилактических мероприятий и скрининга рака желудка, следует отнести отсутствие простых и доступных методов обследования, а также специфических маркеров [2].

Несмотря на некоторые успехи комбинированных методов лечения рака желудка, именно хирургический метод остается стандартом, позволяющим добиться излечения на ранних стадиях заболевания. Прогноз на поздних стадиях заболевания неутешительный и составляет менее года для неоперабельных больных даже при соответствующей терапии [3]. Одним из ключевых подходов к повышению эффективности лечения рака желудка, наряду с ранней диагностикой, совершенствованием хирургических технологий и рациональным использованием комбинированных и комплексных методов, включая классическую химиотерапию, является использование препаратов, направленно воздействующих на молекулы, участвующие в осуществлении и регуляции основных биологических свойств опухоли, и блокирующих регулируемыми ими процессы.

С целью определения риска раннего метастазирования и прогноза рака желудка используют ряд клинико-морфологических признаков первичной опухоли (глубина опухолевой инвазии в стенку желудка, гистологический вариант и степень дифференцировки новообразования, стадия заболевания по системе TNM и др.). Однако степень агрессивности опухоли не всегда определяется этими критериями, поэтому в настоящее время проводится активный поиск дополнительных молекулярно-генетических и биохимических маркеров, характеризующих агрессивный потенциал новообразований и предсказывающих высокий риск опухолевой прогрессии. Правильная оценка биологических факторов, коррелирующих с метастатическим и инвазивным потенциалом опухоли, прогнозом заболевания и продолжительностью жизни пациентов, особенно важна при ранних локализованных формах рака желудка.

Одним из наиболее перспективных направлений молекулярно-направленного лечения различных онкологиче-

ских заболеваний считается антиангиогенная терапия, подавляющая процесс образования новой капиллярной сосудистой сети, снабжающей опухоль кислородом и питательными веществами. Большинство используемых в настоящее время антиангиогенных препаратов направлено на ингибирование активности сигнального пути ключевого стимулятора ангиогенеза – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial growth factor). Помимо самого VEGF, эта система включает также 3 трансмембранных тирозинкиназных рецептора, из которых наиболее значимыми для регуляции роста кровеносных сосудов являются рецепторы 1 и 2 типа (VEGFR1 и VEGFR2) [4]. Антиангиогенная терапия успешно применяется при таких заболеваниях как рак почки, рак толстой кишки, гепатоцеллюлярный рак и др. [5-7]. В последнее время предпринимаются также различные более или менее удачные попытки применения антиангиогенных препаратов при раке желудка [8-10]. При этом одной из важнейших проблем при использовании анти-VEGF/VEGFR препаратов до сих пор остается отсутствие четкой взаимосвязи между экспрессией таргетных молекул и эффективностью соответствующего лечения [11].

Помимо общего для большинства рецепторных киназ митоген-активируемого протеинкиназного каскада, регулирующего экспрессию генов, связанных с пролиферацией, к числу важнейших генов, регулируемых VEGF в эндотелиальных клетках, относится протоонкоген *c-ets-1*, кодирующий транскрипционный фактор Ets-1, который способствует проявлению ангиогенного фенотипа этих клеток через активацию транскрипции генов и последующего синтеза белков важнейших протеаз, расщепляющих внеклеточный матрикс (ВКМ) [12, 13]. Активация протеаз имеет три важных для стимуляции ангиогенеза последствия: облегчает дезинтеграцию эндотелиальных клеток и их инвазию в базальный слой сосудов, генерирует продукты деградации ВКМ, способствующие хемотаксису эндотелиальных клеток, а также активирует и мобилизует находящиеся в ВКМ факторы роста. К важнейшим регуляторам деградации ВКМ относится мультигенное семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), состоящее из более 20 секретрируемых и связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз, вовлеченных во все этапы опухолевого процесса, в первую очередь, в процессы инвазии и метастазирования [14, 15]. Ключевыми для опухолевой прогрессии являются желатиназы А и В (ММП-2 и ММП-9 соответственно) и матрилизин (ММП-7).

Экспрессия VEGF, его рецепторов и различных ММП в опухолевой ткани и их растворимые формы,

циркулирующие в периферической крови, активно изучаются также в качестве факторов прогноза онкологических заболеваний, в том числе рака желудка [16-19], независимо от наличия или отсутствия антиангиогенного компонента в схеме лечения.

Ранее, на основании результатов обследования 104 первичных больных раком желудка и 65 здоровых доноров, мы установили, что содержание VEGF, sVEGFR1 и MMP-7 в сыворотке крови пациентов статистически значимо повышено, а уровни sVEGFR2 и MMP-2 снижены по сравнению с контрольной группой [20, 21]. Однако значимых ассоциаций со стадией заболевания, глубиной инвазии первичной опухоли, гистологическим типом, степенью дифференцировки и локализацией опухоли обнаружено не было. При исследовании плазмы крови больных раком желудка было установлено, что высокий уровень MMP-7 является независимым фактором неблагоприятного прогноза общей выживаемости по данным однофакторного и многофакторного анализа, а низкий уровень MMP-2 – только по результатам однофакторного анализа [22].

Цель данного исследования – анализ прогностической значимости VEGF, растворимых форм его рецепторов (sVEGFR1, sVEGFR2), а также MMP-2, 7 и 9 в сыворотке крови больных раком желудка.

Материал и методы. Проанализированы отдаленные результаты лечения 77 пациентов с впервые выявленным раком желудка в возрасте от 25 до 80 лет (42 мужчины, 35 женщин), обследованных и получавших лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клинико-рентгенологический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологического исследования опухоли и регионарных лимфоузлов согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). I стадия диагностирована у 14, II – у 13, III – у 32, IV – у 18 пациентов. У 46% пациентов опухоль локализовалась в теле, у 20% – в проксимальном и у 19% в дистальном отделе желудка; тотальное поражение желудка выявлено у 19%, кардиоэзофагеальный рак – у 3% больных.

Больным выполнены различные варианты операций: проксимальная резекция желудка – 4, дистальная резекция желудка – 24, гастрэктомия – 42, ревизионная лапароскопия – 7. Неoadьювантную полихимиотерапию получали 5 пациентов, адьювантную полихимиотерапию – 32; схемы полихимиотерапии: DCF – 1 (3,1%), FLOT – 3 (9,4%), FOLFOX – 3 (9,4%), XELOX – 24 (75%), капецитабин (в монорежиме) – 1 (3,1%) больной. Пациенты прослежены на протяжении от 1 до 41 месяца (медиана – 6,4 мес). В качестве критерия оценки прогностической значимости использовали показатель общей выживаемости.

Содержание исследуемых белков в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов для прямого иммуноферментного анализа: «Human VEGF Immunoassay», «Human VEGFR1 Immunoassay», «Human VEGFR2 Immunoassay», «Human/Mouse/Rat MMP-2 (total)», «Human MMP-7 (total)», «Human MMP-9 (total)» (Quantikine[®], R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание VEGF и sVEGFR1 выражали в пикограммах (пг); sVEGFR2, MMP-2, 7, 9 – в нанogramмах (нг) – на 1 мл сыворотки крови.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и SPSS 20. В однофакторном анализе общую выживаемость рассчитывали методом Каплана-Мейера с оценкой достоверности различий с помощью log-rank теста; многофакторный анализ проводили с использованием регрессионной модели Кокса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Пациенты прослежены на протяжении от 1 до 41 месяца (медиана – 6,4 мес). За весь период наблюдения от основного заболевания умерли 20 пациентов, что составило 26% от общего числа обследованных. Продолжительность жизни умерших больных составила от 1 до 31 месяца (медиана – 14,1 мес).

Выбор пороговых значений для оценки влияния уровня VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2, MMP-2, 7 и 9 на общую выживаемость проводили на основании данных о содержании этих белков в сыворотке крови больных раком желудка, опубликованных нами ранее [20, 21]. На первом этапе анализа в качестве таковых рассматривали показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей в общей группе пациентов.

Статистически значимые различия в однофакторном анализе были получены только для VEGF при пороговом значении 420 пг/мл, соответствующем медиане (см. табл. 1, рисунок).

В группе пациентов с уровнями VEGF в сыворотке крови менее 420 пг/мл медиана срока жизни не была достигнута, 3-летняя общая выживаемость составила 88,2±7,8% и была почти в 2 раза выше, чем при более высоких концентрациях маркера – 46,3±12,5% с медианой срока жизни 21,7 мес (рис. 1; $p=0,011$).

Значимых различий в отдаленных результатах лечения больных раком желудка в группах с различной концентрацией sVEGFR1 в сыворотке крови выявлено не было, однако наихудшая общая выживаемость в сроки

Таблица 1

Общая выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации VEGF в сыворотке крови

VEGF, пг/мл	n	Медиана срока жизни, мес	Общая выживаемость, %		
			1 год	2 года	3 года
≤290	15	Не достигнута	83,3±15,2	83,3±15,2	83,3±15,2
291-420	20	Не достигнута	90,9±8,7	90,9±8,7	90,9±8,7
421-600	20	16,5	63,0±17,7	42,0±20,8	42,0±20,8
>600	22	22,0	80,0±12,6	50,0±15,8	50,0±15,8
p			0,06		

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: n – число больных.

от 2-х до 3-х лет ($49,5 \pm 15,4\%$; медиана 21,2 мес) обнаружена в группе пациентов с уровнями sVEGFR1 ≤ 4 пг/мл (нижний квартиль; табл. 2).

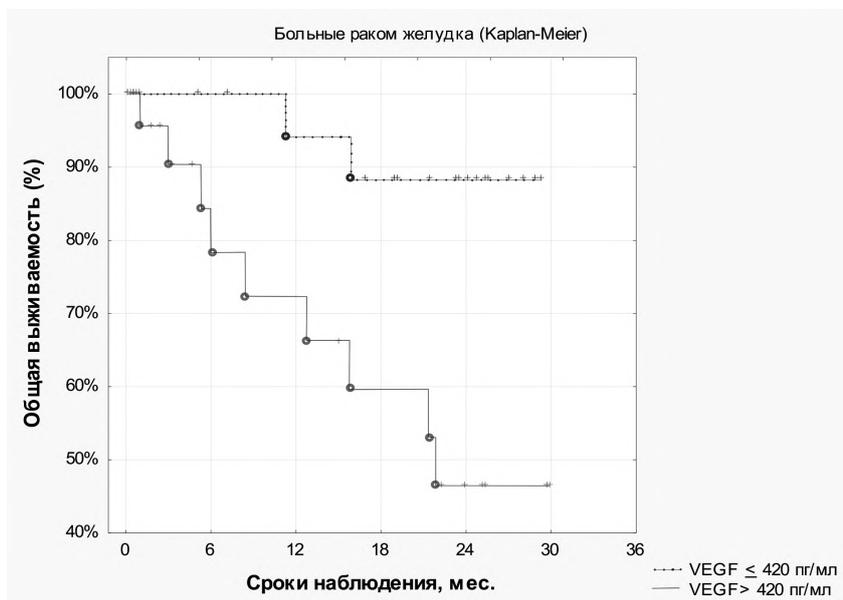
Не отмечено значимых различий в отдаленных результатах лечения больных раком желудка с различной концентрацией sVEGFR2 в сыворотке крови, однако отмечено незначительное ухудшение результатов лечения при уровне маркера 9,0 и более нг/мл (табл. 3).

Таким образом, все изученные компоненты системы VEGF в растворимой форме в той или иной степени обладали прогностическими свойствами. Многофакторный анализ связи 3-х показателей (VEGF, sVEGFR1, sVEGFR2), а также критериев системы TNM с общей выживаемостью больных раком желудка выявил, что значимым независимым фактором прогноза длительности жизни больных раком желудка является только индекс M (наличие отдаленных метастазов) ($p=0,009$) и

уровень VEGF в сыворотке крови ($p=0,036$) (табл. 4).

В отличие от полученных нами ранее данных о прогностическом значении уровней ММП-7 и ММП-2 в плазме крови больных раком желудка [22], уровни ММП-2, 7 и 9 в сыворотке крови не были значимо связаны с общей выживаемостью пациентов, включенных в данное исследование.

Таким образом, продемонстрировано, что сигнальный путь ключевого регулятора ангиогенеза VEGF играет важную роль при раке желудка, как и при многих других онкологических заболеваниях. Компоненты этого сигнального пути – в первую очередь, VEGF A – являются значимыми факторами прогноза заболевания, а также могут быть полезны для мониторинга эффективности проводимого лечения. Особое значение исследование маркеров ангиогенеза приобретает в настоящее время, когда активно развиваются различные методы ан-



Общая выживаемость больных раком желудка с учетом концентрации VEGF в сыворотке крови.

Таблица 2

Общая выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентрации sVEGFR1 в сыворотке крови

sVEGFR1, пг/мл	n	Медиана срока жизни, мес	Общая выживаемость, %		
			1 год	2 года	3 года
≤94	24	21,2	77,4±11,5	49,5±15,4	49,5±15,4
95-116	25	Не достигнута	76,2±14,8	76,2±14,8	76,2±14,8
117-363	21	Не достигнута	90,9±8,7	79,5±13,1	79,5±13,1
>363	7	Не достигнута	100	66,7±27,2	66,7±27,2
p			0,45		

Таблица 3

Общая выживаемость больных раком желудка в зависимости от концентраций sVEGFR2 в сыворотке крови

sVEGFR2, нг/мл	n	Медиана срока жизни, мес	Общая выживаемость, %		
			1 год	2 года	3 года
<9,0	43	Не достигнута	91,5±5,7	76,8±9,3	76,8±9,3
≥9,0	34	19,8	57,3±14,8	45,8±15,6	45,8±15,6
p			0,08		

Результаты анализа с помощью многофакторной регрессионной модели Cox

Признак	Beta	t-value	Wald	p
T	0,01647±0,017524	1,44607	2,0911	0,148
N	0,014281±0,007567	1,57662	2,485738	0,20
M	1,637691±0,777904	2,50059	6,252929	0,009
VEGF	1,89113±1,000932	2,17952	4,750311	0,036
sVEGFR1	-0,0030±0,0036	-0,830155	0,689157	0,406
sVEGFR2	-1,12401±0,113517	-1,44387	2,084773	0,26

тиангиогенной терапии, некоторые из которых уже показали определенную эффективность при раке желудка. Полученные результаты соответствуют относительно немногочисленным публикациям по данному вопросу [23-25], в которых подчеркивается значение компонентов системы VEGF, циркулирующих в периферической крови для независимого прогноза, предсказания и мониторинга эффективности лечения рака желудка.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-14, 16-20, 22-28 см. REFERENCES)

1. Давыдов М.И., Туркин И.Н., Давыдов М.М. Энциклопедия хирургии рака желудка. М.: Эксмо; 2011.
15. Герштейн ЕС, Кушлинский НЕ: Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; (5):16-27.
21. Герштейн Е.С., Петросян А.П., Кушлинский Н.Е., Стилиди И.С. Сравнительная оценка содержания матриксных металлопротеиназ и компонентов сигнальной системы VEGF в сыворотке крови больных раком желудка. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; 5(4):71-2.

REFERENCES

1. Davydov M.I., Turkin M.M., Davydov M.M. Encyclopaedia of Gastric Cancer Surgery. Moscow: Eksmo; 2011. (in Russian)
2. Duffy M.J. Use of Biomarkers in Screening for Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015; 867: 27-39.
3. Wagner A.D., Syn N.L., Moehler M., Grothe W., Yong W.P., Tai B.C. et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017; 8:CD004064.
4. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 39(5):469-78.
5. Moch H., Montironi R., Lopez-Beltran A., Cheng L., Mischo A. Oncotargets in different renal cancer subtypes. *Curr. Drug. Targets*. 2015; 16(2):125-35.
6. Nguyen K., Jack K., Sun W. Hepatocellular Carcinoma: Past and Future of Molecular Target Therapy. *Diseases*. 2015; 4(1):1.
7. Dreanic J., Dhooge M., Barret M., Brezault C., Mir O., Chaussade S. et al. Anti-epidermal or anti-vascular endothelial growth factor as first-line metastatic colorectal cancer in modified Glasgow prognostic score 2⁺ patients. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015; 6(3):231-6.
8. Abdel-Rahman O. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in gastric cancer: preclinical and clinical aspects. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2015; 93(1):18-27.
9. Mawalla B., Yuan X., Luo X., Chalya P.L. Treatment outcome of anti-angiogenesis through VEGF-pathway in the management of gastric cancer: a systematic review of phase II and III clinical trials. *BMC research notes*. 2018; 11(1):21.

10. Qi W.X., Shen Z., Tang L.N., Yao Y. The role of anti-VEGF agents in the treatment of advanced gastric cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Tumour Biol*. 2014; 35(8):7675-83.
11. Macedo F., Ladeira K., Longatto-Filho A., Martins S.F. Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission? *J. Gastric Cancer*. 2017; 17(1):1-10.
12. Sato Y., Teruyama K., Nakano T., Oda N., Abe M., Tanaka K. et al. Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis. *Ann.N-Y Acad.Sci*. 2001; 947:117-23.
13. Iwasaka C., Tanaka K., Abe M., Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol*. 1996; 169(3):522-31.
14. Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res*. 1999; 19(2C):1589-92.
15. Gershtein E.S., Kushlinskii N.E. Clinical prospects of tumor-associated proteases and their tissue inhibitors investigation in oncologic patients. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2014; (5):16-27. (in Russian)
16. Li X., Zhu X., Wang Y., Wang R., Wang L., Zhu M.L. et al. Prognostic value and association of Lauren classification with VEGF and VEGFR-2 expression in gastric cancer. *Oncol. Lett*. 2019; 18(5):4891-9.
17. Chen J., Tang D., Wang S., Li Q.G., Zhang J.R., Li P. et al. High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumour Biol*. 2014; 35(3):2513-9.
18. Chen J., Li T., Wu Y., He L., Zhang L., Shi T. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma: a meta-analysis. *J. cancer Res. Clin. Oncol*. 2011; 137(12):1799-1812.
19. Liu L., Ma X.L., Xiao Z.L., Li M., Cheng S.H., Wei YQ. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in resected gastric cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012; 13(7): 3089-97.
20. Gershtein E.S., Korotkova E.A., Petrosyan A.P., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. Vascular Endothelial Growth Factor and Soluble Forms of Its Receptors 1 and 2 in Gastric Cancer. *Bull. Exper. Biol. Med.* 2021; 170(6): 791-4.
21. Gershtein E.S., Petrosyan A.P., Kushlinskii N.E., Stilidi I.S. Comparative evaluation of matrix metalloproteinases and VEGF signaling system components in blood serum of gastric cancer patients. *Uspekhi Molekulyarnoy Onkologii*. 2018; 5(4): 71-2. (in Russian)
22. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Ivannikov A.A., Davydov M.M., Chang V.L., Ognerubov N.A., Stilidi I.S. Clinical Significance of Matrix Metalloproteinases in Blood Plasma of Patients with Gastric Cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2019; 166(3): 373-376.
23. Bilgic C.I., Tez M. Serum VEGF levels in gastric cancer patients: correlation with clinicopathological parameters. *Turk. J. Med. Sci*. 2015; 45(1):112-7.
24. Kikuchi S., Obata Y., Yagyu K., Lin Y., Nakajima T., Kobayashi O. et al. Reduced serum vascular endothelial growth factor receptor-2 (sVEGFR-2) and sVEGFR-1 levels in gastric cancer patients. *Cancer Sci*. 2011; 102(4):866-9.
25. Ock C.Y., Nam A.R., Bang J.H., Kim T.Y., Lee K.H., Han S.W. et al. The distinct signatures of VEGF and soluble VEGFR2 increase prognostic implication in gastric cancer. *Am. J. Cancer Res*. 2015; 5(11):3376-88.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Дудко Г.А.¹, Дикунец М.А.¹, Вирюс Э.Д.², Крючков А.С.¹

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В СПОРТЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр физической культуры и спорта», 105005, Москва, Россия;

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва, Россия

В настоящем литературном обзоре приводится анализ достоинств и ограничений объектов биохимического контроля функционального состояния атлетов, а также перспективы использования альтернативных объектов для спортивной медицины. Традиционно инвазивные процедуры отбора биоматериала (венозная кровь, мышечная биопсия) являются золотым стандартом для исследования широкого спектра биомаркеров, которые могут использоваться в качестве эффективных диагностических инструментов контроля протекания адаптационных процессов, мониторинга работоспособности, перетренированности и общего состояния здоровья организма спортсменов, но эти методы болезненные, времязатратные и предъявляют ряд требований к хранению и транспортировке. В этой связи, актуальным является вопрос поиска альтернативных объектов для биохимического исследования, не имеющих вышеперечисленных недостатков. Не менее информативными и перспективными объектами биохимического мониторинга состояния спортсменов могут являться слюна и сухие пятна крови (СПК). Неинвазивный характер сбора слюны позволяет ускорить процесс отбора, снизить уровень гормона стресса и риск возможного инфицирования, при ее отборе не требуется специальное оборудование и квалифицированный медицинский персонал, что особенно актуально при нахождении спортсменов на учебно-тренировочных мероприятиях. Техника СПК успешно зарекомендовала себя с целью неонатального скрининга и изучения фармакокинетики лекарственных средств. Основными ее преимуществами являются простота отбора, малый объем биоматериала, высокая стабильность адсорбированных маркеров на поверхности карточек, отсутствие специальных требований к хранению и транспортировке, сокращение расходов на доставку образцов в лабораторию. В совокупности перечисленные преимущества позволят повысить частоту отбора биоматериала для точечного отслеживания влияния нагрузок на различные системы организма спортсменов. Сочетание СПК с иммунохимическим и масс-спектрометрическими методами может служить эффективным инструментом для исследования роли различных биомаркеров в рамках мониторинга функционального состояния спортсменов. Поиск научных материалов осуществляли в базе данных MedLine по ключевым словам «dry blood spots», «saliva», «sports medicine», «sample collection», «sports biochemistry».

Ключевые слова: биохимический анализ; биологическая жидкость; сухие пятна крови; слюна; спорт; обзор.

Для цитирования: Дудко Г.А., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Крючков А.С. Альтернативные и перспективные объекты биохимического анализа в спорте (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 655-660. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-655-660>

Для корреспонденции: Дудко Григорий Алексеевич, ст. науч. сотр. лаб. проблем спортивной подготовки; e-mail: dudko@vniifk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.04.2021

Принята к печати 21.05.2021

Опубликовано 29.11.2021

Dudko G.A.¹, Dikunec M.A.¹, Virjus E.D.², Krjuchkov A.C.¹

ALTERNATIVE AND PROMISING TARGETS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS IN SPORT (REVIEW OF LITERATURE)

¹Federal science center for physical culture and sport, 105005, Moscow, Russia;

²The institute of general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, Russia.

Current literature review provides an evaluation of advantages and limitations of biochemical control objects representing functional state of athletes as well as the outlook for using alternative targets regarding sports medicine. Traditionally, invasive procedures (venous blood collection, muscle biopsy) have been known as the gold standard for analyzing a wide range of biomarkers which could be employed as effective diagnostic tools to control the course of adaptation processes, monitor performance, overtraining and physical well-being of athletes, but these techniques are painful, time-consuming and place demands on storage and shipment. In this behalf finding an alternative objects for biochemical research that does not have disadvantages given above is the question of present interest. Saliva and dry blood spots (DBS) could serve as equally informative and promising targets for monitoring athletes' condition. The non-invasive nature of saliva collection allows to shorten sample collection time, reduce stress hormones levels and possible infection contamination. Moreover, collecting saliva process does not require special equipment and trained medical staff which is particularly important when athletes are at training camps. The DBS method has successfully proven itself with regard to neonatal screening and pharmacokinetics studies. Its key benefits are simplicity, small volume of bioliquid, enhanced stability of adsorbed biomarkers on the card surface, lack of special storage and transportation requirements and low costs for samples shipment to the laboratory. Taken together outlined advantages will provide the opportunity to increase the frequency of biomaterial collection to perform selective observation of training loads effects on various systems of athletes' body. The combination of DBS with immunochemical and mass-spectrometric approaches could serve as an efficient instrument to investigate the role of various biomarkers in monitoring the functional state of athletes. We searched for articles in MedLine database with the key words «dry blood spots», «saliva», «sports medicine», «sample collection», «sports biochemistry».

Key words: biochemical analysis; biological fluid; dry blood spots; saliva; sports; review.

For citation: Dudko G.A., Dikunec M.A., Virjus E.D., Krjuchkov A.C. Alternative and promising targets of biochemical analysis in sport (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 655-660 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-655-660>

For correspondence: *Dudko Grigoriy Alekseevich*, senior scientist of Sports preparation research laboratory; e-mail: dudko@vniifk.ru

Information about authors:

Dudko G.A., <https://orcid.org/0000-0002-1064-3283>;
Dikunec M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5945-0722>;
Virjus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>;
Krjuchkov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-9423-8092>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 21.04.2021

Accepted 21.05.2021

Published 29.11.2021

Для оценки динамики функционального состояния организма спортсмена во время тренировочного процесса наряду с педагогическими, используются и медико-биологические методы контроля, в частности, биохимический. Основной принцип, который должен быть положен в основу системы использования биохимических показателей в качестве средств контроля за оперативным, текущим и этапным состоянием спортсменов с учетом специализации спортсмена, предлагаемых нагрузок, этапа годового цикла и текущих тренировочных задач, – это непрерывный мониторинг динамики биохимических показателей на всем протяжении годового цикла подготовки. Целью динамического контроля за варьированием биохимических показателей является выявление индивидуальных коридоров их изменчивости под влиянием тренировочных нагрузок на различных периодах и этапах подготовки.

Для определения широкого спектра биомаркеров с целью мониторинга работоспособности, перетренированности и функционального состояния организма спортсменов чаще всего используют инвазивные процедуры получения биоматериала, в результате которых происходит микротравматизация мягких тканей [1]. Распространенными инвазивными процедурами применительно к спортивной медицине относятся отбор крови (сыворотки и/или плазмы) и мышечная биопсия. При использовании неинвазивного способа и отбора биоматериала не нарушается целостность кожного покрова и отсутствует контакт инородного предмета со слизистыми оболочками или внутренней полостью тела, например, отбор мочи, слюны, пота и методы визуализации (электрокардиограмма, компьютерная и магнитно-резонансная томографии).

Несмотря на то, что различные инвазивные и неинвазивные процедуры отбора биоматериала обладают теми или иными преимуществами относительно друг друга, систематический пробоотбор как у любителей, так и у спортсменов высокой квалификации, требует практического подхода, который не только не должен нарушать тренировочный процесс, но и быть удобным для тренерского штаба. Принимая во внимание большое количество исследований, посвященных изучению влияния физических нагрузок на организм спортсменов, можно заключить, что общий консенсус научных работ основывается на инвазивном подходе, вероятно, в результате большого количества потенциальных биомаркеров, доступных в сыворотке и плазме, а также многочисленных

литературных данных и, следовательно, возможности сравнения полученных результатов.

При проведении биохимических исследований, направленных на мониторинг функционального состояния спортсмена, в ходе текущего биохимического контроля тренировочного процесса анализ крови необходимо проводить многократно в зависимости от задач, например, до и после нагрузки, на следующий день, в динамике нагрузки. В связи с этим, многократная инвазивная процедура забора крови исключена. Кроме того, многократный отбор венозной крови не находит одобрения со стороны антидопинговых служб. Пробоотбор крови из периферической вены является болезненной, трудоемкой и времязатратной процедурой. Особенно это касается командных видов спорта, где принимает участие большое количество спортсменов, а также в детско-юношеском спорте. Инвазивные процедуры также вызывают значительный стресс у спортсмена, это может повлиять на секрецию некоторых гормонов стресса, таких как кортизол [2, 3]. Эти факторы становятся особенно важными при изучении количественной оценки стресса после физической нагрузки, которые могут привести к получению ложноположительных результатов и переоценке стресса, вызванного нагрузкой.

Внедрение практики, включающей использование неинвазивных методов, позволяющих точно оценивать вызванные нагрузками физиологический и психологический стрессы, важно для длительного непрерывного мониторинга динамики состояния спортсмена. Дополнительным преимуществом использования слюны по сравнению с отбором крови является простота устройств для сбора материала [4].

Слюна. Слюна – бесцветная жидкость, состоящая на 98 % из воды, плотностью 1002–1012 г/л и pH ~6.64 [5, 6], содержащая гормоны, пептиды, электролиты, муцин, антибактериальные соединения и различные ферменты [7]. Концентрации большинства этих соединений в слюне гораздо ниже, по сравнению с плазмой или сывороткой, тем не менее, они надежно отражают концентрации биомаркеров в крови [8, 9].

Секреция слюны в значительной степени управляется нейронным контролем вегетативной нервной системы, которая в свою очередь косвенно регулирует скорость выделения слюны. Последняя зависит от типа активируемого вегетативного рецептора, что влияет на состав биоматериала. Парасимпатическая холинергическая нервная стимуляция вызывает вазодилатацию

капилляров, снабжающих слюнные железы, тем самым усиливая кровоток. Следовательно, повышенный приток крови к железам связан с более высокой скоростью секреции слюны [10]. Несмотря на то, что парасимпатическая холинергическая стимуляция значительно влияет на нейронный контроль секреции слюны, стимуляция симпатической адренергической нервной системы также участвует в секреции биожидкости. Так, слюна, выделяемая подъязычной и малыми слюнными железами, регулируется стимуляцией симпатических нервов, в то время как секреция из околоушной и подчелюстной желез – стимуляцией парасимпатической иннервации [11]. Нормальная секреция слюны складывается из совместного действия парасимпатической и симпатической иннерваций, причем основным стимулом к увеличению секреции является стимуляция парасимпатического возбуждения [12]. Секреция слюны, индуцированная парасимпатической стимуляцией, характеризуется водянистым потоком слюны, содержащим незначительные концентрации органических и неорганических соединений [7]. Симпатическая стимуляция, напротив, приводит к выработке низкого объема биоматериала, который богат содержанием органических соединений (α -амилазы) и неорганических солей (Ca^{2+} , K^+ и HCO_3^-) [13]. Следовательно, повышенный уровень α -амилазы в слюне может служить потенциальным индикатором повышенной активности симпатической нервной системы [14]. В состоянии покоя у здоровых людей нестимулированная слюна выделяется со скоростью 0.30–0.65 мл/мин, тогда как стимуляция слюноотделения увеличивает скорость до 6.0 мл/мин [15,16]. Физические упражнения вызывают усиление симпатической активации, как следствие, интенсивные нагрузки могут привести к снижению скорости выделения слюны и изменить ее состав. Так, например, при длительных нагрузках, превышающих лактатный порог, скорость слюноотделения снижается [17]. Факторы, связанные с низкой секрецией слюны при высокоинтенсивных тренировках (> 60 % максимального потребления кислорода), включают активацию симпатических нервов, обезвоживание и гипервентиляцию, приводящие к потере жидкости за счет ее испарения. Тем не менее, парасимпатическая абстиненция более важна, чем симпатическая активация, поскольку она снижает скорость слюноотделения во время нагрузок [14].

Концентрации маркеров в слюне выражаются в 4-х различных единицах измерения:

1. абсолютная (мкг/мл, нмоль/л);
2. относительно скорости секреции (мкг/мин), применяемая к биомаркерам, концентрация которых зависит от скорости слюноотделения [18,19];
3. относительно массы белка (мкг/мг белка);
4. относительно осмоляльности слюны (мг/мосм), применяющейся в случае низкой скорости потока биожидкости [20].

В литературе наиболее часто встречаются два метода отбора слюны: с использованием ватных тампонов и пассивное слюноотделение в контейнер [21]. Преимущества сбора на ватные тампоны заключаются в минимизации риска кровотечения из десен и комфорте процедуры отбора биожидкости. Однако отбор биоматериала вторым методом является более надежным, поскольку материалы на основе хлопка или полиэстера имеют тенденцию повышать кислотность образца [1] и приводить к искажению количественного состава слюны [22], поскольку перемещение ватного тампона в

ротовой полости может стимулировать разные железы, тем самым влияя на ее состав [14]. Очевидным преимуществом метода пассивного слюноотделения является возможность определения скорости образования слюны путем фиксации времени отбора в предварительно взвешенный контейнер. Однако преимущества и недостатки описанных методов подвергаются сомнению, поскольку стимуляция слюноотделения влияет далеко не на все компоненты биоматериала. Например, изменение скорости слюны не влияет на концентрацию стероидных гормонов, так как они переносятся из крови методом пассивной диффузии, и, наоборот, скорость слюноотделения влияет на концентрацию IgA: при увеличении или уменьшении скорости абсолютное содержание IgA или уменьшается за счет разбавления, или увеличивается за счет концентрирования, соответственно [23].

Таким образом, альтернативным объектом биохимического исследования является слюна – биологическая жидкость с уникальным исследовательским потенциалом, получаемая неинвазивным способом, не имеющая ограничений по частоте отбора и объему образца, не требующая условий стерильности и не связанная с этическими ограничениями. Состав слюны практически полностью идентичен таковому в фракциях цельной крови и тесно связан с гомеостазом, а ее компоненты могут выступать в качестве количественных маркеров протекающих в организме процессов обмена веществ.

Сухие пятна крови. Традиционно, образцы цельной крови отбирают методом венепункции в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт, а для последующего хранения и транспортировки охлаждают. В зависимости от распределения определяемого биомаркера в различных компонентах крови биожидкость могут дополнительно разделять на фракции, например, плазму, эритроциты и мононуклеарные клетки периферической крови. С практической точки зрения плазма или сыворотка предпочтительнее цельной крови, ввиду возможного разрушения эритроцитов, затрудняющего дальнейшие стадии работы с биоматериалом. Однако для всех этих образцов хранение и транспортировка накладывают ряд неотъемлемых требований к логистике, а именно наличие холодильника, морозильника или сухого льда, что приводит к значительным расходам.

Об использовании сухих пятен крови (dried blood spots, СПК) в качестве альтернативной методики отбора биологических образцов для целей педиатрии R. Guthrie и соавт. [24] сообщили более 50 лет назад. Принцип СПК заключается в нанесении нескольких капель капиллярной крови, полученных в результате прокола кожи на пятке или пальце руки, на фильтровальную бумагу в форме карты (также известной как «карта Гутри») и последующей сушке без какой-либо дополнительной обработки. С химической точки зрения, определяемые соединения адсорбируются с компонентами крови на твердой матрице.

Образцы крови наносятся на специальные карточки, обладающие рядом весомых практических преимуществ: низкая стоимость; относительная простота изготовления и печати (маркировка и отслеживание образцов); предварительная химическая пропитка (в зависимости от целей применения); хорошие адсорбционные свойства [25]. На текущий момент коммерчески доступные бумажные карточки на основе целлюлозы для СПК производятся несколькими производителями, которые можно разделить на две группы: необработанные

ные и химически подготовленные. Необработанные карточки – 100% чистая хлопковая целлюлоза («Whatman 903», GE Healthcare Life Sciences, США; «Ahlstrom 226», PerkinElmer Health Sciences, США) – наиболее часто используют в программе скрининга новорожденных. Данные марки карточек зарегистрированы Управлением по надзору за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA) и Европейским союзом (ЕС) как медицинские изделия для *in vitro* диагностики класса II.

