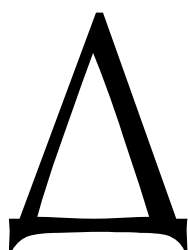


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66
12 • 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

ДЕКАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 02.12.2021.
Подписано в печать 15.12.2021.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,87.

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 из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (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), Thom-
son 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-rl.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 12. 705–768.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИ-
ХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАН-
ЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН,
Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБА-
ЛОВА

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. ЕЛЬ-
ЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск),
А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО
(Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗ-
ЛОВ (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"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ диагностика

Volume 66
12 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

DECEMBER

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 Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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. KOR-
SHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCH-
TOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO
(*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL'
(*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф.

Тест на гомоаргинин для оценки метаболической дисфункции почки709

Обухова Л.М., Медяник И.А., Конторщикова К.Н., Симагина С.А.,

Мусаэлян Л.Т., Конторщиков М.М., Веселова А.С.

Клиническая значимость активности ацетилхолинэстеразы при опухолях головного мозга718

Даренская М.А., Губанов Б.Г., Колесникова Л.И., Колесников С.И.

Изменение уровня ферментов антиоксидантного действия и продуктов липопероксидации у пациентов с механической желтухой в зависимости от уровня билирубина в крови722

Аверьянова И.В.

Возрастные изменения биохимических показателей крови (липидный обмен) у здоровых юношей и мужчин, проживающих в условиях Севера.728

Смирнова В.И., Лапин С.В., Лебедев Д.Г., Эмануэль В.Л., Малышкин К.А., Блинова Т.В.

Валидация метода инфракрасной спектроскопии для анализа состава мочевых конкрементов.733

ГЕМАТОЛОГИЯ

Габрильчак А.И.

Диагностическое значение показателей тромбоцитов и мегакариоцитарной формулы костного мозга при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре739

ИММУНОЛОГИЯ

Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М.

Клиническая значимость выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии747

МИКРОБИОЛОГИЯ

Наумкина Е.В., Кравченко Е.Н., Куклина Л.В.

Опыт диагностики СГВ инфекций у беременных и новорожденных в условиях перинатального центра755

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Водолажский Д.И., Маяковская А.В., Кубышкин А. В., Алиев К.А., Фомочкина И.И.

Клиническая значимость полиморфизма генов наследственной предрасположенности к раку молочной железы и яичников (обзор литературы)760

НЕКРОЛОГ

Памяти профессора Виктории Тазаретовны Морозовой768

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Zhloba A.A., Subbotina T.F.

Homoarginine test for evaluation of metabolic renal dysfunction709

*Obukhova L.M., Medyanik I.A., Kontorshchikova K.N., Simagina S.A., Musaelyan L.T.,
Kontorshchikov M.M., Veselova A.S.*

Clinical significance of acetylcholinesterase activity in brain tumors718

Darenskaya M.A., Gubanov B.G., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I.

Lipid peroxidation functional state changes in patients with obstructive jaundice depending
on the level of bilirubin in the blood.....722

Averyanova I.V.

Age-related blood biochemical changes (lipid metabolism) in healthy young and mature men living
under the North conditions728

Smirnova V.I., Lapin S.V., Lebedev D.G., Emanuel V.L., Malyshkin K.A., Blinova T.V.

Validation of the infrared spectroscopy method for analysis of the composition of urine concretes733

HEMATOLOGY

Gabrilchak A.I.

Diagnostic value of platelet parameters and megakaryocyte formula of bone marrow in idiopathic
thrombocytopenic purpura739

IMMUNOLOGY

Bychkova N.V., Selivanov P.A., Kalinina N.M.

Clinical implication of detecting sensitization to iodinated radiocontrast media
in the basophil activation test by flow cytometry747

MICROBIOLOGY

Naumkina E.V., Kravchenko E.N., Kuklina L.V.

Experience in the diagnosis of group B Streptococcus infections in pregnant women and newborns
in a perinatal center755

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Vodolazhsky D.I., Mayakovskaya A.V., Kubyshkin A.V., Aliev K.A., Fomochkina I.I.

Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer
(review of literature)760

OBITUARY

In memory of professor Viktotiya Tazaretovna Morozova.....768

БИОХИМИЯ

© ЖЛОБА А.А., СУББОТИНА Т.Ф., 2021

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф.

ТЕСТ НА ГОМОАРГИНИН ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ ПОЧКИ

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Низкая концентрация L-гомоаргинина (hArg) в плазме является независимым предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов и общей смертности, а также прогрессирования хронической болезни почек (ХБП). Фермент L-аргинин: глицинамидинотрансфераза (АГАТ, КФ 2.1.4.1) функционирует в мембране митохондрий эпителия канальцев почек, образуя предшественник креатина – гуанидинуксусную кислоту – и в качестве побочного продукта – hArg. Недавно было показано, что на поздних стадиях ХБП наблюдается пониженный уровень hArg, однако осталось не изученным состояние уровня hArg на ранних стадиях ХБП. Целью настоящего исследования было определение диагностических пороговых уровней hArg в крови пациентов с 1 и 2 стадиями ХБП. У пациентов с начальными стадиями ХБП (n=44) в возрасте 58(45- 67) лет по сравнению с группой доноров (n=30) в возрасте 55(42-58) лет обнаружено значительное понижение уровня hArg. В подгруппе с ХБП 2 стадии порог отсечения составил 1,59 мкМ и характеризовался большей чувствительностью и специфичностью, чем в подгруппе с ХБП 1 стадии с пороговым уровнем hArg 1,66 мкМ. Для всей группы порог отсечения hArg составил 1,60 мкМ, что на 0,2 мкМ ниже нижней границы референсного интервала для здоровых лиц. Можно предположить, что ещё до формирования симптомов протеинурии и альбуминурии у значительной популяционной когорты лиц формируется состояние пониженной активности АГАТ, так как экспрессия этого энзима связана с определенным регуляторным торможением обратной связью на уровне организма. В результате проведенного исследования можно отметить, что у пациентов на ранних стадиях ХБП в возрастной группе 45- 67 лет отмечается нарушение метаболической функции почек. Эти метаболические изменения могут быть выявлены путем теста на уровень hArg.

Ключевые слова: гомоаргинин; гомоцистеин; фолиевая кислота; хроническая болезнь почек; сердечно-сосудистые риски.

Для цитирования: Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. Тест на гомоаргинин для оценки метаболической дисфункции почки. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (12): 709-717. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-709-717

Для корреспонденции: Жлоба Александр Анатольевич, д-р. мед. наук, проф., рук. отд. биохимии научно-образовательного института биомедицины; e-mail: zhlobaaa@1spbgbmu.ru

Благодарности. Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова за поддержку в организации исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания.

Поступила 01.07.2021

Принята к печати 21.07.2021

Опубликовано 22.12.2021

Zhloba A.A., Subbotina T.F.

HOMOARGININE TEST FOR EVALUATION OF METABOLIC RENAL DYSFUNCTION

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Minzdrav of Russia, 197022, Saint- Petersburg, Russia

Low plasma L-homoarginine (hArg) concentration is an independent predictor of adverse cardiovascular outcomes and overall mortality, as well as the progression of chronic kidney disease (CKD). The enzyme L-arginine:glycinamidinotransferase (AGAT, EC 2.1.4.1) acts in the mitochondrial membrane of the renal tubular epithelium, forming the precursor of creatine, guanidinoacetic acid, and additionally by-product hArg. As it was shown recently, there is a decreased level of hArg in the late stages of CKD, however, the level of hArg in the early stages of CKD remained unexplored. The aim of this study was to determine the diagnostic threshold levels of hArg in the blood of patients with stages 1 and 2 of CKD.

In patients with the initial stages of CKD (n = 44) at the age of 58 (45-67) years, compared with the group of donors of 55 (42-58) years (n = 30), a significant decrease of hArg level was found. In the subgroup with stage CKD 2, the cut-off point of 1.59 μ M threshold was characterized by greater sensitivity and specificity than in the subgroup with stage CKD 1 with 1.66 μ M threshold level of hArg. For the full group, the hArg cut-off threshold was 1.60 μ M, which is about 0.2 μ M lower than the lower limit of the reference interval for healthy individuals. It can be assumed that even before the formation of symptoms of proteinuria and albuminuria, a significant part of individuals from population cohort develops a state of decreased AGAT activity; since the expression of this enzyme is associated with a certain regulatory feedback inhibition at the body level. As a result of the study, it can be noted that in patients with early stages of CKD in the age group 45-67 years, there is a disturbance of the kidneys metabolic function. These metabolic changes can be detected by testing the level of hArg.

Key words: homoarginine; homocysteine; folic acid; chronic kidney disease; cardiovascular risks.

For citation: Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homoarginine test for evaluation of metabolic renal dysfunction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 709-717 (in Russ.)

DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-709-717

For correspondence: Zhloba A.A., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Biochemistry Department of Scientific and Educational Institute of Biomedicine; e-mail: zhlobaaa@ispgmu.ru.

Information about authors:

Zhloba A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0605-7617>;
Subbotina T.F., <https://orcid.org/0000-0002-2278-8391>.

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

Acknowledgments. The research was carried out within the Ministry of Health framework of the Russian Federation.

The authors would like to express their gratitude for organizational and information support to the management of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

Received 01.07.2021

Accepted 21.07.2021

Published 22.12.2021

Введение. Низкая концентрация L-гомоаргинаина (гАрг) в плазме является независимым предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов и общей смертности, а также прогрессирования хронической болезни почек (ХБП) в различных популяциях [1-5]. Ткани почек регулируют состав и объем жидкостей организма, сохраняя оптимальную среду для остальных тканей, поддерживают гомеостаз. Почки взрослого человека могут весить около 0,08% от общего веса организма, но забирают не менее 20% от объема сердечного выброса [6]. Наряду с экскреторной и эндокринной функциями, почки выполняют важные метаболические функции, которые при ХБП не могут быть в полной мере компенсированы за счет метаболизма в других тканях. К числу таких метаболических функций можно отнести роль почек в образовании эндогенного креатина. Метаболическая функция почек по обеспечению эндогенного пула креатина локализована в составе внутренней мембраны митохондрий клеток проксимальных извитых канальцев [7, 8]. Клетки канальцев почек для этого содержат L-аргинин: глицинамидинотрансферазу (АГАТ, КФ 2.1.4.1) [9]. Этот фермент проявляет свою функцию в мембране митохондрий канальцевого эпителия, образуя предшественник креатина – гуанидинуксусную кислоту (ГУК). Образование ГУК происходит в реакции, катализируемой АГАТ, в основном в почках и может обеспечивать более 20% от общего ее биосинтеза. На стадиях 1 и 2 развития ХБП большое значение для снижения риска быстрого прогрессирования имеет оценка основных клинико-биохимических сдвигов, включая интегральные показатели, такие как скорость клубочковой фильтрации и альбумино/протеинурию. На наш взгляд, альбумино/протеинурия в значительной мере связана со способностью нефрона реабсорбировать компоненты из просвета тубулярного пространства. Эта способность в значительной мере может зависеть от энергетической обеспеченности трансмембранных процессов.

ГУК поступает в кровоток и используется в реакции метилирования, катализируемой гуанидинацетат-N-метилтрансферазой (ГАМТ, КФ 2.1.1.2), преимущественно в ткани печени и, в меньшей степени, в других тканях, например, в тканях мозга и миокарда с образованием креатина. Несмотря на важную роль почек в обеспечении ГУК, о нарушении АГАТ-реакции известно недостаточно, чтобы судить о ее диагностическом значении в отношении ранних стадий

ХБП. Показано нарушение метаболизма ГУК при уремии со снижением активности АГАТ почек примерно на 71% [10]. Одновременно с ГУК в АГАТ-реакции образуется и секретируется в кровь некодируемая аминокислота гомоаргинин (гАрг), при этом амидиновый остаток аргинина переносится на эпислон-аминогруппу лизина, а не на аминогруппу глицина. В отличие от ГУК, гАрг почти не используется в биосинтетических реакциях, сохраняя в крови более высокую стабильность. Это и обеспечивает этому продукту АГАТ-реакции большое диагностическое значение. Образование гАрг преимущественно в почках обнаружено и у мышей с нокаутом соответствующего гена, и у пациентов с дефицитом АГАТ [11-14]. В результате проведенных исследований было показано, что на поздних стадиях ХБП наблюдается пониженный уровень гАрг, однако осталось не изученным состояние уровня гАрг на ранних стадиях ХБП. Следует ожидать, что от метаболической функции почки зависит сохранение потенциала макроэргических фосфатов креатина, и это в значительной мере связано с активностью фермента АГАТ в проксимальных канальцах почки. Изменение уровня гАрг у пациентов с минимальным нарушением функций почек, в том числе со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) выше 60 мл/мин/1,73 м² до настоящего времени не изучено. Для понимания роли АГАТ-реакции и энергетического метаболизма в целом при ХБП, нами проведена оценка уровней гАрг у пациентов на ранних стадиях ХБП.

Целью настоящего исследования было определение диагностических пороговых уровней гАрг в крови, характерных для пациентов с ХБП 1 и ХБП 2 стадиями.

Материал и методы. Сбор клинического материала проходил с апреля 2018 по декабрь 2019 г. на базе клиник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. В исследование были включены образцы крови 44 пациентов с начальными стадиями ХБП, находившихся на стационарном лечении в клиниках терапевтического профиля. Критерием включения в исследование было наличие ХБП 1 стадии ($n=21$) или 2 стадии ($n=23$). ХБП определяли при наличии любых маркеров повреждения почек, персистирующих в течение 3 месяцев и более, а определение стадии проводили с использованием величины скорости клубочковой фильтрации (СКФ): > 90 мл/мин/1,73 м² для 1 стадии и 60-89 мл/мин/1,73 м² для

2 стадии [15]. Критериями исключения были: наличие заболеваний печени, онкогематологических и других онкопролиферативных заболеваний, острых воспалительных процессов, а также состояние беременности. Демографические данные, факторы риска, сведения о коморбидности и показатели, характеризующие экскреторную функцию почек, во всей группе и в подгруппах пациентов представлены в табл. 1.

Материалом исследования служила плазма крови, взятой утром натощак из кубитальной вены в вакутейнеры с гепарином в качестве антикоагулянта. Отделение форменных элементов крови путем центрифугирования (580 g, 15 мин) проводили в течение 1 ч после взятия крови. Образцы плазмы до анализа хранили аликвотами по 1,0 мл при температуре -80°C . Протокол исследования в соответствии с принципами Хельсинкской декларации был одобрен Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Основные биохимические показатели определяли в клиничко-диагностической лаборатории ПСПбГМУ им. И.П. Павлова с помощью стандартных наборов фирмы Roche для биохимического анализатора Cobas Integra 400 Plus. Расчет СКФ проводили по уровню креатинина крови с использованием формулы СКД-ЕРІ. Концентрацию фолиевой кислоты (ФК) и витамина B_{12} в плазме определяли методом конкурентного иммунохемилюминесцентного анализа с использованием наборов реагентов и калибраторов, согласно инструкции производителя (Beckman Coulter Inc., США) и иммуноанализатора Access 2 Immunoassay System той же фирмы. Концентрацию общего гомоцистеина в плазме (оГци) осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано нами ранее [16-17]. Концентрацию гАрг определяли методом ВЭЖХ по разработанному нами методу [18].

Таблица 1

Характеристика обследованных пациентов с начальными стадиями ХБП

Показатель (референсный интервал)	Группа в целом (n=44)	Подгруппа с ХБП 1 (n=21)	Подгруппа с ХБП 2 (n=23)	p*
Демография и факторы риска				
Возраст, годы	58 (45–67)	53 (45–60)	63 (48–70)	0,056
Мужчины / Женщины	15 / 29	7 / 14	8 / 15	0,92
Курение: да / нет	13 / 31	11 / 10	2 / 21	0,0015
Сахарный диабет, n	10	4	6	0,58
Аутоиммунные заболевания, n	8	6	2	0,088
Наличие основного заболевания почек и МВП, n	12	6	6	0,85
САД, мм рт. ст.	130 (120–140)	130 (120–140)	130 (120–140)	0,73
ДАД, мм рт. ст.	80 (73–85)	80 (75–90)	80 (70–80)	0,37
ИМТ, кг/м ²	26,1 (22,7–30,0)	24,6 (22,4–31,7)	27,7 (24,6–29,5)	0,22
Маркеры повреждения почек				
Аномалии развития почек, кисты, n	6	3	3	0,91
A0	1	1	0	
A1	25	15	10	
Стадии альбуминурии	A2	3	7	0,037
A3	5	0	5	
A4	3	2	1	
Креатинин, мкМ (53–115)	69,5 (59–86)	63 (56–65)	84 (71–96)	0,000057
СКФ, мл/мин/1,73 м ² (>90)	88 (73,6–97,7)	97,7 (93,7–110,3)	74,7 (68,9–79,6)	<0,00001
Мочевина, мМ (2,5–7,3)	4,7 (3,9–6,6)	3,9 (3,1–4,8)	6,1 (4,5–8,3)	0,00052
Мочевая кислота, мкМ (155–428)	303 (230–380)	233 (220–310)	360 (277–394)	0,080

Примечание. * – достоверность различий между подгруппами пациентов с ХБП 1 и 2 оценивали с помощью теста Манна-Уитни (количественные данные), хи-квадрата Пирсона (категориальные данные, две группы) и точного критерия Фишера (категориальные данные, более двух групп). САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ИМТ – индекс массы тела; МВП – мочевыводящие пути.