Вторая группа карточек изготавливается из целлюлозы, обработанной различными химическими веществами, например, додецилсульфатом натрия (< 5 %), трис-(гидроксиметил)аминометаном (< 5 %), гуанидинтиоционатом (30–50 %). Карточки этой группы не зарегистрированы как медицинские изделия. Изначально они разработаны для анализа нуклеиновых кислот, а добавление химических веществ предназначено для лизиса клеток, инактивации патогенных микроорганизмов, денатурации ферментов и других белков.

Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) разработано руководство по отбору образцов крови на данные адсорбционные материалы, поскольку способ отбора может привести к расхождению результатов [26]. Для стимуляции местного кровотока перед проколом разрешается сделать массаж или нагреть места отбора. После чего оно обрабатывается 70 % раствором изопропанола и прокалывается одноразовым стерильным ланцетом. Во избежание вытекания межклеточной жидкости первая капля крови удаляется, последующие наносятся на бумагу. Круги, напечатанные на бумаге (диаметр 12 мм), должны быть заполнены полностью и однородно. Образцам дают высохнуть при комнатной температуре в горизонтальном положении карточки (3–4 ч), после чего отправляют в лабораторию.

Адсорбция и твердая поверхность матрицы для получения СПК по большей части снижают реакционную способность анализируемых соединений по сравнению с жидкой кровью. Одним из ключевых преимуществ СПК является то, что при соблюдении нескольких простых мер предосторожности (упаковка карт в герметичные пакеты с осушителем) биомаркеры демонстрируют превосходную стабильность при температуре окружающей среды: от нескольких дней, а в ряде случаев и до нескольких месяцев. Кроме того, некоторые соединения нестабильны *ex vivo* в биологических жидкостях (например, в цельной крови и плазме) и требуют адаптированных процедур для предотвращения деградации [27, 28]. В таких случаях выбор техники СПК позволяет улучшить стабильность соединений без необходимости выполнения вышеупомянутых процедур. Использование СПК значительно упрощает пробоподготовку и кратковременное хранение, позволяя избежать необходимости в специальном лабораторном оборудовании (центрифуги, гомогенизаторы, холодильники, морозильники). Кроме того, анализ СПК снижает или устраняет риски биологической опасности. Доставка СПК до лабораторий осуществляется обычными почтовыми конвертами или курьерским транспортом, тогда как образцы плазмы должны транспортироваться на сухом льду. Транспортировка биоматериала с использованием сухого льда попадает под действие специальных правил Международной ассоциации воздушного транспорта и относится к грузам 9 класса опасности. van Amsterdam и соавторы [29] заявили, что 30 % посылок с сухим льдом имели проблемы с отправлением из-за неправильной упаковки

или неверно заполненной транспортной документации. Транспортировка СПК по сравнению с образцами цельной крови или ее фракций требует облегченных логистических процедур и представляет собой предпочтительный формат доставки биоматериала, особенно если исследования должны проводиться в удаленных местах или регионах с ограниченными ресурсами.

Помимо логистических требований преимущества СПК заключаются в простоте отбора биологического материала – необходимо сделать один прокол, с этой нетрудной операцией может справиться любой человек [30 – 32], тогда как для отбора венозной крови требуется квалифицированный медицинский специалист (флеботомист). Несмотря на то, что процесс прокалывания остается в определенной степени инвазивным, показано, что он более «удобен для пациента», лучше переносится и менее болезнен, чем венепункция [31, 33, 34]. С другой стороны, объем крови для нанесения на фильтровальную бумагу довольно мал (обычно несколько десятков микролитров), тогда как для стандартного отбора проб венозной крови в пробирки требуется от 0.1 мл до нескольких миллилитров биожидкости. СПК представляют особый интерес в случае тестирования спортсменов детско-юношеских школ.

Небольшое количество биоматериала и многокомпонентность матрицы приводят к аналитическим трудностям с точки зрения чувствительности и селективности определения информативных биомаркеров, что в совокупности может снизить интерес к использованию СПК. В рамках скрининга новорожденных, учитывая большое количество анализируемых образцов, пропуская способность и стоимость являются определяющими факторами в пользу выбора того или иного метода пробоотбора. С исторической точки зрения, с момента появления СПК в начале 1960-х гг. для целей неонатального скрининга предложены два ключевых методологических направления, позволивших нивелировать вышеуказанные аспекты. Первый из них – иммунохимический анализ (ИХА), для широкого применения которого в 1970-х гг. было развернуто производство моноклональных антител, что впоследствии привело к разработке коммерчески доступных диагностических наборов для большого количества биомаркеров. Безусловно, ИХА биологических субстанций сыграл важную роль в клиническом анализе и до сих пор используется в рамках программы неонатального скрининга. Однако из-за перекрестной реактивности с мешающими компонентами матрицы иммунохимические методики недостаточно селективны, разработка новых методик является времязатратным процессом, связанным с производством новых моноклональных антител, диагностические наборы имеют высокую стоимость.

Вторым ключевым методом анализа биомаркеров в СПК является масс-спектрометрия (МС), первое применение которого упоминается в работе J.Мее и соавт. [35]. Технический прогресс и расширение знаний в области МС привели к разработке технологии tandemной МС, которая оказалась одним из самых значительных достижений в области клинической диагностики и послужила толчком к сдвигу устоявшейся парадигмы «один анализ – одно заболевание» к модели «один анализ – множество болезней», когда в одном анализе стало возможным быстро детектировать несколько маркеров [36].

В последние годы многие фармацевтические компании проводят количественный анализ лекарственных

средств и их метаболитов в СПК. Такой интерес вызван несколькими причинами: (1) сокращение затрат на транспортировку и логистику в многоцентровых исследованиях, (2) более удобная техника сбора образцов крови и (3) сокращение количества лабораторных животных на стадии доклинических испытаний.

В течение последнего десятилетия активно исследуется возможность использования СПК в качестве дополнительной матрицы в области допинг-контроля, поскольку при тестировании на наличие/отсутствие запрещенных субстанций первостепенное значение имеет надежный, недорогой и простой способ пробоотбора [37]. СПК, как дополнительная матрица, дает возможность увеличить количество точек антидопингового контроля спортсменов и, следовательно, расширить и улучшить стандартные программы тестирования во внесоревновательный период. С помощью техники СПК могут быть сужены аналитические ограничения, связанные с короткими временными окнами обнаружения ряда метаболитов допинговых субстанций. Техника СПК может успешно применяться для тестирования и в соревновательный период, поскольку факт приема запрещенных веществ, повышающих результативность выступления, неоспоримо доказывается фармакологически значимым изменением их концентраций в крови. Это имеет решающее значение в отношении субстанций, запрещенных только в соревновательный период, а также для пороговых соединений [38]. Таким образом, определение текущей концентрации запрещенного вещества в кровотоке спортсмена имеет преимущества для обеих сторон: тестирующие органы получают информацию о концентрации активной формы соединения и, следовательно, могут более точно оценить ее значимость, тогда как у спортсмена есть возможность доставить образец СПК для подтверждения отсутствия запрещенной субстанции в случае, если в образце его мочи обнаружен (неактивный) метаболит, косвенно указывающий на нарушение антидопинговых правил. В обоих случаях результаты анализа СПК, несомненно, повлияют на последующие санкции в отношении спортсмена [39].

Еще одним важным преимуществом СПК в области борьбы с допингом является возможность длительного хранения большого количества карточек (эквивалентных допинг-пробам), отобранных на крупных спортивных мероприятиях, для последующего ретроспективного анализа с использованием более чувствительных методов анализа. На данный момент учеными в области антидопингового контроля разработаны МС методики количественного определения ряда стимуляторов (кокаин, амфетамин, псевдоэфедрин), JWH-018 и сальбутамола [38], анаболических андрогенных стероидов (станозолол, дегидрохлорметилтестостерон) [39], а также 46 пептидных и непептидных агонистов рецепторов грелина, гонадорелина, гормона роста и вазопрессина [40].

Выводы. На основании проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что слюна, рассматриваемая нами как альтернативный объект биохимического контроля в спорте, может предоставить количественную нейрофизиологическую оценку динамики состояния организма спортсмена с использованием неинвазивной процедуры. Простота техники отбора и широкая панель информативных биомаркеров значительно расширяют возможности мониторинга оперативного, текущего и этапного состояний спортсмена.

Техника СПК, успешно зарекомендовавшая себя в педиатрии и фармакологии, а также активно развивающаяся в области антидопингового контроля, представляется нам перспективным объектом биохимического мониторинга. Обладая такими уникальными преимуществами, как малый объем образца, высокая стабильность биомаркеров, отсутствие специальных требований к хранению и транспортировке и низкие сопутствующие расходы, она в сочетании с современными высокотехнологичными методами анализа способна придать новый импульс к развитию и совершенствованию программ тестирования спортсменов всех возрастных групп.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mosby. Mosby's medical dictionary, 8th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier; 2009.
2. Eastell R., Brandi M.L., Costa A.G., D'Amour P., Shoback D.M., Thakker R.V. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the Fourth International Workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(10): 3570-9.
3. Weckesser L.J., Plessow F., Pilhatsch M., Muehlhann M., Kirschbaum C., Miller R. Do venepuncture procedures induce cortisol responses? A review, study, and synthesis for stress research. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;46: 88-99.
4. Lindsay A., Lewis J.G., Scarrot C., Gill N., Gieseg S.P., Draper N. Assessing the effectiveness of selected biomarkers in the acute and cumulative physiological stress response in professional rugby union through non-invasive assessment. *Int. J. Sports Med.* 2015;36(6): 446-54.
5. Schneyer L.H., Young J.A., Schneyer C.A. Salivary secretion of electrolytes. *Physiol. Rev.* 1972;52(3):720-7.
6. Kreusser W., Heidland A., Hennemann H., Wigand M.E., Knauf H. Mono- and divalent electrolyte patterns, pCO₂ and pH in relation to flow rate in normal human parotid saliva. *Eur. J. Clin. Invest.* 1972;2(6): 398-406.
7. Chicharro J.L., Lucia A., Perez M., Vaquero A.F., Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med.* 1998;26(1):17-27.
8. Cadore E., Lhullier F., Brentano M., Silva E., Ambrosini M., Spinelli R. et al. Correlations between serum and salivary hormonal concentrations in response to resistance exercise. *J. Sports Med.* 2008;26(10):1067-72.
9. Sannikka E., Terho P., Suominen J., Santti R. Testosterone concentrations in human seminal plasma and saliva and its correlation with non-protein-bound and total testosterone levels in serum. *Int. J. Androl.* 1983;6(4):319-30.
10. Baum B.J. Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* 1987;66(1):628-32.
11. Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann J.T., de Braud F., Schuch G., Zubel A. et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann. Oncol.* 2011;22(7):1535-46.
12. Ramos D., Martins E.G., Viana-Gomez D., Casimiro-Lopez G., Salerno V.P. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2013;38(5):507-11.
13. de Oliveira V.N., Bessa A., Lamounier R.P.M.S., de Santana M.G., de Mello M.T., Espindola F.S. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. *Int. J. Sports Med.* 2010;31(6):377-81.
14. Turpeinen U., Hamalainen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;27(6):795-801.
15. Heintze U., Birkhed D., Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed. Dent. J.* 1983;7(6):227-38.
16. Watanabe S., Dawes C. The effects of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man. *Arch. Oral. Biol.* 1988;33(1):1-5.
17. Pilardeau P., Richalet J.P., Bouissou P., Garnier M., Vaysse J., Margo J.N. et al. Secretion salivaire et exercice physique. *Med. Sport.* 1992;66(3-4):111-4.

BIOCHEMISTRY

18. Bosch J.A., Ring C., de Geus E.J.C., Veerman E.C.I., Amerongen A.V.N. Stress and secretory immunity. *Int. Rev. Neurobiol.* 2002;52:213-53.
19. Bishop N.C., Walker G.J., Scanlon G.A., Richards S., Rogers E. Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2006;38(3):513-9.
20. Sari-Sarraf V., Reilly T., Doran D.A., Atkinson G. The effects of single and repeated bouts of soccer-specific exercise on salivary IgA. *Arch. Oral. Biol.* 2007;52(6):526-32.
21. Granger D.A., Weisz J.R., McCracken J.T., Kauneckis D., Ikeda S. Testosterone and conduct problems. *J. Am. Child. Adolesc. Psychiatry.* 1994;33(6):908.
22. Muramatsu Y., Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 1994;35(3):139-51.
23. Bishop N.C., Gleeson M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front. Biosci.* 2009;14(2):4444-56.
24. Guthrie R., Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963;32:338-43.
25. Pelton R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends Analyt. Chem.* 2009;28(8):925-42.
26. Clinical and laboratory standards institute. Blood collection on filter paper for newborn screening programs. Approved standard, 6th ed. NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
27. Chen J., Hsieh Y. Stabilizing drug molecules in biological samples. *Ther. Drug Monit.* 2005;27(5):617-24.
28. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. *Biomed. Chromatogr.* 2011;25(1-2):258-77.
29. van Amsterdam P., Waldrop C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis.* 2010;2(11):1783-6.
30. Fokkema M.R., Bakker A.J., de Boer F., Kooistra J., de Vries S., Wolhuis A. HbA1c measurements from dried blood spots: validation and patient satisfaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009;47(10):1259-64.
31. Leichtle A.B., Ceglarek U., Witzigmann H., Gabel G., Thiery J., Fiedler G.M. Potential of dried blood self-sampling for cyclosporine C₀ monitoring in transplant outpatients. *J. Transplant.* 2010;6:1-6.
32. Alodaib A., Carpenter K., Wiley V., Sim K., Christodoulou J., Wilcken B. An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples. *Ann. Clin. Biochem.* 2011;48(5):468-70.
33. Merton G., Jones K., Lee M., Johnston A., Holt D.W. Accuracy of cyclosporin measurements made in capillary blood samples obtained by skin puncture. *Ther. Drug Monit.* 2000;22(5):594-8.
34. Woods K., Douketis J.D., Schnurr T., Kinnon K., Powers P., Crowther M.A. Patient preferences for capillary vs. venous INR determination in an anticoagulation clinic: a randomized controlled trial. *Thromb. Res.* 2004;114(3):161-5.
35. Mee J.M.L., Korth J., Halpern B. Rapid and quantitative blood analysis for free fatty acids by chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Lett.* 1976;9(12):1075-83.
36. Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin. Chem.* 2003;49(11):1797-1817.
37. Thomas A., Geyer H., Guddat S., Schanzer W., Thevis M. Dried blood spots (DBS) for doping control analysis. *Drug Test. Anal.* 2011;3(11-12):806-13.
38. Tretzel L., Thomas A., Geyer H., Pop V., Schanzer W., Thevis M. Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies. *Anal. Methods.* 2015;7(18):7596-7605.
39. Thevis M., Kuuranne T., Dib J., Thomas A., Geyer H. Do dried blood spots (DBS) have the potential to support result management processes in routine sports drug testing? *Drug Test. Anal.* 2020;12(6):704-10.
40. Lange T., Thomas A., Walpurgis K., Thevis M. Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020;412(14):3765-77.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Донсков С.И.¹, Буланов А.Ю.², Симарова И.Б.², Белякова В.В.³, Майорова О.А.³,
Кравцова Е.А.^{4,5}, Вакульчик И.О.⁶, Юркевич Т.Ю.⁷, Белуга М.В.⁷, Зубарева Л.М.⁸,
Михайлова Н.М.⁸, Васильев Н.И.⁸, Давыдова Л.Е.⁹, Бурдинская Ю.В.¹⁰, Крюковский С.Б.¹¹

ГРУППЫ КРОВИ АВ0 И РЕЗУС КАК ФАКТОР РИСКА ОРВИ COVID-19

¹ФДПО ГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России, 127473, г. Москва, Россия;

²Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения г. Москвы, 123182, г. Москва, Россия;

³ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова ДЗМ», 125284, г. Москва, Россия;

⁴Гомельская городская поликлиника № 1, 246013, г. Гомель, Республика Беларусь;

⁵Гомельская городская клиническая больница № 2, 246027, г. Гомель, Республика Беларусь;

⁶Гомельская городская клиническая больница № 3, 246013, г. Гомель, Республика Беларусь;

⁷ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», 220053, г. Минск, Республика Беларусь;

⁸ОГБУЗ «Смоленский Центр крови», 214014, г. Смоленск, Россия;

⁹ГБУ РС(Я) «Станция переливания крови», 677005, г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия;

¹⁰ОГБУЗ «Клиническая больница № 1», 214006, г. Смоленск, Россия;

¹¹ФГБОУ ВО Смоленский государственный медицинский университет Минздрава России, 214006, г. Смоленск, Россия

Исследовали частоту групп крови АВ0 и резус у 12 120 больных ОРВИ COVID-19, 5180 доноров антиковидной плазмы и 118 801 здоровых доноров жителей гг. Москвы, Смоленска, Якутска, Минска и Гомеля. У инфицированных лиц частота группы крови А оказалась существенно выше, чем у неинфицированных (41,54 % и 34,39 % соответственно, $p < 0,05$), а частота группы крови 0, наоборот, существенно ниже (27,69 % и 36,71 %, $p < 0,05$). Частота группы крови А была особенно высока среди больных, погибших от ОРВИ COVID-19, – 45,51 % против 34,39 %, $p = 0,008$. В отдельных группах больных отмечено снижение частоты резус-отрицательных лиц (2,23 % против 8,30 %, $p < 0,001$).

Ключевые слова: группы крови АВ0; резус-фактор; ОРВИ COVID-19.

Для цитирования: Донсков С.И., Буланов А.Ю., Симарова И.Б., Белякова В.В., Майорова О.А., Кравцова Е.А., Вакульчик И.О., Юркевич Т.Ю., Белуга М.В., Зубарева Л.М., Михайлова Н.М., Васильев Н.И., Давыдова Л.Е., Бурдинская Ю.В., Крюковский С.Б. Группы крови АВ0 и резус как фактор риска ОРВИ COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-661-665>

Для корреспонденции: Донсков Сергей Иванович, д-р мед. наук, проф., каф. производственной и клинической трансфизиологии; e-mail: donsi@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 20.07.2021

Принята к печати 20.08.2021

Опубликовано 29.11.2021

*Donskov S.I.¹, Bulanov A.Yu.², Simarova I.B.², Belyakova V.V.³, Mayorova O.A.³, Kravtsova E.A.^{4,5},
Vakulchik I.O.⁶, Yurkevich T.Yu.⁷, Beluga M.V.⁷, Zubareva L.M.⁸, Mikhailova N.M.⁸, Vasiliev N.I.⁸,
Davydova L.E.⁹, Burdinskaya Yu.V.¹⁰, Kryukovskiy S.B.¹¹*

AB0 AND RHESUS BLOOD GROUPS AS A RISK FACTOR FOR ARVI COVID-19

¹FDPO GBOU VO «Moscow State University of Medicine and Dentistry. A.I. Evdokimov» Ministry of Health of Russia, 127473, Moscow, Russia;

²City Clinical Hospital No. 52 of the Moscow Department of Health, 123182, Moscow, Russia;

³GBUZ «Blood Center nam. O.K. Gavrilo DZM», 125284, Moscow, Russia;

⁴Gomel city polyclinic No. 1, 246013, Gomel, Republic of Belarus;

⁵Gomel city clinical hospital No. 2, 246027, Gomel, Republic of Belarus;

⁶Gomel City Clinical Hospital No. 3, 246013, Gomel, Republic of Belarus;

⁷State Institution Republican Scientific and Practical Center «Mother and Child», 220053, Minsk, Republic of Belarus;

⁸OGBUZ «Smolensk Blood Center», 214014, Smolensk, Russia;

⁹GBU RS (Y) «Blood Transfusion Station», 677005, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia;

¹⁰OGBUZ «Clinical Hospital No. 1», 214006, Smolensk, Russia;

¹¹FGBOU VO Smolensk State Medical University, Ministry of Health of Russia, 214006, Smolensk, Russia

The frequency of AB0 and Rhesus blood groups was studied in 12120 patients with COVID-19, 5180 convalescent plasma donors and 118801 healthy donors from Moscow, Smolensk, Yakutsk, Minsk and Gomel. In infected individuals, the frequency of blood group A was significantly higher than in uninfected individuals (41,54 % and 34,39 % respectively, $p < 0,05$), and the frequency of blood group 0, on the contrary, was significantly lower (27,69 % and 36,71 %, $p < 0,05$). The frequency of blood group A was

particularly high among patients who died from ARVI COVID-19 – 45,51 % vs. 34,39 %, $p=0,008$. In some groups of patients, there was a decrease in the frequency of Rh-negative individuals (2,23 % vs. 8,30 %, $p<0,001$).

Key words: AB0 blood groups; Rh factor; ARVI COVID-19.

For citation: Donskov S.I., Bulanov A.Yu., Simarova I.B., Belyakova V.V., Mayorova O.A., Kravtsova E.A., Vakulchik I.O., Yurkevich T.Yu., Beluga M.V., Zubareva L.M., Mikhailova N.M., Vasiliev N.I., Davydova L.E., Burdinskaya Yu.V., Kryukovskiy S.B. Blood groups AB0 and Rh as a risk factor for ARVI COVID-19. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 661-665 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-661-665>

For correspondence: Donskov Sergey Ivanovich, Doctor of Medical Sciences, professor, Department of Industrial and Clinical Transfusiology; e-mail: donsi@mail.ru

Information about authors:

Donskov S.I.,	https://orcid.org/0000-0001-8811-398X ;
Bulanov A.Yu.,	https://orcid.org/0000-0001-6999-8145 ;
Simarova I.B.,	https://orcid.org/0000-0002-9042-3917 ;
Belyakova V.V.,	https://orcid.org/0000-0001-8954-1281 ;
Mayorova O.A.,	https://orcid.org/0000-0002-8589-7122 ;
Kravtsova E.A.,	https://orcid.org/0000-0002-2188-7304 ;
Vakulchik I.O.,	https://orcid.org/0000-0002-0715-7356 ;
Yurkevich T.Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-4942-4210 ;
Beluga M.V.,	https://orcid.org/0000-0002-9877-4797 ;
Zubareva L.M.,	https://orcid.org/0000-0001-8761-7852 ;
Mikhailova N.M.,	https://orcid.org/0000-0003-3879-0573 ;
Vasiliev N.I.,	https://orcid.org/0000-0002-3903-4190 ;
Davydova L.E.,	https://orcid.org/0000-0001-5256-9504 ;
Burdinskaya Yu.V.,	https://orcid.org/0000-0003-3338-7988 ;
Kryukovsky S.B.,	https://orcid.org/0000-0001-8235-9225 .

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.07.2021
Accepted 20.08.2021
Published 29.11.2021

Введение. Исследования последних лет свидетельствует о том, что группы крови AB0 и резус связаны с некоторыми патологическими состояниями [1–4]. Лица с группой крови A(II) чаще встречаются среди больных гриппом и другими респираторными вирусными инфекциями [2, 3]. Группа крови A превалирует у больных раком желудка и молочной железы [4]. Лица с группой крови A, как и резус-отрицательные лица, чаще вырабатывают антиэритроцитарные, антилимфоцитарные и антистафилококковые антитела [5, 6].

В связи с пандемией острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) COVID-19, вызванной коронавирусом *SARS-CoV-2*, возникла необходимость установления факторов риска развития данного заболевания. В частности показано, что лица, имеющие группу крови A, в большей степени подвержены риску ОРВИ COVID-19 [7–9]. Вместе с тем лица, имеющие группу крови 0 и резус-отрицательный фенотип, реже встречаются среди инфицированных [10]. Отмечена связь ОРВИ COVID-19 с генными комплексами, кодирующими групповые антигены AB0, Lewis и Lutheran, а также активаторы антивирусных рестрикционных ферментов и интерферона [11]. Некоторые исследователи не обнаружили достоверных корреляций между группой крови и риском инфицирования *SARS-CoV-2* [12, 13]. В связи с отсутствием подобных работ в Российской Федерации мы сочли целесообразным восполнить этот пробел.

Цель исследования – установить связь ОРВИ COVID-19 с групповой- и резус-принадлежностью в восточно-европейской популяции (Российская Федерация и Республика Беларусь).

Материал и методы. Материалом исследования служили образцы крови больных COVID-19 и перенесших это заболевание доноров антиковидной плазмы

(АКП) жителей городов Москвы, Смоленска и Якутска (Российская Федерация), Минска и Гомеля (Республика Беларусь).

Анализовали распределение групп крови среди 10 878 больных COVID-19 и 3589 доноров АКП (Москва), 426 больных COVID-19 и 1528 доноров АКП (Смоленск), 313 больных COVID-19 и 63 доноров АКП (Якутск), 503 больных COVID-19 беременных женщин (Минск, Гомель).

Контролем служила частота групп крови среди здоровых лиц: 92 651 донора (Москва), 3160 доноров (Смоленск), 19 509 доноров (Якутск), 3481 интактного пациента лечебных учреждений (Минск, Гомель).

COVID-19 диагностировали на основании выявления у обследуемых РНК *SARS-CoV-2* с помощью полимеразной цепной реакции. Группу крови определяли общепринятыми серологическими методами.

Статистические методы. Статистический анализ проводили по программе медицинская статистика (<http://medstatistic.ru/calculators/calsize>). Различия в группах сравнения считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Среди больных ОРВИ COVID-19 в г. Москве группа крови A встречалась чаще – 39,11 % при норме 35,95 % ($p<0,001$). Группа крови 0, напротив, встречалась реже – 31,47 %, по сравнению с контролем – 34,66 % ($p<0,001$). Различий в частоте групп крови B и AB в сравниваемых когортах не выявили: 20,72 и 8,68 % ($p=0,858$) против 20,63 и 8,73 % ($p=0,876$) соответственно (см. таблицу).

В г. Москве среди доноров АКП отмечено статистически значимое снижение частоты группы крови 0 (30,89 %), по сравнению с контролем (34,66 %), $p<0,001$. Частота группы крови A при этом оказалась незначительно выше: у доноров АКП – 36,69 %, у интактных доноров –

35,95 % ($p=0,537$). Отмечалась тенденция к повышению частоты группы крови АВ – 9,61 % (в контроле 8,73 %), $p=0,097$. Следует отметить более высокую частоту лиц с группой крови В среди доноров АКП – 22,79 % (в контроле 20,63 %, $p=0,013$).

Так же, как и в г. Москве, среди больных COVID-19 в г. Смоленске отмечено снижение частоты группы крови 0 (27,69 %), по сравнению с контролем (36,71 %), $p=0,010$. Группа крови А встречалась достоверно чаще – 41,54 % против 34,39 % ($p=0,049$). Частота группы А была наиболее высока среди пациентов, погибших от COVID-19, – 45,51 % против 34,39 % (147 человек из 323, $p=0,008$). Вместе с тем в данной когорте частота группы 0 была существенно ниже – 26,31 % против 36,71 % (85 из 323, $p=0,009$). Статистически значимых различий в соотношении групп крови В и АВ у больных ОРВИ COVID-19 и здоровых в г. Смоленске не выявили.

Для оценки связи групповой принадлежности крови с ОРВИ COVID-19 использовали совокупную частоту групп крови А+АВ и 0+В с тем, чтобы подчеркнуть, что этот феномен связан не с группой крови как таковой, а с группоспецифическим полисахаридом А, присутствующим у лиц, имеющих группу крови А и АВ и отсутствующим у лиц, имеющих группу крови 0 и В. Как прави-

ло, во всех популяциях совокупная частота групп крови 0+В выше, чем А+АВ. Однако среди больных ОРВИ COVID-19 этот показатель, наоборот, смещался в сторону увеличения доли А+АВ. Так, в г. Москве совокупная частота А+АВ составила 47,79 %, а в контроле 44,69 % ($p<0,001$). Одновременно уменьшилась доля 0+В – 52,20 % против 55,3 % ($p<0,001$).

Совокупная частота А+АВ у больных ОРВИ COVID-19 в г. Смоленске составила 52,11 % ($p=0,056$). Достоверно выше данный показатель оказался среди больных, погибших от COVID-19, – 55,72 % ($p=0,017$), по сравнению с его частотой в контрольной группе 43,98 %.

Среди доноров АКП г. Смоленска отмечалось статистически значимое снижение частоты группы крови 0 по сравнению с контролем – 31,28 против 36,70 % ($p=0,011$). Существенных различий между частотой группы А(II) у доноров АКП и у интактных доноров не выявили – 34,64 и 34,39 % соответственно ($p=0,296$), но при этом имелась тенденция повышения совокупной частоты лиц А+АВ – 47,10 против 43,98 % ($p=0,206$) и снижения частоты лиц 0+В – 52,80 против 56,01 % ($p=0,264$).

В Республике Беларусь при отсутствии статистической значимости различий в сравниваемых когортах проявилась тенденция к увеличению частоты групп крови А

Распределение групп крови АВ0 у больных COVID-19, доноров АКП и здоровых доноров в России и Республике Беларусь (2020–2021 гг.)

Город	Контингент обследованных	Показатели	Количество лиц, имеющих группу крови				
			0	А	В	АВ	всего
Москва	Больные	<i>n</i>	3424	4254	2255	945	10878
		%	31,47	39,11	20,72	8,68	99,97
		<i>p</i>	<0,001	<0,001	=0,858	=0,876	
	Здоровые	<i>n</i>	32120	33315	19122	8094	92651
		%	34,66	35,95	20,63	8,73	
		<i>p</i>					
Доноры АКП	<i>n</i>	1109	1317	818	345	3589	
	%	30,89	36,69	22,79	9,61	99,98	
	<i>p</i>	<0,001	=0,537	=0,013	=0,097		
Смоленск	Больные	<i>n</i>	118	177	86	45	426
		%	27,69	41,54	20,18	10,56	99,95
		<i>p</i>	=0,010	=0,050	=0,723	=0,565	
	Здоровые	<i>n</i>	1160	1087	610	303	3160
		%	36,71	34,39	19,30	9,58	99,97
		<i>p</i>					
Доноры АКП	<i>n</i>	478	560	329	161	1528	
	%	31,28	34,64	21,53	10,53	99,98	
	<i>p</i>	=0,011	=0,296	=0,146	=0,357		
Якутск	Больные	<i>n</i>	98	103	76	36	313
		%	29,31	32,53	25,7	12,44	99,98
		<i>p</i>	=0,232	=0,130	=0,461	=0,324	
	Здоровые	<i>n</i>	7020	5397	5209	1883	19509
		%	35,98	27,66	26,70	9,65	99,99
		<i>p</i>					
Доноры АКП	<i>n</i>	18	22	19	4	63	
	%	28,57	34,92	30,15	6,34	99,98	
	<i>p</i>	=0,388	=0,347	=0,643	=0,414		
Гомель, Минск	Больные	<i>n</i>	167	201	92	43	503
		%	33,2	39,96	18,29	8,54	99,99
		<i>p</i>	=0,547	=0,658	=0,767	=0,431	
Здоровые	<i>n</i>	1224	1337	660	260	3481	
	%	35,16	38,41	18,96	7,46	99,98	

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия в группах сравнения.

и АВ среди инфицированных беременных женщин по сравнению с неинфицированными: частота группы крови А у больных составила 39,96 %, в контроле 38,41 % ($p=0,658$); частота группы крови АВ у больных составила 8,54 %, в контроле 7,46 % ($p=0,431$). Лиц с группой крови 0 среди инфицированных беременных в Республике Беларусь выявили меньше, чем среди интактных лиц – 33,20 % против 35,16 %, однако эти различия не были статистически значимыми ($p=0,547$). Частота имеющих полисахарид А в когорте инфицированных SARS-CoV-2 в Беларуси оказалась незначительно выше, чем в контроле: среди больных – 48,50 % (244 из 503), среди здоровых – 45,87 % (1597 из 4381), $p=0,505$.

Среди больных COVID-19 в г. Якутске совокупная частота лиц, имеющих антиген А (А+АВ), имела тенденцию к повышению: 44,40 % (139 из 313) против 37,31 % (7280 из 19 509), $p=0,091$. Совокупная частота не имеющих антигена А (0+В) среди больных г. Якутска незначительно отличалась от таковой в контрольной группе: среди больных частота 0+В составила 55,59 % (98+76=174 из 313), а среди здоровых – 64,00 % (7020+5209=12 229 из 19 509), ($p=0,208$). Частота группы 0 была несколько ниже среди больных – 29,31 % по сравнению со здоровыми – 35,98 % ($p=0,232$).

Что касается резус-фактора, в г. Якутске достоверно реже встречались резус-отрицательные лица среди больных – 2,23 %, а также среди доноров АКП – 6,34 % против 8,30 % в контрольной группе ($p<0,001$).

Тенденция к уменьшению доли резус-отрицательных доноров АКП наблюдалась в г. Смоленске – 18,71 %, в контроле – 19,93 % ($p=0,417$). У больных г. Смоленска, напротив, резус-отрицательный фенотип выявляли несколько чаще: 22,06 % (94 из 426) при контрольном значении 19,93 % (630 из 3160), $p=0,406$. В Республике Беларусь имела место тенденция к снижению количества резус-отрицательных лиц среди больных (13,70 %), по сравнению со здоровыми (16,80 %), ($p=0,135$).

Следует учитывать, что выборка доноров АКП может не отражать истинного соотношения групп крови среди инфицированных SARS-CoV-2, поскольку в когорту доноров АКП не включают лиц, отведенных от донорства в связи с тяжестью заболевания или последствиями перенесенной инфекции, а также умерших в результате этой инфекции.

В целом полученные данные позволяют полагать, что люди, имеющие группы крови А и АВ, в большей мере подвержены инфицированию вирусом SARS-CoV-2 по сравнению с людьми, имеющими группы крови 0 и В. Одной из причин такой неодинаковой устойчивости к инфекции могут служить особенности структуры группоспецифических полисахаридов. Полисахариды А более полиморфны, чем 0 и В, в силу чего являются, по-видимому, более комплементарными лигандами для вируса SARS-CoV-2 по сравнению с группоспецифическими полисахаридами 0 и В. В связи с этим тропность вируса SARS-CoV-2 к эпителию легочных альвеол у носителей определенных разновидностей антигена А может оказаться выше, чем у носителей антигенов 0 и В. Следует также учитывать, что лица, имеющие группу крови А, являются слабыми продуцентами интерферона [15].

Во всех исследованных когортах больных отмечалось увеличение частоты группы АВ. Однако по сравнению с частотой группы крови А, имеющей высокую степень корреляции с ОРВИ COVID-19, корреляция частоты

группы крови АВ с ОРВИ COVID-19 не выражена, поскольку сглаживается в результате взаимовлияния двух противоположных признаков: полисахарид А связан с фактором риска инфекции, а полисахарид В, наоборот, – с протекторным фактором в отношении этой инфекции.

Не исключено, что гомозиготы (А/А) имеют больший риск заражения вирусом SARS-CoV-2, чем гетерозиготы (А/0), поскольку групповой полисахарид 0 связан с большей устойчивостью к инфекции.

При изучении ассоциации резус-принадлежности с ОРВИ COVID-19 нам не удалось получить однозначных результатов, что могло быть обусловлено особенностями выборок. В частности, пул больных в г. Смоленске был представлен пациентами, у которых наблюдалось тяжелое течение заболевания, нередко с летальным исходом. В Республике Беларусь когорта инфицированных вирусом SARS-CoV-2 была представлена беременными женщинами. Следует отметить, что беременность инициирует состояние особой иммунологической толерантности, которая распространяется не только на аллоантигены плода, но и на антигенные детерминанты иного происхождения [16].

Статус D–, по-видимому, снижает риск заражения вирусом SARS-CoV-2, что подтверждается последними работами зарубежных авторов [10, 14].

Выводы. Связь группоспецифического полисахарида А с развитием ОРВИ COVID-19 очевидна, статистически значима. Частота лиц, имеющих группоспецифический полисахарид А, среди заболевших ОРВИ COVID-19 в среднем не превышает 10 % от нормального распределения. Однако, не будучи столь значительным, этот количественный показатель мотивирует поиск дополнительных мер профилактики ОРВИ COVID-19 сверх установленных и заслуживает углубленного изучения. Отмечено достоверное снижение частоты лиц D– в некоторых выборках инфицированных вирусом SARS-CoV-2.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 7-14 см. REFERENCES)

4. Герасимова Н.Д. Распределение эритроцитарных аллоантигенов и антител у онкологических больных. Дисс... канд. биол. наук. Москва; 2003.
5. Донсков С.И., Мороков В.А. Группы крови человека. Руководство по иммуносерологии. М.: ИП Скороходов В.А.; 2011: 264–7.
6. Донсков С.И., Авраменко И.П., Дубинкин И.В., Кравчук О.А., Скудицкий А.Е., Кравцова Е.А. и др. Группы крови и аллоиммунизация. Сообщение II. Связь резус-принадлежности со способностью вырабатывать антитела. *Вестник службы крови России*. 2014; (4): 3–6.
15. Донсков С.И., Еремкина Е.И., Митрофанова Н.М., Готовцева Е.П. Характеристика интерферонпродуцирующей способности лейкоцитов здоровых лиц. 56-я научная сессия ЦНИИГПК: материалы. Москва; 1984: 51–2.
16. Косяков П.Н. Изоантигены и изоантитела человека в норме и патологии. М.: Медицина; 1974.

REFERENCES

1. Cooling L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(3): 801–70.
2. Hutson A., Atmar B., Graham D., Estes M. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(9): 1335–7.
3. Cheng Y., Cheng G., Chui C.H., Lau F.Y. ABO blood group and susceptibility to severe acute respiratory syndrome. *JAMA*. 2005; 293(12): 1447–51.

4. Gerasimova N. D. Distribution of erythrocyte alloantigens and antibodies in cancer patients: autoref. Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
5. Donskov S.I., Morokov V.A. Human blood groups: A guide to immunoserology [Gruppy krovi cheloveka. Rukovodstvo po immunoserologii]. Moscow: IP Skorokhodov V.A.; 2011: 264–7. (in Russian)
6. Donskov S.I., Avramenko I.P., Dubinkin I.V., Kravchuk O.A., Skuditskiy A.E., Kravtsova E.A. et al. Blood types and alloimmunization. Message II. The relationship of Rh-belonging to the ability to produce antibodies. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2014; (4): 3–6. (in Russian)
7. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 15; 395(10223): 507–13.
8. Zhao J., Yang Y., Huang H., Li D., Gu D., Lu X. et al. Relationship Between the ABO Blood Group and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Susceptibility. *Clin. Infect. Dis*. 2020; 4: 1150.
9. Wu S., Arthur C., Wang J., Verkerke H., Josephson C., Kalman D. et al. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain preferentially recognizes blood group A. *Blood Adv*. 2021; 9; 5(5): 1305–9.
10. Ray J., Schull M., Vermeulen M., Park A. Association between ABO and Rh blood groups and SARS-CoV-2 infection of serve COVID-19 illness: a population-based cohort study. *Ann. Intern. Med*. 2021; 174(3): 308–15.
11. Pairo-Castineira E., Clohisey S., Klaric L., Bretherick A.D., Rawlik K, Pasko D. et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*. 2021; 591(7848): 92–8.
12. Bhandari P., Durrance R.J., Bhuti P., Salama C. Analysis of ABO and Rh blood type association with acute COVID-19 infection in hospitalized patients: a superficial association among a multitude of established confounders. *J. Clin. Med. Res*. 2020; 12(12): 809–15.
13. Boudin L., Janvier F., Bylicki O., Dutasta F. ABO blood groups are not associated with the risk of acquiring SARS-CoV-2 infection in young adults. *Haematologica*. 2020; 1; 105(12): 2841–3.
14. Niles J., Karnes H., Dlott J., Kaufman H. Association of ABO/Rh with SARS-CoV-2 positivity: The role of race and ethnicity in a female cohort. *Am. J. Hematol*. 2020; 96: E23–E26.
15. Donskov S.I., Eremkina E.I., Mitrofanova N.M., Gotovtseva E.P. Characteristics of the interferon-producing ability of white blood cells in healthy individuals. 56th scient. CNIIGPK session: materials. Moscow; 1984: 51–2. (in Russian)
16. Kosyakov P.N. Human isoantigens and isoantibodies in normal and pathological conditions [Izoantigeny I izoantitela]. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Преснякова М.В., Загреков В.И., Костина О.В., Пушкин А.С., Кузнецова В. Л., Арефьев И.Ю.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРОКСИИ НА ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ТЯЖЕЛООБОЖЖЕННЫХ

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, 603950, Нижний Новгород, Россия

Нарушения системы гемостаза имеют существенное значение в патогенезе ожоговой болезни, во многом обуславливая ее течение и исход. Цель исследования: изучить влияние ГБО терапии на состояние системы гемостаза у пациентов с тяжелой ожоговой травмой. Состояние системы гемостаза изучено у 9 пациентов средней возрастной группы (44±9,94 года), получивших термическую травму на площади более 32% (49,4±18,3) поверхности тела, сопровождающуюся развитием ожогового шока. Стандартную терапию ожоговой травмы дополняли проведением сеансов ГБО. Лечение гипербарическим кислородом проводилось в барокамерах БЛКС-307, БЛКС-307/1. Состояние коагуляционного, антикоагулянтного и фибринолитического звеньев системы гемостаза, а также вязко-эластические свойства крови оценивали непосредственно до сеанса ГБО и сразу же после его проведения. Общее количество пар сравнения составило 45. Под воздействием ГБО терапии отмечалось повышение активности антитромбина III (АТIII), протейна С (PrC) и снижение вязко-эластических свойств крови ($p < 0.05$). Были выявлены позитивные отклонения значений АТIII, Pr C, фактора Виллебранда, АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, фибриногена, XIII фактора, XIIa-зависимого фибринолиза, D-димеров и показателей тромбоэластографии (ТЭГ). Максимальная частота их встречаемости зарегистрирована для АТIII (95%), минимальная - для D-димера (62%). После процедур ГБО были отмечены и нежелательные отклонения показателей системы гемостаза. Они носили хаотичный характер, были компенсированы повышением активности физиологических антикоагулянтов и не сопровождались осложнениями тромбогенного характера.

Таким образом, проведение сеансов ГБО терапии в острый период ожоговой болезни способствует повышению активности физиологических антикоагулянтов и стабилизации вязко-эластических свойств крови. Отмечается высокая частота встречаемости позитивных эффектов гипероксии на компоненты системы гемостаза. Выявление ее нежелательных эффектов свидетельствует о необходимости мониторинга состояния системы гемостаза при проведении процедур ГБО.

Ключевые слова: гипербарический кислород; ожоги; система гемостаза; дисфункция эндотелия; ТЭГ.

Для цитирования: Преснякова М.В., Загреков В.И., Костина О.В., Пушкин А.С., Кузнецова В. Л., Арефьев И.Ю. Влияние гипероксии на гемостазиологический статус тяжелообожженных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(11): 666-672. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-666-672>

Для корреспонденции: Преснякова Марина Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела лабораторных исследований Университетской клиники; e-mail: Presnyakova@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.06.2021

Принята к печати 28.09.2021

Опубликовано 29.11.2021

Presnyakova M.V., Zagrekov V.I., Kostina O.V. Pushkin A.S., Kuznetsova V.L., Arefyev I.Yu.

THE EFFECT OF HYPEROXIA ON THE HEMOSTASIOLOGICAL STATUS OF SEVERELY BURNED PATIENTS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Disorders of the hemostatic system are essential in the pathogenesis of burn disease, largely determining its course and outcome. Objective: to study the effect of HBO therapy on the state of the hemostasis system in patients with severe burn injury.

The state of the hemostasis system was studied in 9 patients of the middle age group (44 ± 9.94 years) who received thermal trauma on an area of more than 32% (49.4 ± 18.3) of the body surface, accompanied by the development of burn shock. The standard therapy for burn injury was supplemented with HBO sessions. Treatment with hyperbaric oxygen was carried out in pressure chambers BLKS-307, BLKS-307/1. The state of the coagulation, anticoagulant and fibrinolytic links of the hemostasis system, as well as the viscoelastic properties of the blood, were assessed immediately before the HBO session and immediately after it. The total number of comparison pairs was 45. Under the influence of HBO therapy, there was an increase in the activity of antithrombin III (ATIII), protein C (PrS) and a decrease in the viscoelastic properties of blood ($p < 0.05$). Positive deviations in the values of ATIII, Pr C, von Willebrand factor, APTT, prothrombin and thrombin time, fibrinogen, factor XIII, XIIa-dependent fibrinolysis, D-dimers and thromboelastography parameters were revealed. The maximum frequency of their occurrence was recorded for ATIII (95%), the minimum - for the D-dimer (62%). After HBO procedures, undesirable deviations of the hemostatic system parameters were also noted. They were chaotic, were compensated by an increase in the activity of physiological anticoagulants and were not accompanied by complications of a thrombogenic nature.

Thus, conducting HBO therapy sessions in the acute period of burn disease increases the activity of physiological anticoagulants and stabilizes the viscoelastic properties of blood. There is a high frequency of occurrence of positive effects of hyperoxia on the

components of the hemostasis system. The identification of its undesirable effects indicates the need to monitor the state of the hemostasis system during HBO procedures.

Key words: hyperbaric oxygen; burns; hemostasis system; endothelial dysfunction; TEG.

For citation: Presnyakova M.V., Zagrekov V.I., Kostina O.V., Pushkin A.S., Kuznetsova V.L., Arefyev I.Yu. The effect of hyperoxia on the hemostasiological status of severely burned patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): (in Russ.) 666-672. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-666-672>

For correspondence: Presnyakova M.V., Cand. Sci. Biol., Senior Researcher, Laboratory Research Department, University Hospital; e-mail: Presnyakova@list.ru

Information about authors:

Presnyakova M.V. <https://orcid.org/0000-0002-3951-9403>;
Zagrekov V.I. <https://orcid.org/0000-0001-8235-7705>;
Kostina O.V. <https://orcid.org/0000-0001-7529-2544>;
Pushkin A.S. <https://orcid.org/0000-0002-7170-7885>;
Kuznetsova V.L. <https://orcid.org/0000-0002-4146-689X>;
Arefyev I.Yu. <https://orcid.org/0000-0002-2209-5448>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 29.06.2021

Accepted 28.09.2021

Published 29.11.2021

Введение. Тяжелая ожоговая травма вызывает развитие специфического симптомокомплекса (ожоговой болезни) и сопровождается повреждением всех саморегулирующих систем. Одним из ключевых звеньев патогенеза ожоговой болезни являются нарушения системы гемостаза, которые четко соотносятся с основными принципами тромбообразования. Предложенные немецким патологом Рудольфом Вирховым в середине XIX века и известные в литературе как триада Вирхова, они включают повреждение сосудистой стенки, замедление кровотока и ускорение свертывания крови. Тяжелая ожоговая травма вызывает выраженную паралитическую дилатацию капилляров и венул, капилляростаз и сладж эритроцитов, перикапиллярный отек, ишемию сосудистой стенки и повышение ее проницаемости, что в совокупности с дисбалансом основных звеньев системы гемостаза, возрастанием прокоагулянтной активности, плазмопотери и гемоконцентрации создает высокий риск тромботических осложнений [1-4].

В настоящее время для лечения ряда опасных для жизни состояний, таких как отравление угарным газом, декомпрессионная болезнь, газовая эмболия, а также острая ожоговая травма используется терапия гипербарическим кислородом (ГБО) [5]. Гипербарическая терапия способствует восстановлению клеточного и гуморального иммунитета, обладает противомикробной активностью, снижает вероятность септических осложнений, стимулирует ангиогенез, способствует цитопротекции, уменьшает гиперкоагуляцию и способствует заживлению ран [6].

Основу ГБО составляет переизбыток вдыхание 100% кислорода в камере под давлением от 1,5 до 3,0 Ата, что приводит к увеличению скорости и расстояния диффузии кислорода, повышению растворения кислорода в плазме крови, достижению большего насыщения кислородом гемоглобина эритроцитов и улучшению доставки кислорода [7, 8].

Раннее использование гипербарической терапии, особенно при обширных и критических ожогах, препятствует углублению ожогов, уменьшает отечность тканей вследствие вазоконстрикции и улучшает кровоток в пограничных областях, способствует заживлению ожоговых ран и, возможно, приводит к снижению смертности,

сроков госпитализации и потребности в хирургических вмешательствах по восстановлению целостности кожного покрова [9].

Основные побочные эффекты ГБО ограничиваются легочной и неврологической (например, нарушение зрения, шум в ушах, тошнота, лицевые спазмы, головокружение и дезориентация) системами. Легочная токсичность обычно проявляется раздражением трахеобронхиального тракта [10].

Общепризнано, что дыхание более 1 Ата O₂ увеличивает выработку активных форм кислорода (АФК), которые могут оказывать влияние на системы свертывания и фибринолиза, регуляцию эффекторных клеток, таких как тромбоциты, эндотелиальные клетки, эритроциты, нейтрофилы, тучные клетки, моноциты и фибробласты [11]. АФК стимулируют коагуляцию путем увеличения экспрессии тканевого фактора (ТФ) в эндотелиальных клетках [12], моноцитах и гладкомышечных клетках сосудов [13]. Активация протеазоактивируемых рецепторов (PARs) может привести к индукции эндотелиального ТФ через митохондриальную АФК-сигнализацию. Коагуляционная система также сама может активировать генерацию АФК посредством тромбина [14].

АФК могут оказывать протромботическое действие, инактивируя ингибитор пути тканевого фактора, протеин С и его агонист тромбомодулин [15], окисляя фибриноген, который затем более легко превращается в фибрин [16], уменьшая взаимодействие между тромбином и антикоагулянтами [17].

АФК могут снижать регуляцию ингибитора активатора плазминогена-1 (ПАИ-1), тем самым оказывая стимулирующее действие на систему фибринолиза [18].

Учитывая столь многофакторное взаимодействие АФК с системами свертывания и противосвертывания крови, а также роль гемостазиологических изменений в патогенезе ожоговой болезни, значимость изучения состояния гемостазиологического статуса у пациентов с тяжелой ожоговой травмой в условиях гипероксии становится очевидной.

Цель исследования: изучить влияние ГБО терапии на состояние системы гемостаза у пациентов с тяжелой ожоговой травмой.

Материал и методы. Состояние системы гемостаза изучено у 9 пациентов (2-х женщин, 7 мужчин), средней возрастной группы ($44 \pm 9,94$ года), получивших термическую травму на площади более 32% ($49,4 \pm 18,3$) поверхности тела, сопровождающуюся развитием ожогового шока. Пациенты находились на лечении в Университетской клинике Приволжского исследовательского медицинского университета. Стандартная терапия ожоговой травмы дополнялась проведением сеансов ГБО. Лечение гипербарическим кислородом проводилось в барокамерах повышенной комфортности БЛКС-307, БЛКС-307/1 производства государственного космического научно-производственного центра им. М.В.Хруничева. При выборе режима лечения в барокамере учитывали характер термической травмы, локализацию и площадь ожоговой поверхности, возраст пациента, наличие сопутствующих заболеваний, тяжесть ожогового шока, течение ожоговой болезни. При проведении сеанса ГБО использовался режим «малых доз» с изопрессией 1,3 Ата, общая продолжительность сеанса – 50-60 мин. Количество сеансов варьировало от 4 до 6. Определение показателей системы гемостаза проводилось непосредственно до сеанса ГБО и сразу же после его проведения. Общее количество пар сравнения составило 45. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждого пациента получено информированное согласие на участие в исследовании.

Забор крови, ее стабилизация и получение плазмы для исследований осуществлялись согласно общепринятым требованиям для гемостазиологических исследований. Медиана гематокрита в группе тяжелообожженных составила 35,8 [32,9;41,9].

Показатели системы гемостаза: (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), концентрация фибриногена (Фг), Д-димера (Д-д), активность антитромбина III (АТIII), протеина С (ПрС), плазминогена (Пг), α_2 -антиплазмина (α_2 -АП), фактора фон Виллебранда (ФВ), антиген фактора XIII (XIIIф) были определены на анализаторе гемокоагуляции ACL TOP 500 (Instrumentation Laboratory Company, США) с использованием стандартных наборов. Состояние вязко-эластических свойств кровяного сгустка было изучено согласно стандартной методике на тромбозагрографе ТЭГ 5000 («Haemoscope Corporation», США) [6]. Измерение тромбозагрографических параметров выполнялось на цитратных образцах крови с добавлением активатора коалина (режим ТЭГ – citrated kaolin). Были получены все показатели кинетики свертывания, выдаваемые этой программой, статистическому анализу подверглись показатели ТЭГ: R, K, a, MA, G. Для определения активности XIII-зависимого фибринолиза (XIIIа-ЗФ) использовались наборы реагентов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия).

Контрольную группу составили 25 добровольцев, не имеющих очагов воспаления любой локализации и этиологии, артериальной и/или венозной недостаточности.

Для проверки статистических гипотез использовали: U-критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона. Критическая величина уровня значимости принята равной 0,05. Количественные данные представлены в виде: медианы и первого; третьего квартиля Me (Q1; Q3). Частоты наблюдения приведены в процентах, в скобках указаны абсолютные значения. За отклонение значений

показателей было принято различие между определениями до и после ГБО сеанса, превышающее 5%, что соответствует ошибке методов для ACL TOP 500 и ТЭГ 5000.

Результаты. Анализ полученных результатов показал, что до проведения сеансов ГБО у всех пациентов регистрировались характерные для ожоговой болезни изменения системы гемостаза. Выявленный дисбаланс между прокоагулянтными и противосвертывающими механизмами имел выраженную протромботическую направленность.

Значительное повышение активности ФВ, превышающее усредненные значения в контрольной группе более чем в 4 раза, регистрировалось на фоне гиперфибриногенемии, уровень которой отличался от физиологической нормы более чем в 3 раза (табл. 1).

Для пациентов было характерно снижение антигена фибрин-стабилизирующего фактора (XIIIф) практически в 2 раза (см. табл. 1).

Противосвертывающие механизмы характеризовались незначительным снижением активности физиологических антикоагулянтов (АТIII и ПрС) и глубоким угнетением фибринолиза, о чем свидетельствовало удлинение практически в 15 раз времени лизиса сгустка крови по данным XIIIа-ЗФ, а также повышением активности ингибитора фибринолиза α_2 -АП. Изменений активности Пг выявлено не было.

Медиана концентрации Д-димеров была повышена по сравнению с контрольной группой в 6 раз.

Несмотря на то, что медиана значений хронометрических тестов ПВ, АЧТВ и ТВ достоверно отличалась от таковой в контрольной группе, ее изменения были диагностически малозначимыми (см. табл. 1).

Исследования состояния вязко-эластических свойств крови подтверждали данные о повышенном риске тромбообразования у пациентов с тяжелой термической травмой в острый период ожоговой болезни, на что указывали отклонения показателей ТЭГ: укорочение k и увеличение angl, MA и G (см. табл. 1).

Сравнительный анализ показателей системы гемостаза у тяжелообожженных до и после проведения ГБО выявил положительные эффекты гипероксии на систему гемостаза, которые были связаны с возрастанием активности физиологических антикоагулянтов АТIII ($p=0,003$), ПрС ($p=0,04$), а также удлинением ТВ ($p=0,03$) и снижением силы кровяного сгустка (G) ($p=0,025$) (табл. 2). Повышение активности Пг ($p=0,09$) и снижение MA имели тенденцию к достоверности ($p=0,09$; $p=0,058$, соответственно). Медианы показателей, характеризующих коагуляционный статус, практически не изменялись после ГБО терапии.

Более детальный анализ полученных результатов, основанный на оценке частоты встречаемости отклонений значений гемостазиологических показателей после сеанса ГБО, показал, что в преобладающем числе случаев гипероксия способствует стабилизации системы гемостаза. Однако в ряде случаев было выявлено и активирующее действие гипербарического кислорода на систему гемостаза у тяжелообожженных.

Положительный эффект ГБО терапии был выявлен для естественных антикоагулянтов (АТIII и ПрС), компонентов фибринолитической системы (Пг и α_2 -АП), маркера эндотелиальной дисфункции ФВ и показателя тромбозагрографа G, а также хронометрических тестов. Его частота встречаемости для данных тестов превышала 80%.

Под влиянием ГБО у большинства обследованных пациентов отмечались изменения значений показателей

системы гемостаза, имеющие наиболее выраженные отклонения по сравнению физиологической нормой и определяющие прокоагулянтную направленность нарушений гемостазиологического статуса после ожога. После воздействия гипербарического кислорода не отмечалось повышения концентрации Фг, Д-д, антигена ФХIII и угнетения активности ХIIа-ЗФ в более 60% случаев. После некоторых процедур были выявлены нежелательные отклонения значений тестов, свидетельствующие об отсутствии нормализующего эффекта ГБО терапии на систему гемостаза, частота их встречаемости находилась в диапазоне от 27 до 38%. Следует отметить, что

отклонения были выявлены после 3 и 4 процедур ГБО у тяжелообожженного пациента, имеющего такие сопутствующие заболевания как сахарный диабет, артериальную гипертензию, астму и метаболический синдром. Изменения показателей не сопровождалось снижением активности физиологических антикоагулянтов, не вызвали увеличения плотности сгустка крови по данным ТЭГ и развитие тромботических осложнений. У остальных пациентов встречаемость изменений подобного характера была единичной и, как правило, не сопровождалась снижением активности противосвертывающих механизмов.

Таблица 1

Влияние ГБО терапии на показатели системы гемостаза у тяжелообожженных (Ме (Q1;Q3))

Показатели	Контроль	До ГБО	После ГБО
Фактор Виллебранда, %	89,4[86,4;95,9]	453[388;548]*	464[389;525]*
Фибриноген, г/л	2,92 [2,79; 3,03]	8,07[6,87;9,35]*	8,67[7,55;9,35]*
XIII фактор, %	100[85,2;110,0]	46,7[34,0;58,1]*	46,8[32,1;58,7]*
Антитромбин III, %	99,1 [97,7;102]	90,0[78,5;98,5]*	92[80,5;98,5]* **
Протеин С, %	121 [118;133]	97,1[88,8;108,6]*	103,9[91,2;118,6]* **
Пламиноген, %	94,0 [89,4; 95,6]	87,0[76,0;105,0]	90,5[77,0;108,5]
XIIa-ЗФ, мин	4,00 [4,12; 4,54]	60,0[40,0;100,0]*	60,0[50,0;95,0]*
α_2 -антиплазмин, %	101[98,9;102,8]	116[107;127]*	117[109;125]*
Д-Димер, мг/мл	0,095[0,093;0,099]	0,575[0,370;0,93]*	0,570[0,36;1,03]*
Протромбиновое время, с	13,0 [13,0;13,3]	12,1[11,1;12,8]*	12,1[11,2;12,8]*
Тромбиновое время, с	13,9[13,8; 12,0]	12,8[12,1;13,2]*	13,1[12,3;13,8]* **
АЧТВ, с	26,5 [26,0; 27,5]	29,1[27,4;30,9]*	29,9[28,5;31,5]*
R, мин	7,6 [7,2;8,2]	7,80[6,7;9,2]	7,80[6,80;9,40]
K, мин	1,9 [1,7;2,2]	1,7[1,50;2,00]*	1,80[1,60;2,10]
AngI, град	63,9 [61,4;66,5]	67,4[61,6;69,4]*	65,3[61,2;68,9]
МА, мм	67,6 [65,5;69,4]	72,1[66,4;75,1]*	70,0[64,3;73,6]
G, дина/с	10,4 [9,5;11,3]	12,8[9,6;14,9]*	11,4[9,0;13,9]**

Примечание. * - Различия статистически значимы по анализируемым параметрам между контрольной группой и группами 1 и 2; ** - различия статистически значимы по анализируемым параметрам между группами 1 и 2.

Таблица 2

Частота встречаемости отклонений значений гемостазиологических показателей после сеанса ГБО (% в скобках указаны абсолютные значения)

Показатели	Положительный эффект	Нежелательный эффект
Антитромбин III, %	95 (41/43)*	5 (2/43)
Пламиноген, %)	92(33/36)*	8(3/36)
Тромбиновое время, с	91(29/32)*	9(3/32)
Протеин С, %	89(32/36)*	11(4/36)
АЧТВ, с	88(29/33)*	12(4/33)
α_2 -антиплазмин, %	86(31/36)*	14(5/36)
G, дина/с	85(35/39)*	15(6/39)
МА, мм	85(35/39)*	15(6/39)
Протромбиновое время, с	84(38/45)*	16(7/45)
Фактор Виллебранда, %	81(29/36)*	19(7/36)
K, мин	74(19/39)*	26(10/39)
AngI, град	74(19/39)*	26(10/39)
XIIa-ЗФ, мин	73(32/44)*	27(12/44)
XIII фактор, %	66(21/32)*	34(11/32)
Фибриноген, г/л	64(29/44)*	36(16/44)
R, мин	63(22/35)*	37(13/35)
Д-Димер, мг/мл	62(26/42)*	38(16/42)

Примечание. * – Достоверность различия между частотой встречаемости отклонений показателей после ГБО терапии.

Обсуждение. Полученные нами результаты свидетельствуют о влиянии гипероксии на гемостазиологический статус тяжелообожженных, что наглядно подтверждается биологическими маркерами активации и ингибирования системы гемостаза, которые играют важную роль в регуляции как самой системы гемостаза, так и гомеостаза организма в целом.

Под действием гипероксии повышается активность одного из основных физиологических антикоагулянтов антитромбина III. Возрастание активности АТIII свидетельствует об усилении антикоагулянтного потенциала системы гемостаза и противовоспалительного ответа. АТIII нейтрализует многие ферменты свертывания крови, включая тромбин, плазмин и факторы IXa, Xa, XIa, XIIa [19], а также блокирует воспалительные пути, вызванные тромбином. АТIII предотвращает индуцированную фактором Xa и комплексом TF / VIIa продукцию интерлейкина ИЛ-6, ИЛ-8 и Е-селектина. АТIII обладает мощными противовоспалительными свойствами, которые не зависят от его антикоагулянтной активности [20]. Этот белок препятствует адгезии нейтрофилов к стенке кровеносных сосудов и снижает продукцию различных цитокинов и хемокинов эндотелиальными клетками [21].

Гипероксия способствует повышению активности протеина С. Белок ПрС играет важную роль в регуляции гемостаза у человека, ингибируя выработку тромбина путем инактивации факторов Va и VIIIa. В дополнение к своей антикоагулянтной функции ПрС проявляет мощные цитопротекторные и противовоспалительные свойства [22].

Гипербарический кислород оказывает влияние на прокоагулянтный профиль у тяжелообожженных. В основной массе исследований не было отмечено повышения концентрации фибриногена в ответ на гипероксию, в то же время у части больных после сеанса ГБО концентрация этого острофазного белка возрастала.

Фибриноген - это крупный внеклеточный белок, синтезируемый печенью [23]. Фг является белком острой фазы [24]. Повышенный уровень Фг при ожоговой болезни предопределяется основным заболеванием воспалительной природы, при котором потребление фибриногена при формировании микротромбов компенсируется усилением биосинтеза этого белка под действием продуктов его распада, а с другой стороны - нарушением его катаболизма в легких [25].

Фг взаимодействует с такими компонентами плазмы, как тромбоциты, эндотелиальные клетки, эритроциты и внеклеточные белки. Гиперфибриногенемия способствует эндотелиальной дисфункции, пролиферации и ангиогенезу. Фг влияет на вязкость плазмы и уровень СОЭ, способствует повышенной реверсивной агрегации эритроцитов, что в значительной степени способствует окклюзии сосудов [26-28].

Проведенные нами исследования показали, что тяжелая ожоговая травма вызывает возрастание активности фактора Виллебранда, которое обнаруживается практически у всех пациентов. Под воздействием гипероксии не отмечалось ее повышение в более чем 80% исследований.

В настоящее время ФВ является общепризнанным маркером эндотелиальной дисфункции, ему принадлежит центральная роль в процессе контролирования гемостаза и тромбоза. Этот гликопротеин опосредует активацию тромбоцитов, прикрепление их к субэндотелиальному коллагену и индукцию системы гемостаза через фактор VIII. Благодаря своей важной роли в воспалении VWF идентифицируется как белок острой фазы [29]. В ответ

на повреждение сосудов или воспалительные стимулы высвобождение VWF могут вызывать вазоактивные гормоны, такие как адреналин и вазопрессин, а также белки плазмы крови тромбин, гистамин и многие другие медиаторы воспаления и / или тромбоза [30]. Тромбогенерирующая активность повышенных концентраций ФВ является одним из основных причинных факторов ишемической болезни сердца [31]. ФВ служит сайтом связывания лиганда для таких бактерий как *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих опасные для жизни инфекционные заболевания [32].

Еще одной особенностью нарушений системы гемостаза у тяжелообожженных является снижение антигена фактора XIII. В основной массе исследований гипербарический кислород не оказывает негативного влияния на антиген XIIIф. Определение XIIIф является крайне актуальным у пациентов с ожоговой травмой, т.к. его недостаточность является одной из причин развития желудочно-кишечных кровотечений [33].

XIIIф - фибрин-стабилизирующий фактор, называемый также фибринолизом и транслугутиназой - профермент, являющийся одним из основных участников образования сгустков на последних стадиях свертывания и требующий для активации ионы кальция и тромбин [34]. XIIIф является уникальным среди белков свертывания крови не только по природе своей ферментативной активности, которая сшивает, а не протеолизует белки, но и по способности напрямую влиять на устойчивость фибрина к фибринолизу, механическую стабильность фибрина, сокращение и состав сгустка [35-37].

Активный XIIIф образует не только ковалентные связи между α - и γ -цепями фибрина, но и сшивает внутри самого фибринового сгустка такие антифибринолитические белки как α_2 -AP и ПАИ-1. В частности, сшитый α_2 -AP, необходимый для ингибирования фибринолиза, остается полностью активным и защищает образовавшийся сгусток от спонтанного фибринолиза [38].

Функция XIIIф не ограничивается участием в гемостазе, он играет важную роль в заживлении ран, восстановлении тканей, отложении внеклеточного матрикса и дифференцировке остеобластов, участвует в регуляции иммунных реакций как на клеточном, так и на гуморальном уровнях, усиливает пролиферацию и миграцию моноцитов [39].

Приобретенный дефицит XIIIф может возникать из-за снижения его синтеза или увеличения потребления, а также из-за продукции аутоантител против субъединиц XIIIф. Инактивацию XIIIф связывают с обратимым окислением, протеолизом тромбином и ферментами, высвобождаемыми гранулоцитами [40].

Следует отметить, что снижение фактора XIIIф является не только фактором риска развития геморрагических осложнений. В условиях воспаления он может способствовать повышению риска тромбообразования. Степень его снижения коррелирует с выраженностью острофазного ответа и активацией системы свертывания. Отрицательная динамика активности XIIIф сопряжена с уровнем маркеров тромбинемии и степенью снижения физиологических антикоагулянтов [41,42].

Д-димер является еще одним биологически значимым маркером, концентрация которого может изменяться под действием гипербарического кислорода. Повышенная концентрация Д-д стимулирует синтез и высвобождение из моноцитов (макрофагов) интерлейкинов, вызывающих дисфункцию эндотелия, а также ПАИ-1, подавляющего

фибринолиз, что в целом способствует прогрессированию микротромбообразования. Выраженный дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами [43], гипоксия [44], развитие таких опасных для жизни пациентов осложнений ожоговой болезни как сепсис, пневмония и синдром ДВС [45], длительный постельный режим и инвазивное лечение [46] могут способствовать повышению этого деривата фибриногена у тяжелообожженных.

Гипероксия оказывает влияние на активность ХПа-3Ф. Глубокое угнетение ХПа-3Ф является характерной особенностью тяжелой ожоговой травмы. ХПа-3Ф относится к интегральным тестам системы гемостаза, который отражает изменения фибринолитической системы и показывает изменения в системе комплемента и каллекреин-кининовой системы, которые активизируются через XII фактор свертывания [47]. Причинами, вызывающими угнетение ХПа-3Ф, могут быть снижение концентрации плазминогена, увеличение содержания ПАИ-1, фибриногена и деградация белков контактной системы (факторов XII, XIa, прекалликреина, калликреина, высокомолекулярного кининогена) под действием протеиназ, освобождаемых клетками крови при патологических состояниях. Первенство того или иного фактора, способствующего снижению активности ХПа-3Ф, будет определяться также и особенностями патологического процесса [26].

Эффект ГБО терапии отражается на состоянии вязко-эластических свойства крови. Под действием гипербарического кислорода отмечается уменьшение плотности сгустка крови (G). Плотность сгустка является наилучшим показателем гемостатической способности и представляет собой взаимодействие между тромбоцитами и фибриногеном, которые являются детерминантами стабильного образования сгустка [48].

Следует отметить, что тесты, характеризующие вязко-эластические свойства крови, считаются более надежными, чем обычные хронометрические тесты, обеспечивая более точную и быструю оценку состояния системы гемостаза [49]. В раннем после ожоговом периоде рутинные тесты недостаточно чувствительны для обнаружения тонких изменений коагуляции, часто становясь аномальными только после развития тяжелых коагулопатий [50]. По мнению П.А. Воробьева и соавт. [51] нормальные хронометрические показатели свертывания крови при исследовании АЧТВ и ПВ отчасти могут быть связаны с действием растворимых комплексов фибрин-мономеров, которые в избытке образуются при гиперфибриногенемии и являются патологическими антикоагулянтами.

Заключение. Таким образом, тяжелая термическая травма вызывает глубокие нарушения системы гемостаза, проявляющиеся дисфункцией эндотелия, гиперфибриногенемией, снижением фибрин-стабилизирующего фактора, угнетением противосвертывающих механизмов, нарушением вязко-эластических свойств крови.

Под воздействием ГБО терапии отмечается повышение активности естественных антикоагулянтов. В условиях гипероксии в большинстве случаев отмечался стабилизирующий эффект на изменения показателей, характеризующих прокоагулянтную направленность нарушений системы гемостаза. Выявления активации системы гемостаза в ответ на ГБО терапию свидетельствует о необходимости мониторинга гемостазиологических показателей. Для усиления доказательной базы полученных результатов требуются дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-24, 26-32, 34-40, 42-46, 48-50 см. REFERENCES)

25. Преснякова М.В., Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г. Нарушения системы гемостаза в острый период ожоговой болезни. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2005; 3: 44.
33. Муллаканов С.А., Титова М.И., Каем Р.И. Роль нарушений свертывания крови в патогенезе развития желудочно-кишечных кровотечений при ожоговой болезни. *Клиническая медицина*. 1984; 5: 85-95.
41. Сидор Н.В., Момот А.П. Фактор XIII. Структура, функция, методы определения, роль в патологии человека. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2003; 13 (1):10-21.
47. Кречетова А.В., Галстян Г.М., Васильев С.А., Орел Е.Б., Сариди Э.Ю. и др. Оценка тяжести состояния больных сепсисом в динамике по соотношению фибринолитической и антикоагулянтной активности плазмы крови. *Гематология и трансфузиология*. 2009; 54 (6): 23-8.
51. Воробьев П.А., Момот А.П., Зайцев А.А., Елыкомов В.А., Сычев Д.А., Краснова Л.С. и др. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови при инфекции COVID-19. 2020. URL: <https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2020.5.25-34> (Дата обращения 2020 - 12 - 09).