Лабораторные показатели обследованных пациентов в зависимости от стадии ХБП

Показатели (референсный интервал)	Подгруппа с ХБП 1 (n=21)	Подгруппа с ХБП 2 (n=23)	p*
гАрг, мкМ (> 1,80)	1,38 (1,05 - 1,91)	1,13 (0,85 - 1,40)	0,034
Глюкоза, мМ (3,9 – 6,1)	5,3 (4,8 - 5,6)	5,1 (4,7 - 6,2)	0,67
Общий холестерин, мМ (3,1 – 5,2)	4,8 (4,3 - 5,5)	4,7 (3,9 - 5,4)	0,57
Коэффициент атерогенности (< 3,0)	2,5 (1,7 - 3,0)	1,9 (1,4 - 2,4)	0,28
Триглицериды, мМ (0,40- 1,54)	1,33 (0,76 - 1,99)	1,20 (0,90 - 2,88)	0,62
Билирубин общий, мкМ (3,4 – 20,5)	9,6 (7,1 - 13,9)	11,0 (8,1 - 14,6)	0,43
Белок плазмы, г/л (65 – 85)	69 (65 – 73)	68 (64 – 74)	0,57
Фолиевая кислота, нМ (>13,4)	13,9 (8,3 - 22,7)	14,1 (10,6 - 21,4)	0,85
Витамин В ₁₂ , пМ (133 – 675)	274 (182 – 352)	236 (181 – 338)	0,86
оГци, мкМ (<10,9)	10,2 (7,9 - 13,6)	10,8 (6,2 - 14,9)	0,63
Гемоглобин, г/л (130 – 160)	127 (114 – 137)	122 (115 – 131)	0,50
Эритроциты, *10 ¹² /л (4,1-5,1)	4,4 (4,2 - 4,8)	4,2 (3,6 - 4,5)	0,12
Лейкоциты, *10 ⁹ /л (4,0 – 8,8)	6,3 (4,9 - 8,0)	5,7 (4,8 - 6,9)	0,22
СОЭ, мм/ч (1 – 10)	19 (10 – 26)	18 (10 – 26)	0,86
СРБ, мг/л (0,1 – 8,2)	3,0 (3,0 - 18,3)	3,0 (1,0 - 8,4)	0,21
Фибриноген, г/л (1,8 – 3,5)	4,0 (3,2 - 4,6)	3,7 (2,7 - 4,4)	0,56

Примечание. * – достоверность различий между подгруппами пациентов с ХБП 1 и 2 стадии оценивали с помощью теста Манна-Уитни. СОЭ – скорость оседания эритроцитов; СРБ – С-реактивный белок.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Statistica 10. Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилки и Колмогорова-Смирнова. Распределение большинства переменных отличалось от нормального, поэтому данные в таблицах и в тексте представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Me(Q1-Q3)). Для оценки межгрупповых различий в независимых выборках использованы непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса для количественных данных, а также хи-квадрата Пирсона и точного критерия Фишера в случае категориальных данных. Оценка корреляционной связи между показателями проводилась с применением рангового коэффициента Спирмена. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при $p < 0,05$, а значение $0,05 < p < 0,1$ рассматривали как тенденцию. Построение ROC-кривых и их анализ проводили с помощью соответствующего модуля программы MedCalc в соответствии с рекомендациями [19]. Для создания прогностической модели «здоровый – больной» были сформированы две группы: основная – вышеописанные пациенты с ХБП (n=44), и группа сравнения – доноры сопоставимого возраста 55 (42 – 58 лет, n=30). Критериями включения в группу сравнения были: удовлетворительное самочувствие,

нормальное артериальное давление, отсутствие хронических заболеваний, в том числе заболеваний почек, а также признаков острого воспалительного процесса. Все пациенты и доноры давали письменное согласие на анонимное использование полученных лабораторных данных.

Результаты. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что подгруппы пациентов с ХБП 1 и ХБП 2 стадии по демографическим показателям и факторам риска не различались существенно, за исключением частоты курения, которая была больше в подгруппе с ХБП 1 стадии. Выраженность альбумин-/протеинурии – одного из важных маркеров повреждения почек – была ожидаемо выше в подгруппе пациентов с ХБП 2 стадии, а именно стадии альбуминурии 2 и 3 в ней встречались чаще. Что касается экскреторной функции почек, оцениваемой по показателям креатинина, СКФ и мочевины, то она оценивалась как минимально нарушенная и достоверно различалась между подгруппами с ХБП 1 и ХБП 2 (см. табл. 1).

Уровень гАрг в группе пациентов в целом составил 1,28 (0,86 – 1,60) мкМ, что значительно ниже, чем в группе здоровых лиц – 2,3 (1,8 – 3,1) мкМ [4] ($p < 0,000001$). Медианные уровни гАрг на стадии ХБП 1 понижены по сравнению со здоровыми лицами в 1,67 раза, а на стадии ХБП 2 в – 2,04 раза. При этом у пациентов с ХБП 2 стадии они также были значительно ниже, чем при ХБП 1 стадии ($p = 0,034$, табл.

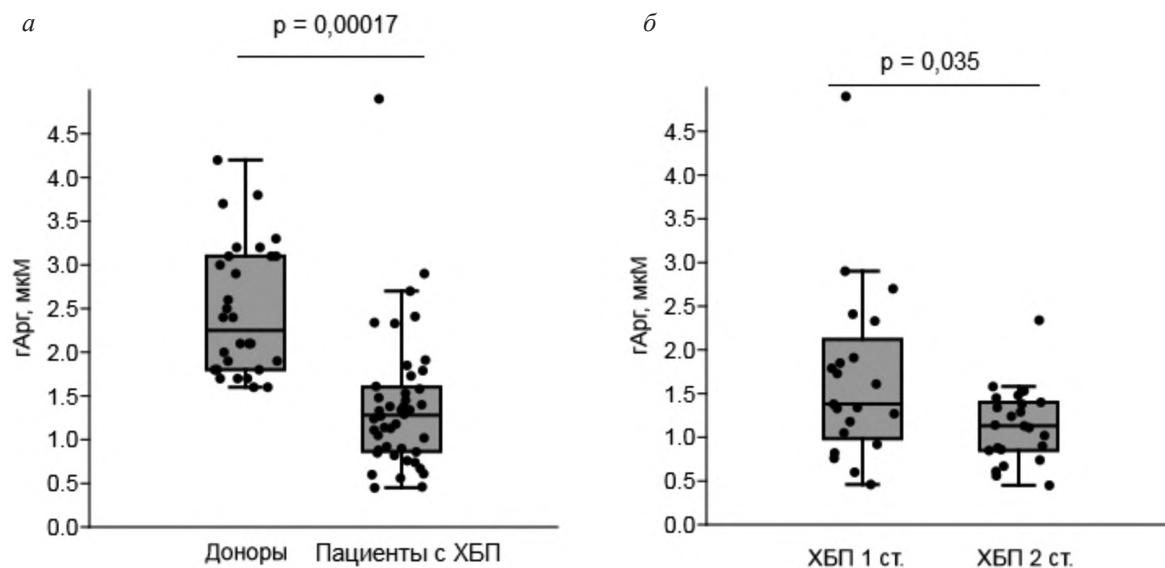


Рис. 1. Сравнение уровней гАрг и разброс показателей в группах сравнения (доноры) и пациентов с ХБП (а) и в подгруппах пациентов с ХБП 1 и 2 стадии (б).

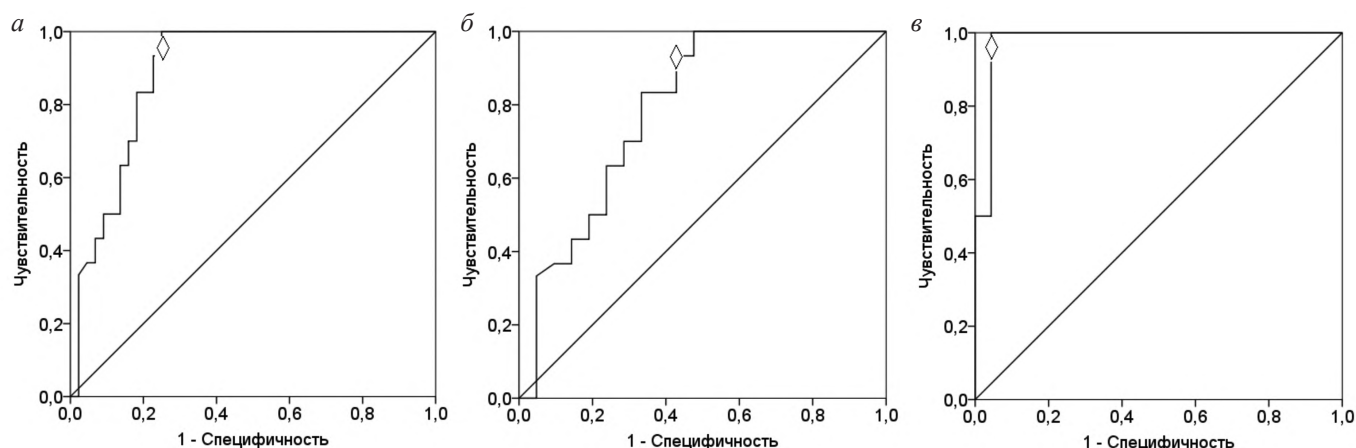


Рис. 2. ROC-кривая диагностической способности уровня гАрг плазмы крови в модели «здоровый – больной ХБП». Точка J, соответствующая наибольшей дистанции от биссектрисы до кривой, определяет значение “Cut off” уровня гАрг. а – группа пациентов в целом; б – подгруппа пациентов с ХБП 1 стадии; в – подгруппа пациентов с ХБП 2 стадии.

2). Разброс показателя гАрг в упомянутых группах представлен на рис. 1, а, б. Видно, что и у здоровых лиц, и у пациентов с ХБП 1 стадии преобладает разброс в сторону больших значений гАрг.

Общелабораторные данные, отражающие состояние красной крови, признаки воспаления, углеводный и липидный обмен, не выявили различий между подгруппами (табл. 2). То же относится к уровням ФК, витамина В₁₂ и оГци, отклонения которых часто встречаются при заболеваниях почек.

Если же сравнивать другие показатели пациентов с референсными значениями, то группа в целом характеризуется следующими отклонениями: снижение уровня ФК отмечено у 35% пациентов, умеренная гипергомоцистеинемия (ГГЦ > 10,9 мкМ) – у 40% пациентов, а уровень витамина В₁₂ у всех был в референсных пределах. Кроме того, примерно у половины пациентов отмечалась небольшая нормох-

ромная анемия, маркеры воспаления были умеренно повышены у четверти пациентов и у такой же части отмечались повышенные уровни общего холестерина и триглицеридов. Уровень общего белка плазмы был несколько понижен у четверти пациентов. Цифры артериального давления и уровень глюкозы были компенсированы.

Результаты ROC-анализа уровня гАрг как диагностического маркера ХБП приведены на рис. 2 для всей группы в целом (а), ХБП 1 стадии (б) и ХБП 2 стадии (в). Во всех случаях в качестве референсной группы использованы данные 30 здоровых лиц сходного возраста. Количественные данные по этому исследованию представлены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, диагностический тест гАрг отличается хорошими характеристиками чувствительности и специфичности лишь в отношении пациентов с ХБП 2 стадии, тогда как при ХБП

Таблица 3

Характеристики показателя гАрг в качестве диагностического маркера ХБП

Показатели	Площадь под кривой (95% ДИ)	<i>p</i>	Порог гАрг, мкМ	Чувствительность, %	Специфичность, %
ХПБ 1-2 стадии, <i>n</i> =44	0,888 (0,813 – 0,964)	<0,000001	1,60	93,3	75,0
ХБП 1 стадии, <i>n</i> =21	0,790 (0,654 – 0,925)	0,00048	1,66 1,88	93,3 70,0	43,0 71,4
ХБП 2 стадии, <i>n</i> =23	0,978 (0,935 – 1,000)	<0,000001	1,59	95,7	95,7

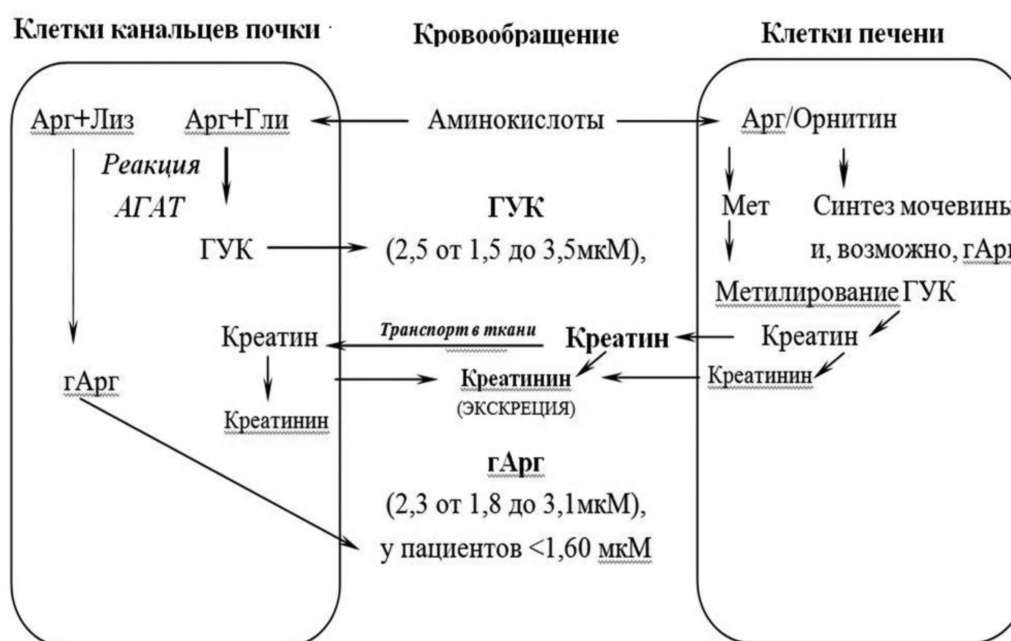


Рис. 3. Образование и гомеостаз гАрг и ГУК клетками проксимального извитого канальца в ключевой реакции биосинтеза креатина, катализируемой L-аргинином: глицинамидинотрансферазой (АГАТ; EC 2.1.4.1).

1 стадии при хорошей чувствительности специфичность теста оказывается низкой. При произвольном определении порога отсечения в 1,88 мкМ в этой подгруппе пациентов обе характеристики оказываются на уровне 70%.

В проведенном исследовании мы обнаруживали уровень гАрг ниже 1,66 мкМ у 77% пациентов, а уровень ниже 1,88 мкМ- у 84%. Обнаружение уровня гАрг ниже указанных предельных значений свидетельствует о снижении активности АГАТ.

Обсуждение. У пациентов с начальными стадиями ХБП в возрасте 58 (45- 67) лет по сравнению с группой доноров в возрасте 55 (42-58) лет обнаружено значительное понижение уровня гАрг. Устойчивое изменение уровня гАрг мы наблюдали у пациентов на ранних стадиях ХБП (см. табл. 2) и выявили значительное понижение его уровня по сравнению с группой здоровых доноров. В отличие от других биохимических показателей крови, включая показатели азотистого обмена, уровни гАрг в основном были ниже нижней границы референсного интервала

ла, установленного в популяционных исследованиях -1,80 мкМ [2,4]. Относительно здоровых лиц подгруппа пациентов с ХБП 2 стадии с порогом отсечения 1,59 мкМ, имела большие чувствительность и специфичность, чем группа ХБП 1 стадии с несколько более высоким пороговым уровнем гАрг- 1,66 мкМ, как это отмечено в табл. 3. Для всей группы ранних стадий ХБП порог отсечения гАрг составил 1,60 мкМ, что на 0,2 мкМ ниже нижней границы референсного интервала для здоровых лиц без ССЗ и явлений нефропатии. Это указывает на направление дальнейшего понижения уровней гАрг при прогрессировании ХБП. Как установлено нами в данном исследовании, уже на начальных стадиях ХБП уровни гАрг заметно снижены по сравнению со здоровыми лицами. При ХБП на более поздних до-диализных стадиях отмечается прямая корреляция между скоростью клубочковой фильтрации и уровнем гАрг в крови [20]. Можно предположить, что ещё до формирования симптомов протеинурии и альбуминурии у некоторой популяционной когорты лиц формиру-

ется состояние пониженной активности АГАТ, так как экспрессия этого энзима связана с определенным регуляторным торможением обратной связью на уровне организма [21].

АГАТ – митохондриальный фермент, в наибольших количествах обнаруженный в почках и поджелудочной железе млекопитающих и катализирующий обратимую реакцию образования ГУК или гАрг (рис. 3). АГАТ связана с внутренней мембраной митохондрий и конкурирует с аргиназами за тот же внутриклеточный пул аргинина. Известно, что АГАТ, локализованная на внутренней мембране митохондрий клеток канальцев, катализирует стадию, лимитирующую пул эндогенного креатина и креатинфосфата во всех тканях организма, а не только в почках [22-24]. В пределах нефрона активность и иммунореактивность АГАТ ограничены эпителиальными клетками проксимального извитого канальца [7-9, 25-26]. АГАТ является ферментом, ограничивающим скорость биосинтеза креатина, и этот фермент подвергается репрессии конечным продуктом орнотином и креатином [27]. Активность АГАТ в почках снижается при добавлении креатина в рацион [21].

Дисфункция митохондрий играет ключевую роль в нарушении функции почек [28-30]. В свою очередь, креатин и его фосфорилированная форма, фосфокреатин, играют решающую роль в поддержании концентраций аденозинтрифосфата в тканях с высокими энергетическими потребностями, таких как скелетные мышцы, сердце и мозг [31]. Нарушение регуляции баланса креатина происходит при различных хронических заболеваниях, сопровождаемых мышечной дисфункцией и кардиомиопатией, а также при онкологических процессах [32]. Ежесуточные потери креатина в креатинин, достигающие 2% от общего количества креатина в организме, полностью могут восполняться почечным биосинтезом ГУК с последующим метилированием в других тканях [33].

Ранние стадии ХБП в клинике часто устанавливают путём достаточно длительного (до 3 месяцев) наблюдения за пациентом, определяя такие показатели, как альбумин-/протеинурия, стойкие изменения в осадке мочи, начальное, но стойкое снижение СКФ и некоторые другие признаки [15]. За редким исключением эти признаки не удаётся обнаружить в ходе однократного обследования. В этом отношении, показатель гАрг плазмы крови имеет большое преимущество, так как отражает регуляторные воздействия на экспрессию белка АГАТ за длительный промежуток времени и отличается стабильностью своих уровней в течении длительного времени [34-36].

Нарушение экскреторной функции на ранних стадиях ХБП развивается в большинстве случаев на фоне уже сложившейся недостаточности важных для организма метаболических функций почек. Именно в связи с этим нами представлены данные о возможности оценить депрессию энергетического метаболизма с соответствующими клиническими последствиями у пациентов с пониженным (менее 1,60 мкМ) уровнем гАрг. Этот показатель в сопоставлении с другими метаболическими функциями

почек подлежит детальной оценке в качестве диагностического критерия угрозы прогрессирования ХБП на ранних стадиях. В частности, при ХБП 1 и 2 мы наблюдали также повышение уровня оГци по сравнению с группой доноров (Таблица 2), но не между подгруппами пациентов. Следует отметить наличие обратной корреляции между уровнями оГци и ФК, что подтверждает участие почек в регуляции всасывания ФК [37]. Метаболические функции по поддержанию уровней гАрг и оГци и функция по регулированию всасывания ФК в кишечнике, скорее относящаяся к эндокринным функциям почек, по нашим данным, уже на ранних стадиях ХБП являются нарушенными. В тканях и сосудистой стенке исследователи отмечают на молекулярном уровне и другие изменения. Эти изменения и их диагностическую значимость следует рассматривать как результат закономерного влияния нарушений энергетического метаболизма в различных тканях на продукцию белковых регуляторных факторов, либо как результат их генетически опосредованного полиморфизма. По-видимому, на ранних стадиях ХБП частные проявления различных регуляторных нарушений могут значительно усиливаться за счет нарушения энергетического метаболизма в условиях торможения АГАТ-реакции. К настоящему времени связь этих нарушений с выраженностью в почках экспрессии белка АГАТ и её активности остается не изученной. Как показано в настоящей работе, у пациентов на ранних стадиях ХБП наблюдается понижение уровня продукта АГАТ реакции – гАрг. Этот уровень оказался также ниже референсного уровня гАрг, показанного нами ранее, для группы здоровых лиц аналогичного возраста (1,8 – 3,1) мкМ [4]. В результате проведенного исследования можно заключить, что у пациентов на ранних стадиях ХБП в возрастной группе 45- 67 лет отмечается торможение АГАТ реакции и, соответственно, снижение возможности для синтеза эндогенного креатина. Можно предположить, что за счет этого возникает ограничение пула креатина и, соответственно креатинфосфата, что сдерживает возможность энергетических процессов в клетках, таких как трансмембранный перенос, поддержание трансмембранного потенциала или разнообразных биосинтетических процессов. Таким образом, за счет теста на пониженный уровень гАрг у пациентов с начальными нарушениями функции почек, возможно предвидеть скорое нарастание других патологических изменений, включая снижение почечного кровотока, склеротические изменения в кортикальном слое почек, атрофию их канальцев, что делает тест на гАрг перспективным для дальнейшего изучения. Кроме того остаётся открытым вопрос о возможности покрытия дефицита этой метаболической функции почек за счёт экспрессии АГАТ в других тканях, в особенности, при прогрессировании ХБП.

Выводы. Из полученных данных следует, что у пациентов уже на ранних стадиях ХБП наблюдается нарушение метаболических функций. У 84 % обследованных пациентов на ранних стадиях ХБП мы об-

наруживали уровень гАрг ниже 1,88 мкМ. Из данных, полученных нами в настоящей работе, видно, что медианные уровни гАрг на стадии ХБП 1 понижены по сравнению со здоровыми лицами в 1,67 раза, а на стадии ХБП 2 в – 2,04 раза. В дальнейших исследованиях следует остановиться на детализации пороговых уровней гАрг, в зависимости от пусковых механизмов возникновения ХБП и её коморбидности.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5–14, 17, 20–36
см. REFERENCES)

4. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С. Значение определения уровня гомоаргинина (гАрг) у пациентов с ишемической болезнью сердца при операциях реваскуляризации миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 281-6. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-281-286>.
15. Смирнов А.В., Шилов Е.М., Добронравов В.А., Каюков И.Г., Бобкова И.Н., Швецов М.Ю. и др. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению. *Нефрология*. 2012; 16(1): 89-115. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2012-16-1-89-115>.
16. Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии. *Клинико-лабораторный консилуим*. 2009; 26(1): 49-60.
17. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ № 2609873; 2017.
18. Кореновский Ю.В., Кудинов А.В., Сузопов Е.В., Поповцева А.В. Сравнение компьютерных программ для проведения описательной статистики и ROC-анализа. *Медицина в Кузбассе*. 2016; 15(3): 40-4.
37. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. Оценка гомоаргинина и фолиевой кислоты у пациентов с артериальной гипертензией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(8): 474-81. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-474-481>.

REFERENCES

1. Atzler D., Baum C., Ojeda F., Keller T., Cordts K., Schnabel R.B. et al. Low homoarginine levels in the prognosis of patients with acute chest pain. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(4): e002565. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002565>.
2. Atzler D., Appelbaum S., Cordts K., Ojeda F.M., Wild P.S., Münzel T. et al. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54(7): 1231-7. <https://doi.org/10.1515/ccm-2015-0785>.
3. März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Wanner C. Homoarginine as a biomarker for the risk of mortality. United States Patent US 9,506,909 B2; 2016.
4. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S. The value of detection of homoarginin level in patients with ischemic heart disease under operations of myocardium revascularization. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(5): 281-6. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-281-286>. (in Russian)
5. Niekamp C., Atzler D., Ojeda F.M., Sinning C.R., Lackner K.J., Böger R.H. et al. Cross-sectional associations between homoarginine, intermediate phenotypes, and atrial fibrillation in the community—The Gutenberg Health Study. *Biomolecules*. 2018; 8(3): 86. <https://doi.org/10.3390/biom8030086>.
6. Herzlinger D., Hurtado R. Patterning the renal vascular bed. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2014; 36: 50-6. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.002>.
7. Sandell L.L., Guan X.J., Ingram R., Tilghman S.M. Gattm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2003; 100(8): 4622-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230424100>.
8. Sorenson R.L., Stout L.E., Brelje T.C., Van Pilsum J.F., McGuire D.M. Evidence for the role of pancreatic acinar cells in the pro-

- duction of ornithine and guanidinoacetic acid by L-arginine:glycine amidinotransferase. *Pancreas*. 1995; 10(4): 389-94. <https://doi.org/10.1097/00006676-199505000-00011>.
9. Reichold M., Klootwijk E.D., Reinders J., Otto E.A., Milani M., Broeker C. et al. Glycine amidinotransferase (GATM), renal fanconi syndrome, and kidney failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 29(7): 1849-1858. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017111179>.
10. Tofuku Y., Muramoto H., Kuroda M., Takeda R. Impaired metabolism of guanidinoacetic acid in uremia. *Nephron*. 1985; 41(2): 174-8. <https://doi.org/10.1159/000183576>.
11. Choe C.U., Atzler D., Wild P.S., Carter A.M., Boger R.H., Ojeda F. et al. Homoarginine levels are regulated by L-arginine: glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation*. 2013; 128(13): 1451-61. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580>.
12. Davids M., Ndika J.D., Salomons G.S., Blom H.J., Teerlink T. Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett.* 2012; 586(20): 3653-7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.020>.
13. Kayacelebi A.A., Langen J., Weigt-Usinger K., Chobanyan-Jürgens K., Mariotti F., Schneider J.Y. et al. Biosynthesis of homoarginine (hArg) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) from acutely and chronically administered free L-arginine in humans. *Amino Acids*. 2015; 47: 1893-1908. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2012-3>.
14. Kleber M.E., Seppälä I., Pilz S., Hoffmann M.M., Tomaschitz A., Oksala N. et al. Genome-wide association study identifies 3 genomic loci significantly associated with serum levels of homoarginine: the AtheroRemo Consortium. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2013; 6: 505-13. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000108>.
15. Smirnov A.V., Shilov E.M., Dobronravov V.A., Kayukov I.G., Bobkova I.N., Shvetsov M.Yu. et al. National guidelines. Chronic kidney disease: basic principles of screening, diagnosis, prevention and treatment approaches. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2012; 16(1): 89-115. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2012-16-1-89-115>. (in Russian)
16. Zhloba A.A. Laboratory diagnosis of hyperhomocysteinemia. *Kliniko-laboratornyi konsilium*. 2009; 26(1): 49-60. (in Russian)
17. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylolation score of high molecular weight plasma proteins. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 893-9.
18. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The way for determining the content of homoarginine in blood plasma and other biological fluids of human. Patent RF N 2609873; 2017. (in Russian)
19. Korenovsky Yu.V., Kudinov A.V., Suzopov E.V., Popovtseva A.V. Comparison of computer programs for descriptive statistics and ROC-analysis. *Meditsina v Kuzbasse*. 2016; 15(3): 40-4. (in Russian)
20. Ravani P., Maas R., Malberti F., Pecchini P., Mieth M., Quinn R. et al. Homoarginine and mortality in pre-dialysis chronic kidney disease (CKD) patients. *PLoS One* 2013; 8(9): e72694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072694>.
21. Guthmiller P., Van Pilsum J.F., Boen J.R., McGuire D.M. Cloning and sequencing of rat kidney l-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(26): 17556-60.
22. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 2000; 80(3): 1107-213. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107>.
23. Sharer J.D., Bodamer O., Longo N., Tortorelli S., Wamelink M.M., Young S. Laboratory diagnosis of creatine deficiency syndromes: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med.* 2017; 19(2): 256-63. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.203>.
24. Humm A., Fritsche E., Steinbacher S., Huber R. Crystal structure and mechanism of human L-arginine:glycine amidinotransferase: a mitochondrial enzyme involved in creatine biosynthesis. *EMBO J.* 1997; 16(12): 3373-85. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3373>.

25. Drechsler C., Kollerits B., Meinitzer A., März W., Ritz E., König P. et al. Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the mild to moderate kidney disease study. *PLoS One*. 2013; 8(5): e63560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063560>.
26. McGuire D.M., Gross M.D., Elde R.P., van Pilsum J.F. Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1986; 34(4): 429-35. <https://doi.org/10.1177/34.4.3512696>.
27. Bera S., Wallimann T., Ray S., Ray M. Enzymes of creatine biosynthesis, arginine and methionine metabolism in normal and malignant cells. *The FEBS Journal*. 2008; 275(23): 5899-5909. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06718.x>.
28. Hallan S., Sharma K. The role of mitochondria in diabetic kidney disease. *Curr. Diab. Rep.* 2016; 16(7): 61. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0748-0>.
29. Takemura K., Nishi H., Inagi R. Mitochondrial dysfunction in kidney disease and uremic sarcopenia. *Front. Physiol.* 2020; 11: 565023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.565023>.
30. Wetzel M.D., Stanley K., Maity S., Madesh M., Bopassa J.C., Awad A.S. Homoarginine ameliorates diabetic nephropathy independent of nitric oxide synthase-3. *Physiol. Rep.* 2021; 9: e14766. <https://doi.org/10.14814/phy2.14766>.
31. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011;40(5): 1271-96. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>.
32. Bonilla D.A., Kreider R.B., Stout J.R., Forero D.A., Kerkisick C.M., Roberts M.D. et al. Metabolic basis of creatine in health and disease: a bioinformatics-assisted review. *Nutrients*. 2021;13(4): 1238. <https://doi.org/10.3390/nu13041238>.
33. Edison E.E., Brosnan M.E., Meyer C., Brosnan J.T. Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007; 293(6): F1799-804. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00356.2007>.
34. Atzler D., Schwedhelm E., Nauck M., Ittermann T., Böger R.H., Friedrich N. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(12): 1835-42. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0314>.
35. Atzler D., Gore M.O., Ayers C.R., Choe C.U., Böger R.H., de Lemos J.A. et al. Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34(11): 2501-7. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304398>.
36. Vaidya SR, Aeddula NR. Chronic Renal Failure. [Updated 2020 Dec 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535404/>.
37. Zhloba A.A., Subbotina T.F. The evaluation of homoarginine and folic acid in patients with arterial hypertension. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(8): 474-81. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-474-481>. (in Russian)

Обухова Л.М., Медяник И.А., Конторщикова К.Н., Симагина С.А., Мусаэлян Л.Т., Конторщиков М.М., Веселова А.С.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

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

Установлено, что не-нейрональная холинэргическая система имеет отношение к онкогенезу, что повышает значение ее компонентов как перспективных маркеров онкологических заболеваний. Цель данной работы – оценить клиническую значимость анализа активности ацетилхолинэстеразы в качестве нового маркера глиом. Активность ацетилхолинэстеразы оценивали фотокolorиметрически по методу Hestrin, пересчитывая активность фермента в ткани опухоли на 1 г белка, а в крови – на 0,1 г гемоглобина. Данные, полученные в первичных опухолях головного мозга (n=28), в ткани мозга лиц, погибших в результате травмы (n=6), в цельной крови больных глиомами (n=28) и практически здоровых людей (n=10) сопоставляли с применением ряда статистических программ. Выявлено значимое снижение активности ацетилхолинэстеразы в ткани опухоли и в цельной крови по мере увеличения степени анаплазии опухолей, начиная с Grade II. Впервые отмечена значимая прямая корреляция, показывающая согласованность между снижением активности ацетилхолинэстеразы в опухолевой ткани головного мозга и крови. Биоинформационный анализ показал связь фермента ацетилхолинэстеразы с белками сигнальных путей PI3K-AKT и Notch, обеспечивающих антиапоптотический и пролиферативный эффекты. Выявленные зависимости вносят вклад в понимание механизмов глиомогенеза и могут быть использованы для отбора новых диагностических маркеров опухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиомы; ацетилхолинэстераза.

Для цитирования: Обухова Л.М., Медяник И.А., Конторщикова К.Н., Симагина С.А., Мусаэлян Л.Т., Конторщиков М.М., Веселова А.С. Клиническая значимость активности ацетилхолинэстеразы при опухолях головного мозга. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (12): 718-721. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-718-721>

Для корреспонденции: Обухова Лариса Михайловна, д-р биол. наук, доц., проф. каф. биохимии им. Г.Я. Городисской; e-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.05.2021

Принята к печати 21.07.2021

Опубликовано 22.12.2021

Obukhova L.M., Medyanik I.A., Kontorshchikova K.N., Simagina S.A., Musaelyan L.T., Kontorshchikov M.M., Veselova A.S.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN BRAIN TUMORS

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

It has been established that the non-neuronal cholinergic system is related to the oncogenesis which increases the attractiveness of its components as the promising markers of oncologic diseases. The purpose of this work is to evaluate the clinical significance of the analysis of the activity of acetyl cholinesterase as a new marker of gliomas. The activity of acetyl cholinesterase was assessed by photo colorimetric analysis according to the Hestrin method recalculating the activity of the enzyme in the tumor tissue per 1 g of protein, and in the blood – by 0.1 g of hemoglobin. The data obtained in the primary tumors of the brain (28) in the tissue of the brain of persons who died as a result of injury (6) and in whole blood of patients with gliomas (28) and practically healthy people (10) were compared with the use of a number of statistical programs. A significant decrease in the activity of acetyl cholinesterase in tumor tissue and in whole blood is revealed as the degree of anaplasia of tumors increases, starting with Grade II. It is for the first time that a significant direct correlation was noted showing the consistency between the decrease in the activity of acetyl cholinesterase in the tumor tissue of the brain and blood. Bioinformatic analysis showed the connection of the enzyme of acetyl cholinesterase with proteins of the PI3K-AKT and Notch signaling pathways providing antiapoptotic and proliferative effects. The found dependences provide new insights into understanding of the mechanisms of gliomas genesis and can be used for selection of new diagnostic markers of brain tumors.

Key words: gliomas; acetylcholinesterase.

For citation: Obukhova L.M., Medyanik I.A., Kontorshchikova K.N., Simagina S.A., Musaelyan L.T., Kontorshchikov M.M., Veselova A.S. Clinical significance of acetylcholinesterase activity in brain tumors. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 718-721 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-718-721>

For correspondence: Obukhova Larisa Mikhailovna, Doctor of Biological Sciences, associate professor, professor of the Department of Biochemistry. G.Ya. Gorodissky; e-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Information about authors:

Obukhova L.M.,	https://orcid.org/0000-0003-4064-9616 ;
Medyanik I.A.,	https://orcid.org/0000-0002-7519-0959 ;
Kontorshchikova K.N.,	https://orcid.org/0000-0001-8345-9359 ;
Simagina S.A.,	https://orcid.org/0000-0002-5887-2739 ;
Musaelyan L.T.,	https://orcid.org/0000-0002-8813-3312 ;

Kontorshchikov M.M., <https://orcid.org/0000-0002-0262-5448>;
Veselova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4927-6353>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.05.2021

Accepted 21.07.2021

Published 22.12.2021

Введение. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент, который осуществляет гидролиз ацетилхолина в холинэргических синапсах, прекращая, таким образом, передачу нервного импульса. Относится к семейству ферментов класса гидролаз, субстратами которых являются сложные эфиры холина с уксусной, пропионовой или масляной кислотами [1]. Ацетилхолинэстераза выявляется преимущественно в синапсах, нейронах и эритроцитах. В головном мозге ацетилхолин действует как нейромедиатор, а не-нейрональный ацетилхолин функционирует как сигнальная молекула, регулируя основные функции клеток: иммунную, двигательную, организацию цитоскелета, секреторную активность, деление, пролиферацию, дифференциацию и апоптоз [2-4]. Именно поэтому не-нейрональная холинэргическая система выполняет важную роль в онкогенезе. АХЭ выступает опухолевым супрессором в культурах клеток опухолей даже при отсутствии ферментативной активности и может влиять на апоптоз раковых клеток негидролитическим путем [5]. Кроме того, экспрессия и активность холинэстераз в опухолевых тканях коррелирует с выживаемостью больных, и связана со степенью злокачественности опухоли [6].

Цель данной работы – оценить клиническую значимость анализа активности ацетилхолинэстеразы в качестве нового маркера глиом.