REFERENCES

1. Edwards M., Singh M., Selesny S., Cooper J.S. Hyperbaric Treatment of Thermal Burns. 2020 Aug 13. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. PMID: 29262193.
2. Geng K., Liu Y., Yang Y., Ding X., Tian X., Liu H. et al. Incidence and Prognostic Value of Acute Coagulopathy After Extensive Severe Burns. *J. Burn. Care Res.* 2020; 41:544-9. doi: 10.1093/jbcr/irz178. PMID: 32036383.
3. Jeschke M.G., van Baar M.E., Choudhry M.A., Chung K.K., Gibran N.S., Logsetty S. Burn injury. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2020; 6:11. doi: 10.1038/s41572-020-0145-5. PMID: 32054846; PMCID: PMC7224101.
4. Zhang P., Zou B., Liou Y.C., Huang C. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns Trauma.* 2021; 9: tkaa047. doi: 10.1093/burnst/tkaa047. PMID: 33654698; PMCID: PMC7901709.
5. Gill A.L., Bell C.N. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q.J.M.* 2004; 97:385-95.
6. Criado P.R., Miot H.A., Pincelli T.P.H., Fabro A.T. From dermatological conditions to COVID-19: Reasoning for anticoagulation, suppression of inflammation, and hyperbaric oxygen therapy. *Dermatol. Ther.* 2021;34:14565. doi: 10.1111/dth.14565. Epub 2020 Nov 30. PMID: 33219572; PMCID: PMC7744832.
7. Smolle C., Lindenmann J., Kamolz L., Smolle-Juettner F.M. The History and Development of Hyperbaric Oxygenation (HBO) in Thermal Burn Injury. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57:49. doi: 10.3390/medicina57010049. PMID: 33430046; PMCID: PMC7827759.
8. Harch P.G. Hyperbaric oxygen treatment of novel coronavirus (COVID-19) respiratory failure. *Med. Gas. Res.* 2020; 10:61-2. 10.4103/2045-9912.282177.
9. Oley M. H., Oley M. C., Aling D., Kalangi J. A., Islam A. A., Hatta M. et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the healing of thermal burns and its relationship with ICAM-1: a case-control study. *Ann. Med. Surg.* 2021; 61:104-9. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.12.025>.
10. Paganini M., Bosco G., Perozzo F.A.G., Kohlscheen E., Sonda R., Bassetto F., Garetto G., Camporesi E.M., Thom S.R. The Role of Hyperbaric Oxygen Treatment for COVID-19: A Review. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021;1289:27-35. doi: 10.1007/5584_2020_568. PMID: 32696443; PMCID: PMC7979083.
11. Thom S.R. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011; 127 :131-41. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181f8e2bf.
12. Gutmann C., Siow R., Gwozdz A.M., Saha P., Smith A. Reactive Oxygen Species in Venous Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21:1918. doi: 10.3390/ijms21061918. PMID: 32168908; PMCID: PMC7139897.
13. Golino P., Ragni M., Cirillo P., Avvedimento V. E., Feliciello A., Esposito N. et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radi-

COAGULOLOGY

- cal on coronary flow during reperfusion. *Nat. Med.* 1996; 2: 35–40.
14. Djordjevic T., Pogrebniak A., BelAiba R.S., Bonello S., Wotzlaw C., Acker H. et al. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 616–30.
 15. Glaser C.B., Morser J., Clarke J.H., Blasko E., McLean K., Kuhn I. et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J. Clin. Investig.* 1992; 90: 2565–73.
 16. Upchurch G.R., Ramdev N., Walsh M.T., Loscalzo J. Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin. *J. Thromb. Thrombolysis.* 1998; 5:9–14.
 17. De Cristofaro R., Landolfi R. Oxidation of human alpha-thrombin by the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system: Structural and functional effects. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 253–61.
 18. Imperato F., Cuzzocrea S., De Lucia D., Sessa M., Rinaldi B., Capuano A. et al. Hyperbaric oxygen therapy prevents coagulation disorders in an experimental model of multiple organ failure syndrome. *Intensive Care Med.* 2006;32:1881–8.
 19. Opal S.M. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand. J. Infect. Dis.* 2003; 35:545–54.
 20. Roemisch J. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2002; 13:657–70.
 21. Levy J.H., Sniecinski R.M., Welsby I.J., Levi M. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb. Haemost.* 2016; 115:712–28. doi: 10.1160/TH15-08-0687. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26676884.
 22. Dinarvand P., Moser K.A., Protein C Deficiency. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019;143:1281–5. doi: 10.5858/arpa.2017-0403-RS. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30702334.
 23. Grover S.P., Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019; 39:331–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.312130. PMID: 30700128.
 24. Randeria S.N., Thomson G.J.A., Nell T.A., Roberts T., Pretorius E. Inflammatory cytokines in type 2 diabetes mellitus as facilitators of hypercoagulation and abnormal clot formation. *Cardiovasc. Diabetol.* 2019; 18:72. doi: 10.1186/s12933-019-0870-9. PMID: 31164120; PMCID: PMC6549308.
 25. Presnyakova M.V., Sidorkina A.N., Sidorkin V.G. Disorders of the hemostasis system in the acute period of burn disease. *Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2005; 3:44. (in Russian)
 26. Doolittle R.F. Structural Basis of Signaling Events Involving Fibrinogen and Fibrin. In *Handbook of Cell Signalling*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2010; Chapter 17: 111–4.
 27. Tyagi N., Roberts A.M., Dean W.L., Tyagi S.C., Lominadze D. Fibrinogen induces endothelial cell permeability. *Mol. Cell Biochem.* 2008; 307(1-2):13–22. doi: 10.1007/s11010-007-9579-2. Epub. 2007 Sep 12. PMID: 17849175; PMCID: PMC2811266.
 28. Kowalewski M., Fina D., Stomka A., Raffa G.M., Martucci G., Lo Coco V. et al. De Piero M.E., Ranucci M., Suwalski P, Lorusso R. COVID-19 and ECMO: the interplay between coagulation and inflammation—a narrative review. *Crit. Care.* 2020; 24(1):205. doi: 10.1186/s13054-020-02925-3. PMID: 32384917; PMCID: PMC7209766.
 29. Mancini I., Baronciani L., Artoni A., Colpani P., Biganzoli M., Cozzi G. et al. *J. Thromb. Haemost.* 2021; 19:513–21. doi: 10.1111/jth.15191. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33230904; PMCID: PMC7753796.
 30. Tischer A., Machha V.R., Frontrouth J.P., Brehm M.A., Obser T., Schneppenheim R. et al. Enhanced local disorder in a clinically elusive von willebrand factor provokes high-affinity platelet clumping. *J. Mol. Biol.* 2017; 429:2161–77. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.013.
 31. Bhogal P., Jensen M., Hart D., Makalanda L., Collins G.B., Spooner O., Jaffer O. Von Willebrand factor. *Clin. Med. (Lond).* 2020; 20(6):e279. doi: 10.7861/clinmed.Let.20.6.3. PMID: 33199342; PMCID: PMC7687332.
 32. Jagau H., Behrens I.K., Lahme K., Lorz G., Koster R.W., Schneppenheim R. et al. Von Willebrand factor mediates pneumococcal aggregation and adhesion in blood flow. *Front. Microbiol.* 2019; 10:511. doi: 10.3389/fmicb.2019.00511.
 33. Mullakandov S.A., Titova M.I., Kaem R.I. The role of blood clotting disorders in the pathogenesis of gastrointestinal bleeding in burn disease. *Klinicheskaya meditsina.* 1984; 5: 85–95. (in Russian)
 34. Tahlan A., Ahluwalia J. Factor XIII: congenital deficiency factor XIII, acquired deficiency, factor XIII A-subunit, and factor XIII B-subunit. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014;138(2):278–81. doi: 10.5858/arpa.2012-0639-RS. PMID: 24476525
 35. Katona E.E., Ajzner E., Toth K., Karpati L., Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J. Immunol. Methods.* 2001;258(1–2):127–35.
 36. Duval C., Allan P., Connell S.D., Ridger V.C., Philippou H., Ariens R.A. Roles of fibrin α - and γ -chain specific cross-linking by FXIIIa in fibrin structure and function. *Thromb. Haemost.* 2014;111(5):842–50. doi: 10.1160/TH13-10-0855. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24430058.
 37. Byrnes J.R., Duval C., Wang Y., Hansen C.E., Ahn B., Moberly M.J. et al. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α -chain crosslinking. *Blood.* 2015;126(16):1940–8. doi: 10.1182/blood-2015-06-652263. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26324704; PMCID: PMC4608241.
 38. Memtsas V.P., Arachchillage D.R.J., Gorog D.A. Role, Laboratory Assessment and Clinical Relevance of Fibrin, Factor XIII and Endogenous Fibrinolysis in Arterial and Venous Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(3):1472. doi: 10.3390/ijms22031472.
 39. Schroeder V., Kohler H.P. Factor XIII: Structure and Function. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016; 42(4):422–8.
 40. Byrnes J.R., Wolberg A.S. Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016;42(4):445–54. doi:10.1055/s-0036-1571343
 41. Sidor N.V., Momot A.P. Factor XIII. Structure, function, methods of determination, role in human pathology. *Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2003; 1:10–21. (in Russian)
 42. Pitkänen H.H., Jouppila A., Lemponen M., Ilmakunnas M., Ahonen J., Lassila R. Factor XIII deficiency enhances thrombin generation due to impaired fibrin polymerization - An effect corrected by Factor XIII replacement. *Thromb. Res.* 2017; 149:56–61. doi: 10.1016/j.thromres.2016.11.012. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27902939.
 43. Levi M., van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* 2017; 149:38–44. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007.
 44. Gupta N., Zhao Y.Y., Evans C.E. The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb. Res.* 2019; 181:77–83. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.013.
 45. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18:844–7. https://doi.org/10.1111/jth.14768.
 46. Hess K., Grant P.J. Inflammation and thrombosis in diabetes. *Thromb. Haemost.* 2011; 105:43–54. doi: 10.1160/THS10-11-0739.
 47. Krechetova A.V., Galstyan G.M., Vasil'ev S.A., Orel E.B., Saridi E. Yu. et al. Assessment of the severity of the condition of patients with sepsis in dynamics by the ratio of fibrinolytic and anticoagulant activity of blood plasma. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2009; 54 (6):23–8. (in Russian)
 48. Harr J.N., Moore E.E., Ghasabyan A., Chin T.L., Sauaia A., Banerjee A. et al. Functional fibrinogen assay indicates that fibrinogen is critical in correcting abnormal clot strength following trauma. *Shock.* 2013; 39(1):45–9. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182787122.
 49. Cochrane C., Chinna S., Um J.Y., Dias J.D., Hartmann J., Bradley J., et al Brooks A. Site-Of-Care Viscoelastic Assay in Major Trauma Improves Outcomes and Is Cost Neutral Compared with Standard Coagulation Tests. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(7):486. doi: 10.3390/diagnostics10070486. PMID: 32708960; PMCID: PMC7400090.
 50. Marsden N.J., Van M., Dean S., Azzopardi E.A., Hemington-Gorse S., Evans P.A. et al. Measuring coagulation in burns: an evidence-based systematic review. *Scars Burn Heal.* 2017; 3:1–13. doi: 10.1177/2059513117728201. PMID: 29799542; PMCID: PMC5965330.
 51. Vorob'ev P.A., Momot A.P., Zaitsev A.A., Elykomov V.A., Sychev D.A., Krasnova L.S. et al. Disseminated intravascular coagulation syndrome in COVID-19 infection. - 2020. - URL: https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2020.5.25-34 (Data obrashheniya 2020 - 12 - 09). (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Харсеева Г. Г.¹, Мангутов Э. О.¹, Алутина Э. Л.¹, Бут О. М.², Пахомова А. Е.¹

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM SPP.* В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

¹ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

²МБУЗ «Городская больница № 20 г. Ростова-на-Дону», 344091, Ростов-на-Дону, Россия

Corynebacterium spp. связывают с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (трахеит, фарингит, риносинусит, бронхит, пневмония и др.). *C. pseudodiphtheriticum* может являться возбудителем бактериальной коинфекции у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Цель – определение патогенных свойств и резистентности к антимикробным препаратам (АМП) штаммов *Corynebacterium spp.* для установления их этиологической значимости в развитии воспалительных заболеваний респираторного тракта. Штаммы *Corynebacterium spp.* выделены от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (n=43) и практически здоровых лиц (n=29). Изоляты идентифицировали масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToF MS), определяли их цитопатическое действие в культуре клеток CHO-K1, гемолитическую, уреазную активность, резистентность к АМП. Штаммы *Corynebacterium spp.* выделяли от больных в количестве 10^5 КОЕ/мл и более, практически здоровых – 10^4 КОЕ/мл и менее. Изоляты *Corynebacterium spp.* от больных оказывали более выраженное цитопатическое действие ($83,7 \pm 11,1\%$) и чаще обладали резистентностью к АМП, чем выделенные от практически здоровых. Для установления этиологической значимости изолятов *Corynebacterium spp.* в развитии воспалительных заболеваний респираторного тракта целесообразным является определение их количества в биологическом материале (10^5 КОЕ/мл и более), цитопатического эффекта на культуре клеток CHO-K1, наличия множественной резистентности к АМП. Различия в характеристиках изолятов *Corynebacterium spp.* от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц связаны со штаммовой, а не видовой принадлежностью коринебактерий.

Ключевые слова: *Corynebacterium spp.*; воспалительные заболевания респираторного тракта; цитопатическое действие; резистентность к антимикробным препаратам.

Для цитирования: Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О., Алутина Э. Л., Бут О. М., Пахомова А. Е. Этиологическая значимость штаммов *Corynebacterium spp.* в развитии заболеваний респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (11): 673-677. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-673-677

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Государственного задания «Маркёры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта».

Поступила 22.10.2021

Принята к печати 28.10.2021

Опубликовано 29.11.2021

Kharseeva G. G.¹, Mangutov E. O.¹, Alutina E. L.¹, But O. M.², Pakhomova A. E.¹

ETIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF *CORYNEBACTERIUM SPP.* IN THE DEVELOPMENT OF DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT

¹Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia;

²Municipal budgetary health care institution, «City hospital № 20 of Rostov-on-Don», 344091, Rostov-on-Don, Russia

Corynebacterium spp. It is associated with inflammatory diseases of the respiratory tract (tracheitis, pharyngitis, rhinosinusitis, bronchitis, pneumonia, etc.). *C. pseudodiphtheriticum* can be the causative agent of bacterial coinfection in patients with a new coronavirus infection (COVID-19). The aim is to determine the pathogenic properties and resistance to antimicrobial drugs of *Corynebacterium spp.* strains to establish their etiological significance in the development of inflammatory diseases of the respiratory tract. Strains of *Corynebacterium spp.* isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (43 pcs.) and practically healthy individuals (29 pcs.). Isolates were identified by mass spectrometric method (MALDI-TOF MS), their cytopathic effect in CHO-K1 cell culture, hemolytic, urease activity, antimicrobial drug resistance were determined. Strains of *Corynebacterium spp.* isolated from patients in the amount of 10^5 CFU/ml or more, practically healthy – 10^4 CFU/ml or less. Isolates of *Corynebacterium spp.* patients had a more pronounced cytopathic effect ($83.7 \pm 11.1\%$) and were more often resistant to antimicrobial drugs than those isolated from practically healthy. To establish the etiological significance of *Corynebacterium spp.* isolates, in the development of inflammatory diseases of the respiratory tract, it is advisable to determine their amount in biological material (10^5 CFU/ml or more), the cytopathic effect on CHO-K1 cell culture, as well as the presence of multiple resistance to antimicrobial drugs. Differences in the characteristics of *Corynebacterium spp.* isolates from patients with respiratory tract pathology and practically healthy individuals are associated with the strain, not the species, of corynebacteria.

Key words: *Corynebacterium spp.*; inflammatory diseases of the respiratory tract; cytopathic action; antimicrobial resistance.

For citation: Kharseeva G. G., Mangutov E. O., Alutina E. L., But O. M., Pakhomova A. E. Etiological significance of *Corynebacterium spp.* in the development of diseases of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 673-677 (in Russ.) DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-673-677

For correspondence: Kharseeva Galina G., Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Kharseeva G. G. <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Mangutov E.O. <https://orcid.org/0000-0001-6959-2540>;
Alutina E. L. <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>;
But O.M. <https://orcid.org/0000-0002-7816-4596>;
Pakhomova A.E. <https://orcid.org/0000-0002-8967-5391>.

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 22.10.2021

Accepted 28.10.2021

Published 29.11.2021

Введение. *Corynebacterium spp.* входят в состав нормальной микрофлоры человека, в связи с чем микробиологической диагностике инфекций, вызываемых этими микроорганизмами, не уделяется должного внимания. Накапливается всё больше данных о роли *Corynebacterium spp.* в патологии как у иммунокомпрометированных, так и иммунокомпетентных пациентов, чему способствует недостаточность врождённого иммунитета, хронические заболевания, социальные и другие условия. *C. pseudodiphtheriticum*, близкородственный ему вид *C. propinquum*, *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. accolens*, *C. argentoratense*, *C. tuberculostearicum* и др. связывают с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (трахеит, фарингит, риносинусит, бронхит, пневмония, обострение бронхоэктатической болезни и хронической обструктивной болезни лёгких и др.) [1-3]. *C. pseudodiphtheriticum* может быть возбудителем бактериальной коинфекции у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), находящихся на искусственной вентиляции лёгких [4]. Это указывает на необходимость установления их этиологической роли в патологии. Для установления клинической значимости изолятов *Corynebacterium spp.* в развитии воспалительных заболеваний респираторного тракта большое значение имеет определение их количества в правильно собранном клиническом материале (мокрота, промывные воды бронхов) [5, 6]. Выделение *Corynebacterium spp.* как преобладающих микроорганизмов в биологическом материале из дыхательных путей может быть связано с активным инфекционным процессом и не должно игнорироваться при проведении культурального исследования [5]. *Corynebacterium spp.*, выделяемые от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, не продуцируют токсины (дифтерийный и PLD-экзотоксин), что свидетельствует о значении в развитии инфекционного процесса иных факторов патогенности. Патогенные свойства недифтерийных коринебактерий связывают с адгезивностью, инвазивностью, цитотоксичностью, наличием у некоторых видов ферментов уреазы и гемолизина [7-9]. Важное значение имеет и установление чувствительности изолятов *Corynebacterium spp.* к антимикробным препаратам (АМП), которая обусловлена штаммовыми различиями, а не видовой принадлежностью [10-13]. Целесообразным является выявление изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), расцениваемых в настоящее время как

высоко патогенные. Имеются указания на то, что предшествующее лечение пациентов АМП, по-видимому, даже способствует колонизации *C. pseudodiphtheriticum* их организма [3, 14-16]. Инфекции, вызываемые *Corynebacterium spp.*, не контролируются средствами массовой вакцинации, проводимой препаратами дифтерийного анатоксина, поэтому к ним следует относиться с настоятельностью.

Цель исследования – определение патогенных свойств и резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium spp.* для установления их этиологической значимости в развитии воспалительных заболеваний респираторного тракта.

Материал и методы. Исследованы штаммы *Corynebacterium spp.* (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. argentoratense*, *C. propinquum*, *C. tuberculostearicum*, *C. simulans*, *C. falsenii*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum*, *C. frenesi*, *C. durum*, *C. xerosis*), выделенные из верхних дыхательных путей (зев, нос) больных с хроническим тонзиллитом, назофарингитом, бронхитом, пневмонией, ангиной (43 штамма); штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. propinquum*, *C. durum*, *C. xerosis*, выделенные от практически здоровых лиц, проходивших профилактическое обследование (29 штаммов). Все исследованные штаммы *Corynebacterium spp.* получены за период с октября 2018 г. по июнь 2021 г. из бактериологической лаборатории МБУЗ «Городская больница № 20 г. Ростова-на-Дону».

Идентификацию выделенных штаммов *Corynebacterium spp.* проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) [17]. Для проведения MALDI-ToF MS из подозрительных на коринебактерии колоний, выращенных на кровяно-теллуриновом и кровяном агаре, высеивали чистые культуры, которые наносили на мишень масс-спектрометра (MSP-чип). Полученные культуры смешивали в чашке Петри в объёме 2 мкл матрицы, представляющей собой α -циано-гидроксикоричную кислоту (HGGA, Bruker Daltonics) в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Смесь готовили путём добавления 1 мкл органического растворителя к 10 мг HGGA, смешивали на вортексе в течение 30 мин. до полного растворения кристаллов гидроксикоричной кислоты. Раствор использовали в качестве матрицы для кристаллизации белков. В качестве стандарта калибровки использован коммерческий препарат DH5-alpha *E. coli*

(Bruker bacteria teststandart). Определяли коэффициент совпадения (Score Value). Результаты идентификации со значением коэффициента Score > 2,0 считали достоверными. Учёт результатов проводили с помощью прибора Bruker Daltonics Biotyper (Германия) с использованием программного обеспечения Flex-control для идентификации штаммов рода *Corynebacterium* и сравнением со спектрами из базы данных.

Для определения цитопатического действия (ЦПД) исследовали фильтраты культур штаммов *Corynebacterium spp.*, выращенных на 20%-ном сывороточном бульоне, и полученные с помощью мембранных фильтров фирмы «Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм. Фильтраты титровали в 96-луночном планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками СНО-К1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур штаммов *Corynebacterium spp.* исследовали в 7-8 повторах. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при температуре +37° С, влажности 90%, концентрации CO₂ – 5%. Учёт производили через 72 ч. Характер ЦПД штаммов коринебактерий на культуре клеток СНО-К1 [18, 19] учитывали под инвертированным микроскопом. Определяли количество жизнеспособных и изменённых клеток по морфологическим и деструктивным изменениям в виде истончения, удлинения, округления, образования симпластов. Регистрацию результатов проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Лунки с интактной культурой клеток СНО-К1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт) фиксировали на предметном столике. Клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

Гемолитическую активность штаммов исследовали по методу Грейга [20]. Уреазную активность определяли в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» (МУК 4.2.3065-13. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания. М.; 2013).

Резистентность изолятов *Corynebacterium spp.* к АМП (бензилпенициллину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, линезолиду, рифамицину) определяли диско-диффузионным методом (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к antimicrobным препаратам», 2020. Доступно на: <http://antibiotics.ru/iacmac/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf>).

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты. Исследованы изоляты *Corynebacterium spp.*, выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта в количестве 10⁵ КОЕ/мл и более и от практически здоровых лиц – в количестве 10⁴ КОЕ/мл и менее. По результатам MALDI-ToF MS у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий индекс Score составил >2,0 что расценено как безусловный положительный результат. Спектр изолированных *Corynebacterium spp.* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта включал 12 видов коринебактерий, среди

которых чаще обнаруживали *C. pseudodiphtheriticum* (23,3±6,5,0%), *C. accolens* (16,3±5,6%), *C. afermentans* (11,6±4,9%) (табл.1). Из респираторного тракта практически здоровых лиц изолированы 7 видов *Corynebacterium spp.*, которые представлены, в основном, *C. accolens* (37,9±9,2%) и *C. propinquum* (34,5±8,9%).

При исследовании патогенных свойств штаммов *Corynebacterium spp.* установлено (табл. 2), что количество погибших клеток СНО-К1 под воздействием фильтратов культур, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, значительно выше (83,7±11,1%), чем от практически здоровых лиц (29,2±18,6%). Характер ЦПД проявлялся, в основном, округлением клеток СНО-К1 (более 80% случаев).

Гемолитическая активность чаще регистрировалась у штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (37,2±3,9%), чем от практически здоровых лиц (13,8±3,5%). При определении уреазной активности штаммов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц, никаких отличий не обнаружено.

При исследовании больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта выделены штаммы *Corynebacterium spp.*, резистентные к бензилпенициллину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, линезолиду (табл. 3). Наиболее часто выделяли штаммы недифтерийных коринебактерий, резистентные к клиндамицину (46,0±6,9%), эритромицину (33,0±6,5%), ципрофлоксацину (27,09±6,2%), бензилпенициллину (21,0±5,6%). Выделено 6 штаммов *Corynebacterium spp.*, обладающих МЛУ, из которых 2 устойчивы к трём, 3 – к четырём, 1 – к семи АМП. Все исследованные штаммы чувствительны к ванкомицину и рифамицину.

При обследовании практически здоровых лиц штаммы, резистентные к АМП, выделяли реже: к бензилпеп-

Таблица 1

Частота выделения *Corynebacterium spp.* из респираторного тракта (абс./%±m)

Вид	Больные с воспалительными заболеваниями респираторного тракта		Практически здоровые лица	
	абс.	%±m	абс.	%±m
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	10	23,3±6,5%	3	10,4±5,8%
<i>C. accolens</i>	7	16,3±5,6%	11	37,9±9,2%
<i>C. afermentans</i>	5	11,6±4,9%	1	3,5±3,5%
<i>C. amycolatum</i>	4	9,3±4,4%	1	3,5±3,5%
<i>C. argentoratense</i>	4	9,3±4,4%	-	-
<i>C. propinquum</i>	4	9,3±4,4%	10	34,5±8,9%
<i>C. tuberculostearicum</i>	2	4,6±3,2%	-	-
<i>C. simulans</i>	2	4,6±3,2%	-	-
<i>C. falsenii</i>	2	4,6±3,2%	-	-
<i>C. coyleae</i>	1	2,3±2,3%	-	-
<i>C. aurimucosum</i>	1	2,3±2,3%	-	-
<i>C. freneyi</i>	1	2,3±2,3%	-	-
<i>C. durum</i>	-	-	2	6,9±4,8%
<i>C. xerosis</i>	-	-	1	3,5±3,5%
Всего:	43	100%	29	100%

Цитопатические свойства изолятов *Corynebacterium spp.* из респираторного тракта

Группы обследованных	Количество погибших клеток СНО-К1 (%±m)	Характер ЦПД (%±m)			
		округление	истончение, удлинение	образование симпластов	отслоение
Больные с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, n=43	83,7±11,1	83,5±11,2	7,3±7,8	5,0±6,6	4,2±6,1
Практические здоровые лица, n=29	29,2±18,6	83,3±15,2	15,2±14,7	1,1±4,3	0,4±2,6

Примечание. Здесь и в табл. 3: n – число обследованных.

Таблица 3

Резистентные к АМП штаммы *Corynebacterium spp.*, выделенные из респираторного тракта

АМП	Контингент обследованных			
	Больные с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (n=43)		Практически здоровые лица (n=29)	
	абс.	%±m	абс.	%±m
Бензилпенициллин	11	21,0±5,6	2	7,0±4,8
Ципрофлоксацин	14	27,0±6,2	2	7,0±4,8
Моксифлоксацин	3	6,0±3,3	-	-
Гентамицин	3	6,0±3,3	-	-
Ванкомицин	-	-	-	-
Эритромицин	17	33,0±6,5	1	3,0±3,2
Клиндамицин	24	46,0±6,9	17	59,0±9,3
Тетрациклин	3	6,0±3,3	4	14,0±6,6
Линезолид	1	2,0±1,9	-	-
Рифампицин	-	-	-	-

нициллину (7,0±4,8%), ципрофлоксацину (7,0±4,8%), эритромицину (3,0±3,2%), тетрациклину (14,0±6,6%). Количество резистентных к клиндамицину штаммов, как и среди больных с патологией респираторного тракта, высокое (59,0±9,3%). Выделен 1 штамм (*C. propinquum*) с МЛУ к четырём АМП.

Обсуждение. Учитывая многочисленные указания на роль *Corynebacterium spp.* в патологии человека [2-4, 21-23], при обследовании больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта целесообразным является проведение культурального исследования, направленного, на выделение и идентификацию этих микроорганизмов. По нашим данным, видовой спектр *Corynebacterium spp.* представлен значительно шире у лиц с патологией респираторного тракта (хронический тонзиллит, назофарингит, бронхит, пневмония, ангина), чем у практически здоровых (выделено 12 и 7 видов коринебактерий соответственно). От больных в диагностически значимом титре (10^5 КОЕ/мл и более) чаще выделялись *C. pseudodiphtheriticum* (23,3±6,5,0%), *C. accolens* (16,3±5,6%), *C. afermentans* (11,6±4,9%). У практически здоровых лиц чаще обнаруживались те же виды коринебактерий: *C. accolens* (37,9±9,2%) и *C. propinquum* (34,5±8,9%), близкородственный виду *C. pseudodiphtheriticum*. Количество выделяемых штаммов недифтерийных коринебактерий (10^4 КОЕ/мл и менее) в биологическом материале не соответствовало диагностически значимой величине. Это свидетельствует в пользу того, что при оценке роли *Corynebacterium spp.* в развитии патологического процесса следует определять их количество в биоматериале.

Определение факторов патогенности *Corynebacterium spp.* проводили по уровню их цитопатического эффекта на культуре клеток СНО-К1, гемолитической и уреазной активности. При исследовании ЦПД обнаружено, что штаммы *Corynebacterium spp.*, выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, обладают более выраженным цитопатическим эффектом, чем клинические изоляты от практически здоровых лиц (83,7±11,1% и 29,2±18,6% погибших клеток СНО-К1 соответственно). ЦПД проявлялось у всех клинических изолятов от больных и практически здоровых лиц, одинаково, в основном, округлением клеток СНО-К1 (более 80% случаев). Такие морфологические изменения клеток СНО-К1 могли быть связаны с действием поверхностных структур коринебактерий, ферментов, продуктов их жизнедеятельности. Это свидетельствовало о возможности определения патогенных свойств штаммов *Corynebacterium spp.* путём оценки их ЦПД на культуре клеток СНО-К1.

Гемолитическую активность, как и цитопатический эффект, чаще обнаруживали у штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, чем от практически здоровых лиц. Частота её обнаружения низкая (37,2±3,9% и 13,8±3,5% случаев соответственно), что указывает на недостаточную информативность этого теста для характеристики патогенных свойств коринебактерий. При определении факторов патогенности ряда видов *Corynebacterium spp.*, например, *C. riegellii*, выделенных от больных с патологией урогенитального тракта, высокая уреазная активность может расцениваться как фактор патогенности [24]. Представляло интерес оценить способность к продукции уреазы у продуцирующих её изолятов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*. При сравнении показателей уреазной активности этих видов коринебактерий, выделенных от больных и практически здоровых лиц, никакие отличия не обнаружены. Следовательно, определение уреазы не является целесообразным для характеристики патогенных свойств штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

Имеются указания на то, что штаммы микроорганизмов, обладающие МЛУ, следует расценивать как патогенные (СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», а также к организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». М.; 2021). Проведено определение резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с хроническим тонзиллитом, назофарингитом, бронхитом, пневмонией, ангиной и практически здоровых лиц. Показано, что от больных с воспалительными за-

болеваниями респираторного тракта выделено шесть штаммов *Corynebacterium spp.* с МЛЮ, из которых 2 (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. afermentans*) устойчивы к трём, 3 (*C. propinquum*, *C. coyleae*, *C. falsenii*) – к четырём, 1 (*C. amycolatum*) – к семи АМП. От практически здоровых лиц выделен 1 штамм (*C. propinquum*), обладавший резистентностью к четырем АМП.

Заключение. Для установления этиологической роли штаммов *Corynebacterium spp.* в развитии воспалительных заболеваний респираторного тракта целесообразно определение их количества в биологическом материале (10^5 КОЕ/мл и более), ЦПД на культуре клеток СНО-К1, наличия резистентности к АМП, особенно МЛЮ. Различия в указанных характеристиках клинических изолятов *Corynebacterium spp.* от больных с хроническим тонзиллитом, назофарингитом, бронхитом, пневмонией, ангиной и практически здоровых лиц связаны со штаммовой, а не видовой принадлежностью коринебактерий, что необходимо учитывать при проведении микробиологической диагностики.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 12-19, 22-24
см. REFERENCES)

11. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю., Харисова А.Р. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 2: 56-9.
20. Лабинская А. С., Костюкова Н. Н., Иванова С. М., ред. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. М.: Медицина, 2012: 574.
21. Миронов А. Ю., Савицкая К. И., Воробьев А. А. Условно-патогенные микроорганизмы при заболеваниях дыхательных путей у больных региона Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 1: 81-4.

REFERENCES

1. Silva-Santana G., Silva C. M. F., Olivella J. G. B., Oliveira Fernandes I. F. S. L. M., Sued-Karam B. R., Silva Santos C. et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020. *Archives of Microbiology*. 2021; 203 (5): 1-18.
2. Nishiyama A., Ishida T., Ito A., Arita M. Bronchopneumonia caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Int. Med.* 2013; 52 (16): 1847.
3. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbijosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C. et al. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 2013; 32 (6): 769-71.
4. Yoshihiko O., Hiroyuki O., Tatsuya A., Ryo K., Kazuhide K., Toshihiko N. et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a pathogen in bacterial co-infection in COVID-19 patients with mechanical ventilation. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2021 Aug 31. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34470958/>. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.481. Open Element.
5. Gupta R., Popli T., Ranchal P., Khosla J., Aronow W. S., Frishman W. H. et al. *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a review of the literature. *The Cardiology in Review Journal*. September 21, 2020. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32976125/>. doi: 10.1097/CRD.0000000000000355. Open Element.
6. Kang S. J., Choi S.-M., Choi J.-A., Choi J. U., Oh T.-H., Kim S. E. et al. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures. *PLoS ONE*. 2018; 13 (6): e0199454.