Материал и методы. Обследовали 28 первичных больных с глиомами в возрасте от 39 до 63 лет. У всех пациентов клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования опухоли в соответствии с классификацией ВОЗ опухолей ЦНС [7]. У 4 пациентов выявлены опухоли со степенью аноплазии Grade I, у 6 – Grade II, у 9 – Grade III, у 9 – Grade IV. Исследования проведены в образцах гомогената послеоперационного материала первичных опухолей, а также в крови.

Контролем явилась ткань мозга лиц, погибших в результате травмы – 6 человек: 4 мужчины, 2 женщины (31-56 лет) и кровь практически здоровых людей, при выполнении МРТ опухоль мозга у которых не была выявлена (10 человек: 6 мужчин и 4 женщин, 32-58 лет). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ (протокол № 6 от 17.04.2019 г.).

Анализ активности ацетилхолинэстеразы. Определение активности ацетилхолинэстеразы проводили фотокolorиметрически по методу Hestrin, основанном на реакции ацетилхолина с щелочным раствором гидроксиламина, в результате чего образуется ацетилгидроксамовая кислота, которая в присутствии солей трёхвалентного железа даёт коричнево-красное окрашивание [8]. Активность АХЭ крови пересчитывали на 0,1 г гемоглобина, активность фермента в тканях пересчитывали на 1 г белка, содержание которого определяли по методу Лоури (ООО «Фирма Синтакон», Россия).

Биоинформационный анализ. Для выявления белок-белковых взаимодействий использовали биоинформативный ресурс STRING. Это база данных для поиска

информации о функциональной взаимосвязи между двумя и более белками. Она содержит экспериментально известную и предсказанную информацию о белок-белковых взаимодействиях для более чем 9,5 миллионов белков. STRING обобщает информацию из различных источников: экспериментальные данные, литературные данные и предсказания *de novo*. По результатам поискового запроса взаимодействия заданного белка с другими белками представлены в виде графа, вершинами которого являются белки, а ребрами — различные типы доказательств функциональных взаимосвязей между этими белками. Вершины, соответствующие белкам, для которых расшифрована (или предсказана с определенной идентичностью) кристаллографическая структура, показаны более крупно. При клике на вершину во всплывающем окне доступны ссылки на сторонние ресурсы с информацией о данном белке, предпросмотр доменной архитектуры и кристаллографической структуры. Возможна кластеризация сети взаимодействий, добавление в сеть взаимодействий других белков при понижении порога достоверности функциональной взаимосвязи (и наоборот, удаление из сети взаимодействий белков при повышении порога), настройка допустимых типов доказательств функциональной взаимосвязи (например, можно оставить в сети взаимодействий только те белки, для взаимодействий которых есть экспериментальные доказательства), а также сохранение списка найденных белок-белковых взаимодействий в виде текстового файла и сохранение картинки сети взаимодействий. При этом список возможных функциональных взаимосвязей заданного белка содержит доказательства каждой взаимосвязи и ранжирован по уровню оцененной достоверности каждой взаимосвязи.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета StatPlus6. Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критериям Колмогорова-Смирнова/Лиллифорса, Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, полученные результаты представляли в виде медианы, квартилей и применяли непараметрические методы сравнения. Достоверность полученных различий оценивали с применением непараметрических критериев (U-критерий Манна-Уитни, критерий Колмогорова-Смирнова). U-критерий Манна-Уитни используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий Колмогорова-Смирнова позволяет проверить гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем

U-тест Манна-Уитни. Для всех статистических критериев значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Корреляционный анализ проводили по Спирмену для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Результаты и обсуждение. Снижение активности ацетилхолинэстеразы в ткани опухолей головного мозга. В табл. 1 представлены статистические характеристики активности ацетилхолинэстеразы в опухолевой ткани глиом в зависимости от степени аномалии.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, медианы уровня активности ацетилхолинэстеразы в ткани опухоли при глиомах Grade II, III, IV были значимо ниже, чем в контроле: при Grade II- в 2,45 раз, при Grade III- в 11,55 раз, при Grade IV- более, чем в 70 раз. Однако при сравнении активности фермента в ткани опухоли при Grade I с контролем, значимых отличий выявлено не было (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,6325$; критерий Колмогорова-Смирнова, $p=0,5561$).

Снижение активности ацетилхолинэстеразы в крови пациентов с глиомами. В табл. 2 представлены статистические характеристики активности ацетилхолинэстеразы в цельной крови в зависимости от степени аномалии глиом.

Как следует из данных, приведенных в табл. 2, медианы уровня активности ацетилхолинэстеразы в крови при глиомах Grade II, III, IV были значимо ниже, чем в контроле: при Grade II- в 1,74 раз, при Grade III- в 3,66 раз, при Grade IV – в 8,37 раз. Однако при сравнении активности фермента в крови при Grade I с контролем значимых отличий выявлено не было.

Взаимосвязь активности ацетилхолинэстеразы ткани опухоли и крови. При проведении анализа корреляционных зависимостей выявлена статистически высоко значимая прямая корреляционная зависимость

между активностью ацетилхолинэстеразы в опухолевой ткани головного мозга и крови ($r_s = 0,632$).

Биоинформационный анализ белок-белковых взаимодействий ацетилхолинэстеразы. Сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и эмбриогенез (PI3K-AKT, каскад митогенактивируемых протеинкиназ Ras-Raf-MEK-ERK, TGF- β -Smad, Wnt, Notch, Hedgehog), задействованы в глиомогенезе [9-12]. Был проведен анализ белок-белковых взаимодействий между АХЭ и белками TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, а также белками PI3K/AKT/mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK, Sonic Hedgehog/Patched, Notch, Wnt/ β -катенин сигнальных путей.

Проведенный биоинформационный анализ белок-белковых взаимодействий показал, что наиболее значимые взаимодействия с ацетилхолинэстеразой наблюдаются для белков PI3K-AKT сигнального пути и белком Пресенилин-1, который участвует в сигнальных каскадах Notch, Wnt, в том числе регулируя уровень β -катенина [13,14].

АХЭ входит в кластер из 27 белков, биологически связанных с белками PI3K-AKT сигнального пути. При этом, средний коэффициент локальной кластеризации равен 0,609. Такой уровень кластеризации может указывать на значимую биологическую связь АХЭ с данными белками. АХЭ напрямую взаимодействует с киназой AKT1, которая фосфорилирует белки, отвечающие за выживание и рост клеток (MDM2, BAD, p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, mTOR и др.) [15].

Снижение активности АХЭ приводит к увеличению концентрации ацетилхолина, который активирует мускариновый ацетилхолиновый рецептор M3R, что ведет к высвобождению эпидермального фактора роста EGF, активирующий рецепторы эпидермального фактора роста EGFR [16]. В результате запускается сигнальный путь PI3K/Akt, активируя пролиферацию клеток.

АХЭ входит в кластер из 6 белков, биологически связанных с белками Notch сигнального пути. Средний

Таблица 1

Активность ацетилхолинэстеразы (мг/мл/час/1 г белка) в гомогенатах опухолевой ткани глиом

Степень аномалии	АХЭ, мг/мл/час/1 г белка		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Контроль, n=6	35,12; 34,96-35,28	34,8-35,43		
Grade I, n=4	33,40; 30,92-34,12	28,43-34,83	$p=0,6325$	$p=0,5561$
Grade II, n=6	14,3; 8,79-21,36	7,50-23,12	$p=0,0091$	$p=0,0465$
Grade III, n=9	3,04; 2,48-3,41	2,12-4,93	$p=0,0011$	$p=0,0020$
Grade IV, n=9	0,51; 0,23-1,11	0,12-2,25	$p=0,0006$	$p=0,0008$

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – число наблюдений.

Таблица 2

Активность ацетилхолинэстеразы (мг/мл/час/0,1 г гемоглобина) в крови при глиомах разной степени аномалии

Степень аномалии	АХЭ, мг/мл/час/0,1 г гемоглобина		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Контроль, n=6	26,30; 23,25-30,56	19,25- 33,78		
Grade I, n=4	26,91; 25,16-28,24	20,55- 31,60	$p=0,5224$	$p=0,4353$
Grade II, n=6	15,15; 14,17- 17,56	12,81-19,68	$p=0,0163$	$p=0,0766$
Grade III, n=9	7,19; 6,69-8,43	4,66-13,12	$p=0,0024$	$p=0,0035$
Grade IV, n=9	3,14; 3,01-4,65	2,17-5,79	$p=0,0015$	$p=0,0022$

коэффициент локальной кластеризации равен 0,933, что свидетельствует о высокозначимой биологической взаимосвязи ацетилхолинэстеразы с данными белками, опосредованной через белок Пресенилин-1.

Рецепторы Notch на наружной поверхности клеточной мембраны гидролизуются пресенилинзависимым комплексом γ -секретазы. В результате внутриклеточный домен NICD (Notch intracellular domain) высвобождается, а затем транслоцируется в ядро, что в конечном итоге приводит к активации транскрипции [17]. Сигнал Notch регулирует p27^{cip1} / waf1, циклин D1, c-Мус, p21, апоптотический белок сурвивин, транскрипционные факторы Slug и Nanog, а также активирует путь ядерного фактора-каппа B [18]. Сигнал Notch, в первую очередь, является онкогенным для многих клеток (лимфобластная лейкемия, нейробластома, рак молочной и предстательной желез) [19]. При глиобластомах выявлена активация сигнального пути Notch, который поддерживает потенциальность опухолевых стволовых клеток, обеспечивая их пролиферацию [10].

Заключение. В представленном исследовании изучена активность ацетилхолинэстеразы в 28 первичных опухолях головного мозга, в 6 образцах головного мозга лиц, погибших в результате травмы, 28 образцах цельной крови больных глиомами и 10 образцах цельной крови практически здоровых людей. По мере увеличения степени анаплазии опухолей, начиная с Grade II, активность ацетилхолинэстеразы значимо снижалась, как в ткани опухоли, так и в цельной крови. Впервые отмечена значимая прямая корреляция, показывающая согласованность между снижением активности ацетилхолинэстеразы в опухолевой ткани головного мозга и крови. С помощью биоинформационного анализа показана взаимосвязь фермента ацетилхолинэстеразы с белками сигнальных путей PI3K-AKT и Notch, обеспечивающих антиапоптотический и пролиферативный эффекты. Можно предположить, что высокая активность ацетилхолинэстеразы выступает в качестве супрессора опухолевого роста не только благодаря своей ферментативной активности (осуществляя гидролиз ацетилхолина), но и по специфическому некаталитическому механизму, за счет образования комплексов с различными белками. Полученные нами результаты углубляют понимание механизмов глиоматоза и могут быть использованы для отбора новых диагностических маркеров опухолей головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 7, 9-16, 18, 19 см. REFERENCES)

6. Петров К. А., Харламова А. Д., Никольский Е. Е. Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога. *Гены и клетки*. 2014; 3(9): 160-7.
8. Хрусталева Д.А., Доведова Е.Л., Ещенко Н.Д. Влияние амфетамина на активность ферментов обмена нейромедиаторов в структурах головного мозга крыс линий Вистар и Август. *Вестник СПбГУ*. 2004; 3: 55-9.
17. Куликова К.В., Кибардин А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Новикова М.В. и др. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015; 2: 30-42.

REFERENCES

1. Silman I., Sussman J. L. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chemico-biological interactions*. 2008; 175(1-3): 3-10. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.035.

2. Lazarevic-Pasti T., Leskovic A., Momic T., Petrovic S., Vasic V. Modulators of acetylcholinesterase activity: From Alzheimer's disease to anti-cancer drugs. *Current medicinal chemistry*. 2017; 24 (30): 3283-3309. DOI: 10.2174/0929867324666170705123509.
3. Jiang H., Zhang X.J. Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J*. 2008; 275(4): 612-7. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06236.x.
4. Fujii T., Mashimo M., Moriwaki Y., Misawa H., Ono S., Horiguchi K. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2017; 134(1):1-21. DOI:10.1016/j.jphs.2017.05.002.
5. Campoy F. J., Vidal C.J., Munoz-Delgado E., Montenegro M.F., Cabezas- Herrera J., Nieto-Ceron S. Cholinergic system and cell proliferation. *Chemico-biological interactions*. 2016; 259: 257-65. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.04.014.
6. Petrov K. A., Harlamova A. D., Nikol'skij E. E. Cholinesterase: a neurophysiologist's view. *Geny i клетки*. 2014; 3(9): 160-7. (in Russian)
7. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (4th ed.). Lyon: IARC; 2016.
8. Khrustalev D.A., Dovedova E.L., Eshchenko N.D. Effect of amphetamine on activity of enzymes of metabolism of neurotransmitters in the structures of the head brains of rats of Wistar and August lines. *Vestnik SPBGU*. 2004; 3: 55-9. (in Russian)
9. Bazzoni R., Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(3):292-317. doi: 10.3390/cancers11030292.
10. Saito N., Hirai N., Aoki K., Suzuki R., Fujita S., Nakayama H. et al. The Oncogene Addiction Switch from NOTCH to PI3K Requires Simultaneous Targeting of NOTCH and PI3K Pathway Inhibition in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(1):121-33. DOI: 10.3390/cancers11010121.
11. Mondal S., Bhattacharya K., Mandal C. Nutritional stress reprograms dedifferentiation in glioblastoma multiforme driven by PTEN/Wnt/Hedgehog axis: a stochastic model of cancer stem cells. *Cell Death. Discov*. 2018; 4: 110-26. DOI: 10.1038/s41420-018-0126-6. eCollection 2018.
12. Nanta R., Shrivastava A., Sharma J., Shankar S., Srivastava R.K. Inhibition of sonic hedgehog and PI3K/Akt/mTOR pathways cooperate in suppressing survival, self-renewal and tumorigenic potential of glioblastoma-initiating cells. *Mol. Cell Biochem*. 2019; 454(1-2):11-23. DOI: 10.1007/s11010-018-3448-z.
13. Teo J. L. Ma H., Nguyen C., Lam C., Kahn M. Specific inhibition of CBP/ β -catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(34):12171-6. DOI: 10.1073/pnas.0504600102.
14. Komiya Y., Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008; 4(2): 68-75. DOI: 10.4161/org.4.2.5851.
15. Hers I., Vincent E. E., Tavaré J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011;23(10):1515-27. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.
16. Hoogduijn M.J., Cheng A., Genever P.G. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2009;18(1):103-12. DOI: 10.1089/scd.2008.0032.
17. Kulikova K.V., Kibardin A.V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Larin S.S., Novikova M.V. et al. The role of Notch proteins in carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2015; 2: 30-42. (in Russian)
18. Niessen K., Fu Y., Chang L., Hoodless P.A., McFadden D., Kar-san A., Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J. Cell Biol*. 2008; 182: 315-25. DOI:10.1083/jcb.200710067.
19. Fabbri G., Rasi S., Rossi D., Trifonov V., Khiabanian H., Ma J. et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J. Exp. Med*. 2011; 208(7):1389-401. DOI: 10.1084/jem.20110921.

Даренская М.А., Губанов Б.Г., Колесникова Л.И., Колесников С.И.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ И ПРОДУКТОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ БИЛИРУБИНА В КРОВИ

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск, Россия

Механическая желтуха (МЖ) является наиболее частым синдромом среди заболеваний гепатопанкреатодуоденальной области и обнаруживается в 12-45% случаев. Выделяют МЖ доброкачественной и злокачественной этиологии. Несмотря на доказательства участия билирубина в снижении бактерицидных свойств нейтрофилов, в настоящий момент отсутствуют данные относительно изменений функционирования системы антиоксидантной защиты в зависимости от уровня билирубина в крови больных МЖ различного генеза. Исследования в данном направлении раскрывают возможность для разработки патогенетических рекомендаций по воздействию на данные звенья патогенеза заболевания. Обследованы мужчины с механической желтухой неопухолевого (МЖНГ) ($n=47$; средний возраст – $52,02 \pm 5,18$ лет) и с механической желтухой опухолевого генеза (МЖОГ) (I-II стадии опухолевого процесса) ($n=45$; средний возраст – $53,02 \pm 4,8$ лет), разделенные на три подгруппы, в зависимости от уровня билирубина в крови. В качестве контроля использованы показатели практически здоровых мужчин ($n=50$, средний возраст – $48,7 \pm 3,9$ лет). Применялись спектрофотометрические и статистические методы исследования. Выявлено статистически значимое снижение показателей супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, церулоплазмينا, увеличение значений диеновых конъюгатов, малонового диальдегида в группе больных с МЖНГ относительно контроля вне зависимости от уровня билирубина в крови. Наличие опухолевого генеза заболевания сопровождается более интенсивными изменениями в исследуемых параметрах относительно контроля. Сравнение показателей между группами пациентов с МЖ разного генеза показало снижение значений глутатион-S-трансферазы и увеличение уровня диеновых конъюгатов у пациентов с МЖОГ и уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л , а также рост содержания диеновых конъюгатов у пациентов с МЖОГ и уровнем билирубина $60-200 \text{ мкмоль/л}$ в сравнении с соответствующими группами пациентов с МЖНГ. Таким образом, как в группах с МЖНГ, так и в группах с МЖОГ происходит значительное снижение активности основных антиоксидантных ферментов и повышение продуктов липопероксидации вне зависимости от уровня билирубина в крови. Наличие опухолевого процесса характеризуется более интенсивными различиями. Выявленные изменения могут служить дополнительными критериями оптимизации диагностики и лечения данной когорты больных.

Ключевые слова: мужчины; механическая желтуха; опухолевый процесс; ферменты-антиоксиданты, перекисное окисление липидов.

Для цитирования: Даренская М.А., Губанов Б.Г., Колесникова Л.И., Колесников С.И. Изменение уровня ферментов антиоксидантного действия и продуктов липопероксидации у пациентов с механической желтухой в зависимости от уровня билирубина в крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (12): 722-727. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-722-727>

Для корреспонденции: Даренская Марина Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии; e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 23.07.2021

Принята к печати 22.09.2021

Опубликовано 22.12.2021

Darenskaya M.A., Gubanov B.G., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I.

LIPID PEROXIDATION FUNCTIONAL STATE CHANGES IN PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE JAUNDICE DEPENDING ON THE LEVEL OF BILIRUBIN IN THE BLOOD

Scientific Centre for the Family Health and Human Reproduction Problems, 664003, Irkutsk, Russia

Obstructive jaundice (OJ) is the most common syndrome among diseases of the hepatopancreatoduodenal region and is found in 12-45% of cases. OJ may be benign and malignant etiology. Despite the evidence of the participation of bilirubin in reducing the bactericidal properties of neutrophils, there are no data currently on changes in the functioning of the antioxidant defense system depending on the level of bilirubin in the blood of patients with OJ of various origins. Research in this direction reveals the possibility for the development of pathogenetic recommendations for influencing these links of the pathogenesis of the disease. The study included men with OJ of non-malignant (OJNMG) ($n = 47$; mean age – 52.02 ± 5.18 years) and OJ of malignant genesis (OJMG) (I-II stages of the malignant process) ($n = 45$; mean age – 53.02 ± 4.8 years), divided into three subgroups, depending on the level of bilirubin in the blood. The indicators of practically healthy men as a control ($n = 50$, average age – 48.7 ± 3.9 years) were used. Spectrophotometric and statistical research methods were used. A statistically significant decrease of superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, glutathione-peroxidase, ceruloplasmin, an increase in the values of diene conjugates, malondialdehyde in the group of patients with OJNMG relative to the control was revealed, regardless of the level of bilirubin in the blood. The presence of malignant genesis of the disease with more intense changes in the studied parameters relative to control is accompanied. Comparison of indicators between groups of patients with OJ of different genesis showed a decrease in the values of glutathione-S-transferase and an increase in the level of diene conjugates in patients with OJMG and the level of bilirubin less than $60 \text{ } \mu\text{mol/L}$, as well as an increase in the content of diene conjugates in patients with OJNMG and a level of bilirubin $60-200 \text{ } \mu\text{mol/L}$ in comparison with the corresponding groups of patients with OJNMG. Thus, both in the groups with OJNMG and in the groups with OJMG, there is a significant decrease in the activity of the main antioxidant enzymes

and an increase in lipid peroxidation products, regardless of the level of bilirubin in the blood. The presence of malignant genesis is characterized by more intense differences. The revealed changes can serve as additional criteria for optimizing the diagnosis and treatment of this cohort of patients.

Key words: men; obstructive jaundice; malignant process; antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

For citation: Darenskaya M.A., Gubanov B.G., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. Lipid peroxidation functional state changes in patients with obstructive jaundice depending on the level of bilirubin in the blood. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 722-727 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-722-727>

For correspondence: Darenskaya Marina Alexandrovna, Dr. Sci. Biol., Lead researcher of the department of Pathophysiology; e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Information about authors:

Darenskaya M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3255-2013>;
Gubanov B.G., <https://orcid.org/0000-0002-1793-1122>;
Kolesnikova L.I., <https://orcid.org/0000-0003-3354-2992>;
Kolesnikov S.I., <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>.

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

Acknowledgment. The study was performed without external funding.

Received 23.07.2021

Accepted 22.09.2021

Published 22.12.2021

Введение. Заболевания гепатопанкреатоодуоденальной области в настоящее время имеют особый приоритет по причине широкой распространенности и роста числа больных [1]. Механическая желтуха (МЖ) является наиболее частым синдромом среди данного рода заболеваний и обнаруживается в 12-45% случаев [2]. МЖ (код K83.1 по МКБ 10) представляет собой симптомокомплекс клинических и морфологических проявлений, развивающихся при нарушении проходимости желчных путей и прекращении поступления желчи из печени по магистральным желчным протокам в двенадцатиперстную кишку [1, 3]. Выделяют МЖ доброкачественной и злокачественной этиологии [4]. Причинами возникновения доброкачественных процессов могут быть многочисленные нарушения, в том числе, панкреатит, желчнокаменная болезнь, врожденные аномалии магистральных желчных протоков и т.д. [5]. Злокачественные новообразования поджелудочной железы, большого дуоденального сосочка, желчных протоков, печени (первичные и метастатические) составляют около 20% причин МЖ [3, 6]. Особенно опасными считаются осложнения МЖ, которые включают поражения желчевыводящих путей, печеночную дисфункцию, многочисленные системные нарушения [1]. Ряд исследований подтверждает, что билирубин играет решающую роль в прогрессировании заболевания и ухудшении состояния пациентов с МЖ [7]. В частности, показано, что повышенный уровень билирубина в сыворотке может быть причиной ухудшения бактерицидной активности нейтрофилов вследствие наличия выраженных антиоксидантных свойств, и, соответственно, может способствовать снижению бактериального клиренса у пациентов с гипербилирубинемией [8, 9]. Однако, высокий уровень билирубина в крови и тканях является не единственной причиной развития системных расстройств при МЖ. Ряд исследований свидетельствует о том, что усугублению ситуации способствует множество токсических агентов, что, в свою очередь, приводит к затруднению в диагностике эндогенной интоксикации и, как следствие, несвоевременному назначению соответствующей терапии [1, 4, 10].

Основным пусковым механизмом повреждения гепатоцитов и развития печеночной недостаточности яв-

ляется гипоксия клеток печени, обусловленная повышением внутрипротокового давления, а также нарушением перфузии тканей печени [11]. Развитие циркуляторной гипоксии может привести к интенсификации реакций окислительного стресса и недостаточности антиоксидантных факторов. В настоящее время выраженные изменения в системе «перекисное окисление липидов-антиоксидантная защита» при наличии МЖ рассматриваются как патогенетические и служат важным фактором развития дисрегуляторных нарушений [12–14]. Несмотря на доказательства участия билирубина в снижении бактерицидных свойств нейтрофилов, в настоящий момент отсутствуют данные относительно изменений функционирования системы антиоксидантной защиты в зависимости от уровня билирубина в крови больных МЖ различного генеза. Исследования в данном направлении раскрывают возможность для разработки патогенетических рекомендаций по воздействию на данные звенья патогенеза заболевания.

В связи с этим, целью нашей работы являлось изучение уровня ферментов антиоксидантного действия и продуктов липопероксидации у больных механической желтухой неопухолевого и опухолевого генеза в зависимости от уровня билирубина в крови.

Материал и методы. Обследованы пациенты-мужчины с механической желтухой неопухолевого генеза (МЖНГ) ($n=47$; средний возраст – $52,02 \pm 5,18$ лет) и с механической желтухой опухолевого генеза (МЖОГ) (I-II стадии опухолевого процесса) ($n=45$; средний возраст – $53,02 \pm 4,8$ лет) на базе ФИЦ КНЦ СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера». В качестве контроля использовались показатели практически здоровых мужчин ($n=50$, средний возраст – $48,7 \pm 3,9$ лет), которые проходили плановую диспансеризацию. В качестве критериев включения во все исследуемые группы были использованы следующие параметры: принадлежность к мужскому полу, возраст 45-59 лет, обязательное подписанное информированное согласие для участия в исследовании; в качестве критериев исключения – наличие тяжелых соматических расстройств, в том числе, туберкулеза, ВИЧ – инфекции, наркотической зависимости, отказ от участия в исследовании. Синдром механической желтухи (МЖ) был верифицирован на основании сочетания

клинико-диагностических признаков (выраженный болевой синдром, уровень билирубина, щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ, УЗИ печени) и данных лабораторных и инструментальных исследований. В группы с МЖ включались пациенты с подтвержденным диагнозом – МЖНГ, обусловленной желчнокаменной болезнью или МЖОГ, обусловленной холангиокарциномой (I – II стадии неоплазии). Обе группы, в зависимости от уровня билирубина в крови были разделены на 3 группы: менее 60 мкмоль/л (МЖНГ ($n=10$), МЖОГ ($n=15$)), 60-200 мкмоль/л (МЖНГ ($n=20$), МЖОГ ($n=20$)), более 200 мкмоль/л (МЖНГ ($n=17$), МЖОГ ($n=10$)) [15].

Оценка активности ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (Кат), глутатион-S-трансферазы (Г-S-T), глутатионпероксидазы (ГПО), церулоплазмينا (ЦП) и продуктов липопероксидации (ДК и МДА) проводилась в момент поступления больных в стационар до проведения патогенетической терапии. Материалом исследования была венозная кровь, которая бралась утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены. Определяли: активность СОД [16], Кат [17], Г-S-T [18], ГПО [18], ЦП [18], содержание ДК [19], МДА [20].

Перед началом исследования получено одобрение этического комитета ФИЦ КНЦ СО РАН «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» (протокол №7 от 16.11.2012). Были соблюдены этические принципы согласно Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, ред. 2008)). Статистическая обработка материала состояла в использовании пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и включала методы определения близости выборки к нормальному закону распределения (визуально-графический метод, критерии согласия Колмогорова-Смирнова, поправки Лиллиефорса и Шапиро-Уилки), а также применение

рангового критерия Манна-Уитни для анализа статистической значимости выявленных различий между количественными данными. Критический уровень значимости принимался равным $p<0,05$.

Результаты. В результате исследования было выяснено, что в группе больных МЖНГ с уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л имело место статистически значимое снижение значений СОД ($p=0,02$), Г-S-T ($p=0,003$) и ГПО ($p=0,003$), увеличение концентрации конечных продуктов ПОЛ – МДА ($p=0,02$) относительно контроля (рис. 1). У пациентов с МЖОГ и уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л наблюдались следующие изменения: снижение показателей СОД ($p<0,001$), Г-S-T ($p<0,001$), ГПО ($p<0,001$) и ЦП ($p<0,001$), увеличение уровня ДК ($p<0,001$), МДА ($p<0,001$) относительно контроля.

У больных МЖНГ с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л также отмечалось статистически значимое снижение СОД ($p=0,03$), Г-S-T ($p=0,001$), ГПО ($p=0,002$) и ЦП ($p=0,02$), увеличение содержания МДА ($p<0,001$) относительно контроля (рис. 2). У больных МЖОГ с аналогичным уровнем билирубина регистрировалось: снижение параметров СОД ($p<0,001$), Г-S-T ($p<0,001$), ГПО ($p<0,001$) и ЦП ($p<0,001$), увеличение уровня ДК ($p<0,001$), МДА ($p<0,001$) относительно контрольных значений.

Группа МЖНГ с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л характеризовалась сниженными значениями – СОД ($p=0,02$), Г-S-T ($p=0,001$), ГПО ($p<0,001$) и ЦП ($p=0,01$), увеличенными – ДК ($p<0,001$), МДА ($p<0,001$); группа МЖОГ (уровень билирубина более 200 мкмоль/л): снижением значений СОД ($p=0,02$), Г-S-T ($p<0,001$), ГПО ($p<0,001$) и ЦП ($p<0,001$), увеличением уровней ДК ($p<0,001$), МДА ($p<0,001$) (рис. 3).

Сравнение показателей между группами пациентов с МЖНГ и различным уровнем билирубина показало

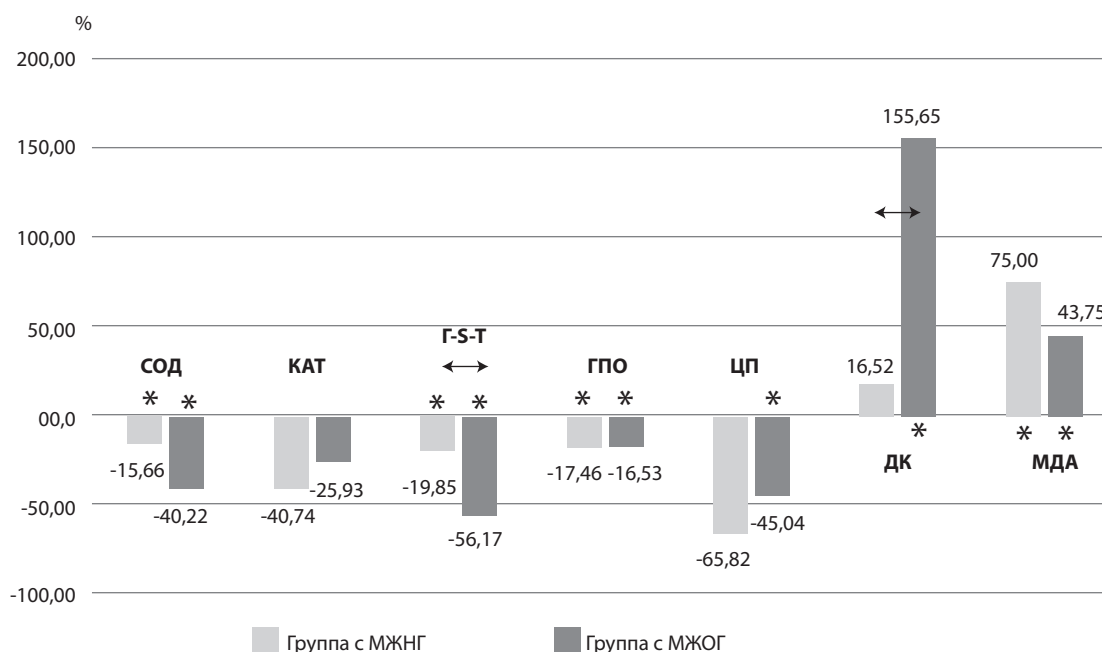


Рис. 1. Активность ферментов-антиоксидантов и содержание продуктов липопероксидации у пациентов с механической желтухой неопухолевого (МЖНГ) и опухолевого (МЖОГ) генеза и уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л. Здесь и на рис. 2, 3: * – статистически значимые различия с контролем (значения приняты за 0%), стрелками обозначены статистически значимые различия между группами с МЖНГ и МЖОГ.

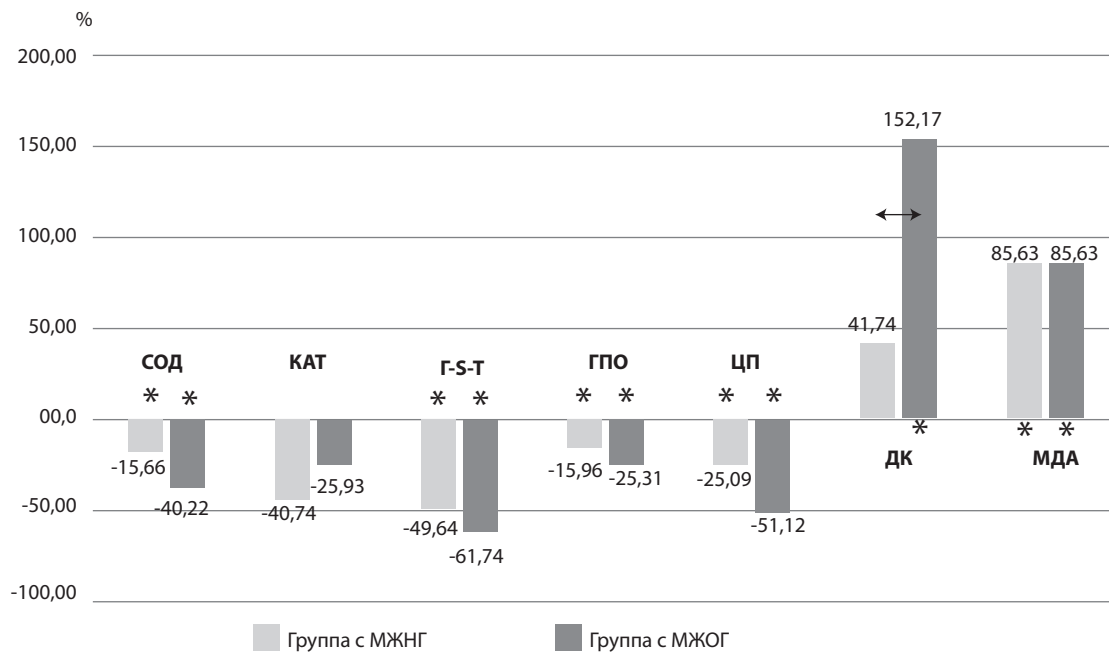


Рис. 2. Активность ферментов-антиоксидантов и содержание продуктов липопероксидации у пациентов с МЖНГ и МЖОГ и уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л.

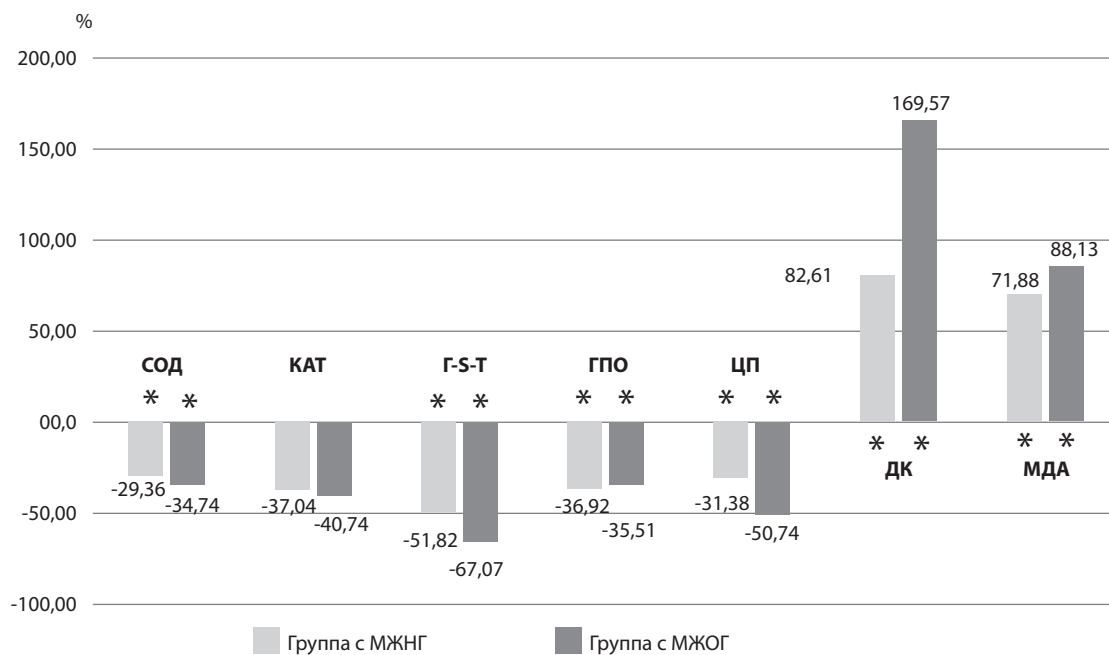


Рис. 3. Активность ферментов-антиоксидантов и содержание продуктов липопероксидации у пациентов с МЖНГ и МЖОГ и уровнем билирубина более 200 мкмоль/л.