7. Möller J., Busch A., Berens C., Hotzel H., Burkovski A. Newly isolated animal pathogen *Corynebacterium silvaticum* is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22 (7): 3549.
8. Clariot S., Constant O., Lepeule R., Fihman V., Razazi K., Cook F. et al. Clinical relevance and impact of *Corynebacterium* isolation in lower respiratory tract of critically ill patients requiring mechanical ventilation. *Infection*. 2020; 48 (3): 413-20.
9. Bernard K., Pacheco A. L., Cunningham I., Gill N., Burdz T., Wiebe D. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiol.* 2013; 63: 2146-454.
10. Neemuchwala A., Soares D., Ravirajan V., Marchand-Austin A., Julianne V. Kus, Patel S.N. In vitro antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheria *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(4): e01776-17.
11. Kharseeva G. G., Voronina N. A., Mironov A. Yu., Harisova A. R. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium non diphtheriae* strains circulating in Rostov-on-Don and Rostov region. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 2: 56-9. (in Russian)
12. Renom F., Garau M., Rubí M., Ramis F., Galmés A., Soriano J.B. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (6): 2064-7.
13. Olender A., Niemcewicz M. Macrolide, licosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. *Microb. Drug Resist.* 2010; 16 (2): 119-22.
14. Shariff M., Aditi A., Beri K. *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2018; 12 (7): 581-6.
15. Camello T.C.F., Souza M.C., Martins C.A.S., Damasco P.V., Marques E.A., Pimenta F.P. et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48 (4): 458-64.
16. Olender A., Niemcewicz M. Macrolide, licosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. *Microb. Drug Resist.* 2010; 16 (2): 119-22.
17. Zasada A. A., Mosiej E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Lett Appl. Microbiol.* 2018; 66 (6): 472-83.
18. Roy S., Marla S., Praneetha D. C. Recognition of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* by Toll-like receptors and upregulation of antimicrobial peptides in human corneal epithelial cells. *Virulence*. 2015; 6 (7): 716-21.
19. Camello T. C. F., Mattos-Guaraldi A. L., Formiga L. C. D., Marques E.A. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital. *Braz. J. Microbiol.* 2003; 34 (1): 39-44.
20. Labinskaya A. S., Kostyukova N. N., Ivanova S. M. Manual of Medical Microbiology. [Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya i etiologicheskaya diagnostika infektsiy]. Moscow: Meditsina; 2012: 574. (in Russian)
21. Mironov A. Yu., Savitskaya K. I., Vorobyev A. A. Conditionally pathogenic microorganisms in respiratory tract diseases in patients of the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 1: 81-4. (in Russian)
22. Valdoiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., Gonçalves C., Pereira P., Vasconcelos O. et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39 (9): 1745-52.
23. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V., Diot A., Tasse J., Conrad A. et al. Bone and joint infection involving *Corynebacterium spp.*: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med. (Lausanne)*. 2020; 7: 539501.
24. Funke G., Lawson P. A., Collins M. D. *Corynebacterium riegliei* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(3): 624-7.

Балмасова И.П., Царев В.Н., Унаньян К.Г., Ипполитов Е.В., Царёва Т.В., Харах Я.Н., Ахмедов Г.Д., Степанова С.А., Катков И.И., Арутюнов С.Д.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ МИКРОБИОМА ПАРОДОНТА У ПАЦИЕНТОВ С АССОЦИАЦИЕЙ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА И САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»
Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

Место высокотехнологичных методов молекулярной биологии в клинической лабораторной диагностике и разработке системы биомаркеров, как важной составляющей диагностических исследований, в настоящее время привлекает самое пристальное внимание научного сообщества. В данной работе предпринята попытка использования высокотехнологичного метагеномного анализа для решения проблем, возникающих в связи с регистрацией высокой частоты ассоциации заболеваний пародонта с системной патологией, в частности, с сахарным диабетом типа 2. Цель исследования – определение таксономических и метаболических особенностей микробиома пародонтальных тканей при заболеваниях пародонта, ассоциированных с сахарным диабетом типа 2, как модели соотношения локальных и системных эффектов пародонтопатогенных бактерий. Исследование включало проведение 16S секвенирования методом дробовика генома рибосомальной РНК бактерий в составе биологического материала из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды 46 человек, в том числе 15 пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, 15 пациентов с хроническим пародонтитом вне связи с системной патологией, а также 16 здоровых людей контрольной группы, с последующей биоинформационной обработкой полученных данных. Результаты исследования позволили установить таксономические особенности микробиома пародонта при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2, которые включали преобладание в его составе представителей семейств Prevotellaceae и Spirochaetaceae. Выявлены характерные особенности метаболических процессов в пародонтальных тканях с участием микробиома, которые заключались в нарастании обмена аминокислот цистеина и метионина на фоне снижения метаболизма пиримидина, метана, сфинголипидов, синтеза жирных кислот, которые имеют диагностическое значение при оценке состояния больных сахарным диабетом типа 2.

Ключевые слова: лабораторная диагностика; биомаркеры; 16S секвенирование; микробиом пародонта; пародонтопатогенные бактерии; метаболизм; хронический пародонтит; сахарный диабет типа 2.

Для цитирования: Балмасова И.П., Царев В.Н., Унаньян К.Г., Ипполитов Е.В., Царёва Т.В., Харах Я.Н., Ахмедов Г.Д., Степанова С.А., Катков И.И., Арутюнов С.Д. Диагностическое значение биомаркеров микробиома пародонта у пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 678-683. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-678-683>

Для корреспонденции: Царев Виктор Николаевич, засл. работник высшей школы РФ, д-р мед. наук, проф., дир. Научно-исследовательского медико-стоматологического института, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии; e-mail: nikola777@rambler.ru

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность Ильиной Е. Н., зам. ген. директора по научной работе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», члену-корр. РАН, д-ру биол. наук, проф. РАН, а также сотрудникам лаборатории геномных исследований и вычислительной биологии, в том числе научному сотруднику, канд. биол. наук Олехновичу Е.И. и ст. научному сотруднику, канд. биол. наук Климиной К.М. за совместную работу по выполнению метагеномных исследований и их биоинформационному анализу.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.06.2021

Принята к печати 30.06.2021

Опубликовано 29.11.2021

Balmasova I.P., Tsarev V.N., Unanyan K.G., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Kharakh Y.N., Akhmedov G.D., Stepanova S.Y., Katkov I.I., Arutyunov S.D.

DIAGNOSTIC VALUE OF MICROBIOME BIOMARKERS OF THE PERIODONITIS MICROBIOME IN PATIENTS WITH THE ASSOCIATION OF CHRONIC PERIODONTITIS AND DIABETES MELLITUS TYPE 2

Moscow State University of Medicine and Dentistry, 127473, Moscow, Russia

The place of high-tech methods of molecular biology in clinical laboratory diagnostics of various diseases and the development of a system of biomarkers as an important component of diagnostic research is currently attracting the closest attention of the scientific community. In this paper, an attempt is made to use high-tech metagenomic analysis to solve problems that arise due to the high frequency of association of periodontal diseases with systemic pathology, in particular, with type 2 diabetes mellitus. The aim of the study was to determine the taxonomic and metabolic features of the microbiome of periodontal tissues in periodontal diseases associated with type 2 diabetes mellitus, as a model of the ratio of local and systemic effects of periodontal pathogenic bacteria. The study included 16S shotgun sequencing of bacterial DNA as part of biological material from periodontal pockets/dentoalveolar furrows of 46 people – 15 patients with chronic periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus, 15 patients with chronic periodontitis unrelated to systemic pathology, as well as 16 healthy people in the control group, followed by bioinformatic processing of the data obtained. The obtained data allowed us to establish the taxonomic features of the periodontal microbiome in the association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus, which included the predominance of representatives of the

families Prevotellaceae and Spirochaetaceae in its composition. The features of metabolic processes in periodontal tissues with the participation of the microbiome were also revealed, which consisted in an increase in the exchange of cysteine and methionine against the background of a decrease in the metabolism of pyrimidine, methane, sphingolipids, and the synthesis of fatty acids, which are of diagnostic value in assessing the condition of patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words: laboratory diagnostics; biomarkers; 16S sequencing; periodontal microbiome; periodontopathogenic bacteria; metabolism; chronic periodontitis; type 2 diabetes mellitus.

For citation: Balmasova I.P., Tsarev V.N., Unanyan K.G., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Kharakh Y.N., G.D. Akhmedov, Stepanova S.Y., Katkov I.I., Arutyunov S.D. Diagnostic value of microbiome biomarkers of the periodontal microbiome in patients with the association of chronic periodontitis and diabetes mellitus type 2. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 678-683 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-678-683>

For correspondence: Tsarev V.N., Dr. Sci. Med., director of the Research Institute of Medicine and Dentistry, head of the department of microbiology, virology and immunology; e-mail: nikola777@rambler.ru

Information about authors:

Balmasova I.P., <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>;
Tsarev V.N., <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>;
Unanyan K.G., <https://orcid.org/0000-0002-9109-8431>;
Ippolitov E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>;
Tsareva T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>;
Kharakh Y.N., <https://orcid.org/0000-0001-7181-8211>;
Akhmedov G.D., <https://orcid.org/0000-0002-9380-6868>;
Stepanova S.Y., <https://orcid.org/0000-0001-5006-4799>;
Katkov I.I., <https://orcid.org/0000-0002-5299-5981>;
Arutyunov S.D., <https://orcid.org/0000-0001-6512-8724>.

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

Acknowledgment. The authors acknowledge Ilyina E.N., deputy general director of research at the Federal State Budgetary Institution «Federal Scientific and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine of FMBA», a corresponding member of the Russian Academy of Science, Doctor of Biology, Professor of the Russian Academy of Science, as well as laboratory scientists of genomic research and computational biology, including authors acknowledgment to a researcher, Ph.D. in Biology Olekhovich E.I. and senior research associate, Ph.D. in Biology Klimina K.M. for the coordination in metagenomic studies and their bioinformatical analysis.

Funding. The study had no sponsor support.

Received 24.06.2021
Accepted 30.06.2021
Published 29.11.2021

Введение. Место высокотехнологичных методов молекулярной биологии в клинической лабораторной диагностике и разработке системы биомаркеров, как важной составляющей диагностических исследований, в настоящее время привлекает самое пристальное внимание научного сообщества. Появление и развитие технологий метагеномного анализа определило существенный прорыв в изучении микробиома человека. В руках исследователей оказался инструмент детального изучения таксономического состава и функциональных характеристик очень важного компонента здоровья человека, как и триггерных механизмов самых разнообразных патологических процессов [1, 2]. Однако, как и при использовании любых сложных технологий, данные, полученные в результате метагеномного анализа, ставят новые задачи и порождают новые научные вопросы, которые все еще ждут ответа.

Одним из важнейших биотопов формирования микробиома человека является полость рта, а наиболее обитаемой частью полости рта служит зубодесневая борозда, на долю которой приходится от 400 до 500 видов бактерий из примерно 700 зарегистрированных в этой экологической нише. Изменения таксономической структуры и несостоятельность биологических функций микробиома данной локализации приводят к состоянию дисбиоза, которое связано с началом и прогрессированием заболеваний пародонта и других патологических состояний, имеющих не только локальный, но и системный характер [3–5].

Одной их наиболее часто регистрируемых ассоциаций заболеваний пародонта с системной патологией является

сочетание хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 [6 – 8], основным проявлением которого, в соответствии с публикациями последних лет, служит изменение таксономического состава микробиома полости рта и его влияния на метаболизм тканей пародонта [9, 10].

Целью работы послужило определение на базе 16S секвенирования таксономических и метаболических особенностей микробиома пародонтальных тканей при заболеваниях пародонта, ассоциированных с сахарным диабетом типа 2, как комплексного диагностического приёма оценки состояния пациентов с сочетанной патологией.

Материал и методы. В исследование были включены 46 человек, из числа которых были сформированы 3 группы исследования. 1-я (основная) группа включала 15 пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2; 2-я группа характеризовалась как группа сравнения, в ее состав входили 15 человек, у которых хронический пародонтит не сочетался с клинически значимой соматической патологией; 3-я группа служила контролем и содержала 16 условно здоровых людей, не страдающих ни хроническим пародонтитом, ни сахарным диабетом типа 2. Учитывая возрастной состав, для включения в группу контроля допускалось наличие явлений гингивита (6 человек). Пациенты основной группы и группы сравнения наблюдались сотрудниками кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России. Больные с ассоциацией

сахарного диабета типа 2 и хроническим пародонтитом проходили лечение на базе кафедры эндокринологии и диабетологии того же университета. Контрольная группа здоровых лиц формировалась из контингента, обращавшегося к стоматологам по поводу санации полости рта и обследованных впоследствии на кафедре эндокринологии и диабетологии того же университета для подтверждения отсутствия системной патологии. Состав исследуемых групп и план их обследования утверждены межвузовским этическим комитетом, все участники исследования подписали информированное согласие на обработку их персональных данных.

Принцип включения пациентов в исследование заключался в формировании максимально однородных групп, биологические образцы которых могли быть пулированы для метагеномного анализа. Группы исследования содержали примерно равное число некурящих мужчин и женщин в возрасте 45-65 лет. Стоматологический статус больных хроническим пародонтитом оценивался в соответствии с Международной классификацией заболеваний пародонта 2018 г. [11], все они имели среднетяжелое течение заболевания при генерализованном характере поражения, глубине пародонтальных карманов 4-6 мм, потере костной ткани вокруг зубов не более 1/3 длины корней, практическом отсутствии потери зубов, связанной с пародонтитом. Все пациенты, у которых диагностировался сахарный диабет типа 2, имели продолжительность заболевания от 3-х до 7 лет при его компенсированном течении, уровне глюкозы в крови ниже 7,8 ммоль/л и уровне гликированного гемоглобина ниже 7,5% [12].

Взятие биологического материала проводили утром натощак до использования зубной щетки и других средств гигиены. Материал из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды забирался из 4-х сайтов на уровне вторых моляров с помощью стерильных бумажных эндодонтических зондов N 25, помещался затем в 0,2 мл физиологического раствора и хранился при -20° в лаборатории молекулярно-биологических исследований НИМСИ МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Тотальную ДНК из образцов зубного налета выделяли с использованием QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Библиотеку ампликонов для 16S метагеномного секвенирования методом дробовика готовили согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Секвенирование библиотек и анализ полученных данных осуществляли с использованием генетического анализатора MiSeq (Illumina) и MiSeq Reagent Kit v2 согласно инструкциям производителя. Визуализацию результатов проводили с использованием программы MEGAN5 [13].

Для проведения таксономического анализа результатов секвенирования переменных участков гена 16S рРНК была применена биоинформационная платформа микробиома QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology) [14] и база данных SILVA [15]. Выявление различий на уровне таксономических композиций проводилось путем дисперсионного анализа данных на основе теста PERMANOVA для микробных сообществ [16] из функционала QIIME2. Для выявления биоинформационных различий между группами на уровне предсказанных метаболических путей применяли статистический анализ метаболических профилей STAMP [17]. Графическая визуализация данных метагеномного анализа проводилась с использованием программного обеспечения GNU/R [18] и «vegan» пакета [19].

Результаты. Для клинко-лабораторной оценки изменения таксономического состава микробиоты в группах исследования при работе с полученной базой данных проводили поэтапный биоинформационный анализ, результаты которого показаны на рис. 1. При этом при построении модели таксономических различий между группами исследования использовались так называемые балансы дендрограммы (CoDa dendrogram) [20]. Эта модель позволяет описать интенсивность таксономических изменений при перемещении профилей метагеномов от здорового состояния (контроль) к патологии, в нашем случае – к хроническому пародонтиту и далее к хроническому пародонтиту, ассоциированному с сахарным диабетом типа 2.

Как следует из представленной дендрограммы, из всего многообразия семейств бактерий, обитающих в полости рта и входящих в состав биопленки пародонтальных карманов/зубодесневой борозды, наибольшее представительство приходится на 10 семейств, которые регистрировались во всех случаях, но с разной частотой встречаемости в группах. Баланс B1 позволяет довольно четко разграничивать состав микробиомов группы здоровых людей и больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2.

Эта группа была связана с относительным ростом представительства пяти бактериальных семейств, таких как *Campylobacteraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Spirochaetaceae*, а относительное содержание бактерий семейств *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Neisseriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Leptotrichiaceae* уменьшалось. Здоровое состояние тканей пародонта (контрольная группа) характеризовалось прямо противоположным образом. Группа хронического пародонтита без сопутствующей системной патологии занимала пограничное положение между двумя другими группами.

Кроме того, балансы B2 и B3 показывают, что семейства, включающие пародонтопатогенные бактерии *Prevotellaceae* и *Spirochaetaceae*, больше связаны с группой хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, чем с группой только хронического пародонтита, а семейства *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Campylobacteraceae* с большей частотой отмечены при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии.

Полученные данные согласуются с известными положениями о значимой роли пародонтопатогенных видов бактерий *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Campylobacter (Wolinella) rectus*, являющихся представителями указанных семейств, определённых в нашей работе как зона повышенного риска [23, 24, 27, 30, 31].

При использовании 16S секвенирования появляется также возможность охарактеризовать роль микробиома в метаболизме пародонтальных тканей. Таксономические различия в метагеномах разных групп исследования ассоциированы с различиями в функциональном потенциале микробных сообществ (рис. 2). Оценка результатов, полученных в результате определения состояния метаболических реакций в пародонте с участием микробиома, проводилась в сравнительном аспекте: путем сопоставления групп «хронический пародонтит – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – хронический пародонтит».

При сравнении групп «хронический пародонтит – контроль» основные различия касались обмена аминокислот и энергетического обмена. В группе хронического пародонтита был снижен уровень обмена таких аминокислот как цистеин, метионин (ko00270), гистидин (ko00340), а также наблюдалось относительное снижение роли метаболических путей серы (ko00920) и глицеролипидов (ko00561).

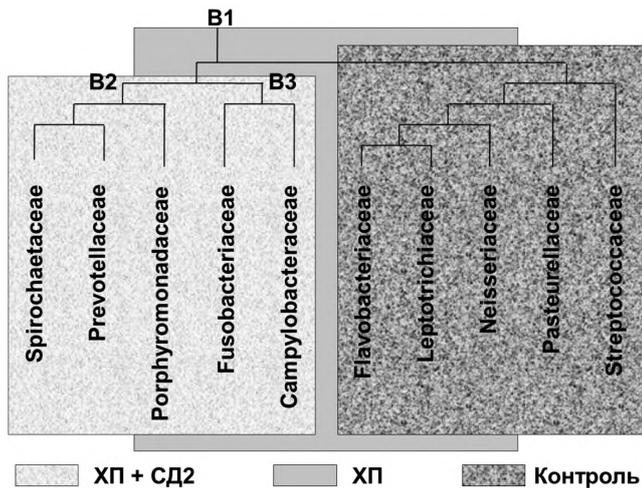


Рис. 1. Балансы дендрограммы преимущественного таксономического состава микробиоты в группах исследования (ХП – хронический пародонтит, СД2 – сахарный диабет типа 2).

Группа хронического пародонтита в сочетании с сахарным диабетом типа 2 и контрольная группа различались по гораздо большему числу метаболических признаков, причем совершенно иных, чем те, которые были выявлены при предыдущем сопоставлении. Единственный признак, который отличал от контроля наличие хронического пародонтита вне зависимости от сопутствующей патологии – это снижение метаболизма глицеролипидов. Этот результат показывает, что метаболизм микробиома при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2, принципиально отличается от метаболизма микробиома в отсутствие сопутствующей патологии.

Наиболее отчетливо эти особенности регистрировались при сравнении двух групп хронического пародонтита между собой. Были выявлены 5 метаболических путей, по которым отмечалось подобное различие. Группа «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2» характеризовалась повышенным метаболизмом цистеина и метионина (ko00270), снижением метаболизма пиримидина (ko00240), метаболизма метана (ko00680), биосинтеза жирных кислот (ko00061) и метаболизма сфинголипидов (ko00600). Снижение метаболизма, присутствующего стафилококковой инфекции, в данном случае не рассматривалось, как не связанное с этиологией хронического пародонтита.

Обсуждение. В настоящее время накоплено достаточно примеров использования метагеномного анализа для выявления особенностей микробиома при сочетании заболеваний пародонта и сахарного диабета типа 2 у человека. Осуществлена попытка выявить особенности

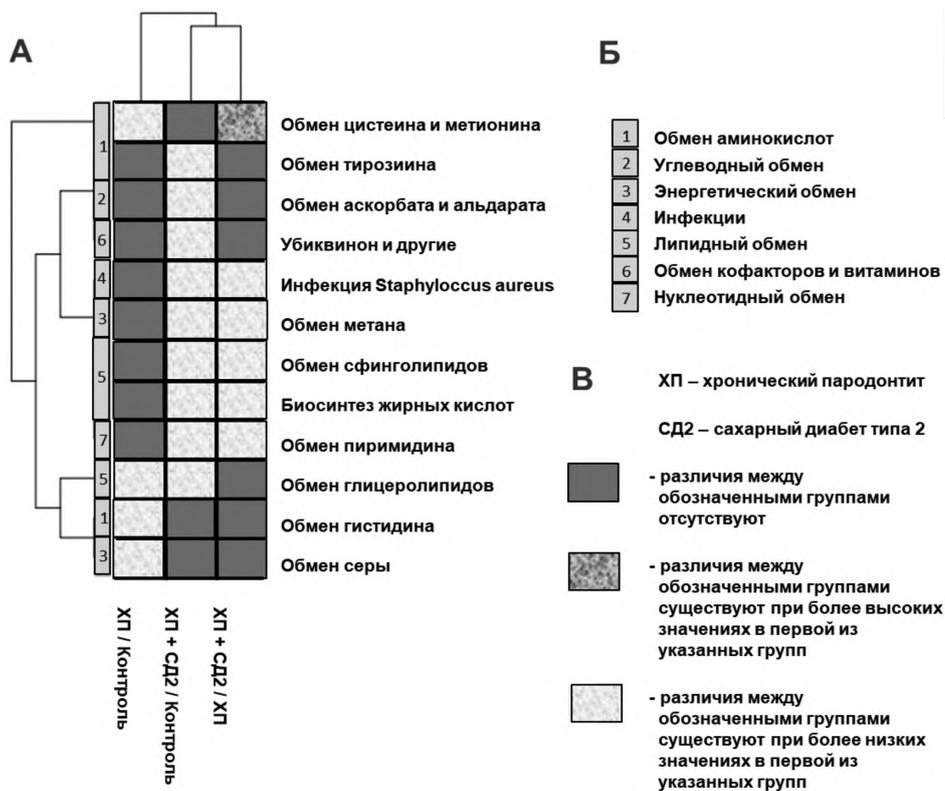


Рис. 2. Межгрупповые различия в метаболическом профиле микробиома пародонтальных карманов/зубодесневой борозды: А – график межгрупповых различий; Б – природа метаболических реакций; В – условные обозначения.

микробиома пожилых людей, позволяющие установить его взаимосвязь с развитием сахарного диабета. Результаты тестирования слюны оказались довольно скромными с практической точки зрения и были ограничены констатацией наличия такой взаимосвязи [21]. Еще одна работа практической направленности была посвящена изучению влияния ожирения на состав и разнообразие микробиоты полости рта у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. На примере бактерий, принадлежащих различным типам, была показана высокая вероятность такого влияния вне зависимости от гликемического контроля [22].

Описан ряд интересных наблюдений [9]. Авторы подчеркивают зависимость изменений в составе идентифицированных типов бактерий от гликемического статуса и стадии заболевания пародонта, хотя вопрос о том, какой из этих факторов послужил основной причиной изменений, так и остался неразрешенным. В другой работе, используя метагеномное секвенирование методом дробовика, исследователи дали оценку изменениям поддесневого микробиома, связанным с пародонтитом при сахарном диабете типа 2, таким как дисбиоз, потенциально обусловленный нарушением метаболической и иммунной регуляции со стороны хозяина [10].

Проведенный нами анализ таксономического состава показал, что при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 наблюдается отчетливое преобладание прокариот, относящихся к семействам *Prevotellaceae* и *Spirochaetaceae*, хотя интерпретировать преобладание отдельных таксонов именно этих семейств пока довольно сложно.

Полученные данные по особенностям метаболизма микробиома пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, свидетельствуют о значительной роли сдвигов со стороны обмена аминокислот, нуклеотидов, энергетического обмена, метаболизма липидов.

Установленный рост обмена цистеина может быть связан со способностью ключевого пародонтопатогена *Porphyromonas gingivalis* продуцировать такой патогенетический фактор как цистеиновые протеазы – гингипаины [23]. К настоящему времени экспериментально доказана способность гингипаинов при их распространении в составе наружных мембранных везикул как к местному воздействию, так и системному влиянию на тканевой метаболизм, ведущему к изменению метаболизма глюкозы в печени и прогрессированию сахарного диабета [24].

Снижение метаболизма пиримидина с участием микробиоты полости рта, по нашим данным, является довольно характерным признаком особенностей хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2. Пиримидин является агонистом рецептора GR119, связанного с гипогликемическим воздействием и протекторным эффектом в отношении β -клеток поджелудочной железы, что позволяет даже рекомендовать производные пиримидина в качестве лечебных средств при сахарном диабете типа 2 [25]. Снижение метаболизма пиримидина у микробиома тканей пародонта может служить маркером связи пародонтита с сахарным диабетом, а возможно, и одним из многочисленных элементов патогенеза сахарного диабета типа 2, особенно, если предположить распространение пародонтопатогенов и их патогенетических факторов за пределы пародонта.

В составе микробиоты полости рта человека, в том числе и при хроническом пародонтите, значительное место занимают представители группы археев – метанообразую-

щих прокариот [26]. Их роль при заболеваниях пародонта связана со способностью к симбиозу с пародонтопатогенами, например, с *Prevotella intermedia*, транспортирующего археям водород, необходимый для синтеза метана [27]. Снижение метаболизма метана при наличии сопутствующего сахарного диабета тип 2 может оказаться важным признаком качественных изменений энергетического обмена микробиома при данной патологии в виде снижения в нем роли метанообразующих археев, несмотря на отмеченное нами возрастание в составе биопленки представительств бактерий семейства *Prevotellaceae*.

Что касается установленного нами снижения способности микробиома к синтезу жирных кислот, то другими авторами было показано, что липидный профиль тканей пародонта в виде свободных жирных кислот определяет уровень местных воспалительных реакций при инфекционно-воспалительных заболеваниях пародонта. Экспериментально установлено, что насыщенные жирные кислоты, продуцируемые пародонтопатогенами, в отличие от ненасыщенных жирных кислот, индуцируют воспалительные реакции путем стимуляции секреции провоспалительных цитокинов фибробластами десны, а также усиливают резорбцию альвеолярной кости, то есть способствуют развитию явлений пародонтита [28]. Эти данные входят в противоречие с нашими результатами по зарегистрированному снижению синтеза жирных кислот микробиомом пародонта на фоне роста доли пародонтопатогенных бактерий в составе микробиома при ассоциации хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2.

Вызывает интерес нарушение обмена сфинголипидов. Особенностью этой группы липидов является их участие в формировании клеточных рецепторов, определяющих чувствительность к инсулину [29]. Что касается возможной роли бактерий в продукции сфинголипидов, то у пародонтопатогенов (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*) отмечена выраженная способность продуцировать сфинголипиды и их разновидность церамиды [30]. Учитывая эти свойства пародонтопатогенов, особых комментариев заслуживает зарегистрированный нами феномен достоверного снижения метаболизма сфинголипидов у бактерий в группе хронического пародонтита в ассоциации с сахарным диабетом при том, что количество пародонтопатогенов в случае такой ассоциации явно возрастает.

В качестве объяснения установленным феноменам, ассоциированным с липидным обменом, можно предложить гипотезу о снижении роли ключевых пародонтопатогенов в этом метаболическом процессе вследствие их своеобразного «экранирования», связанного с их интернализацией внутрь клеток пораженного пародонта, которая предположительно усиливается при сопутствующей системной патологии, в том числе и при сахарном диабете типа 2.

Способность *P. gingivalis* к внутриклеточной персистенции следует рассматривать в контексте эпидемиологической и патогенетической связи между пародонтитом и системными заболеваниями, а присутствие жизнеспособного *P. gingivalis* внутри макрофагов может быть достаточным для того, чтобы позволить этому микроорганизму использовать миграционный потенциал макрофагов для перемещения в другие органы и ткани [31]. При этом меняются свойства самих макрофагов: усиливаются процессы перекисного окисления липидов, появляется способность вместо продукции провоспалительных цитокинов осуществлять секрецию цитокинов иммуносупрессорного действия [32 – 34]. Дополнительным основанием для раз-

вия этой точки зрения послужили и данные наших предыдущих исследований цитокинового профиля слюны при ассоциации хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2 [35].

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что таксономический состав микробиома зубодесневой борозды, определенный с помощью 16S секвенирования и его биоинформационного сопровождения, довольно четко позволяет провести грань между состоянием здоровья полости рта и хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, что имеет существенное клинико-лабораторное и дифференциально-диагностическое значение. Ассоциация заболеваний пародонта с системной патологией, в частности, с сахарным диабетом типа 2, существенно влияет не только на таксономию микробного пейзажа, но и на его метаболизм, что важно в прогностическом аспекте. Полученные данные открывают возможности по формированию на основе таксономических и метаболических характеристик микробиома субгингивальных тканей системы биомаркеров, которая позволит решать вопросы о первичной или вторичной роли изменений микробиоты при различных патологических состояниях и намечать стратегии их лечения и предупреждения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4 – 35 см. REFERENCES)

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: в 2 томах. Учебник. Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016. <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970436417.html>.
2. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Леонтьева А.В., Козлова Е.А., Стулов Н.М., Беляев В.С., Григорьянц Э.О., Миронов А.Ю. Микробиом полости рта у больных пародонтитом, адгезивные и биопленкообразующие свойства. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 1(66): 45-51.
3. Микробиология, вирусология, иммунология полости рта. Учебник. 2-е изд. Царев В.Н., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019. DOI:10.33029/9704-5-55-0-MVI-2019-1-720.

REFERENCES

1. Medical Microbiology, Virology and Immunology: in 2 volumes. Textbook. Zverev V.V., Boychenko M.N., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970436417.html>. (in Russian)
2. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Leontieva A.V., Kozlova E.A., Stulov N.M., Belyaev V.S., Grigoryants E.O., Mironov A.Y. Oral microbiome in patients with periodontitis, adhesive and biofilm-forming properties. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 1(66): 45-51. (in Russian)
3. Oral Microbiology, Virology, Immunology. Textbook. 2nd ed. Tsarev V.N., ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. DOI:10.33029/9704-5-55-0-MVI-2019-1-720. (in Russian)
4. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B., Trinh A., Liu J., Woodward J. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *J. Biomed. Sci.* 2019; 42(1): 27-35.
5. Graves D.T., Correa J.D., Silva T.A. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J. Dent. Res.* 2019; 98(2): 148-56.
6. Glurich I., Acharya A. Updates from the evidence base examining association between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: Current status and clinical relevance. *Curr. Diab. Rep.* 2019; 19(11): 121.
7. Perez-Losada F.L., Jane-Salas E., Sabater-Recolons M.M., Estrugo-Devesa A., Segura-Egea J.J., López-López J. Correlation between periodontal disease management and metabolic control of type 2 diabetes mellitus. A systematic literature review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 2016; 21(4): e440-6.
8. Sanz M., Ceriello A., Buysschaert M., Chapple I., Demmer R.T., Graziani F. et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* 2018; 45(2): 138-49.
9. Matsha T.E., Prince Y., Davids S., Chikhe U., Erasmus R.T., Kengne A.P. et al. Oral microbiome signatures in diabetes mellitus and periodontal disease. *J. Dent. Res.* 2020; 99(6): 658-65.
10. Shi B., Lux R., Klokkevold P., Chang M., Barnard E., Haake S. et al. The subgingival microbiome associated with periodontitis in type 2 diabetes mellitus. *ISME J.* 2020; 14(2): 519-30.

11. Graetz C., Mann L., Krois J., Salzer S., Kahl M., Springer C. et al. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 2019; 46(9): 908-17.
12. Davies M.J., D'Alessio D.A., Fradkin J., Kernan W.N., Mathieu C., Mingrone G. et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018; 41(12): 2669-701.
13. Huson D.H., Mitra S., Ruscheweyh H.J., Weber N., Schuster S.C. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome research*. 2011; 21(9): 1552-60.
14. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Jonson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*. 2016; 13(7): 581-3.
15. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 590-6.
16. Tang Z.Z., Chen G., Alekseyenko A.V. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatic.* 2016; 32(17): 2618-25.
17. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014; 30(21): 3123-4.
18. Vogel T.M., Simonet P., Jansson J.K., Hirsch P.R., Tiedje J.M., van Elsas J.D. et al. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 252.
19. Oksanen J., Blanchet G.F., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'hara R.B. et al. Package 'vegan'. *Community Ecology Package*, version 2.9, 2013: 1-295.
20. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. Exploring compositional data with the CoDa-dendrogram. *Austrian J. Statistics*. 2011; 40 (1-2): 103-13.
21. Ogawa T., Honda-Ogawa M., Ikebe K., Notom Y., Iwamoto Y., Shirobayashi I. et al. Characterizations of oral microbiota in elderly nursing home residents with diabetes. *J. Oral Sci.* 2017; 59(4): 549-55.
22. Tam J., Hoffmann T., Fischer S., Bornstein S., Grabler J., Noack B. Obesity alters composition and diversity of the oral microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus independently of glycemic control. *PLoS One*. 2018; 13(10): e0204724.
23. Benedyk M., Mydel P.M., Delaleu N., Plaza K., Gawron K., Milewska A. et al. Gingipains: critical factors in the development of aspiration pneumonia caused by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Innate Immun.* 2016; 8(2): 185-98.
24. Seyama M., Yoshida K., Yoshida K., Fujiwara N., Ono K., Eguchi T. et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020; 1866(6): 165731.
25. Fang Y., Xu J., Li Z., Xiong L., Jin Y. et al. Design and synthesis of novel pyrimido[5,4-d]pyrimidine derivatives as GPR119 agonist for treatment of type 2 diabetes. *Bioorg. Med. Chem.* 2018; 26(14): 4080-7.
26. Nguyen-Hieu T., Khelaifa S., Aboudharam G., Drancourt M. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. *APMIS*. 2013; 121(6): 467-77.
27. Horz H.P., Robertz N., Vianna M.E., Henne K., Conrads G. Relationship between methanogenic archaea and subgingival microbial complexes in human periodontitis. *Anaerobe*. 2015; 35(Pt A): 10-2.
28. Shikama Y., Kudo Y., Ishimaru N., Funaki M. Potential role of free fatty acids in the pathogenesis of periodontitis and primary Sjögren's syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 836-43.
29. Bergman B.C., Brozinic J.T., Strauss A., Bacon S., Kerege A., Bui H.H. et al. Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015; 309(4): 398-408.
30. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B., Downes J., Finegold S.M., Knee E. et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS ONE*. 2011; 6(2): e16771.
31. Li L., Michel R., Cohen J., Decarlo A., Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 26-36.
32. Fleetwood A.J., Lee M.K.S., Singleton W., Achuthan A., Lee M.C., O'Brien-Simpson N.M. et al. Metabolic remodeling, inflammasome activation, and pyroptosis in macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and its outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7: 351.
33. Ghurye J.S., Cepeda-Espinoza V., Pop M. Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. *Yale J. Biol. Med.* 2016; 89(3): 353-62.
34. Takahashi N., Salijaya B., Yamada-Hara M., Tsuzuno T., Tabeta K., Yamazaki K. Gingival epithelial barrier: regulation by beneficial and harmful microbes. *Tissue Barriers*. 2019; 7(3): e1651158.
35. Balmosova I.P., Lomakin Y.A., Babaev E.A., Tsarev V.N., Gabibov A.G., Smirnov I.V. et al. «Shielding» of cytokine induction by the periodontal microbium in patients with periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus. *Acta Naturae*. 2019; 11(4): 79-87.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ В ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, 119571, Москва, Россия

Одной из важнейших проблем современной медицины является распространение резистентности к антибиотикам среди актуальных бактериальных возбудителей патологии человека. Диагностические технологии, направленные на определение спектра устойчивости каждого бактериального изолята, лежат в основе оптимизации лечебного процесса и мероприятий по борьбе с распространением резистентности. Совершенствование методов оценки резистентности становится приоритетной задачей лабораторной медицины.