наличие статистически значимых различий только в отношении значений МДА (ниже в группе с билирубином более 200 мкмоль/л ($p=0,018$), чем в группе с уровнем 60-200 мкмоль/л) и значений СОД (ниже в группе с билирубином более 200 мкмоль/л ($p=0,02$), чем в группе с уровнем 60-200 мкмоль/л). В группе с МЖОГ значимых различий у пациентов с разным уровнем билирубина выявлено не было ($p>0,05$).

Сравнительный анализ исследуемых показателей между группами пациентов с МЖ разного генеза показал

значимое снижение значений Г-S-T ($p=0,042$) и увеличение уровня ДК ($p=0,002$) у пациентов с МЖОГ и уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л, а также рост содержания ДК ($p=0,015$) у пациентов с МЖОГ и уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л в сравнении с соответствующими группами пациентов с МЖНГ. Разницы в показателях между группами с МЖ различного генеза и уровнем билирубина более 200 мкмоль/л обнаружено не было ($p>0,05$).

Обсуждение. Билирубин является желчным пигментом, продуктом катаболизма гемсодержащих соедине-

ний и, в основном, рассматривается как негативный фактор при заболеваниях печени и желчевыводящих путей [21]. Токсическое действие повышенного билирубина в крови при МЖ проявляется возникновением очагов некроза в паренхиматозных органах, подавлением клеточного иммунного ответа и другими эффектами [22,23]. Конечными этапами патологического процесса в печеночной паренхиме является запуск гипоксического или свободнорадикального некролиза с последующей клеточной гибелью [7]. Однако, нельзя также недооценивать антиоксидантные свойства билирубина, в особенности в отношении пероксильных радикалов. Причем одна молекула билирубина может обрывать больше двух цепей окисления за счет образования продуктов превращения, имеющих ингибирующие эффекты [9,24]. В нашем исследовании обнаружено падение значений основных антиоксидантных ферментов как в группах с МЖНГ, так и в группах с МЖОГ относительно контроля вне зависимости от уровня билирубина, с более интенсивным снижением показателей в группе с МЖОГ. Известно, что чрезмерная активация свободнорадикальных процессов приводит к трансформации органических молекул, деградации клеточных структур, нарушению функциональной активности клеток [25, 26]. Негативное влияние активных кислородных метаболитов, как правило, уравнивается работой системы антиоксидантной защиты, представленной ферментативным и неферментативным звеньями [27, 28]. К антиоксидантным ферментам относят супероксиддисмутазу, катализирующую дисмутацию супероксидного радикала, каталазу, разлагающую гидроперекиси, глутатионпероксидазу, катализирующую восстановление пероксида водорода до воды, глутатионредуктазу, восстанавливающую глутатион путем окисления НАДФН, глутатион-S-трансферазу, участвующую в детоксикации различных ксенобиотиков [29]. Высокая активность ферментов необходима для постоянного поддержания реакций гомеостаза, в случае же серьезных сдвигов организм начинает страдать от окислительного стресса, имеющего место в различных компартментах клетки. Одним из основных субстратов являются липиды биомембран, в результате окисления которых образуются гидроперекиси, метаболизирующиеся в первичные (ДК) и вторичные (МДА) продукты. Нами обнаружен значительный рост значений ДК в группе с МЖНГ и уровнем билирубина в крови – более 200 мкмоль/л, однако изменения в группе с МЖОГ отражали более интенсивную картину – высокие показатели ДК при всех значениях билирубина. Рост вторичных продуктов – МДА обнаруживался соизмеримо роста указанного пигмента, причем более интенсивные изменения имели место в группе с МЖОГ и максимумом билирубина. Повышение реактивности процессов липопероксидации является, с одной стороны, отражением степени метаболических расстройств, а со второй, вызывает ряд серьезных вторичных патологических процессов. Наличие опухолевого процесса характеризуется более интенсивными изменениями, что выражается снижением значений Г-S-T и увеличением уровня ДК при уровне билирубина менее 60 мкмоль/л и повышением содержания ДК при значениях билирубина 60-200 мкмоль/л в сравнении с соответствующими группами пациентов с МЖ неопухолевого генеза. Падение активности глутатион-S-трансферазы может иметь определенные негативные последствия для клеток и тканей, по причине многочисленных детоксикационных эффек-

тов данного фермента. Можно предполагать снижение защитных свойств клеток от действия ксенобиотиков и продуктов ПОЛ в исследуемых группах. При этом, в нашем исследовании не было выявлено существенных изменений в показателях ПОЛ-АОЗ при высоком уровне билирубина относительно предыдущих уровней в группах с МЖНГ и МЖОГ, а также различий между группами различного генеза с высоким уровнем пигмента. Наиболее вероятным в данном случае представляется объяснение непосредственного участия билирубина в процессах липопероксидации. Данное предположение основано на полученных в ряде исследований результатах, свидетельствующих о том, что повышение его уровня является компенсаторным механизмом, позволяющим регулировать протекание реакций ПОЛ при патологии печени и желчных путей, когда функциональные способности гепатоцитов значительно снижены [9,30]. Показано, что билирубин, воздействуя непосредственно на сфингомиелиновый цикл, может защищать клетки организма от апоптоза, вызванного не только активацией ПОЛ, но и другими стимулами [24].

Заключение. Можно заключить, что сниженная активность ферментов антиоксидантного действия, а также рост показателей липопероксидации у больных механической желтухой отмечается вне зависимости от генеза заболевания и уровня билирубина в крови. Наличие опухолевого процесса, однако, характеризуется более интенсивными изменениями, что выражается снижением значений глутатион-S-трансферазы и увеличением уровня первичных продуктов ПОЛ при уровне билирубина менее 60 мкмоль/л и повышением содержания последних при значениях билирубина 60-200 мкмоль/л относительно данных по механической желтухе неопухолевого генеза. Выявленные изменения могут служить дополнительными критериями оптимизации диагностики и лечения данной когорты больных.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–9, 11–14, 20–25, 27, 29, 30 см. REFERENCES)

10. Курбонов К.М., Назирбоев К.Р. Эндотоксикоз и показатели уровня цитокинов у пациентов с механической желтухой неопухолевого генеза. *Новости хирургии*. 2017; 25(4): 359-64.
15. Гальперин Э.А., Момунова О.Н. Классификация тяжести механической желтухи. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2014; 1: 5-9.
16. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*. 1999; 3: 36-42.
17. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-9.
18. Медицинские лабораторные технологии: Справочник (в 2-х томах). Карпищенко А.И., ред.. 2-е изд. СПб: Интермедика; 2002.
19. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983; 3: 33-6.
23. Смирнова О.В., Титова Н.М., Каспаров Э.В., Елманова Н.Г. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании механической желтухи в зависимости от уровня билирубина и генеза желтухи. *Медицинская иммунология*. 2016; 18(3): 269-78.
26. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16(4): 16-29.
28. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Осипова Е.В., Долгих М.И., Семенова Н.В. Анализ антиоксидантного статуса и фактического питания студентов. *Вопросы питания*. 2015;

84(4): 66-73.

30. Даренская М.А., Смирнова О.В., Губанов Б.Г., Каспаров Э.В., Гребенкина Л.А., Колесникова Л.И. и др. Анализ функциональной активности нейтрофилов у мужчин с механической желтухой различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(9): 547-51.

REFERENCES

- Vagholkar K. Obstructive Jaundice: Understanding the pathophysiology. *International Journal of Surgery and Medicine*. 2020; 6(4): 26-31.
- Kwon W. Impact of Obstructive Jaundice on Outcomes after Non-Hepatic Surgery. *KASL*. 2018; 1: 442-5.
- Pavlidis E.T., Pavlidis T.E. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2018; 17(1): 17-21.
- Khan R.S., Houlihan D.D., Newsome P.N. Investigation of jaundice. *Medicine*. 2019; 47(11): 713-7.
- Khan Z.A. Clinical profile of patients with obstructive jaundice: a surgeon's perspectives. *International Surgery Journal*. 2019; 6(6): 1876-80.
- Moole H., Bechtold M., Puli S.R. Efficacy of preoperative biliary drainage in malignant obstructive jaundice: a meta-analysis and systematic review. *World journal of surgical oncology*. 2016; 14(1): 182.
- Uemura S., Higuchi R., Yazawa T., Izumo W., Otsubo T., Yamamoto M. Level of total bilirubin in the bile of the future remnant liver of patients with obstructive jaundice undergoing hepatectomy predicts postoperative liver failure. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2020; 27(9): 614-21.
- Arai T., Yoshikai Y., Kamiya J., Nagino M., Uesaka K., Yuasa N. et al. Bilirubin impairs bactericidal activity of neutrophils through an antioxidant mechanism in vitro. *J Surg Res*. 2001; 96(1): 107-13.
- Dudnik L.B., Azyzova O.A., Solovyova N.P., Savchenkova A.P., Pokrovskaya M.A. Primary biliary cirrhosis and coronary atherosclerosis: protective antioxidant effect of bilirubin. *Bull. Exper. Biol. Med*. 2008; 145(1): 18-22.
- Kurbonov K.M., Nazirboev K.R. Endotoxemia and indicators of the level of cytokines in patients with obstructive jaundice of non-neoplastic genesis. *Novosti khirurgii*. 2017; 25(4): 359-64. (in Russian)
- Assimakopoulos S.F., Scopa C.D., Vagianos C.E. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(48): 6458.
- Martínez-Cecilia D., Reyes-Díaz M., Ruiz-Rabelo J., Gomez-Alvarez M., Villanueva C.M., Álamo J. et al. Oxidative stress influence on renal dysfunction in patients with obstructive jaundice: A case and control prospective study. *Redox biology*. 2016; 8: 160-4.
- Usman N., Rudiman R. Effect of vitamin C inhibiting liver fibrosis and lipid peroxidation in biliary obstruction of Wistar rats. *International Surgery Journal*. 2020; 7(9): 2830-6.
- Ommati M.M., Farshad O., Mousavi K., Taghavi R., Farajvajari S., Azarpira N. et al. Agmatine alleviates hepatic and renal injury in a rat model of obstructive jaundice. *PharmaNutrition*, 2020; 13: 100212.
- Gal'perin Ye.A., Momunova O.N. Classification of the severity of obstructive jaundice. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2014; 1: 5-9. (in Russian)
- Sirota T.V. A new approach in the study of adrenaline autooxidation and its use to measure the activity of superoxide dismutase. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1999; 3: 36-42. (in Russian)
- Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
- Medical laboratory technologies: Handbook: (in 2 vol.). Karpishchenko A.I., ed. 2nd ed. St.Petersburg: Intermedika; 2002. (in Russian)
- Gavrilov V.B., Mishkorudnaja M.I. Spectrophotometric determination of the content of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Laboratornoe delo*. 1983; 3: 33-6. (in Russian)
- Asakava T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980; 15: 137-40.
- Khoei N.S., Jenab M., Murphy N., Banbury B.L., Carreras-Torres R., Viallon V. et al. Circulating bilirubin levels and risk of colorectal cancer: serological and Mendelian randomization analyses. *BMC medicine*. 2020; 18(1): 1-15.
- Alatise O.I., Owojuyigbe A.M., Omisore A.D., Ndububa D.A., Aburime E., Dua K.S. et al. Endoscopic management and clinical outcomes of obstructive jaundice. *Nigerian Postgraduate Medical Journal*. 2020; 27(4): 302.
- Smirnova O.V., Titova N.M., Kasparov Je.V., Elmanova N.G. Chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in the progression of obstructive jaundice depending on the level of bilirubin and the genesis of jaundice. *Meditsinskaya immunologiya*. 2016; 18(3): 269-78. (in Russian)
- Dudnik L.B., Tsyupko A.N., Khrenov A.V., Alessenko A.V. Effect of bilirubin on lipid peroxidation, sphingomyelinase activity, and apoptosis induced by sphingosine and UV irradiation. *Biochemistry (Moscow)*. 2001; 66(9): 1019-27.
- Olson K.R. Hydrogen sulfide, reactive sulfide species and coping with reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. Med*. 2019; 140: 74-83.
- Kolesnikova L.I., Darenkaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiological view. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2017; 16(4): 16-29. (in Russian)
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 2015; 4: 180-3.
- Kolesnikova L.I., Darenkaya M.A., Grebenkina L.A., Osipova E.V., Dolgikh M.I., Semenova N.V. Analysis of the antioxidant status and actual nutrition of female students. *Voprosy pitaniya*. 2015; 84(4): 66-73. (in Russian)
- Yang H.Y., Lee T.H. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB reports*. 2015; 48(4): 200.
- Darenkaya M.A., Smirnova O.V., Gubanov B.G., Kasparov Ye.V., Grebenkina L.A., Kolesnikova L.I. et al. Analysis of the functional activity of neutrophils in men with obstructive jaundice of various origins. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(9): 547-51. (in Russian)

© АВЕРЬЯНОВА И.В., 2021

Аверьянова И.В.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ (ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН) У ЗДОРОВЫХ ЮНОШЕЙ И МУЖЧИН, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

ФГБУН Научно-исследовательский центр «Арктика» Дальневосточного отделения РАН (НИЦ «Арктика» ДВО РАН), 685000, г. Магадан, Россия

В настоящее время большое внимание исследователей привлекают заболевания, напрямую связанные с метаболическими нарушениями, особое место среди которых занимают сердечно-сосудистые заболевания, обусловленные нарушением жирового обмена (дислипидемией). Целью данной работы явилось изучение возрастной динамики и степени выраженности дислипидемии основных характеристик липидного обмена в различных возрастных группах (в группе юношей и группе мужчин). В исследовании приняли участие 55 мужчин, (средний возраст $36,8 \pm 0,8$ лет) и 147 юношей ($18,7 \pm 0,8$ лет) из числа европеоидов – уроженцев и постоянных жителей Магаданской области. Исследование основных показателей липидного обмена в сыворотке крови выполнялось колориметрическим фотометрическим методом с использованием АУ 680 (Beckman Coulter, США). Полученные нами данные показали, что по мере увеличения возраста от группы юношей к группе мужчин отмечается значимое увеличение уровня всех показателей липидограммы, с повышением процента встречаемости дислипидемии, что наблюдается на фоне увеличения расчетных индексов, отражающих степень атерогенности липидного профиля. В целом, проведенные исследования выявили более благоприятный липидный профиль в группе юношей, тогда, как результаты биохимического профиля у жителей Севера более старшей возрастной группы (мужчины), характеризовались увеличением основных характеристик и индексов, отражающих степень атерогенности липидного профиля, что можно расценивать как весьма тревожный фактор развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также как предиктор риска развития метаболического синдрома.

Ключевые слова: мужчины; юноши; Северо-Восток России; липидный профиль; дислипидемии; риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Для цитирования: Аверьянова И.В. Возрастные изменения биохимических показателей крови (липидный обмен) у здоровых юношей и мужчин, проживающих в условиях Севера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (12): 728-732. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-728-732>

Для корреспонденции: Аверьянова Инесса Владиславовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии экстремальных состояний; e-mail: Inessa1382@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена за счет бюджетного финансирования НИЦ «Арктика» ДВО РАН в рамках выполнения темы «Изучение межсистемных и внутрисистемных механизмов реакций в формировании функциональных адаптивных резервов организма человека «северного типа» на разных этапах онтогенеза лиц, проживающих в дискомфортных и экстремальных условиях с определением интегральных информативных индексов здоровья» (рег. номер АААА-А21-121010690002-2).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2021

Принята к печати 13.04.2021

Опубликовано 22.12.2021

Averyanova I. V.

AGE-RELATED BLOOD BIOCHEMICAL CHANGES (LIPID METABOLISM) IN HEALTHY YOUNG AND MATURE MEN LIVING UNDER THE NORTH CONDITIONS

Scientific Research Center "Arktika", Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (SRC "Arktika" FEB RAS), 685000, Magadan, Russia

Metabolic disorders (dyslipidemias) are currently crucial since they develop cardiovascular diseases. The work was aimed at studying age dynamics and its correlation with severity of dyslipidemia in basic lipid metabolism variables (in different age groups). Materials and methods: Examinees were Caucasians born and permanently residing in Magadan region: 55 mature men and 147 young men (mean ages were 36.8 ± 0.8 and 18.7 ± 0.8 yr, respectively). Blood serum lipid metabolism was examined by colorimetric and photometric method using AU 680 (Beckman Coulter, USA). Results: The data of obtained lipidogram showed dependence of rise in all indicators on subjective older age with higher percentage of dyslipidemia and increase in calculated indices reflecting degree of the lipid profile atherogenicity. Conclusion: Overall, the North study revealed a safer lipid profile in group of younger men, while biochemical picture of older residents demonstrated increased values. Lipid atherogenicity is a very alarming factor in developing cardiovascular diseases, and a predictor of risks for metabolic syndrome.

Key words: mature and young men; North-East of Russia; lipid picture; dyslipidemia; risks for cardiovascular diseases.

For citation: Averyanova I.V. Age-related blood biochemical changes (lipid metabolism) in healthy young and mature men living under the North conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 728-732. (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-728-732>

For correspondence: Averyanova Inessa Vladislavovna, Biological Candidate, Leading Researcher, Laboratory for Physiology of Extreme States; Inessa1382@mail.ru

Information about authors:

Averyanova I.V., <https://orcid.org/0000-0002-4511-6782>.

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

Acknowledgment. The work has been fulfilled with Arktika Scientific Research Center, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, under the financial support of the Russian Federation budget within the framework of the project "Study of intersystem and intrasystem mechanisms involved in developing functional and adaptive reserves of the northern type man at different stages of ontogenesis under discomfort and extreme conditions of residence with the determination of health integral informative indices" (registration number, AAAA-A21-121010690002-2).

Received 05.04.2021

Accepted 13.04.2021

Publisher 22.12.2021

Введение. В настоящее время большое внимание исследователей привлекают заболевания, напрямую связанные с метаболическими нарушениями, особое место среди которых занимают сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), обусловленные нарушением жирового обмена (дислипидемией) [1]. Дислипидемия - это многофакторное заболевание, возникающее в результате взаимодействия генетических факторов, образа жизни и факторов окружающей среды [2]. Нарушение регуляции метаболизма холестерина неразрывно связано со здоровьем сердечно-сосудистой системы, и по этой причине холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) обычно используются в качестве биомаркеров риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [3, 4]. Уровни общего холестерина в плазме крови, ЛПНП и ЛПВП являются давно установленными золотыми стандартными факторами риска развития ССЗ [5]. В частности, повышение, как общего, так и ЛПНП, приводит к увеличению риска ССЗ, в то время как, наоборот, повышение ЛПВП приводит к снижению риска ССЗ [6-8]. Данные Фрамингемского исследования свидетельствуют о возрастных изменениях основных характеристик липидного профиля, так наблюдается постепенное повышение уровня ЛПНП от начального значения, равного 2,59 ммоль/л у 15-19-летних юношей до 3,70 ммоль/л у 60-64-летних мужчин [10]. Наиболее вероятной причиной этого является то, что увеличение возраста приводит к нарушению регуляции обмена холестерина во всем организме [11]. Метаболизм холестерина во всем организме регулируется рядом факторов, включая синтез холестерина, всасывание холестерина в кишечнике, поглощение холестерина печенью (известный как обратный транспорт холестерина), экскрецию холестерина, выработку желчных кислот и деконъюгацию кишечной микрофлорой и последующую экскрецию. Изменения любого из этих механизмов могут нарушать регуляцию метаболизма холестерина [12].

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы явилось изучение возрастной динамики и степени выраженности дислипидемии основных показателей липидного обмена в различных возрастных группах (юноши, мужчины).

Материал и методы. В исследованиях приняли участие 55 мужчин трудоспособного возраста (средний возраст $36,8 \pm 0,8$ лет) из числа европеоидов, проживающих на территории Магаданской области, обследуемые в рамках программы научного мониторинга психофизиологического состояния лиц трудоспособного возраста в условиях Северо-Востока России «Арктика. Человек. Адаптация», проводимой на базе НИЦ «Арктика» ДВО РАН (г. Магадан). Средние соматометрические характеристики обследуемых мужчин имели следующие числовые величины: длина тела составила $180,5 \pm 0,9$ см, масса

тела была равна $84,1 \pm 1,1$ кг и индекс массы тела (ИМТ) был равен $25,8 \pm 0,5$ кг/м². Также были обследованы 147 юношей из числа европеоидов ($18,7 \pm 0,8$ лет) со следующими антропометрическими характеристиками (длина тела - $179,0 \pm 0,5$ см, масса тела $70,4 \pm 0,7$ кг, индекс массы тела - $21,9 \pm 0,2$ кг/м²).

Содержание общего холестерина (ОХС, ммоль/л), триглицеридов (ТГ, ммоль/л), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП, ммоль/л) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП, ммоль/л) определялось колориметрическим фотометрическим методом с использованием AU 680 (Beckman Coulter, США). Для оценки атерогенного потенциала липидного профиля были рассчитаны следующие показатели: отношение общего холестерина к холестерину липопротеинов высокой плотности: ОХС/ЛПВП и показатель отношения холестерина липопротеинов низкой плотности к холестерину липопротеинов высокой плотности: ЛПНП/ЛПВП. Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по следующей формуле: $КА = (ОХС - ЛПВП) / ЛПВП$ [13]. Дислипидемию анализируемых характеристик определяли исходя из критериев Российских рекомендаций VII пересмотра 2020 г. [14] и на основе доклада экспертов NCEP [15].

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации (2013) [16]. Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУН ИБПС ДВО РАН (№001/019 от 29.03.2019 г.). У всех обследуемых было получено письменное информированное согласие до включения в исследование.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с применением пакета прикладных программ «Statistica 7.0». Проверка на нормальность распределения измеренных переменных осуществлялась на основе теста Шапиро-Уилки. Результаты параметрических методов обработки представлены в виде среднего значения (М) и ошибки средней арифметической ($\pm m$). Статистическая значимость различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости (p) в работе принимался равным 0.05; 0.01; 0.001 [17].

Результаты. В табл. 1 представлены основные показатели липидного обмена в группах юношей и мужчин из числа постоянных жителей Севера. Из приведенных данных видно, что в группе юношей отмечались значимо более низкие показатели основных характеристик липидного профиля, тогда как у обследованных мужчин все проанализированные показатели липидограмм на статистически значимую величину были выше относительно лиц более молодого возраста. При этом в группе мужчин было зафиксировано значимое увеличение расчетных индексов, отражающих степень атерогенности липидного профиля, относительно обследованных юношей. Анализ индивидуальных отклонений липидного профиля относительно нормативных величин представ-

лен в табл. 2. Показано, что изменения в характеристиках липидного обмена в виде гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии, повышения ЛПНП и снижения ЛПВП отмечено у 6 %, 2 %, 4 %, 8 % юношей. Тогда, как для группы мужчин была характерна более высокая частота встречаемости нарушений липидограмм, которая проявлялась гипертриглицеридемией у 22 % обследуемых, гиперхолестеринемией, выявленной в 61 % случаев, повышением ЛПНП у 80 % мужчин и снижением ЛПВП у 2% мужчин.

Обсуждение. Полученные в нашем исследовании средние уровни общего холестерина, ЛПНП и триглицеридов среди мужчин составили $5,83 \pm 0,09$ ммоль/л, $3,90 \pm 0,09$ ммоль/л и $1,37 \pm 0,10$ ммоль/л. Тогда, как в группе юношей вышеперечисленные характеристики были на статистически значимую величину ниже, чем в выборке мужчин, и были равны $3,47 \pm 0,06$ ммоль/л ($p < 0,001$), $1,66 \pm 0,05$ ммоль/л ($p < 0,001$) и $0,80 \pm 0,04$ ммоль/л ($p < 0,001$), соответственно. Полученные результаты показали, что среднее значение триглицеридов для группы мужчин составляло $1,37$ ммоль/л (диапазон $0,45-3,83$ ммоль/л), а у 22 % было выявлено превышение относительно нормативного диапазона (выше $1,77$ ммоль/л). Известно, что высокие уровни триглицеридов сыворотки крови натошак предсказывают долгосрочный риск развития диабета у здоровых мужчин среднего возраста, тогда, как более низкий уровень триглицеридов, напротив, связывают со снижением риска развития диабета [18-21]. Показано, что высокие уровни триглицеридов также являются частью «порочного метаболического круга», повышающего риск развития диабета [18], так как гипертриглицеридемия связана с повышением концентра-

ции свободных жирных кислот в плазме крови, снижением чувствительности к инсулину и увеличением выработки глюкозы печенью [22, 23].

Известно, что нарушение регуляции метаболизма холестерина неразрывно связано с сердечно-сосудистой системой, и по этой причине холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) обычно используются в качестве биомаркеров риска ССЗ [3]. Руководящие принципы ESC 2016 г. рекомендуют уровень ЛПНП ниже 3 ммоль/л для лиц с низким риском развития ССЗ [10]. В нескольких крупных метаанализах проспективных эпидемиологических исследований сообщалось о непрерывной логарифмической линейной связи между абсолютной величиной уровня ЛПНП в плазме крови и риском развития ССЗ [24]. Например, было высказано предположение, что увеличение потребления пищевого холестерина является одним из факторов, ответственных за повышение уровня ЛПНП в сыворотке крови с возрастом [25]. Полученные результаты показали, что 4% обследованных юношей и 80% мужчин имели уровень ЛПНП, превышающий референсный нормативный диапазон, равный 3,0 ммоль/л, что в полной мере согласуется с результатами других исследований, где отмечается, что как сам уровень, так и степень выраженности дислипидемии относительно концентрации ЛПНП увеличивается с возрастом в различных группах населения [26, 27].

Полученные нами данные показали, что по мере увеличения возраста от группы юношей к группе мужчин, отмечалось значимое увеличение уровня ЛПВП с одновременным снижением процента встречаемо-

Таблица 1

Показатели липидного обмена у жителей Севера двух возрастных групп ($M \pm m$)

Показатели	Магаданская область		Уровень значимости различий, p
	Юноши ($n=147$)	Мужчины ($n=55$)	
ОХС, ммоль/л	$3,47 \pm 0,06$	$5,83 \pm 0,09$	<0.001
ТГ, ммоль / л	$0,80 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,10$	<0.001
ЛПВП, ммоль/л	$1,29 \pm 0,03$	$1,42 \pm 0,05$	<0.01
ЛПНП, ммоль / л	$1,66 \pm 0,05$	$3,90 \pm 0,09$	<0.001
КА, усл. ед.	$1,91 \pm 0,11$	$3,32 \pm 0,17$	<0.001
ОХС/ЛПВП, усл. ед.	$2,91 \pm 0,11$	$4,32 \pm 0,17$	<0.001
ЛПНП/ЛПВП, усл. ед.	$1,45 \pm 0,08$	$2,92 \pm 0,11$	<0.001

Таблица 2

Частота встречаемости нарушений липидного и углеводного обменов у европеоидов и аборигенов, проживающих в различных регионах Северо-Востока России

Обследуемые группы	Изучаемые показатели			
	ТГ выше $1,77$ ммоль/л	ОХС выше $5,18$ ммоль/л	ЛПВП ниже $0,9$ ммоль/л	ЛПНП выше $3,0$ ммоль/л
Юноши	6 ± 2 %	2 ± 1 %	8 ± 2 %	4 ± 2 %
Мужчины	22 ± 6 %	61 ± 7 %	2 ± 1 %	80 ± 5 %
Уровень значимости различий	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$

сти величин ниже нормативного диапазона. Известно, что холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) защищает от развития ССЗ с помощью ряда механизмов, включая усиление обратного транспорта холестерина, а также за счет противовоспалительного и антиоксидантного механизмов [7]. По мнению авторов, низкая концентрация уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) связана с инсулинорезистентностью, заболеваниями и сахарным диабетом 2 типа (СД2) [28, 29].

Величины коэффициента атерогенности свидетельствуют об увеличении данного показателя в возрастном аспекте: так, среднее значение КА в группе юношей составило $1,91 \pm 0,11$ усл. ед., тогда как в выборке мужчин данный коэффициент значительно превышал значение в группе молодых людей и составил $3,32 \pm 0,17$ усл. ед. При этом нужно указать, что если в группе юношей, превышение нормативного диапазона для данного показателя (более 3 усл. ед.) было выявлено лишь у 8 % обследуемых, то в группе мужчин уже у 61 % обследуемых характеризовался превышением референсного порога.

Заключение. Таким образом, наши результаты подтвердили тот факт, что для мужчин, проживающих в условиях Севера, характерен более атерогенный профиль ЛПНП и ЛПВП, чем у юношей того же региона проживания. Концентрация атерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови увеличивалась с возрастом. В целом, проведенные исследования выявили более благоприятный липидный профиль в группе юношей. Таким образом, полученные результаты биохимического профиля у жителей Севера в более старшей возрастной группе (мужчины), проявляющиеся увеличением ОХС, ЛПНП, ТГ, на фоне увеличения индексов, отражающих степень атерогенности липидного профиля, можно расценивать как весьма тревожный фактор развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также как фактор риска развития метаболического синдрома в более старших возрастных группах. Наш вывод согласуется с рекомендациями НСЕР АТР III, которые указывают на то, что мужчины среднего возраста имеют повышенный риск развития ССЗ и должны рассматриваться как группы для более агрессивной первичной профилактики, направленной на оптимизацию характеристик липидного обмена [15].

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 12, 15 – 16, 18 – 29 см. REFERENCES)

1. Рябова Т.И., Попова Т.В., Сиротин Б.З. Инсулинорезистентность у коренного (эвены, ульчи, нанайцы) и пришлого населения Хабаровского края. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012; 4: 12–4.
13. Климов А.Н., Никольцева Н. Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушение: руководство для врачей. СПб: Питер Ком; 1999.
14. Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В. Арабидзе Г.Г., Бубнова М.Г., Балахонova Т.В. и др. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. российские рекомендации, VII пересмотр. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2020; 1 (38):7–40. DOI: 10.34687/2219-8202. JAD.2020.01.0002.
17. Боровиков В.П. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов (2-е издание)*. СПб: Питер; 2003. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6_108.
1. Ryabova T. I., Popova T. V., Sirotn B. Z. Insulin resistance among the indigenous (evens, ulchi, nanai) and newly arrived population of the Khabarovsk krai. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal*. 2012; 4: 12–4. (in Russian)
2. Halcox J.P., Banegas J.R., Roy C., Dallongeville J., De Backer G., Guallar E. et al. Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2017; 17(1): 160. https://doi.org/10.1186/s12872-017-0591-5.
3. Morgan A.E., Mooney K.M., Wilkinson S.J., Pickles N.A., Mc Auley M.T. Mathematically modelling the dynamics of cholesterol metabolism and ageing. *Biosystems*. 2016; 145: 19-32. https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2016.05.001.
4. Rosenson R.S. Clinical role of LDL and HDL subclass and apolipoprotein measurement. *ACC Curr. J. Rev.* 2004; 13: 33-7. https://doi.org/10.1016/j.accreview.2004.04.095.
5. Appelman Y., Rijn B.B., Haaf M.E., Boersma E., Peter S.A.E. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis*. 2015;241(1): 211–8. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.027.
6. Austin M.A., Breslow J.L., Hennekens C.H., Buring J.E., Willett W.C., Krauss R.M. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988; 260(13): 1917-21. https://doi.org/10.1001/jama.260.13.1917.
7. Cooney M.T., Dudina A., De Bacquer D., Wilhelmsen L., Sans S., Menotti A.G et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009; 206 (2):611–6. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.041.
8. Borén J., Chapman M.J., Krauss R.M., Packard C.J., Bentzon J.F., Binder C.J. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*. 2020; 41(24):2313-30. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz962.
9. Kagan A., Dawber T.R., Kannel W.B., Revotskie N. The Framingham Study: a perspective study of coronary heart disease. *A Federation Proceeding*. 1962; 21: 52–7.
10. Catapano A.L., Graham I., De Backer G., Wiklund O., Chapman M. J., Drexel H. et al. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the european society of cardiology (ESC) and European atherosclerosis society (EAS). *Eur. Heart J*. 2016; 27:272. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.018.
11. Mooney K.M., Mc Auley M.T. Cardiovascular disease and healthy ageing. *J. Int. Cardiol.* 2015; 1(4): 76-8. https://doi.org/10.15761/jic.1000122.
12. Morgan A.E., Mooney K.M., Wilkinson S.J., Pickles N.A., Mc Auley M.T. Cholesterol metabolism: a review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res. Rev.* 2016; 27:108-24. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.008.
13. Klimov A. N., Nikul'cheva N. G. The exchange of lipids and lipoproteins and its disorders: a guide for doctors. [Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narushenie: rukovodstvo dlya vrachei]. St.Petersburg: Piter Kom; 1999. (in Russian)
14. Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V., Arabidze G.G., Bubnova M.G., Balakhonova T.V. et al. Diagnostics and correction of lipid metabolism disorders in order to prevent and treat atherosclerosis: Russian recommendations VI revision *Ateroskleroz i dislipidemii*. 2020; 1(38):7–40. DOI: 10.34687/2219-8202. JAD.2020.01.0002. (in Russian)
15. National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-3421. https://doi.org/10.1161/circ.106.25.3143.

16. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>.
17. Borovikov V. P. Statistica. The Art of Analyzing Data on a Computer: For Professionals. St.Petersburg: Piter; 2003. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6_108. (in Russian)
18. Skretteberg P.T., Grytten A.N., Gjertsen K., Grundvold I., Kjeldsen S.E., Erikssen J. et al. Triglycerides-diabetes association in healthy middle-aged men: Modified by physical fitness? A long term follow-up of 1962 Norwegian men in the Oslo Ischemia Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2013;101(2):201-9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.06.001>.
19. Perry I.J., Wannamethee S.G., Walker M.K., Thomson A.G., Whincup P.H., Shaper A.G. Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men. *BMJ*. 1995; 310:560-4. <https://doi.org/10.1136/bmj.310.6979.560>.
20. Tirosh A., Shai I., Bitzur R., Kochba I., Tekes-Manova D., Israeli E. et al. Changes in triglyceride levels over time and risk of type 2 diabetes in young men. *Diabetes Care*. 2008; 31:2032-7. <https://doi.org/10.2337/dc08-0825>.
21. Balkau B., Lange C., Fezeu L., Tichet J., de Lauzon-Guillain B., Czernichow S. et al. Predicting diabetes: clinical, biological, and genetic approaches: data from the epidemiological study on the insulin resistance syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. 2008; 31:2056-61. <https://doi.org/10.2337/dc08-0368>.
22. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997; 46: 3-10. <https://doi.org/10.2337/diab.46.1.3>.
23. Mostaza J.M., Vega G.L., Snell P., Grundy S.M. Abnormal metabolism of free fatty acids in hypertriglyceridaemic men: apparent insulin resistance of adipose tissue. *J. Intern Med*. 1998; 243(4): 265-74. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1998.00298.x>.
24. Ference B.A., Ginsberg H.N., Graham I., Ray K.K., Packard C.J., Bruckert E. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*. 2017; 38(32): 2459-72. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx144>.
25. Duan L.P., Wang H. H., Ohashi A., Wang D.Q. Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2006; 290 (2): 269-76. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00172.2005>.
26. Abbott D., Garrison R.J., Wilson P.W., Epstein F.H., Castelli W.P., Feinleib M. et al. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. *The Framingham study. Arteriosclerosis*. 1983; 3: 260-72. <https://doi.org/10.1161/01.atv.3.3.260>.
27. Yang W., Xiao J., Yang Z., Ji L., Jia W., Weng J. et al. Serum lipids and lipoproteins in chinese men and women. *Circulation*. 2012; 125(18): 2212-21. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.065904>.
28. D'Agostino R. B., Pencina M. J., Massaro J. M. Cardiovascular disease risk assessment: insights from Framingham. *Glob. Heart*. 2013; 8(1):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2013.01.001>.
29. Kelley D.E., Williams K. V., Price J.C., McKolanis T.M., Goodpaster B.H., Thaete F.L. Plasma fatty acids, adiposity, and variance of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2011;86(11):5412-9. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.8027>.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Смирнова В.И.¹, Лапин С.В.¹, Лебедев Д.Г.^{2,3}, Эмануэль В.Л.¹, Малышкин К.А.¹, Блинова Т.В.¹

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА СОСТАВА МОЧЕВЫХ КОНКРЕМЕНТОВ

¹Научно-методический центр по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

²ГБУЗ «Александровская больница», 193312, Санкт-Петербург, Россия;

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Целью работы являлась валидация метода анализа состава мочевых конкрементов с помощью инфракрасной (ИК)-спектроскопии Фурье путем исследования модельных смесей солей. Исследование проводили с помощью метода ИК-Фурье спектрометром ALPHA-P с программным обеспечением OPUS (Bruker, Германия). Были использованы образцы чистых химических солей производства фирмы Sigma-Aldrich (США). Из них были приготовлены смеси 10/90, 50/50 и 90/10. Порошки из мочевого конкремента разной степени дисперсности исследованы для оценки воспроизводимости измерений. ИК-анализ чистых модельных солей показал, что при исследовании соли цистина CV(%) составил 0,79%, карбоната кальция – 0,92%, урата натрия – 0,97%, оксалата кальция моногидрата – 4,94%, ортофосфата аммония магния гидрата – 5,59%.