Обзор посвящён важнейшей проблеме современной медицины, связанной с распространением антибиотикорезистентности – анализу возможностей биоинформатических инструментов обработки данных полногеномного секвенирования бактериальных возбудителей. Поиск источников для анализа проблемы выполнялся по базам данных PubMed, Российской научной электронной библиотеке eLIBRARY, поисковым системам Всемирной организации здравоохранения, Европейского общества микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID).

Описаны существующие технологические платформы полногеномного секвенирования для определения генетических детерминант резистентности у бактерий. В основе систем обнаружения детерминант антибиотикорезистентности лежат базы данных известных белковых или нуклеотидных последовательностей. К числу наиболее часто используемых баз данных принадлежат Resfinder, CARD, Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database.

Классическим этапом поиска генов резистентности является сверка новых последовательностей с базой данных с учётом разных порогов сходства. Предварительная сборка бактериального генома изучаемого изолята делает результаты поиска генов резистентности более корректными (по сравнению с поиском генов в контигах, не собранных в геном). Рассматриваются новые биоинформатические подходы к поиску генов резистентности, включая использование нейросетей и машинного обучения. Критический обзор достоинств и недостатков существующих баз данных антибиотикорезистентности позволил предложить протокол предсказания антибиотикорезистентности на основе массивов полногеномного секвенирования. Предлагаемый протокол может быть использован в качестве основы для создания стандартизированного алгоритма качественной и количественной оценки чувствительности микроорганизмов к АМП на основе данных полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: антибиотики; резистентность; бактерии; секвенирование; биоинформатика; обзор.

Для цитирования: Чаплин А.В., Коржанова М., Коростин Д.О. Выявление генов антибиотикорезистентности бактерий в данных полногеномного секвенирования (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 684-688. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-684-688>

Для корреспонденции: Коржанова Маргарита, лаборант центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины; e-mail: marory.kmm@gmail.com

Благодарности. Выражаем благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины за поддержку в методической части исследования/работы.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.09.2020

Принята к печати 23.03.2021

Опубликовано 29.11.2021

Chaplin A.V., Korzhanova M., Korostin D.O.

IDENTIFICATION OF BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA (REVIEW OF LITERATURE)

Pirogov Russian National Research Medical University, 119571, Moscow, Russia

The spread of antibiotic-resistant human bacterial pathogens is a serious threat to modern medicine. Antibiotic susceptibility testing is essential for treatment regimens optimization and preventing dissemination of antibiotic resistance. Therefore, development of antibiotic susceptibility testing methods is a priority challenge of laboratory medicine. The aim of this review is to analyze the capabilities of the bioinformatics tools for bacterial whole genome sequence data processing. The PubMed database, Russian scientific electronic library eLIBRARY, information networks of World health organization and European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) were used during the analysis. In this review, the platforms for whole genome sequencing, which are suitable for detection of bacterial genetic resistance determinants, are described. The classic step of genetic resistance determinants searching is an alignment between the query nucleotide/protein sequence and the subject (database) nucleotide/protein sequence, which is performed using the nucleotide and protein sequence databases. The most commonly used databases are Resfinder, CARD, Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database. The results of the resistance determinants searching in genome assemblies is more correct in comparison to results of the searching in contigs. The new resistance genes searching bioinformatics tools, such as neural networks and machine learning, are discussed in the review. After critical appraisal of the current antibiotic resistance databases we designed a protocol for predicting antibiotic resistance using whole genome sequence data. The designed protocol can be used as a basis of the algorithm for qualitative and quantitative antimicrobial susceptibility testing based on whole genome sequence data.

Key words: antibiotics; resistance, bacteria; sequencing; bioinformatics; review.

For citation: Chaplin A.V., Korzhanova M., Korostin D.O. Identification of bacterial antibiotic resistance genes in next-generation sequencing data (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 684-688 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-684-688>

For correspondence: Korzhanova M., laboratory assistant Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine; e-mail: marory.kmm@gmail.com

Information about authors:

Chaplin A., <https://orcid.org/0000-0003-1377-7153>;

Korzhanova M., <https://orcid.org/0000-0003-2512-2517>;

Korostin D., <https://orcid.org/0000-0003-1343-2550>.

Acknowledgment. *The study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235). We thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.*

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

Received 04.09.2020

Accepted 23.03.2021

Published 29.11.2021

Борьба с заболеваниями, в основе которых лежит инфекционный процесс, осложняется распространением резистентности возбудителей к антибиотикам. Антибиотикорезистентность получила глобальное распространение и расценивается специалистами в качестве одной из угроз для человечества [1]. Только в США от проблем, связанных с резистентными микробами, ежегодно погибает около 35000 пациентов [2]. Важной задачей медицины является совершенствование технологий оценки антибиотикорезистентности каждого возбудителя. Фенотипические методы выявления резистентности, широко применяемые в микробиологической практике, часто не позволяют расшифровать механизмы её возникновения. Развитие и удешевление молекулярно-генетических методов и, прежде всего, полногеномного секвенирования (ПГС) в начале XXI века позволяет рассматривать ПГС в качестве альтернативы фенотипической диагностике. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний рассматривает ПГС в качестве основной технологии будущего в изучении молекулярной эпидемиологии инфекционных заболеваний и антибиотикорезистентности бактерий [3]. Внедрение ПГС задерживается из-за отсутствия доступных и универсальных инструментов биоинформатической обработки полученных данных. Стандартные пакеты биоинформатического обеспечения, находящиеся на серверах компаний, предоставляющих услуги по обработке данных ПГС (Illumina BaseSpace Sequence Hub, Thermo Fisher Cloud Connect), не позволяют находить генетические детерминанты антибиотикорезистентности.

Цель обзора – проанализировать возможности биоинформатических инструментов анализа данных бактериальных сиквенсов и предложить протокол выявления генов резистентности в массивах данных ПГС.

Платформы для полногеномного секвенирования. К технологиям коротких прочтений относят методы второго поколения, основанные на детекции сигнала от множества случайно фрагментированных молекул ДНК длиной от 80 до 800 пар оснований и генерировании больших объёмов выходных данных [4].

Большую часть рынка ПГС-платформ коротких прочтений занимают системы Illumina. В основе их работы лежит технология SBS (от *англ.* – sequencing by synthesis), при которой считываются сигналы флуоресцентно меченных дезоксирибонуклеотидов с обратимыми терминаторами на 3'-конце, используемых для построения комплементарной молекулы ДНК, при их присоединении ДНК-полимеразой. Секвенаторы MiniSeq и MiSeq отно-

сятся к бюджетной линейке и обладают низкой производительностью и понятным рабочим процессом, подходят для небольших лабораторий. Более дорогие HiSeq and NovaSeq обеспечивают высокую производительность при снижении себестоимости образца, но требуют дополнительной автоматизации процесса подготовки библиотек для регулярной загрузки приборов. Платформа IonTorrent от Thermo Fisher Scientific основана на полупроводниковом секвенировании, где детектируется изменение pH в ходе синтеза комплементарной цепи ДНК на прочитываемой матрице [5]. Модель этой платформы S5 сравнима с MiSeq по производительности, но превосходит его по длительности секвенирования в 2-3 раза. Пробоподготовка запуска может автоматизироваться при помощи системы IonChef. Недостатком является высокая частота ошибок в гомополимерных регионах.

Технологии длинных прочтений относятся к третьему поколению и основаны на детекции сигнала от единичной молекулы ДНК. При этом отсутствие этапа клональной амплификации библиотеки снижает количество ошибок в процессе подготовки ДНК, однако повышает требования к технологической части секвенаторов из-за высокого шума при детекции. Несмотря на преимущества для *de novo* сборки, III поколение все ещё используется реже, чем технологии коротких прочтений [6, 7]. Вероятно, это происходит из-за того, что технологии длинных прочтений нуждаются в собственных алгоритмах первичного и вторичного анализа, исправляющих ошибки, которых на 11-15% больше, чем у платформ коротких прочтений [8, 9]. Платформы PacBio от Pacific Biosciences используют секвенирование синтезом одиночных молекул ДНК и прочитывают фрагменты ДНК до 175 тыс. пар оснований в течение нескольких часов. Приборы Sequel и Sequel II характеризуются средней производительностью, но высокой скоростью секвенирования [10]. Платформа Oxford Nanopore Technologies MinION использует метод «протаскивания» ДНК через нанопоры, в ходе которого каждый тип азотистых оснований специфически изменяет ионный ток на мембране, длина прочтения достигает даже миллионов пар оснований [11]. Базовая модель MinION рассчитана на прямое подключение к компьютеру, обеспечивает высокую производительность при низкой скорости секвенирования: 30 Гб данных за 48 час. Из недостатков стоит отметить: трудности с прочтением GC-богатых регионов и невысокую точность секвенирования, которая составляет от 65% до 88% [12], ошибки при секвенировании гомополимерных участков [13].

Главным недостатком ПГС являются необходимость в квалифицированном персонале на каждом этапе выполнения методики, включая подготовку библиотеки, обогащение целевыми фрагментами, секвенирование, последующую обработку и интерпретацию данных. Другой недостаток связан с тем, что ПГС в России находится в «серой» правовой зоне: для большинства реактивов, приборов, технологий и биоинформатических решений нет регистрационных удостоверений, допускающих к использованию в клинической практике.

Биоинформатическая обработка данных полногеномного секвенирования с целью выявления генов антибиотикорезистентности. В основе систем обнаружения детерминант антибиотикорезистентности лежат базы данных известных белковых или нуклеотидных последовательностей. Среди самых популярных баз данных, которые курируются вручную и регулярно обновляются следует отметить базы Resfinder [14], CARD [15], Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database [16].

Стандартным этапом поиска детерминант резистентности является сверка просеквенированных последовательностей изучаемого бактериального изолята с последовательностями детерминант резистентности, представленными в используемой базе данных. Эта задача может быть сравнительно простой для случая активно изучаемых условно-патогенных или патогенных микроорганизмов – зачастую детерминанты резистентности будут на 100% соответствовать представленным в базах данных. Бывают и другие случаи. В настоящее время активно изучаются резистомы – совокупности всех генов антибиотикорезистентности, представленных в бактериальных сообществах, населяющих определённые экологические ниши (например, кишечник человека) [17]. Поиск детерминант резистентности в метагеномах для оценки состава резистомов может представлять значительные сложности – такие детерминанты мало представлены в существующих базах данных, преимущественно сформированных на основании изучения легко культивируемых микроорганизмов, вследствие чего является задача поиска далёких гомологов [18].

Изначально для сверки новых последовательностей с базой данных использовался просто поиск гомологов, обладающих определённым процентом сходства последовательности с помощью алгоритмов BLAST или DIAMOND. Данный вариант используется в программе Resfinder [14], использующей одноимённую базу данных, и ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), способной осуществлять поиск во множестве баз данных. Развитием данного подхода можно считать установление разных порогов сходства для разных детерминант резистентности, как сделано в программном обеспечении RGI, использующем базу данных CARD [15]. Недавно предложено более сложный вариант, воплощённый в алгоритме DeepARG, при котором результаты поиска гомологов по сходству передаются в глубокую нейросеть, что может обеспечить более точное распознавание генов резистентности, далёких от референсных [19].

Перспективная альтернатива перечисленных способов связана с подходом на основе использования скрытых моделей Маркова (СММ), которые позволяют по-разному оценивать несовпадения и инсерции/делеции в разных позициях белковой последовательности, что даёт возможность различать консерватив-

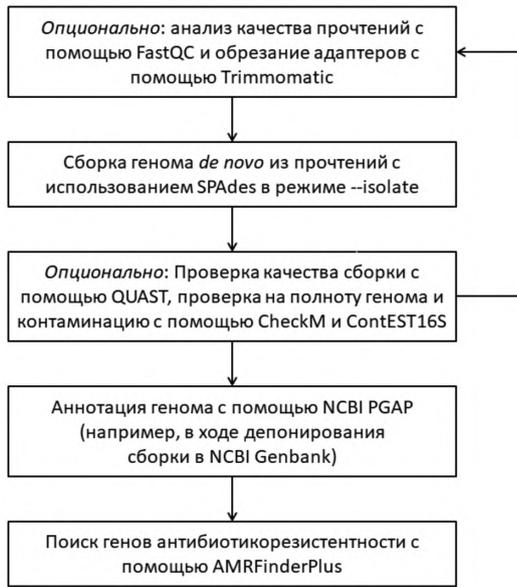
ные и варибельные участки белка [20]. С помощью СММ возможно выявление генов резистентности, которые являются эволюционно отдалёнными от ранее известных генетических детерминант [16, 20]. За счёт этого подход с использованием СММ оказался более чувствительным в выявлении генов резистентности в метагеномах почв и кишечника человека, чем поиск с помощью BLAST по базе данных CARD [20]. Комбинированная схема, в которой применяются как BLAST, так и СММ, используется в программном обеспечении AMRFinderPlus, осуществляющем поиск с использованием Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database [16].

Для поиска отдалённых гомологов генов резистентности разработан и ряд других методов, пока не воплощённый в виде универсального и широко используемого программного обеспечения. Для этой цели применяется анализ таких признаков, как аминокислотный состав, вторичная структура, физико-химические свойства белка [21, 22]. Наиболее ресурсоёмкий и вычислительно сложный из применённых подходов – сравнительное моделирование трёхмерных структур белков, которые являются более консервативными, чем аминокислотная последовательность [18]. Возможно, такие методы впоследствии будут применяться для расширения существующих баз данных, чтобы потом поиск по ним можно было осуществлять более простыми средствами.

Классические подходы к предсказанию антибиотикорезистентности по последовательности генома используют собранный геном (или метагеном). Используются сборка генома *de novo*, при которой прочтения объединяются в длинные фрагменты непрерывной геномной последовательности (контиги). Фрагментированность такой сборки может привести к потере некоторых генов антибиотикорезистентности, если они будут разорваны границами контигов [23]. Сложность могут представлять многокопийные гены (такие, как рибосомальные РНК), так как небольшие вариации между копиями могут быть потеряны в результате сборки. Если главной задачей исследования является обнаружение аллелей генов «домашнего хозяйства», вызывающих антибиотикорезистентность, альтернативой сборке *de novo* может стать сборка по референсному геному, однако приобретённые гены резистентности (располагающиеся, например, в мобильных генетических элементах) могут быть потеряны при таком подходе.

Использование собранных геномов позволяет тщательно проверить чистоту образца, качество секвенирования и качество предсказаний, однако, сборка является медленным процессом, требовательным к вычислительным ресурсам. Для упрощения разработан ряд подходов, которые осуществляют поиск непосредственно в прочтениях, получаемых в результате полногеномного секвенирования. Программное обеспечение ARIBA [24] позволяет осуществлять картирование парно-концевых прочтений на кластеры, составленные из генов антибиотикорезистентности, с последующей локальной сборкой прочтений и выравниванием этой сборки на гены антибиотикорезистентности.

Ещё одним важным аспектом является простота использования. Большинство вариантов программного обеспечения рассчитано на запуск через командную строку в системе Linux, что требует наличия квалифицированного сотрудника, осуществляющего обработку данных. Обнадеживающим исключением является



Возможный протокол предсказания антибиотикорезистентности по последовательности генома чистой культуры бактерий.

система Muckgobe с графическим интерфейсом, рассчитанная на анализ прочтений, полученных в результате полногеномного секвенирования *Mycobacterium tuberculosis* [25].

Серьёзная проблема выявления генетических детерминант антибиотикорезистентности проявляется в отсутствии общепринятого подхода к валидации результатов с использованием различных программ [26, 27]. Непонятно, должны ли быть представлены в тестовых выборках «пограничные» случаи антибиотикорезистентности, насколько должны тестовые выборки отражать реальное генетическое разнообразие микробных сообществ, какое соотношение различных механизмов антибиотикорезистентности должно быть в них отражено [27]. Среди наиболее крупных валидационных работ на реальных данных необходимо отметить сравнительное исследование предсказательной способности AMRFinder и Resfinder, в котором первая программа показала более высокую чувствительность [16]. Данное исследование проведено на 6242 изолятах, однако, они относились к всего четырём видам возбудителей острых кишечных инфекций человека.

Отсутствие общепринятой методики валидации не позволяет выявить, какой именно из современных подходов к обнаружению детерминант резистентности окажется оптимальным для решения конкретной задачи. К тому же, базы данных генов антибиотикорезистентности постоянно расширяются, а в уже выпущенное программное обеспечение добавляются новые функции, такие как корректное предсказание инактивирующих мутаций в генах антибиотикорезистентности.

На основе анализа возможностей современных программных инструментов мы синтезировали протокол предсказания антибиотикорезистентности на основе данных полногеномного секвенирования генома чистой культуры бактерий (см. рисунок). Он может быть использован для данных, полученных с любой платформы высокопроизводительного секвенирования или некото-

рых их комбинаций за счёт универсальности программы для сборки *de novo* SPAdes [28]. Применение полной сборки генома позволяет провести полноценную проверку качества и отсутствия контаминации в образце на основании уровня различий между копиями консервативных белок-кодирующих генов (что осуществляется программой CheckM) и 16S рПНК (что можно проверить с помощью веб-сервиса ContEst16S) [29, 30]. Использование AMRFinderPlus позволяет проводить не только корректную аннотацию генов антибиотикорезистентности, присутствующих в базе данных, но и предсказывать функции у сравнительно далёких гомологов [16]. Недостатком данного варианта анализа можно считать значительные требования к вычислительной мощности и объёму оперативной памяти для осуществления сборки *de novo*, многоэтапность, не позволяющая масштабировать подход для одновременной работы со множеством штаммов. В случае необходимости такого масштабирования можно обратиться к программам для предсказания генов антибиотикорезистентности на уровне исходных прочтений, например, ARIBA [24], которые позволяют добиться желаемой цели за один шаг.

Часто предсказание антибиотикорезистентности по полному геному обычно осуществляется на основе правила «наличие гена – наличие резистентности». Данный подход несёт в себе допущения: (а) за резистентность отвечает только один локус, а не несколько; (б) локус резистентности имеет высокую пенетрантность и его эффект не может быть замаскирован другими участками генома или зависеть от условий внешней среды [23]. В некоторых случаях эти допущения нарушаются [31]. Это может приводить к значительному числу ошибок предсказания, что показано при валидации системы AMRFinder в случае предсказания резистентности *Salmonella enterica* к хинолонам и аминогликозидам [16].

Проведён ряд работ, в которых данная задача предсказания фенотипа по генотипу решалась с помощью подходов машинного обучения. Для этого необходимо создать большую базу результатов полногеномного секвенирования штаммов с известными профилями резистентности, из этой базы сформировать обучающую выборку для классификатора. При этом в некоторых работах использовались ранее полученные данные о генах антибиотикорезистентности [32], в других работах обучение классификатора осуществлялось с нулевого уровня [33]. При этом последние работы в этой области используют не алгоритмы обучения по типу «чёрного ящика» (например, нейросети), а легко интерпретируемые алгоритмы, такие как деревья решений [32,33]. Это позволяет не просто сформировать систему предсказания, но и проследить логику её работы, что откроет возможность более глубокого понимания механизмов приобретения резистентности.

Интересным направлением является предсказание резистентности не как бинарного признака «чувствительный/резистентный», а как численного показателя минимальной подавляющей концентрации препарата (МПК), что может помочь в исследовании ситуаций, когда данная концентрация близка к пограничному значению. Этот подход успешно применён как для случая предварительно заданного массива детерминант резистентности, так и для обучения «с нуля» [34, 35].

Такие системы машинного обучения зачастую видоспецифичны, поэтому развитие данного подхода ограничивается количеством геномных данных для конкрет-

ных видов возбудителей заболеваний человека. Можно ожидать, что в будущем подобные системы предсказания будут внедрены в программное обеспечение, использующееся для рядовых задач предсказания антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Banin E., Hughes D., Kuipers O.P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41(3): 450-2. DOI: 10.1093/femsre/fux016.
2. CDC's Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 (2019 AR Threats Report). Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf> (accessed 26 August 2020).
3. Revez J., Espinosa L., Albiger B., Leitmeyer K. C. Struelens M.J., Tóth Á. et al. Survey on the use of whole-genome sequencing for infectious diseases surveillance: rapid expansion of European national capacities, 2015-2016. *Front. Public Health.* 2017; 5: 347. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00347.
4. Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(R2): R227-R240. DOI: 10.1093/hmg/ddq416.
5. Rothberg J., Myers J. Semiconductor sequencing for life. *J. Biomol. Tech. JBT.* 2011; 22(Suppl): S41-S2.
6. Loman N.J., Quick J., Simpson J.T. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat. Methods.* 2015; 12(8): 733-5. DOI: 10.1038/nmeth.3444.
7. Schmid M., Frei D., Patrignani A., Schlapbach R., Frey J. E., Remus-Emsermann, M. N., Ahrens, C. H. Pushing the limits of de novo genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(17): 8953-65. DOI: 10.1093/nar/gky726.
8. Chin C.S., Alexander D.H., Marks P., Klammer A.A., Drake J., Heiner C. et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. methods.* 2013; 10(6): 563-9. DOI: 10.1038/nmeth.2474.
9. Nagarajan N., Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat. Rev. Genet.* 2013. 2013; 14(3): 157-67. DOI: 10.1038/nrg3367.
10. Rhoads A., Au K.F. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015; 13(5): 278-89. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.08.002.
11. Stoddart D., Heron A.J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(19): 7702-7. DOI: 10.1073/pnas.0901054106.
12. Lu H., Giordano F., Ning Z. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016; 14(5): 265-79. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.
13. Jain M., Koren S., Miga K.H., Quick J., Rand A.C., Sasani T.A. et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. biotechnol.* 2018; 36(4): 338-45. DOI: 10.1038/nbt.4060.
14. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11): 2640-4. DOI: 10.1093/jac/dks261.
15. Alcock B.P., Raphenya A.R., Lau T.T., Tsang K.K., Bouchard M., Edalatmand, A. et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D517-D25. DOI: 10.1093/nar/gkz935.
16. Feldgarden M., Brover V., Haft D.H., Prasad A.B., Slotta D.J., Tolstoy I. et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(11): e00483-19. DOI: 10.1128/AAC.00483-19.
17. Lim M.Y., Cho Y., Rho M. Diverse distribution of resistomes in the human and environmental microbiomes. *Curr. Genomics.* 2018; 19(8): 701-11. DOI: 10.2174/1389202919666180911130845.
18. Ruppé E., Ghozlane A., Tap J., Pons N., Alvarez A.S., Maziers N. et al. Prediction of the intestinal resistome by a three-dimensional structure-based method. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(1): 112-23. DOI: 10.1038/s41564-018-0292-6.
19. Arango-Argoty G., Garner E., Pruden A., Heath L.S., Vikesland P., Zhang L. DeepARG: A deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome.* 2018; 6(1): 1-15. DOI: 10.1186/s40168-018-0401-z.
20. Gibson M.K., Forsberg K.J., Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J.* 2015; 9(1): 207-16. DOI: 10.1038/ismej.2014.106.
21. Chowdhury A.S., Khaledian E., Broschat S.L. Capreomycin resistance prediction in two species of Mycobacterium using a stacked ensemble method. *J. Appl. Microbiol.* 2019; 127(6): 1656-64. DOI: 10.1111/jam.14413.
22. Chowdhury A.S., Call D.R., Broschat S.L. Antimicrobial resistance prediction for gram-negative bacteria via game theory-based feature evaluation. *Sci. Rep.* 2019; 9: 14487. DOI: 10.1038/s41598-019-50686-z.
23. Su M., Satola S.W., Read T.D. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57(3): e01405-18. DOI: 10.1128/JCM.01405-18.
24. Hunt M., Mather A.E., Sánchez-Busó L., Page A.J., Parkhill J., Keane J. A., Harris S.R. ARIBA: Rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb. Genomics.* 2017; 3(10): e000131. DOI: 10.1099/mgen.0.000131.
25. Hunt M., Bradley P., Lapierre S.G., Heys S., Thomsit M., Hall M.B. et al. Antibiotic resistance prediction for Mycobacterium tuberculosis from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res.* 2019; 4: 191. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.15603.1.
26. Yao H., Yiu S.-M. Deep analysis and optimization of CARD antibiotic resistance gene discovery models. *BMC Genomics.* 2019; 20: 914. DOI: 10.1186/s12864-019-6318-5.
27. Angers-Loustau A., Petrillo M., Bengtsson-Palme J., Berendonk T., Blais B., Chan K.G. et al. The challenges of designing a benchmark strategy for bioinformatics pipelines in the identification of antimicrobial resistance determinants using next generation sequencing technologies. *F1000Res.* 2018; 7: 459. DOI: 10.12688/f1000research.14509.2.
28. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
29. Lee I., Chalita M., Ha S.M., Na S.I., Yoon S.H., Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017; 67(6): 2053-7. DOI: 10.1099/ijsem.0.001872.
30. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015; 25: 1043-55. DOI: 10.1101/gr.186072.114.
31. Hughes D., Andersson D.I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41(3): 374-91. DOI: 10.1093/femsre/fux004.
32. Van Camp P.J., Haslam D.B., Porollo A. Prediction of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria from whole-genome sequencing data. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1013. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01013.
33. Drouin A., Letarte G., Raymond F., Marchand M., Corbeil J., Laviolette F. Interpretable genotype-to-phenotype classifiers with performance guarantees. *Scientific Reports.* 2019; 9: 4071. DOI: 10.1038/s41598-019-40561-2.
34. Nguyen M., Long S.W., McDermott P.F., Olsen R.J., Olson R., Stevens R.L. et al. Using machine learning to predict antimicrobial MICs and associated genomic features for nontyphoidal *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57(2): e01260-18. DOI: 10.1128/JCM.01260-18.
35. Nguyen M., Brettin T., Long S.W., Musser J.M., Olsen R.J., Olson R., et al. Developing an in silico minimum inhibitory concentration panel test for *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* 2018; 8: 428. DOI: 10.1038/s41598-017-18972-w.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Шутикова А. Л.¹, Леонова Г. Н.¹, Попов А. Ф.², Щелканов М. Ю.^{1,3}

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ КЛЕЩЕВОЙ МИКСТ-ИНФЕКЦИИ В СОЧЕТАНИИ С COVID-19

¹ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова», Роспотребнадзора, 690087, Владивосток, Россия;

²ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 690002, Владивосток, Россия;

³ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, 690022, Владивосток, Россия

*Сосуществование различных возбудителей в организме пациента – один из малоизученных и актуальных вопросов. Цель исследования – на примере случая хронической энцефалит-боррелиозной инфекции выявить связь показателей комплексной лабораторной диагностики с клиническими проявлениями микст-заболевания при последующем заражении вирусом SARS-CoV-2. У пациентки на протяжении года собраны и исследованы семь образцов сывороток крови. Для этиологической верификации возбудителей КЭ, ИКБ, COVID-19 использованы методы ИФА и ПЦР диагностики. Диагноз ИКБ пациентке выставлен на основании выявления антител IgG к боррелиям через 5 мес от начала заболевания, так как укусы клеща она отрицала. В клинической картине имел место суставной синдром и мигрирующая эритема. Позже, обнаружены в крови антитела IgG к ВКЭ. Антитела IgM к боррелиям не выявлялись. Об обострении ИКБ можно было судить по клиническим проявлениям этого заболевания и росту титра специфических IgG антител. Особенностью этого случая явилось то, что во время обострения ИКБ произошло заражение вирусом SARS-CoV-2. Назначено лечение (умифеновир, гидроксихлорохин, азитромицин, цефтриаксон), которое повлияло на улучшение состояния по основному заболеванию, стали меньше боли в суставах, снизился уровень IgG к боррелиям. В этот период появились серологические маркеры ВКЭ: антиген, антитела IgM, стал нарастать титр антител IgG. Вероятнее всего этому способствовало переключение иммунной системы на вирус SARS-CoV-2, с одновременным подавлением боррелий антибиотиками и назначением гидроксихлорохина, обладающего иммунодепрессивным действием. Несмотря на активацию вируса клинических проявлений КЭ у больной не наблюдалось, что может быть связано с заражением слабовирулентным штаммом ВКЭ. Дальнейшее течение клещевых инфекций выявило доминирующее влияние *B. burgdorferi* по отношению к ВКЭ. Лабораторные исследования показали, что подавление активности боррелиозного процесса этиотропным лечением впоследствии приводило к активации персистирующего вируса КЭ.*

Ключевые слова: микст-инфекция; иксодовый клещевой боррелиоз; клещевой энцефалит; COVID-19; ИФА; IgM; IgG; антиген к ВКЭ.

Для цитирования: Шутикова А. Л., Леонова Г. Н., Попов А. Ф., Щелканов М. Ю. Клинико-диагностические проявления клещевой микст-инфекции в сочетании с COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 689-694. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-689-694>

Для корреспонденции: Шутикова Анна Леонидовна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. природно-очаговых трансмиссивных инфекций; e-mail: shutikova79@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы № 0545-2019-0007 государственного задания НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Роспотребнадзора и гранта РФФИ 20-04-60212 «Комплексный эколого-вирусологический мониторинг коронавирусов в экосистемах Дальнего Востока».

Поступила 02.06.2021

Принята к печати 25.06.2021

Опубликовано 29.11.2021

Shutikova A. L.¹, Leonova G. N.¹, Popov A. F.², Shchelkanov M. Yu.^{1,3}

CLINICAL AND DIAGNOSTIC MANIFESTATIONS OF TICK-BORNE MIXED INFECTION IN COMBINATION WITH COVID-19

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 690087, Vladivostok, Russia;

²Pacific state medical university of the Russian Ministry of Health 690002, Vladivostok, Russia;

³Federal Scientific Center of East Asia Terrestrial Biodiversity of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, 690022, Vladivostok, Russia

The coexistence of various pathogens inside the patient's body is one of the poorly studied and current issues. The aim of the study is to identify the relationship between the indicators of complex laboratory diagnostics and the clinical manifestations of a mixed disease during subsequent infection with the SARS-CoV-2 virus using the example of a case of chronic encephalitis-borreliosis infection. Seven blood serum samples were collected from the patient over the course of a year. For the etiological verification of the causative agents of TBE, Lyme disease and COVID-19, the methods of ELISA and PCR diagnostics were used. The patient was diagnosed with Lyme disease on the basis of the detection of IgG antibodies to Borrelia 5 months after the onset of the disease, since she denied the tick bite. In the clinical picture, there was an articular syndrome and erythema migrans. Later, IgG antibodies to the TBEV were found in the blood. Throughout the study, IgM antibodies to Borrelia were not detected. The exacerbation of Lyme disease could be judged by the clinical manifestations of this disease and by the growth of specific IgG antibodies. A feature of this case was that during an exacerbation of the Lyme disease, an infection with the SARS-CoV-2 virus occurred. Treatment (umifenovir, hydroxychloroquine, azithromycin, ceftriaxone) was prescribed, which improved the condition of the underlying disease, decreased joint pain, decreased IgG levels to borrelia. However, during this period, serological markers of TBEV appear: antigen, IgM antibodies, and the titer of IgG antibodies increases. Most likely, this was facilitated by the switching of the immune system to the SARS-CoV-2 virus, with the simultaneous suppression of borrelia with antibiotics and the appointment of hydroxychloroquine, which has an immunosuppressive effect. Despite the activation of the virus, clinical manifestations of TBE were not observed in the patient, which is most likely

associated with infection with a weakly virulent TBEV strain. The further course of tick-borne infections revealed the dominant influence of *B. burgdorferi* in relation to TBEV. Laboratory studies have shown that suppression of the activity of the borreliosis process by etiotropic treatment subsequently led to the activation of the persistent TBEV.

Key words: mixed infection; Lyme disease; tick-borne encephalitis; COVID-19; ELISA; IgG; IgM; TBEV antigen.

For citation: Shutikova A. L., Leonova G. N., Popov A. F., Shchelkanov M. Yu. Clinical and diagnostic manifestations of tick-borne mixed infection in combination with COVID-19. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 689-694 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-689-694>

For correspondence: Shutikova A.L., candidate of medical sciences, researcher at the laboratory of natural focal transmissible infections; e-mail: shutikova79@mail.ru

Information about authors:

Shutikova A.L., <https://orcid.org/0000-0002-6803-0439>;

Leonova G.N., <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>;

Popov A.F., <https://orcid.org/0000-0002-5166-5569>;

Shchelkanov M. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>.

Acknowledgment. This work was supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant № 20-04-60212.

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

Received 02.06.2021

Accepted 25.06.2021

Published 29.11.2021

Введение. Широкое распространение сочетанных природных очагов клещевых инфекций, имеющих, как правило, общие ареалы, часто служит причиной инфицирования клещей одновременно несколькими патогенами. Это создаёт предпосылки к развитию микст-инфекций у человека, пострадавшего от укуса клеща [1-7]. В лесных зонах на территории РФ 5-10% клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* заражены одновременно вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) и боррелиями [8]. В Приморском крае практически все очаги иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и клещевого энцефалита (КЭ) являются сопряженными [6, 9]. На большей части биотопов, обследованных нами в 2019 г, в иксодовых клещах, присосавшихся к людям, выявлены высокие показатели заражённости боррелиями (до 35%) и низкие – вирусом КЭ (1,8%). В общей структуре заражённых клещей показатели микст-инфицирования этими возбудителями отмечены в 2,2% случаев [10]. При этом заболеваемость ИКБ и КЭ на территории Приморского края составила 8,0 и 1,0 на 100 тыс. населения, соответственно. В структуре клинических проявлений КЭ преобладала лихорадочная форма до 50%, которая в 5,5% случаев вызвана микст-инфекцией (КЭ+ИКБ) [11].

Анализируя особенности течения КЭ в Приморском крае за последнее десятилетие, необходимо отметить, что наряду с крайне тяжёлыми формами заболевания всё чаще стали встречаться случаи с лихорадочной, стертой и бессимптомной формами инфекции [9,12]. Это может свидетельствовать о заражении людей либо субпороговой дозой ВКЭ [13], либо – низковирулентными штаммами возбудителя [14]. Инаппарантное течение инфекционного процесса затрудняет раннюю диагностику КЭ, что может способствовать длительной персистенции не верифицированного вируса в организме пациента. С таким течением КЭ при микст-инфекции (КЭ+ИКБ) доминируют клинические признаки ИКБ [15, 16], препятствуя диагностике смешанной инфекции. Этим пациентам, как правило, ставят диагноз клещевой боррелиоз, а диагноз смешанной энцефалит-боррелиозной инфекции чаще всего упускается.

В конце 2019 г. вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) [17] преодолел межвидовой барьер и впервые за весь период

изучения коронавирусов [18] проник в человеческую популяцию, подтвердив прогнозы о пандемическом потенциале этих вирусов [19-21]. Современная пандемия COVID-19 (Coronavirus disease 2019), этиологически связанного с вирусом SARS-CoV-2 [17, 22], свидетельствует о том, что этот вирус станет постоянным участником структуры ОРВИ человека в ближайшее время. Тяжёлые формы COVID-19 связаны с развитием системной воспалительной реакции, цитокинового шторма, гиперкоагуляции, нарушения доставки и потребления кислорода, что приводит к полиорганной недостаточности [17, 23-25]. Указанные патологические проявления особенно значимы для больных с сопутствующими хроническими инфекционными заболеваниями, так как создают предпосылки к обострению и утяжелению течения этих инфекций [26, 27].

Своевременная диагностика и дальнейшее наблюдение за людьми с сочетанной инфекционной патологией приобретает важное практическое значение, поскольку сосуществование различных возбудителей внутри организма пациента – один из малоизученных и актуальных в настоящее время вопросов.

Цель исследования – на примере случая хронической энцефалит-боррелиозной инфекции выявить связь показателей комплексной лабораторной диагностики с клиническими проявлениями микст-заболевания при последующем заражении вирусом SARS-Cov-2.

Материал и методы. У пациентки с диагнозом клещевой боррелиоз, диссеминированная форма на протяжении одного года собраны семь образцов сывороток крови, которые хранили при температуре -20 °C. В последующем проведены комплексные исследования одновременно всех сывороток. Антиген ВКЭ определяли методом ИФА с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя тест-системы. Присутствие в сыворотках крови специфических антител IgM и IgG против возбудителей КЭ, ИКБ, COVID-19 выявляли с помощью наборов для ИФА – «ВектоВКЭ-IgM», «ВектоВКЭ-IgG», «ЛаймБест-IgM», «ЛаймБест-IgG», «SARS-Cov-2-IgM-ИФА-Бест», «SARS-Cov-2-IgG-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Уровень антигенемии и сывороточных антител оценивали по показателю K_{opt} (отношение оптической плотности исследуемой пробы к оптической плотности критической пробы).

На наличие генетических маркёров ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica* / *Rickettsia heilongjiangensis*, *Borrelia miyamotoi* материал исследовали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов «АмплиСенс ВКЭ, *B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris-FL*» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), «РеалБест ДНК *R. Sibirica* / *R. heilongjiangensis*, ДНК *B. miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителей. Исследования проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия).

Результаты и обсуждение. Из анамнеза пациентки К., 60-ти лет, известно, что в сентябре 2019 г. она отдыхала на даче в пригороде г. Артём Приморского края, после чего заметила появление на голени правой нижней конечности ярко-розового пятна с лёгким шелушением по окружности. Укус клеща пациентка отрицала. С этой симптоматикой она обратилась к врачу дерматологу, где ей назначено местное лечение (мазь тридерм). В течение последующего месяца у пациентки появилась боль в правом голеностопном суставе, что заставило её обратиться к инфекционисту и терапевту. Во время осмотра инфекционист зарегистрировал бледно-розовое продолговатое пятно диаметром 5 см с лёгким шелушением по окружности, но признаков инфекционного заболевания он не отметил. В декабре 2019 г. больная посетила ревматолога уже с жалобами на боли в области мелких суставов кистей и стоп, возникающие в покое и при нагрузке, на появление вторичных высыпаний на месте первичного пятна. Ревматолог по данным МРТ поставил диагноз: Остеоартроз, полиостеоартроз и назначил лечение (витамины и хондропротекторы). Через месяц при повторной консультации ревматолога пациенткой отмечено появление болей в области правой голени в покое и в коленных суставах при физических нагрузках, сохранялись жалобы на высыпания на правой голени и появилось новое пятно на левом бедре. С целью дополнительного обследования пациентка направлена на анализ крови на антитела к миелопероксидазе и протеиназе (антитела в пределах референсных значений) и на доплерографию сосудов нижних конечностей (без патологии) для исключения васкулитного процесса, на консультацию к дерматологу и сосудистому хирургу.

В начале февраля 2020 г. пациентка впервые сдала кровь на антитела к боррелиям (ИФА), в которой обнаружены антитела IgG. С этим результатом она обратилась к инфекционисту, врач назначил анализ крови на наличие генетических маркёров *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi* методом ПЦР (ДНК боррелий не обнаружена). На основании полученных результатов исследования крови, наличия у больной в анамнезе суставного синдрома и мигрирующей эритемы инфекционист диагностировал клещевой боррелиоз, диссеминированная форма, подострый период и назначил этиотропное лечение (цефтриаксон 2,0 г внутривенно в течение двух недель). После курса антибиотикотерапии уровень антител IgG к боррелиям продолжил нарастать, сохранялись боли в суставах рук и ног. Больная стала отмечать появление болей в области головы (губы, надбровная область) и правого плечевого сустава. Очаговой неврологической симптоматики в этот период не зарегистрировано. Проведена комплексная рентгенография, которая выявила периартроз правого плечевого сустава, системное умеренное сужение меж-

фаланговых сочленений суставов кистей рук и признаки подагрического артроза на стопах. Рентгенография тазобедренных суставов патологии не выявила.

В начале июля 2020 г. у пациентки повысилась температура, появился сухой кашель, чувство нехватки воздуха, выраженная слабость. Она обратилась в поликлинику. При исследовании мазка из носоглотки методом ПЦР обнаружена РНК SARS-CoV-2. Пациентку госпитализировали с диагнозом: коронавирусная инфекция, среднетяжёлая форма, двухсторонняя полисегментарная пневмония с площадью поражения 30% (данные компьютерной томографии). В клиническом анализе крови наблюдались нормоцитоз и увеличение СОЭ до 45 мм/час. Лимфопении свойственной для COVID-19 не выявлено. Отмечено повышение С-реактивного белка до 4 мг/л. Назначено лечение: умифеновир (по 200 мг 4 раза в день), гидроксихлорохин (800 мг в первые сутки, затем по 400 мг в сутки), азитромицин (500 мг в сутки), эноксапирин натрия (0,4 мг подкожно), цефтриаксон (2,0 г/сутки), омега-3 и амброксол. После лечения коронавирусной инфекции пациентка отметила улучшение по основному заболеванию (ИКБ), уменьшились боли в суставах, улучшилось общее самочувствие.

В середине октября у пациентки появилась боль и ограничение движения в левом плечевом суставе. В анализах крови выявлено снижение уровня антител IgG к боррелиям. В этот период впервые выявлено повышение антител IgM и IgG к ВКЭ и СОЭ до 27 мм/ч. В начале ноября у больной возобновились боли в суставах рук и ног, в анализе крови отмечено повышение показателей IgG к боррелиям. Инфекционист назначил амбулаторное лечение (цефтриаксон в течение 3 нед). После лечения наступило незначительное улучшение общего самочувствия.

Особенностью этого случая явилось то, что во время ухудшения состояния больной, связанного с клещевым боррелиозом, произошло заражение вирусом SARS-CoV-2, оказавшего влияние на дальнейшее течение болезни. Чтобы проследить динамику изменений при тройной микст-инфекции проведено комплексное лабораторное исследование одновременно всех сывороток крови этой пациентки, собранных на протяжении длительного периода времени (период наблюдения – более 1 года) (см. таблицу).

При ретроспективном анализе данных отмечено, что на протяжении всего периода наблюдения IgM к боррелиям у больной не обнаружены. Об обострении ИКБ можно судить по клиническим проявлениям этого заболевания (мигрирующая эритема, суставной синдром), по росту показателей специфических IgG.

После того как был выставлен диагноз ИКБ (26.02-17.03.2020) пациентка впервые получила этиотропное лечение (назначен цефтриаксон), в результате которого в сыворотке крови появились антитела IgM к вирусу КЭ ($K_{\text{н}}=1,2$) на фоне высокого титра антител IgG к ВКЭ ($K_{\text{н}}=7,8$). Хотя симптомов характерных для КЭ в этот период больная не отмечала. Появление антител IgM свидетельствовало об активации вируса КЭ и могло быть связано с подавлением активности боррелий на фоне специфического лечения. Приём антибиотиков часто приводит к иммуносупрессии, что может являться триггером для активации латентных вирусов.

Спустя месяц наступило ухудшение состояния больной, суставной болевой синдром усилился, повысился титр специфических антител IgG к боррелиям. Именно в этот период произошло заражение SARS-CoV-2, по поводу чего проведено лечение следующими препаратами: умифе-

Динамика диагностических показателей клещевых инфекций и COVID-19 в сыворотках крови пациентки К.

Дата забора проб	Показатели ИФА, K _n					ПЦР-РВ					Показатели ИФА, K _n	
	к вирусу КЭ			к боррелиям		ДНК/РНК возбудителей клещевых инфекций					к SARS-CoV-2	
	АГ	IgM	IgG	IgM	IgG	КЭ	ИКБ/ВКЛ	МЭЧ	ГАЧ	КР	IgM	IgG
18.02.2020	н.о.	н.о.	6,9	н.о.	4,2	н.о.	н.о./н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	Н.и.	Н.и.
26.02-17.03.2020 г Диагноз: Клещевой боррелиоз, диссеминированная форма, острый период. Больная получает этиотропное лечение (цефтриаксон) / КАК(10.03.20)Нб-129г/л, эр.-3,8x10 ¹² /л, тр.- 194x10 ⁹ /л, лейкоц.-4,1x10 ⁹ /л, СОЭ-20мм/ч, СРБ-н.о.												
22.04.2020	н.о.	н.о.	8,5	н.о.	5,3	н.о.	н.о./н.и.	н.о.	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.
05.06.2020	н.о.	1,2	7,8	н.о.	6,6	н.о.	н.о./н.и.	н.о.	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.
08.07-22.07.2020 г Диагноз: COVID-19, среднетяжелая форма. Двухсторонняя полисегментарная пневмония с площадью поражения 30%. Больная получает лечение по поводу COVID-19 (умифеновир, гидроксихлорохин, азитромицин, цефтриаксон). КАК(09.07.20) Нб-130г/л, эр.-3,8x10 ¹² /л, тр.- 221x10 ⁹ /л, лейкоц.-4,7x10 ⁹ /л, СОЭ-45мм/ч, СРБ-4мг/л												
15.10.2020	4,3	1,3	12,0	н.о.	2,5	н.о.	н.о./н.и.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	8,2
КАК(28.10.20) Нб-129г/л, эр.-3,88x10 ¹² /л, тр.- 189x10 ⁹ /л, лейкоц.-4,3x10 ⁹ /л, СОЭ-27мм/ч												
03.11.2020	1,9	0,9	8,2	н.о.	3,6	н.о.	н.о./н.и.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	8,1
10.11-01.12.2020 г Диагноз: Хронический клещевой боррелиоз, рецидивирующее течение. Больная получает этиотропное лечение (цефтриаксон)												
14.12.2020	2,0	н.о.	5,8	н.о.	3,4	н.и.	н.о./н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.о.	8,4
16.01.2021 г Диагноз: Микст-инфекция - клещевой боррелиоз, хроническая форма. Клещевой энцефалит, бессимптомная форма, хроническое течение.												
14.05.2021	7,1	н.о.	9,2	н.о.	1,9	н.и.	н.о./н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.о.	11,0

Примечание. КАК – клинический анализ крови; K_n – коэффициент позитивности в ИФА; АГ – антиген; н.и. – не исследовали; н.о. – не обнаружено; КЭ – клещевой энцефалит; ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз; МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека; ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека; ВКЛ – возвратная клещевая лихорадка; КР – клещевой риккетсиоз.

новир, гидроксихлорохин, азитромицин, цефтриаксон. Общее состояние больной значительно улучшилось, практически купировался суставной болевой синдром, что, вероятнее всего, связано с комплексной антибиотикотерапией, являющейся этиотропной и для лечения ИКБ [28]. Через 3 мес после этого лечения зарегистрированы стабильные показатели антител IgG к SARS-CoV-2 (K_n = 8,3 ± 0,1) и значительное снижение IgG к боррелиям (с 6,6 до 2,5).

При заражении больной SARS-CoV-2 произошла дальнейшая реактивация вируса КЭ. Об этом свидетельствовало появление антигена к вирусу КЭ и увеличение количества антител IgM (с 1,2 до 1,3) и IgG (с 7,8 до 12,0). Этому могло способствовать несколько факторов: переключение иммунного ответа на SARS-CoV-2, с одновременным подавлением активности боррелий под действием этиотропного лечения и назначение гидроксихлорохина, обладающего иммунодепрессивным действием. Для активации латентной инфекции достаточно любого внешнего или внутреннего (интеркуррентные заболевания) воздействия, которое привело бы к дисбалансу взаимоотношений возбудителей и иммунной системы. При таких условиях запускается репликация персистирующего вируса, который вступает во взаимодействие с иммунокомпетентными клетками [29]. Несмотря на активацию вируса клинических проявлений КЭ у больной не наблюдалось, что могло быть связано с инфицированием низковирулентным штаммом вируса КЭ. Такие штаммы вируса, стали доминировать в настоящее время на территории Приморского края [30].

Лабораторные исследования в дальнейшем показали, что подавление активности боррелиозного процесса этиотропным лечением (IgG к боррелиям снизились с 3,4 до 1,9) опять привело к активации персистирующего вируса КЭ (увеличение антигена к ВКЭ с 2,0 до 7,1 и антител IgG с 5,8 до 9,2). Клинических проявлений КЭ у больной не отмечено.

На примере изучаемого случая, при проведении комплексного ретроспективного анализа клинико-лаборатор-

ных данных, полученных на протяжении длительного периода времени, удалось проследить доминирующее влияние *B. burgdorferi* по отношению к ВКЭ. Ранее подобное явление описано на уровне организма специфического переносчика – клеща *I. persulcatus* [31]. Показано, что клещи, заражённые боррелиями, либо не восприимчивы к вводимому парентерально высоковирулентному штамму вируса КЭ, либо репликация вируса в их организме тормозилась [32]. Этот антагонизм находит своё отражение и в клинической практике. В клещах, снятых с пациентов с диагнозом ИКБ, в 72,2% обнаружен также ВКЭ [33]. По клиническим проявлениям случаи смешанной энцефалит-боррелиозной инфекции выявлены только у 2,4% больных, с учётом серологических данных – у 4,8%. На основании этого предположено, что заражение ВКЭ происходит в 10 раз реже, чем фактически могло бы быть (72,2% к 7,2%). На долю боррелиозной микст-инфекции, ассоциированной с клещевым энцефалитом на различных эндемичных территориях, приходится 5-40% случаев заражения [34 – 36]. Предполагают, что лиганды боррелий могут блокировать процесс проникновения вирионов через мембраны в клетки клещей [37]. Эта блокада, может осуществляться не только в кишечнике – основном месте обитания боррелий, но и в других тканях, в том числе – в гемоцитах [38]. Возможна блокада клеток слюнных желез, т. к. при заражении микст-инфицированных боррелиями и ВКЭ клещей в 93% случаев передача вируса, не происходит [33]. Несмотря на описанные трудности совместного существования этих возбудителей, сочетанное заражение людей ими все же происходит.

Подобные взаимоотношения проявляются и в сложившейся в настоящее время эпидемической ситуации COVID-19. Сочетанная циркуляция вируса гриппа и вируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции показывает преимущество в пользу пока мало изученного нового вируса. Потенциал активности вируса гриппа уступает, случаи этой респираторной инфекции не регистрируются, что указывает на превосходство вируса SARS-CoV-2,

доминирующего в настоящее время в экологической нише респираторных инфекций. Предполагают, что в предстоящий эпидемический сезон совершенно иное значение приобретёт кампания по вакцинации против гриппа и значительный охват населения страны вакцинацией должен положительно сказаться на показателях заболеваемости не только гриппом, но и, возможно, на исходах COVID-19 [39]. По мнению ряда авторов [17,18, 40] через несколько лет пандемический SARS-CoV-2 может превратиться в сезонный эпидемический компонент ОРВИ, подобно тому, как это произошло с пандемическим вариантом гриппа А (H₁N₁) pdm09 [41-44].

Восприимчивость организма к той или иной инфекции определяется совокупностью ряда факторов: патогенностью инфекционных агентов, конкуренцией между возбудителями, состоянием иммунной системы, окружающей средой. Возможность репликации вируса КЭ, обуславливающей клинические проявления инфекции, зависит от вирулентности вируса, жизнеспособности клетки-хозяина и состояния иммунной системы организма. Важное практическое значение имеет учёт и наблюдение за людьми с бессимптомной персистенцией ВКЭ, что позволяет в дальнейшем правильно оценивать эпидемиологическую обстановку, объяснять происхождение естественной иммунизации лиц, длительно проживающих на территориях природных очагов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 14, 22, 37-38, 40 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристов В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: Научно-практический центр традиционной медицины Минздрава Российской Федерации; 2001.
2. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Львов Д.Н., Киреев Д.Е., Гурьев Е.Л., Аканина Д.С. и др. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края (2003-2006). *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(5): 37-48.
3. Алексеев А.Н. Диагностические и клинические важные аспекты изучения смешанных клещевых инфекций. *ПЕСТ менеджмент*. 2004; (3): 10.
4. Шкарин В.В., Благонравова А.С., Чумаков М.Э. Эпидемиологические особенности сочетанных природно-очаговых инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 96(5): 43-52.
5. Рудаков Н.В., Ястребов В.К. Эволюция учения о природной очаговости болезней человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; 4: 4-38.
6. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Молекулярно-генетический мониторинг как основа современного эпидемиологического надзора за клещевыми инфекциями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 424-9. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429.
7. Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А. Эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика клещевых трансмиссивных инфекций человека на территориях с различной степенью риска заражения населения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (5): 30-5.
8. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Вестник РАМН*. 2001; (11): 41-5.
9. Леонова Г.Н. О нозологической однородности и эволюции клещевого энцефалита. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; (3): 19-22.
10. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Верификация моно- и микст-инфицированности переносчиков клещевых инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (10): 659-64. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-659-664.
11. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2019 году». <http://25.rosпотреbnadzor.ru/306>.
12. Леонова Г.Н. Динамика эпидемической ситуации по клещевому энцефалиту на Дальнем Востоке. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(3): 17-22.
13. Коренберг Э.И. Молекулярно-биологические методы и изучение феномена природной очаговости болезней. *Успехи современной биологии*. 2012; 132(5): 448-62.
14. Субботин А.В., Семёнов В.А., Этенко Д.А. Проблема современных смешанных нейроинфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Архив внутренней медицины*. 2012; (2): 35-9. doi: 10.20514/2226-6704-2012-0-2-35-39.
15. Амосов М.Л., Лесняк О.М., Надеждина М.В., Бардина Т.Г. Клинические проявления клещевого энцефалита при его сочетании с Лайм-боррелиозом в остром периоде. *Актуальные проблемы природно-очаговых инфекций*. Ижевск; 1998: 214-5.
16. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. COVID-19: этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10 (3): 421-45. doi: 10.15789/2220-7619-СЕС-1473.
17. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Амикин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10 (2): 221-46. doi: 10.15789/2220-7619-НОИ-1412.
18. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. *Лечащий врач*. 2013; (10): 49-54.
19. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; (2): 94-8.
20. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май-июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; (3): 25-9.
21. Устьянцева И.М., Зинченко М.А., Гусельникова Ю.А., Кулагина Е.А., Алиев Е.Р., Агаджанян В.В. SARS-CoV-2. Маркеры воспаления. *Политравма*. 2020; (4): 35-43. doi: 10.24411/1819-1495-2020-10044.
22. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Миронов А.Ю., Забозлаев Ф.Г. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. Учебно-методическое пособие. М.: Академия постдипломного образования ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»; 2020.
23. Грибова В.В., Окунь Д.Б., Шалфеева Е.А., Щеглов Б.О., Щелканов М.Ю. Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных инфекций (в том числе – связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. *Якутский медицинский журнал*. 2020; (2): 44-7. doi: 10.25789/YMJ.2020.70.13.
24. Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013.
25. Чучалин А.Г., ред. Пульмонология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
26. Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Ханипова Л.В., Любимцева О.А., Огошкова Н.В., Антонова М.В. и др. Иксодовые клещевые боррелиозы (обучающий модуль). *Инфекционные болезни. Новости. Мнения. Обучение*. 2014; 9 (4): 57-81.
27. Хафизова И.Ф., Фазылов В.Х., Якупов Э.З., Матвеева Т.В., Хакимова А.Р., Муллаянова Р.Ф. Хроническая форма клещевого энцефалита: особенности клиники и диагностики (обзор литературы). *Вестник современной клинической медицины*. 2013; 6 (3): 79-85.
28. Леонова Г.Н., Беликов С.И. Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа (Flaviviridae, flavivirus, TBEV-FE) на территории Азии. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64 (5): 250-6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256>.
29. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В. Вирус клещевого энцефалита во внутренней среде клеща переносчика: экологические аспекты. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2007; (4): 100-4.
30. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Вашукова М.А., Волкова Л.И. Боррелии как вероятные антагонисты вируса клещевого энцефалита: паразитологический и клинический аспекты проблемы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2001; (3): 3-11.
31. Лайковская Е.Э., Лесняк О.М., Волкова Л.И., Турова Е.Л., Соколова З.И., Ходырев В.Н. Микст-инфекция Лайм-боррелиоза и клещевого энцефалита. В кн.: Проблемы клещевых боррелиозов. Коренберг Э.И., ред. М.: Центр по боррелиозам; 1993: 93-8.
32. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. М.: НИИ общей патологии и патофизиологии; 1997.
33. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Паксинна Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2007; (5): 8-10.
34. Попова С.П., Безбородов Н.Г., Половинкина Н.А., Голуб В.П., Барышева И.В., Вознесенский С.Л. Клинико-лабораторные признаки ранних проявлений иксодового клещевого боррелиоза (Болезни Лайма). *Вестник РУДН. Медицина*. 2012; (3): 37-42.
35. Даниленко Д.А., Комиссаров А.Б., Стукова М.А., Лиознов Д.А. Быть или не быть: прогноз развития эпидемии COVID-19 в России. *Журнал инфектологии*. 2020; 12(3): 6-11. doi:10.22625/2072-6732-2020-12-3-6-11.
36. Щелканов М.Ю., Львов Д.К., Федякина И.Т., Баранов Н.И., Гореликов В.Н., Резник В.Я. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А(H₁N₁)swl на Дальнем Востоке в 2009 г. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (3): 10-5.
37. Бурцева Е.И., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Альховский С.В. и др. Особенности социализации вируса гриппа в постпандемический период 2010-2011 гг. по итогам деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова Минздрава России. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (1): 20-8.

MICROBIOLOGY

43. Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Бурцева Е.И., Альховский С.В., Прилипов А.Г., Кужкова И.С. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа А (H₁N₁) pdm09 в эпидсезоне 2012-2013 гг. в г. Москве. *Вопросы вирусологии*. 2013; (S1): 90-101.
44. Колобухина Л.В., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Альховский С.В., Прилипов А.Г., Меркулова Л.Н. и др. Эпидемический сезон 2013-2014 гг. Госпитальный мониторинг и противовирусная терапия. *Терапевтический архив*. 2014; 86 (10): 52-9.

REFERENCES

1. L'vov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevskiy V.L. et al. Atlas of the spread of causative agents of natural focal viral infections in the territory of the Russian Federation. Moscow: Nauchno-prakticheskoy tsentr traditsionnoy meditsiny Ministerstva zdoravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2001. (in Russian)
2. Shchelkanov M.Yu., Anan'yev V.Yu., L'vov D.N., Kireyev D.Ye., Gur'yev Ye.L., Akanina D.S. Comprehensive ecological and virological monitoring in the Primorsky Territory (2003-2006). *Voprosy virusologii*. 2007; 52(5): 37-48. (in Russian)
3. Alekseyev A.N. Diagnostically and clinically important aspects of the study of mixed tick-borne infections. *PEST menedzhment*. 2004; (3): 10. (in Russian)
4. Shkarin V.V., Blagoravova A.S., Chumakov M.E. Epidemiological features of combined natural focal infections. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2017; 96(5): 43-52. (in Russian)
5. Rudakov N.V., Yastrebov V.K. The evolution of the doctrine of natural foci of human disease. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy*. 2014; 4: 4-38. (in Russian)
6. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Molecular genetic monitoring as the basis of modern epidemiological surveillance of tick-borne infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (7): 424-9. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429. (in Russian)
7. Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Rudakova S.A. Epidemiology, laboratory diagnostics and prevention of human tick-borne transmissible infections in areas with varying degrees of risk of infection of the population. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2014; (5): 30-5. (in Russian)
8. Korenberg E.I. Study and prevention of mixed infections transmitted by ixodid ticks. *Vestnik RAMN*. 2001; (11): 41-5. (in Russian)
9. Leonova G.N. About nosological homogeneity and evolution of tick-borne encephalitis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; (3): 19-22. (in Russian)
10. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Verification of mono- and mixed-infection of tick-borne infection vectors. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2020; 65 (10): 659-64. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-659-664 (in Russian)
11. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in Primorsky Krai in 2019». <http://25.rosпотренадзор.ru/306>. (in Russian)
12. Leonova G.N. Dynamics of the tick-borne encephalitis epidemic in the Far East. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; 14(3): 17-22. (in Russian)
13. Korenberg E.I. Molecular biological methods and study of the phenomenon of natural focus of diseases. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2012; 132(5): 448-62. (in Russian)
14. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2017; 162: 2211-8. doi: 10.1007/s00705-017-3309-1.
15. Subbotin A.V., Semenov V.A., Etenko D.A. The problem of modern mixed neuroinfections transmitted by ixodid ticks. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2012; (2): 35-9. doi: 10.20514/2226-6704-2012-0-2-35-39. (in Russian)
16. Amosov M.L., Lesnyak O.M., Nadezhkina M.V., Bardina T.G. Clinical manifestations of tick-borne encephalitis when combined with Lyme borreliosis in the acute period. *Aktual'nyye problemy prirodno-ochagovykh infeksiiy. Izhevsk*. 1998; 214-5. (in Russian)
17. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kruzhkova I.S., Maleyev V.V. COVID-19: etiology, clinic, treatment. *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10 (3): 421-45. doi: 10.15789/2220-7619-CEC-1473. (in Russian)
18. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Amikin V.G., Maleev V.V. History of study and modern classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Infektsiya i immunitet*. 2020. 10 (2): 221-46. doi: 10.15789/2220-7619-HOI-1412. (in Russian)
19. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., L'vov D.K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic danger. *Lechashchiy vrach*. 2013; (10): 49-54. (in Russian)
20. Shchelkanov M.Yu., Anan'yev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Middle East respiratory syndrome: when will a smoldering focus break out? *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; (2): 94-8. (in Russian)
21. Shchelkanov M.Yu., Anan'yev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Epidemic outbreak of Middle East respiratory syndrome in the Republic of Korea (May-July 2015): causes, dynamics, conclusions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; (3): 25-9. (in Russian)

22. World Health Organization. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. 2020; <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19%2D%2D11-march-2020>.
23. Ust'yantseva I.M., Zinchenko M.A., Gusel'nikova Yu.A., Kulagina Ye.A., Aliyev Ye.R., Agadzhanyan V.V. SARS-CoV-2. Inflammation markers. *Politравма*. 2020; (4): 35-43. doi: 10.24411/1819-1495-2020-10044. (in Russian)
24. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Mironov A.YU., Zabozyayev F.G. New coronavirus infection (COVID-19): etiology, epidemiology, clinic, diagnosis, treatment and prevention. *Uchebno-metodicheskoye posobiye*. Moscow: FMBA Academy of Graduate Education; 2020. (in Russian)
25. Gribova V.V., Okun' D.B., Shalfeyeva Ye.A., Shcheglov B.O., Shchelkanov M.YU. Cloud service for differential clinical diagnostics of acute respiratory viral infections (including those associated with especially dangerous coronaviruses) using artificial intelligence methods. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; (2): 44-7. doi: 10.25789/YMJ.2020.70.13. (in Russian)
26. L'vov D.K., ed. Viruses and viral infections of humans and animals. *Rukovodstvo po virusologii*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
27. Chuchalin A.G., ed. Pulmonology [Pul'monologiya. Natsional'noye rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
28. Kashuba E.A., Drozdova T.G., Khanipova L.V., Lyubimtseva O.A., Ogoshkova N.V., Antonova M.V., Bel'tikova A.A. Ixodic tick-borne borreliosis (training module). *Infeksionnyye bolezni: Novosti. Mneniya. Obucheniye*. 2014; 9 (4): 57-81. (in Russian)
29. Khafizova I.F., Fazylov V.Kh., Yakupov E.Z., Matveyeva T.V., Khakimova A.R., Mullayanova R.F. Chronic form of tick-borne encephalitis: clinical features and diagnostics (literature review). *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2013; 6 (3): 79-85. (in Russian)
30. Leonova G.N., Belikov S.I. Phylogenetic analysis and spread of the tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern subtype (flaviridae, flavirus, TBEV-FE) in Asia. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(5): 250-6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256>. (in Russian)
31. Alekseyev A.N., Dubinina Ye.V. Tick-borne encephalitis virus in the internal environment of a tick vector: ecological aspects. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2007; (4): 100-4. (in Russian)
32. Alekseyev A.N., Dubinina Ye.V., Vashukova M.A., Volkova L.I. Borrelia as probable antagonists of tick-borne encephalitis virus: parasitological and clinical aspects of the problem. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 2001; (3): 3-11. (in Russian)
33. Laykovskaya Ye.E., Lesnyak O.M., Volkova L.I., Turova Ye.L., Sokolova Z.I., Khodyrev V.N. Mixed infection of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. In: Tick-borne borreliosis problems. Korenberg E.I., ed. Moscow: Tsentr po borreliozam; 1993: 93-8. (in Russian)
34. Kryzhanovskiy G.N., Magayeva C.B., Makarov C.B. Neuroimmunopathology. Moscow: NII obshchey patologii i patofiziologii; 1997. (in Russian)
35. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Paksina N.D. Organization of surveillance for tick-borne viral encephalitis and measures for its prevention in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2007; (5): 8-10. (in Russian)
36. Popova S.P., Bezborodov N.G., Polovinkina N.A., Golub V.P., Barysheva I.V., Voznesenskiy S.L. Clinical and laboratory signs of early manifestations of ixodic tick-borne borreliosis (Lyme disease). *Vestnik RUDN. Meditsina*. 2012; (3): 37-42. (in Russian)
37. Alekseev A.N., Arumova E.A., Vasilieva I.S. Borrelia burgdorferi sensu lato in the female cement plug of Ixodes persulcatus ticks (Acari, Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 1995; 19: 519-22.
38. Alekseev A.N. The pathogen-vector interface: A history of paradigms. *Acarina*. 1999; 7 (2): 111-20.
39. Danilenko D.A., Komissarov A.B., Stukova M.A., Lioznov D.A. To be or not to be: a forecast of the development of the COVID-19 epidemic in Russia. *Zhurnal infektologii*. 2020; 12(3): 6-11. doi: 10.22625/2072-6732-2020-12-3-6-11. (in Russian)
40. Neher R.A., Dyrdak R., Druelle V., Hodcroft E.B., Albert J. Potential impact of seasonal forcing on a SARS-CoV-2 pandemic. *Swiss Med. Wkly*. 2020 Mar 16;150:w20224. doi: 10.4414/sm.w.2020.20224.
41. Shchelkanov M.Yu., L'vov D.K., Fedyakina I.T., Baranov N.I., Gorelikov V.N., Reznik V.YA. et al. Dynamics of the spread of pandemic influenza A / H₁N₁ swl in the Far East in 2009. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (3): 10-5. (in Russian)
42. Burtseva Ye.I., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Prilipov L.G., Al'khovskiy S.V. et al. Peculiarities of the social circulation of influenza viruses in the post-pandemic period of 2010-2011 based on the results of the activities of the center for ecology and epidemiology of influenza of the federal state institution research institute of virology named after D.I. Ivanovskiy Ministry of Health and Social Development of Russia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (1): 20-8. (in Russian)
43. Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., Burtseva Ye.I., Al'khovskiy S.V., Prilipov A.G., Kuzhkova I.S. et al. Clinical and epidemiological characteristics of influenza A (H1N1) pdm09 in the epidemiological season 2012-2013 in Moscow. *Voprosy virusologii*. 2013; (S1): 90-101. (in Russian)
44. Kolobukhina L.V., Burtseva Ye.I., Shchelkanov M.Yu., Al'khovskiy S.V., Prilipov A.G., Merkulova L.N. et al. Epidemic season 2013-2014. Hospital monitoring and antiviral therapy. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2014; 86 (10): 52-9. (in Russian)

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Резниченко М.Ф.¹, Островский О.В.¹, Веровский В.Е.¹, Стаценко М.Е.¹, Воронков А.А.², Гильманов А.Ж.³, Соснин Д.Ю.⁴, Цвиренко С.В.⁵.

ГОТОВНОСТЬ ВРАЧЕЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И КАРДИОЛОГОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ РЕКОМЕНДАЦИЙ ЧЕТВЕРТОГО УНИВЕРСАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 400131, Волгоград, Россия;

²ГУЗ «Консультативно-диагностическая поликлиника № 2», 400081, Волгоград, Россия;

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

⁴ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика

Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия;

⁵ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, Екатеринбург, Россия

В настоящем исследовании рассмотрены проблемы реализации четвертого универсального определения инфаркта миокарда в лечебных учреждениях четырех крупных городов: г. Волгограда (включая г. Волжский), г. Екатеринбурга, г. Перми, г. Уфы, а также районов Волгоградской области. Многоцентровое исследование проводилось в форме анкетирования специалистов кардиологической и лабораторной служб. По результатам опроса специалистов кардиологической службы установлено, что треть из них не видят преимуществ рекомендованного для диагностики инфаркта миокарда hs-cTn теста, а также практически половина опрошенных специалистов считают, что миоглобин является необходимым тестом для выявления инфаркта миокарда. Вероятно, это напрямую связано с тем, что в 16 клинико-диагностических лабораториях из 5 вышеуказанных регионов до сих пор выполняется определение миоглобина у пациентов, поступающих с подозрением на инфаркт миокарда. Материально-техническая обеспеченность лечебно-диагностических учреждений в целом соответствует требованиям четвертого универсального определения инфаркта миокарда. Однако существует проблема «качественного» оснащения регионов Волгоградской области, поскольку только 3 из 31 района заявили о возможности выполнения количественного определения hs-cTn, а качественный анализ проводился на платформах, которые не мониторируются IFCC. Настораживает факт, что почти половина специалистов клинико-диагностических лабораторий центральных районных больниц Волгоградской области не указали производителя реагентов для определения тропонинов. Таким образом, в образовательные программы повышения квалификации специалистов кардиологической и лабораторной служб требуется включение аспектов, связанных с разъяснением аналитических характеристик, особенностей технологии выполнения тропониновых тестов и связанных с этим вариантов интерпретации результатов.

Ключевые слова: инфаркт миокарда; тропонин; анкетирование; диагностика; многоцентровое исследование; кардиологическая служба; лабораторная служба.

Для цитирования: Резниченко М.Ф., Островский О.В., Веровский В.Е., Стаценко М.Е., Воронков А.А., Гильманов А.Ж., Соснин Д.Ю., Цвиренко С.В. Готовность врачей клинической лабораторной диагностики и кардиологов к выполнению рекомендаций четвертого универсального определения инфаркта миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 695-704. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-695-704>

Для корреспонденции: Резниченко Мария Федоровна, ст. преподаватель каф. теоретической биохимии с курсом клинической биохимии; e-mail: brezgina@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.04.2021

Принята к печати 14.05.2021

Опубликовано 29.11.2021

Reznichenko M.F.¹, Ostrovskij O.V.¹, Verovsky V.E.¹, Statsenko M.E.¹, Voronkov A.A.², Gilmanov A.Z.³, Sosnin D.Y.⁴, Tsvirenko S.V.⁵

READINESS OF CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS AND CARDIOLOGISTS TO IMPLEMENT THE RECOMMENDATIONS OF THE FOURTH UNIVERSAL DEFINITION OF MYOCARDIAL INFARCTION

¹Volgograd State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 400131, Volgograd, Russian Federation;

²Consultative Diagnostic Clinic № 2, 400081, Volgograd, Russian Federation ;

³Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russian Federation;

⁴Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician Ye. A. Vagner Perm State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614000, Perm, Russian Federation;

⁵Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 620028, Ekaterinburg, Russian Federation

This study describes the problems of the implementation of the fourth universal definition of myocardial infarction in the medical institutions of four cities: Volgograd (with Volzhsky), Yekaterinburg, Perm, Ufa, and districts of the Volgograd region. The multicenter study was conducted in the form of a questionnaire of specialists in cardiology and laboratory services. After a survey

of cardiac specialists, it was found that a third of them did not see the benefits of the hs-cTn test recommended for the diagnosis of myocardial infarction, and almost half of the specialists surveyed believed that myoglobin was a necessary test for detecting myocardial infarction. Probably, this is due to the fact that 16 clinical diagnostic laboratories from the 5 above regions still perform the determination of myoglobin in patients with suspected myocardial infarction. The material and technical support of medical and diagnostic institutions generally meets the requirements of the fourth universal definition of myocardial infarction. However, there is a problem of «qualitative» equipment of the regions of the Volgograd region, since only 3 out of 31 districts declared the possibility of carrying out a quantitative determination of hs-cTn, and qualitative analysis was carried out on platforms that are not monitored by the IFCC. It is worrying that almost half of the specialists of the clinical and diagnostic laboratories of the central district hospitals of the Volgograd region did not indicate the manufacturer of reagents for determining troponins. Thus, in the educational programs of advanced training of specialists in cardiology and laboratory services, it is necessary to include aspects related to the explanation of analytical characteristics, the characteristics of the technology for performing troponin tests and the related interpretation options for the results.

Key words: myocardial infarction; troponin; questionnaires; diagnostics; multicenter study; cardiology service; laboratory service.

For citation: Reznichenko M.F., Ostrovskij O.V., Verovsky V.E., Statsenko M.E., Voronkov A.A., Gilmanov A.Z., Sosnin D.Y., Tsvirenko S.V. Readiness of clinical laboratory diagnostics and cardiologists to implement the recommendations of the fourth universal definition of myocardial infarction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 695-704 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-695-704>

For correspondence: Reznichenko M.F., senior lecturer of the department of biochemistry; e-mail: brezgina@gmail.com

Information about authors:

Reznichenko M.F., <https://orcid.org/0000-0001-8670-791X>;
Ostrovskij O.V., <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>;
Verovsky V.E., <https://orcid.org/0000-0001-5944-9572>;
Statsenko M.E., <https://orcid.org/0000-0002-3306-0312>;
Gilmanov A.Z., <https://orcid.org/0000-0003-0996-6189>;
Sosnin D.Y., <https://orcid.org/0000-0002-1232-8826>;
Tsvirenko S.V., <https://orcid.org/0000-0003-0185-0050>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.04.2021

Accepted 14.05.2021

Published 29.11.2021

Введение. Успехи диагностики острых форм ишемической болезни сердца очевидны. В основном они достигнуты в результате как непрерывного совершенствования биомаркеров, так и создания новых диагностических стратегий. Применительно к инфаркту миокарда таким биомаркером является высокочувствительный тропонин (hs-cTn) [1]. Внедрение теста hs-cTn в клиническую практику позволило разработать стратегии ранней диагностики инфаркта миокарда (ИМ), а также мониторинга повреждения миокарда при различных медицинских манипуляциях [2 – 5]. Однако прогресс от внедрения этого маркера в рутинную медицинскую практику тормозится по целому ряду причин, а применение теста hs-cTn в практическом здравоохранении менее эффективно, чем можно было ожидать на основании опубликованных клинических исследований (в основном зарубежных).

Несмотря на то, что все методы определения концентрации тропонина на сегодняшний день основаны на одной и той же иммунохимической реакции – так называемом сэндвич-анализе, производители тест-наборов с целью повышения чувствительности применяют оригинальные технологические подходы, что привело к значительному разбросу абсолютных величин, получаемых разными тест-системами при определении тропонина в крови больных [6]. Более того, известно, что в крови циркулирует не собственно тропонин, а постоянно изменяющийся спектр его модифицированных фрагментов, а для их обнаружения используется 1–2 типа антител для связывания антигена (мышинные моноклональные антитела против определенного эпитопа, способные

связаться лишь с некоторыми фрагментами молекулы тропонина) и 1–2 типа меченых каким-либо способом детекторных антител.

Специальный комитет Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) совместно с Американской ассоциацией клинической химии (ААСС) приложил немало усилий для стандартизации hs-cTn тестов. Однако до настоящего момента при практически идеальной корреляции величин, полученных наилучшими тест-системами, абсолютная величина определяемой концентрации этого аналита при использовании коммерчески доступных тестов может различаться в 5–10 раз. Поэтому прямое сравнение абсолютных значений концентрации тропонина невозможно, а границы нормы должны быть определены отдельно для каждого вида тест-систем [7]. И хотя клинические решения с учетом соответствующих референсных диапазонов в целом совпадают для всех тестов, эта ситуация создает очевидное неудобство и требует от врачей-клиницистов и врачей клинической лабораторной диагностики (КЛД) как формирования дополнительных компетенций по интерпретации результатов hs-cTn тестов, так и нового уровня взаимодействия между собой.

Цель работы: оценить информированность специалистов лабораторной и кардиологической служб об особенностях аналитических технологий и диагностических алгоритмов применения теста hs-cTn и cTn, а также оценить обеспеченность лечебных учреждений средствами, позволяющими проводить исследования в соответствии с рекомендациями четвертого универсального определения инфаркта миокарда.

Материал и методы. Проведено многоцентровое исследование в форме анкетирования, в котором приняли участие лечебные учреждения четырех крупных

городов с населением более 1 млн человек: г. Волгограда (включая г. Волжский), г. Екатеринбурга, г. Перми, г. Уфы, а также районов Волгоградской области. В опро-

Анкета врача

1. Наименование специальности _____
2. Есть ли на ваш взгляд преимущества при использовании в диагностике ОИМ hsTn теста перед обычным Tn тестом
 - да
 - нет
3. Есть ли на ваш взгляд преимущества при использовании в диагностике ОИМ **количественного** Tn теста перед **качественным** экспресс тестом на Tn
 - да
 - нет
4. Какие лабораторные тесты Вы считаете **необходимыми** для выявления пациентов с ОИМ
 - Tn тест (качественный экспресс-тест)
 - hsTn тест (качественный экспресс-тест)
 - Tn тест (количественный тест)
 - hsTn (количественный тест)
 - КФК-МВ
 - АсАТ
 - ЛДГ
 - Миоглобин
5. Какие лабораторные тесты Вы считаете **достаточными** для подтверждения ОИМ
 - Tn тест (качественный экспресс-тест)
 - hsTn тест (качественный экспресс-тест)
 - Tn тест (количественный тест)
 - hsTn (количественный тест)
 - КФК-МВ
 - АсАТ
 - ЛДГ
 - Миоглобин
6. Какие рекомендации, вы используете для диагностики и лечения пациентов с ОИМ
 - Третье универсальное определение инфаркта миокарда
 - Четвертое универсальное определение инфаркта миокарда
 - Клинические рекомендации Европейского общества кардиологов
 - Клинические рекомендации Американского общества кардиологов
 - Клинические рекомендации Российского кардиологического общества
 - Стандарты специализированной медицинской помощи МЗ РФ
7. Какие стратегии диагностики ОИМ вы считаете наиболее оптимальными для выявления пациентов с ОИМ без подъема сегмента ST на ЭКГ
 - LoD strategy (Level of Detection) + nonischemic ECG
 - ESC 0/3-h algorithms
 - ESC 0/2-h algorithms
 - ESC 0/1-h algorithms
 - ни одна из выше перечисленных
 - свой вариант _____

Рис. 1. Анкета для врачей кардиологов и терапевтов.

се принимали участие 96 врачей-терапевтов и врачей-кардиологов г. Волгограда и Волгоградской области, участвующих в системе непрерывного медицинского образования, а также 81 клинико-диагностическая лаборатория (КДЛ) из 5 вышеуказанных регионов. Для врачей-терапевтов и врачей-кардиологов анкета включала вопросы, позволяющие оценить уровень знаний врачей о преимуществах высокочувствительного и обычного теста на тропонин в диагностике ОИМ, а также уровень осведомленности о применении различных диагностических стратегий ОИМ (рис. 1). Для врачей КДЛ анкета включала вопросы, связанные с аналитическими характеристиками тестов, техническими возможностями лаборатории и др. (рис. 2, а, б).

Результаты и обсуждение. Уровень информированности врачей. Результаты опроса врачей-кардиологов и терапевтов представлены на рис.3. Установлено, что только 70% врачей отметили преимущество использования для диагностики и мониторинга ОИМ теста hs-cTn по сравнению с обычным Tn (из них кардиологи – 43%, терапевты – 29%); примерно так же распределились мнения и о преимуществах количественного Tn-теста перед качественным: преимущества отметили 67% (из них кардиологи – 38%, терапевты – 29%). Настораживает тот факт, что 48% опрошенных специалистов считают, что миоглобин до сих пор является необходимым тестом для выявления инфаркта миокарда. Вопрос об использовании диагностических стратегий для выявления пациентов с ОИМ без подъема сегмента ST на ЭКГ оказался одним из наиболее трудных для врачей: только 10% показали знание современных рекомендаций, 43% проигнорировали этот вопрос, 33% указали, что ни одна из стратегий не применяется. По-видимому, интерпретация теста выполняется в соответствии с рекомендациями производителя, о которых врач-клиницист информирует специалист, выполняющий анализ, а аналитические особенности теста игнорируются.

Таким образом, многие из врачей не знают о современных стратегиях диагностики ОИМ у пациентов, плохо информированы и не понимают рекомендаций актуального на сегодняшний день «четвертого универсального определения ИМ» [8], не понимают специфики hs-cTn теста и не видят перспектив внедрения новых диагностических алгоритмов ОИМ. Более того, очевидно, что врачи-клиницисты не участвуют в подготовке технического задания и, следовательно, в выборе производителя теста, целиком полагаясь на лабораторную службу и на 44-ФЗ, что противоречит рекомендациям Российского общества кардиологов (РКО) и Европейского общества кардиологов (ESC) [9].

Результаты опроса врачей КДЛ представлены на рис. 4. Как видно, практически все КДЛ городского и районного уровня используют данные об аналитических характеристиках (специфичность, чувствительность, пороговые значения), указанные в сопроводительной документации. Об определении коэффициента вариации (CV20) заявили только 7 КДЛ из 5 регионов (все лаборатории – из крупных городов). Главная причина отказа от определения вариации – высокая стоимость реагентов. Только в 9 КДЛ для принятия клинического решения при ОИМ используется внутрибольнично полученные величины 99-го перцентиля, 7 КДЛ выдают результаты качественной оценки без информации о пороге определения (LOQ), сотрудники 27 КДЛ испытывали затруднения при ответе на этот вопрос.

Использование лабораторных тестов, не рекомендованных для диагностики ОИМ (миоглобин), заявлено в 16 КДЛ из 5 вышеуказанных регионов.

Анализ обеспеченности современными средствами диагностики и их применение в регионах. В городской агломерации Волгоград-Волжский о возможности определения кардиомаркеров заявили 23 лечебных учреждения (рис. 5). Количественное определение тропонинов, как и ожидалось, проводится преимущественно в крупных стационарах, поэтому в дальнейшем данные по исследованию кардиомаркеров в специализированных клиниках приводятся в сопоставлении с уровнем, достигнутым в других городах-миллионниках. Информация о количестве и качестве исследований тропонинов в этих городах приведена в табл 1.

По уровню оказания услуги (анализ тропонинов, табл. 1) исследованные регионы примерно идентичны: в них проводится 15-20 анализов на 1000 населения, что составляет 0,1-0,2% от общего количества анализов в КДЛ клиник, предоставивших информацию. Однако качественный состав услуги существенно различается: если в Уфе и Перми количественные и качественные тесты представлены примерно одинаково, то в Волгограде и Волжском качественные тесты составляют всего 11% (табл. 1). Так как в исследование были включены только многопрофильные больницы, мы сочли возможным привести данные по доле всех определений тропонинов, в общем количестве анализов.

Отметим, что во всех регионах в крупных стационарах количественное определение hs-cTn и cTn выполняется в основном на платформах и реагентах с известными клиническими и аналитическими характеристиками, информация о которых постоянно актуализируется специализированным комитетом IFCC [<http://www.ifcc.org/ifcc-education-division/emd-committees/committee-on-clinical-applications-of-cardiac-bio-markers-c-cb>] (табл. 2). Доля анализов на платформах других производителей колеблется в зависимости от региона (табл. 2).

Таким образом, несмотря на ограниченную осведомленность терапевтов и кардиологов о современных подходах к лабораторной диагностике инфаркта миокарда, в крупных городах эта проблема успешно решается на уровне лабораторного звена – лечащие врачи получают от КДЛ диагностическую информацию, в основном соответствующую требованиям четвертого определения инфаркта миокарда.

Ситуация в районах Волгоградской области. Сведения о способности проводить анализ тропонинов заявили 32 лечебных учреждения 31 района области (вкл. г.Камышин); результаты представлены на рис.6. Техническая возможность количественного определения hs-cTn заявлена только в 3 больницах (менее 10%); в 5 районах (15,2%) такая возможность на момент проведения анкетирования отсутствовала. Сотрудники 8 больниц (24,2%) затруднились указать метод, которым проводится качественный анализ.

Данные о количестве тропониновых тестов, выполненных в районных больницах Волгоградской области в 2019 г., приведены на рис. 7. Число количественных тестов в пересчете на 1000 населения составило всего 0,61, а их доля в общем числе анализов на тропонин – всего 18,2% (на фоне 89% в Волгограде и Волжском, табл.1). Качественный анализ проводился на платформах, которые не мониторируются IFCC (то есть практически неизвестен ни принцип определения диагностических

АНКЕТА ДЛЯ ВРАЧА КЛД

1. Укажите тип вашего ЛПУ (название) _____

2. Укажите суммарный объем выполняемых анализов за 2019 г (данные из формы № 30 (годовая) "Сведения о медицинской организации")

3. Определяется в вашей лаборатории:

- | | |
|---------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> TnT | <input type="checkbox"/> hs TnI |
| <input type="checkbox"/> TnI | <input type="checkbox"/> Креатинкиназа-MB |
| <input type="checkbox"/> hs TnT | <input type="checkbox"/> Миоглобин |

4. Какое оборудование и наборы вы используете:

a

Производитель, страна	Платформа (оборудование)	Метод (набор реагентов)	Какие пороговые значения вы используете (LoD): указать цифрой, нг
<input type="checkbox"/> Abbott, США	<input type="checkbox"/> Alinity I systems <input type="checkbox"/> ARCHITECT I systems <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Alinity i STAT hs Troponin-I <input type="checkbox"/> ARCHITECT STAT hs Troponin-I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	
<input type="checkbox"/> Beckman Coulter, США	<input type="checkbox"/> Access 2 <input type="checkbox"/> DxI <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Access hsTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> bioMérieux VIDAS, Франция	<input type="checkbox"/> VIDAS <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> VIDAS hs Troponin I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> ET Healthcare Pylon, Китай	<input type="checkbox"/> Pylon <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Pylon hsTn I assay <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	
<input type="checkbox"/> Fujirebio Lumipulse G G1200, Япония	<input type="checkbox"/> Lumipulse <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Lumipulse hsTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	
<input type="checkbox"/> Fujirebio G600II, Япония	<input type="checkbox"/> Lumipulse <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Lumipulse hsTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	
<input type="checkbox"/> LSI Medience Mitsubishi PATHFAST, Япония	<input type="checkbox"/> PATHFAST <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> PATHFAST cTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> Ortho, США	<input type="checkbox"/> VITROS <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> hsTroponin I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	
<input type="checkbox"/> Roche, Швейцария	<input type="checkbox"/> Cobas e601, e602, E170 <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> hs cTnT STAT <input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	

Рис. 2. Анкета для специалистов клинической лабораторной диагностики. a – лист 1, б – лист 2.

б

<input type="checkbox"/> Siemens, Германия	<input type="checkbox"/> ADVIA Centaur System <input type="checkbox"/> Dimension VISTA System <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> ADVIA Centaur hs Cardiac Troponin I <input type="checkbox"/> Dimension Vista hs Cardiac Troponin I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> Singulex Clarity cTnI, США	<input type="checkbox"/> Singulex Clarity cTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Singulex Clarity cTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> Tosoh CL AIA-PACK cTnI, Япония	<input type="checkbox"/> Tosoh CL AIA-PACK cTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Tosoh CL AIA-PACK cTn I <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> Response Biomedical Corp., Канада	<input type="checkbox"/> RAMP Reader System <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> RAMP Тропонин I (Response Biomedical Corp.), тест-кассеты (количественный экспресс-анализ) <input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	
<input type="checkbox"/> Другая (указать какая)	<input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	<input type="checkbox"/> Другая (указать какая) _____	

5. Вы используете:

- 99 перцентиль мкг
 95 перцентиль другое (указать) _____
 нг

6. Информацию о пороговых значениях вы получаете из:

- Сопроводительной документации Определяете самостоятельно
 Рекомендаций IFCC Другое (указать источник) _____

7. Известна ли вам информация о специфичности и чувствительности для используемых вами пороговых значений:

- Да (если да указать значение) Нет
 • Специфичность _____
 • Чувствительность _____

8. Укажите, какие контрольные материалы для тропонинов (и их контрольные пределы) используются в вашей лаборатории

9. Укажите РЕАЛЬНЫЕ значения CV₂₀ (по данным контроля качества) для тропонинов в вашей лаборатории _____

10. Укажите количество выполненных количественных тестов на тропонин за период с 01.01.2019 по 31.12.2019г _____

11. Укажите количество выполненных качественных тестов на тропонин за период с 01.01.2019 по 31.12.2019г _____

Рис. 2. Анкета для специалистов клинической лабораторной диагностики. а – лист 1, б – лист 2.

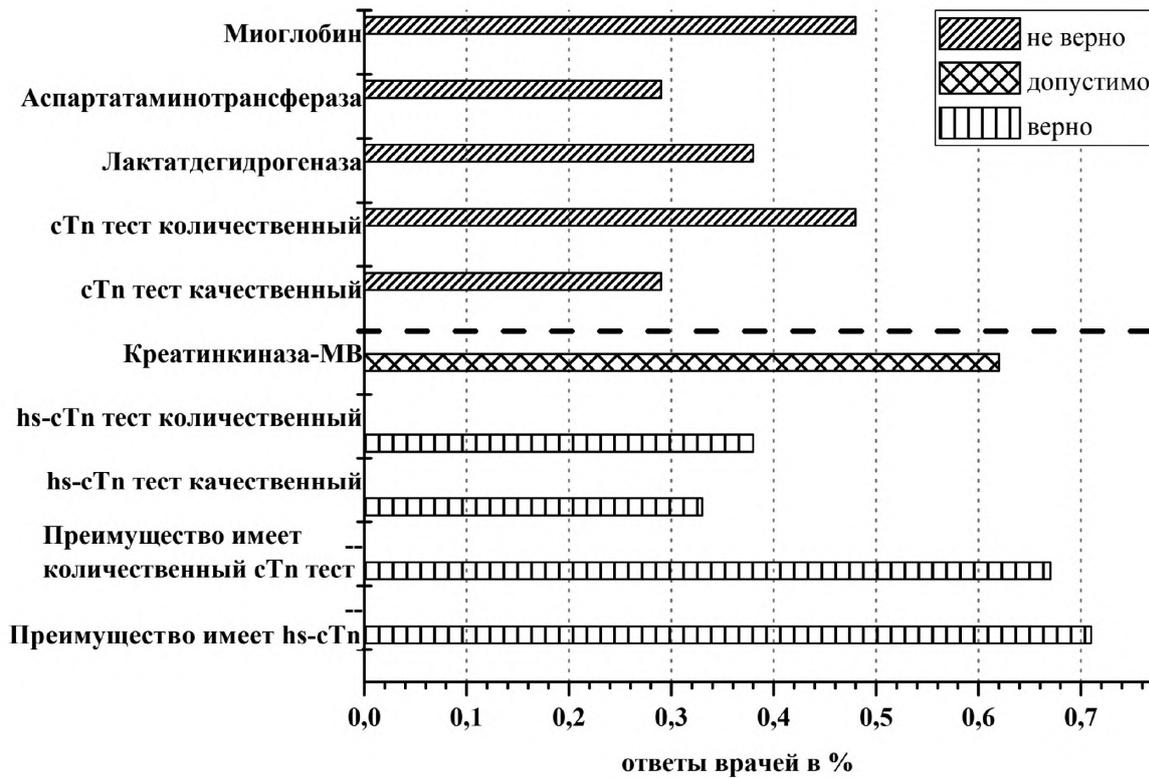


Рис. 3. Оценка информированности врачей о современных требованиях к диагностике инфаркта миокарда. Tn тест- тропониновый тест, hs-cTn – высокочувствительный тропониновый тест.

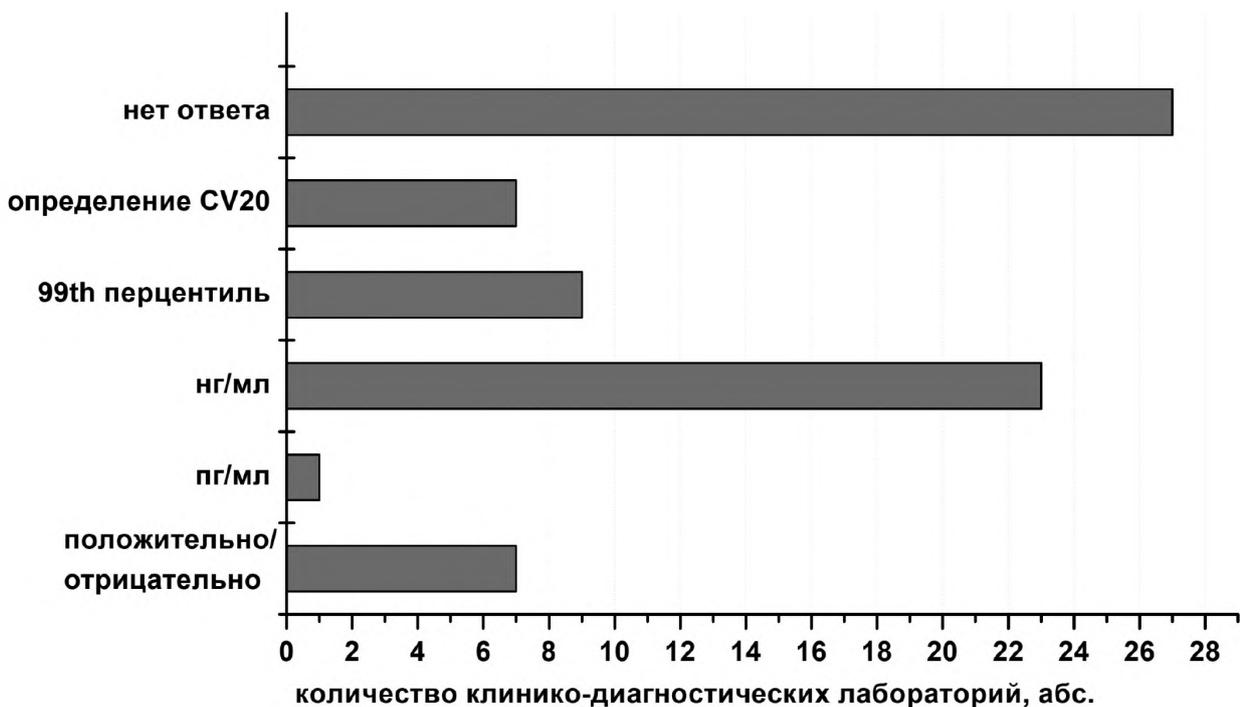


Рис. 4. Определение аналитических характеристик тропониновых тестов и выражение их результатов в региональных клинико-диагностических лабораториях.

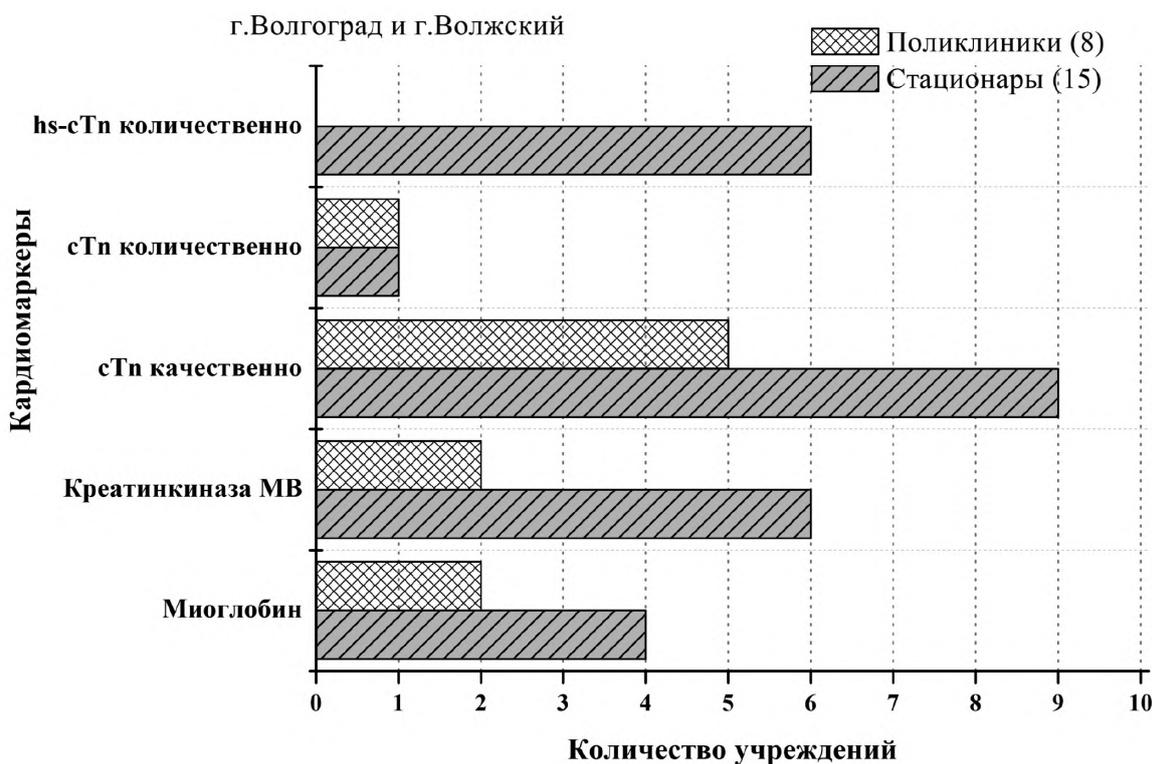


Рис. 5. Исследование кардиомаркеров в ЛПУ г. Волгограда и г. Волжского.

Таблица 1

Количество исследований и варианты анализа тропонинов в крупных лечебных учреждениях городов-миллионников

Количество клиник, по которым имеется информация	Население	Общее количество анализов	Тропонины, всего исследований и доля в общем количестве анализов		Тропонины на 1000 населения	
			Количественно	Качественно	Количественно	Качественно
Агломерация Волгоград – Волжский						
15	1337072	15401441	23228 0,15%	2958 0,02%	17,4	2,2 (11%)
Из них в больницах СМП*			10659	-		
Уфа						
6	1124226	19520059	7374 0,038%	10107,0 0,05%	6,6	9,0
Из них в больницах СМП*			1800	7629		
Пермь						
10	1053936	8464314	15087 0,18%	7676 0,09%	14,3	7,3
Екатеринбург						
1	1483119	3011908	6127 0,20%	-	4,1	-

Примечание. * – СМП – скорая медицинская помощь.

порогов, ни характеристики выборки, на которой проводилось изучение чувствительности и специфичности). Следовательно, при интерпретации результатов определяющее значение имеет достоверность информации, предоставляемой производителем в сопроводительной документации. 1099 качественных анализов (35%) и 200 количественных (6,3%) были проведены на платформах, информация о которых не была предоставлена участниками анкетирования, что может свидетельствовать о недостаточной компетентности персонала (рис. 7).

Выводы:

1. Во всех регионах, включенных в исследование, существуют проблемы взаимодействия лабораторной и кардиологической службы; требуется дополнительное обучение кардиологов, связанное с разъяснением особенностей технологии выполнения тропониновых тестов и связанных с этим вариантов интерпретации результатов.
2. В крупных стационарах всех регионов, включенных в исследование, проводится количественное опре-

Доли производителей наборов для количественного определения hs-cTn и cTn, в крупных лечебных учреждениях городов-миллионников

Город	Волгоград + Волжский		Пермь		Уфа	
	Количество исследований Tn в 2019 г.					
Платформа	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мониторюемые IFCC						
Beckman Coulter	7159	37,6	-	-	1800	24,4
LSI Med. Mitsubishi PATHFAST	7313	38,5	4967	41,1	-	-
Roche Diagnostics	4353	22,9	-	-	5419	73,5
Tosoh CL AIA-PAK cTnI	176	0,9	-	-	-	-
Abbott ARCHITECT (+iSTAT)	-	-	-	-	4163	36,6
Ortho VITROS	-	-	1463	10,8	-	-
Нет данных в IFCC						
Response Biomedical Corp. RAMP	17	0,1	7108	58,9	-	-
Siemens IMMULITE 2000	-	-	199	1,4	-	-

Районы Волгоградской области

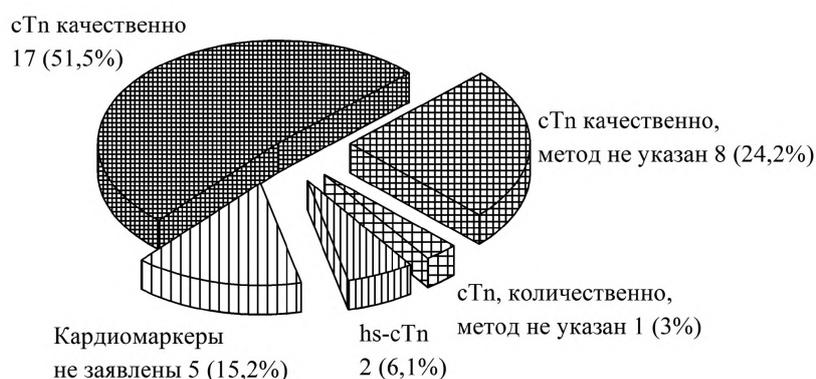


Рис. 6. Возможности определения тропонинов, заявленные районными ЦРБ Волгоградской области.

Всего проведено анализов: Tn тест количественный - 573 (18,2%) - 0,61 на 1000 населения
Tn тест качественный - 2578 - 2,74 на 1000 населения

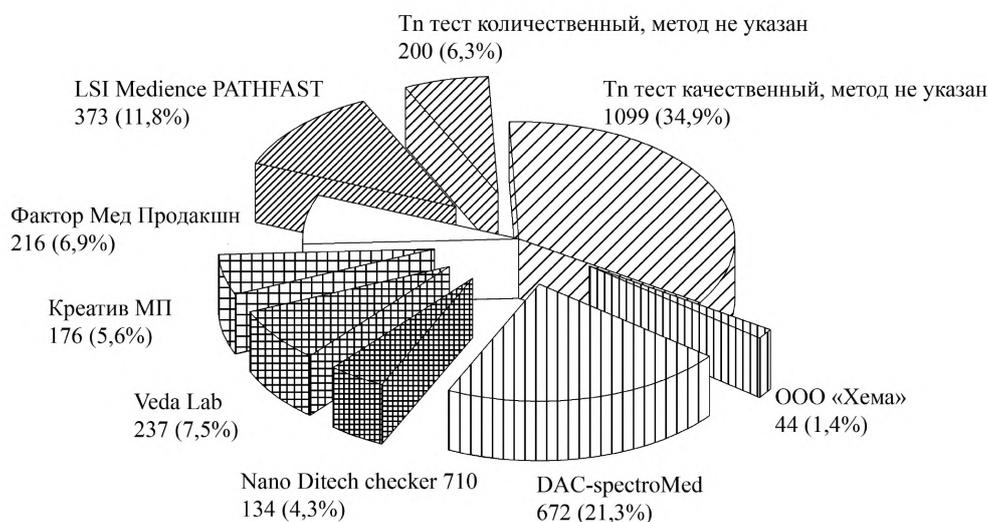


Рис. 7. Количество исследований тропонина, проведенных на различных аналитических платформах в 2019 г. в районах Волгоградской области.

деление тропонинов, что соответствует требованиям четвертого универсального определения инфаркта миокарда. Наряду с этим, определение variability результатов теста и внутрибольничного референтного интервала, как это указано в клинических рекомендациях, производится далеко не всегда.

3. Почти половина специалистов клиническо-диагностических лабораторий центральных районных больниц Волгоградской области не указали производителя реагентов для определения тропонинов, что свидетельствует о недооценке важности понимания влияния аналитических технологий на интерпретацию результатов исследования. Вероятно, требуется включение этих аспектов в образовательные программы повышения квалификации специалистов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mueller T., Egger M., Peer E., Dieplinger B. 5th generation cardiac troponin I and T assays in clinical routine – A head-to-head comparison with data from the Linz troponin (LITROP) study. *Clinica Chimica Acta*. 2018; 485:195-204. Doi.org/10.1016/j.cca.2018.06.027.
2. Boeddinghaus J., Nestelberger T., Twerenbold R., Wildi K., Badertscher P., Cupa J. et al. Direct comparison of 4 very early rule-out strategies for acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Circulation*. 2017; 135:1597–1611. Doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025661.
3. Eggers K.M., Jernberg T., Ljung L., Lindahl B. High-Sensitivity cardiac troponin-based strategies for the assessment of chest pain patients—a review of validation and clinical implementation studies. *Clin. Chem*. 2018; 64:111572–85. Doi: 10.1373/clinchem.2018.287342.
4. Roffi M., Patrono C., Collet J.-P., Mueller C., Valgimigli M., Andreotti F., et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J*. 2016; 37(3):267-315. Doi: 10.1093/eurheartj/ehv320.
5. Rubini Giménez M., Hoeller R., Reichlin T., Zellweger C., Twerenbold R., Reiter M. et al. Rapid rule out of acute myocardial infarction using undetectable levels of high-sensitivity cardiac troponin. *Int. J. Cardiol*. 2013; 168(4):3896-901. Doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.049.
6. Apple F.S., Sandoval Y., Jaffe A.S., Ordóñez-Llanos J. IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: Guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin. Chem*. 2017; 63(1):73-81. Doi: 10.1373/clinchem.2016.255109.
7. Collinson P., Hammerer-Lercher A., Suvisaari J., Apple F.S., Christenson R.H., Pulkki K., van Dieijen-Visser M.P. et al. How Well Do Laboratories Adhere to Recommended Clinical Guidelines for the Management of Myocardial Infarction: The CARDiac Marker Guidelines Uptake in Europe Study (CARMAGUE). *Clin. Chem*. 2016; 62:91264–71. Doi.org/10.1373/clinchem.2016.259515.
8. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A., White H.D. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart J*. 2019; 40:237–69. Doi:10.1093/eurheartj/ehy462.
9. Ibanez B., James S., Agewall S., Antunes M.J., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H. et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *EHJ*. 2017; 39:119–77. Doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393.