Анализ воспроизводимости измерений сложных смесей выявил, что при содержании 9 частей оксалата кальция к одной части примесей CV(%) составил 5,70%, при пропорции 50/50 – 21,57%, 10/90 – 5,70%. Для смесей мочевой кислоты 90/10 – 2,20%, при 50/50 – 10,09%, 10/90 – 31,94%. Для кальция при 90/10 – 9,02%, при 50/50 – 11,98%, 10/90 – 24,70%. Навески солей с диаметром частиц более 0,8 мм обеспечивают воспроизводимость с CV 11,48%, диаметром 0,2–0,8 мм – 5,35%, менее 0,1 мм – 2,28%. При применении метода ИК-спектроскопии была показана высокая воспроизводимость для чистых солей с CV, не превышающим, 5,59%, однако сравнительно низкая при анализе конкрементов смешанного состава, ввиду увеличения CV при определении долей примесей. Особое внимание лаборатории должны уделять подготовке образца, а именно обеспечить дисперсность измеряемого образца менее 0,1 мм и его гомогенность.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия Фурье; спектрометр ALPHA-P; химический состав конкремента; мочекаменная болезнь.

Для цитирования: Смирнова В.И., Лапин С.В., Лебедев Д.Г., Эмануэль В.Л., Малышкин К.А., Блинова Т.В. Валидация метода инфракрасной спектроскопии для анализа состава мочевых конкрементов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (12): 733-738. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-733-738

Для корреспонденции: Смирнова Вероника Игоревна, биолог лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний; e-mail: nika_pion@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 12.04.2021

Принята к печати 26.05.2021

Опубликовано 22.12.2021

Smirnova V.I.¹, Lapin S.V.¹, Lebedev D.G.^{2,3}, Emanuel V.L.¹, Malyshkin K.A.¹, Blinova T.V.¹

VALIDATION OF THE INFRARED SPECTROSCOPY METHOD FOR ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF URINE CONCRETES

¹Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 197022, Saint-Petersburg, Russian Federation;

²Alexander Hospital, 193312, Saint-Petersburg, Russian Federation;

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, Saint-Petersburg, Russian Federation

The aim of this study was to validate the method for analyzing the composition of calculus using infrared (IR) spectroscopy by studying model mixtures of salts.

Study was made with an ALPHA-P IR Fourier spectrometer with OPUS software (Bruker, Germany). The samples of pure chemical salts manufactured by Sigma-Aldrich USA were used to validate the method. Salt mixtures were prepared in ratios of 10/90, 50/50 and 90/10. To assess the effect of the fraction size on the calculus component results, were used calculi of patients with urolithiasis. For each mixture were used 10 repeated measurements. Analysis of the composition of model salts showed that in the study of pure cystine salt CV(%) was 0,79%, calcium carbonate – 0,92%, sodium urate – 0,97%, calcium oxalate monohydrate – 4,94%, magnesium ammonium phosphate – 5,59%. And the most common components were analyzed in the composition of complex mixtures, including 90%, 50% and 10% of the investigated component. Calcium oxalate monohydrate has CV(%) 5.70% in mixture 9 part of it to one part of impurities, in mixture 50/50 – 21.57% and in 10/90 – 5.70%. For uric acid in 90/10 – 2.20%, in 50/50 – 10.09%, in 10/90 – 31.94%. For calcium carbonate in 90/10 – 9.02%, in 50/50 – 11.98%, in 10/90 – 24.70%. The dispersion analysis showed that the weighed portions of salts with a particle diameter of more than 0.8 mm provide reproducibility with a CV – 11.48%, with a diameter of 0.2–0.8 mm – 5.35%, and finally less than 0.1 mm – 2.28%. The accuracy of the method is high, but the reproducibility of the IR-spectroscopy method is relatively low in the analysis of stones of mixed composition, due to the greater error in the determination of impurities. Laboratories should pay special attention to optimizing sample preparation to ensure particle fineness less than 0.1 mm.

Key words: infrared (IR)-Fourier spectroscopy; ALPHA-P spectrometer; chemical composition of calculus; urolithiasis.

For citation: Smirnova V.I., Lapin S.V., Lebedev D.G., Emanuel V.L., Malyshkin K.A., Blinova T.V. Validation of the infrared spectroscopy method for analysis of the composition of urine concretes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 733-738 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-733-738

For correspondence: Smirnova V.I., biologist; e-mail: nika_pion@mail.ru

Information about authors:

Smirnova V.I., <https://orcid.org/0000-0001-5783-0572>;
Lapin S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>;
Lebedev D.G., <https://orcid.org/0000-0003-3065-4657>;
Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>;
Malyshkin K.A., <https://orcid.org/0000-0002-9658-8712>;
Blinova T.V., <https://orcid.org/0000-0003-4896-3319>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.04.2021

Accepted 26.05.2021

Published 22.12.2021

Введение. Оценка состава мочевого конкремента является неотъемлемой частью в процессе выбора оптимальной лечебной тактики и метафилактики мочекаменной болезни (МКБ) [3, 4]. Мочевые конкременты являются результатом ряда обменных нарушений, среди которых главная роль принадлежит определенным метаболическим и физико-химическим факторам нарушения коллоидной устойчивости процесса мочеобразования, известным как факторы риска МКБ [1]. Эти факторы проявляют себя в виде нарушенной экскреции с мочой комплекса кристаллообразующих веществ и ионов, сдвигов pH мочи и низкого диуреза [2]. Как правило, около 95% состава мочевого конкремента представлено кристаллическим, а остальные 5% органическим компонентом. Процессы образования камней в почках многообразны, поскольку включают ряд последовательных процессов, в том числе кристаллизацию, рост кристаллов, агрегацию и их адгезию к эпителиальным клеткам, а также кристаллическую инвазию через внеклеточный матрикс в почечный интерстиций. Некоторые кристаллы после образования становятся более крупными вследствие роста либо путем агрегации [9]. В результате формируются конкременты смешанного типа. Точность анализа такого рода уrolитов во многом определяется подготовкой образца перед тестированием.

Среди методов анализа кристаллических составляющих, такие, как порошковая рентгеновская дифракция, метод энергодисперсионного рентгеновского излучения, сканирующая электронная микроскопия [5], Рамановская спектроскопия [6], ИК-спектроскопия Фурье и другие [7], Европейские клинические рекомендации отдают предпочтение ИК-спектроскопии Фурье или порошковой рентгеновской дифракции [8]. За счет сравнительной простоты метода и скорости проведения исследования ИК-спектроскопия является методом выбора для клинической лабораторной диагностики.

Целью работы являлась валидация метода анализа состава конкремента с помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии путем анализа модельных солей и их смесей.

Материал и методы. Для химического анализа уrolитов мы использовали метод ИК-спектроскопии, основанный на явлении поглощения химическими веществами инфракрасного излучения с одновременным возбуждением колебаний молекул. В случае использования этого метода, пробоподготовкой является преобразование конкремента в однородный мелкодисперсный порошок. Результаты получали с помощью системы для анализа почечных камней со специализированным про-

граммным обеспечением OPUS – ИК-Фурье спектрометром ALPHA-P (СИ ДЕ.С.37.003.А №504481 Ростехрегулирования) производства Bruker (Германия). Анализатор почечных камней ALPHA-P использует технологию нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), что позволяет измерить очень маленькие образцы, достаточно 1 мг вещества. При пропускании инфракрасного излучения через вещество происходит возбуждение колебательных движений молекул или их отдельных фрагментов с дальнейшим считыванием поглощенного спектра и сопоставлением его с базой данных. Базой данных является обширная спектральная библиотека для идентификации почечных камней, содержащая более 5000 образцов спектров. Библиотека связана напрямую с программным обеспечением OPUS, с помощью которой производился полный анализ конкремента.

В качестве образцов мы использовали чистые химические вещества в виде кристаллических солей фирмы Sigma-Aldrich (США), входящие в состав почечных камней, представленные в табл.1. По химическому составу кристаллические соли и минеральные компоненты конкремента являются одним и тем же веществом с разным номенклатурным наименованием.

Измерения проводили на образцах двух типов: навески солей анализировались аналогично монокомпонентным конкрементам, а смеси солей в разных пропорциях использовались как модель смешанных конкрементов.

Модельные смеси, имитирующие уrolиты были сформированы гравиметрическим методом в ФГУП «ВНИИ метрологии им. Д.М. Менделеева» в «отделе Государственных эталонов и научных исследований в области органического и неорганического анализа» (рук. отдела д.х.н. А.И. Крылов), аккредитованном на соответствие требованиям ГОСТ PISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» и ГОСТ ISO Guide34-2014 «Общие требования к компетентности изготовителей стандартных образцов».

Для оценки аналитических параметров метода ИК-спектроскопии в анализе мочевых конкрементов были проанализированы результаты с точки зрения воспроизводимости метода. Воспроизводимость была вычислена при измерении образцов солей полученных в 10 повторяющихся измерениях, позволяющий рассчитать коэффициенту вариации метода (CV), а также оценить влияние интерферирующих субстанций.

Также мы проанализировали 5 конкрементов разного химического состава, полученных от пациентов с МКБ, и сравнили результаты одного и того же конкремента с

Таблица 1

Наименования и формулы кристаллических солей

Наименование химических веществ	Химическая формула соли	Минеральный компонент конкремента
Оксалат кальция моногидрат (х.ч.)	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$	Вевеллит
Мочевая кислота (х.ч.)	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$	Мочевая кислота безводная
Натриевая соль мочевой кислоты (х.ч.)	$\text{NaC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$	Урат натрия
Карбонат кальция (х.ч.)	CaCO_3	Кальцит
Гидроксипатит (х.ч.)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Карбонатапатит
Ортофосфат аммония магния гидрат (х.ч.)	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$	Струвит
Цистин (х.ч.)	$[\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}]_2$	Цистин

Примечание. х.ч. – химически чистые реактивы (содержание основного компонента более 99,995-99,997 %).

Таблица 2

Воспроизводимость измерений чистых кристаллических солей

Наименование коммерческой соли	Результат исследования, $n=10$ (min-max%)	Среднее значение, %	SD	CV, %
Оксалат кальция моногидрат (вевеллит)	Вевеллит (85-96%)	93,8	4,60	4,94
Ортофосфат аммония магния гидрат (струвит)	Струвит (80-95%)	89,5	5,50	5,59
Цистин	Цистин (95-97%)	96,6	0,84	0,79
Натриевая соль мочевой кислоты (урат натрия)	Урат натрия (90-92%)	90,6	0,97	0,97
Карбонат кальция (кальцит)	Кальцит (95-97%)	95,6	0,97	0,92

Примечание. Здесь и в табл.3: SD-стандартное отклонение, n – количество проводимых измерений.

различной дисперсностью измельченных частиц между собой. С помощью агатовой ступки каждый образец отдельно измельчали и просеивали через лабораторное сито с размером ячейки 0,1 мм и 0,8 мм. Таким образом, мы получили по три части гомогенной смеси у каждого образца с известным размером частиц конкремента и поочередно исследовали состав этих частей.

Все статистические расчеты проводились с использованием программы Microsoft Excel. Оценку метода для анализа конкремента ИК-спектроскопией с помощью модельных солей и их смесей проводили согласно значениям, представленным в приказе Минздрава Российской Федерации от 26.05.2003 г. № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

Результаты. Проводили анализ солей методом ИК-спектроскопии. В табл. 2 и 3 представлены усредненные результаты 10 повторяющихся измерений по солям без примесей и смешанных солей.

При измерении химических веществ без примесей в повторяющихся измерениях, мы получили расхождения результатов по процентному составу, так в случае измерения оксалата кальция моногидрат от 85% до 96%, а наиболее точный результат был получен при измерении цистина и карбоната кальция от 95 до 97%. Стоит отметить, что в случае выявления кальция в качестве примесей был обнаружен арагонит, по химической формуле являющийся тем же веществом, что и кальцит, однако отличающийся кристаллической решеткой, но для диагностики МКБ и разработки тактики лечения полученное расхождение не имеет драматического значения.

В случае измерения моделей из смешанных солей в известной пропорции результаты отличались в зависимости от исходного размера кристаллических частиц каждой соли. Значения с наименьшим коэффициентом вариации были получены у смесей солей, характеризующиеся похожим размером кристаллов, так как при пробоподготовке, а именно измельчении смеси, гомогенизация проходила равномерно, что и давало наиболее точный результат. При смешивании солей с существенными отличиями исходной дисперсности наблюдался различный разброс значений, так в случае смеси мочевой кислоты и оксалата кальция моногидрата в пропорции 90/10, был получен результат, мочевая кислота (85-90%) и дигидрат мочевой кислоты (10-15%). Таким образом, вевеллит в малых количествах в полученной смеси соли не был выявлен, это можно объяснить тем, что соли мочевой кислоты исходно обладают в значительной степени более мелкой дисперсностью относительно других солей.

То есть наблюдался больший коэффициент вариации в случае определения примесей в составах смесей солей по сравнению с коэффициентом вариации, при определении основного компонента.

При анализе конкрементов, полученных от пациентов с МКБ, использовали различную дисперсность измельченного уrolита (табл. 4). В случае анализа смесей с диаметром частиц меньше и равный 0,1 мм выявлялось наибольшее количество компонентов и при повторном исследовании результат получали с минимальным расхождением. В случае измерения смесей с диаметром частиц от 0,2 мм до 0,8 мм результаты в большей степени отличались друг от друга при повторном исследовании. Рассмотрев смеси с диаметром частиц от 0,8 мм и больше, мы получили результаты

BIOCHEMISTRY

со значимыми расхождениями относительно исходного состава. Также показатель «качество совпадений» в библиотеке спектров у таких образцов был ниже, чем у более мелкодисперсных смесей, что говорит о менее точном результате.

Обсуждение. Результаты, полученные с помощью метода ИК-спектроскопии доказывают, что данный метод является оптимальным для анализа состава конкремента, так как программное обеспечение обращается к оригинальной спектральной библиотеке и на ее основе формирует результат исследования.

Библиотеку спектров создавали, измеряя различные вещества в смесях, спрессованные с бромидом калия (в пропорции 0,5-2%) [10].

Однако сейчас используют прямое измерение веществ без смешивания с бромидом калия, поэтому данный метод нуждается в стандартизации и адаптации для клинического использования.

Для создания библиотеки спектров группа ученых из Франции проанализировала более 70 000 мочевых конкрементов в течение 10 лет. Идентификацию моновеществ проводили после анализа более 20 000 уролитов,

Таблица 3

Воспроизводимость измерений основного компонента в составе модельной смешанной соли

Основной компонент в составе смеси	Заданная пропорция солей в смеси	Результаты исследования, n=10 (min-max%)	Среднее значение доли исследуемой соли, %	SD	CV, %
Оксалат кальция моногидрат	Оксалат кальция моногидрат (50%) и гидроксиапатит (50%)	Вевеллит (40-70%), карбонатапатит (40-60%), веделлит (10-15%)	56,0	13,29	21,57
	Оксалат кальция моногидрат (90%) и гидроксиапатит (10%)	Вевеллит (70-80%), карбонатапатит (10%), веделлит (10-20%)	77,0	4,83	5,70
	Оксалат кальция моногидрат (10%) и гидроксиапатит (90%)	Карбонатапатит (60-80%), вевеллит (10-20%), веделлит (10-20%)	14,0	8,4	5,70
Мочевая кислота	Мочевая кислота (50%) и оксалат кальция моногидрат (50%)	Мочевая кислота (45%-60%), вевеллит (40-55%)	57,0	6,32	10,09
	Мочевая кислота (90%) и оксалат кальция моногидрат (10%)	Мочевая кислота (85%-90%), дигидрат мочевиной кислоты (10-15%)	86,0	2,12	2,20
	Мочевая кислота (10%) и оксалат кальция моногидрат (90%)	Вевеллит (80-90%), мочевая кислота (10%), веделлит (10%)	9,0	3,16	31,94
Карбонат кальция (кальцит)	Кальцит (50%) и гидроксиапатит (50%)	Кальцит (45-50%), карбонатапатит (50-55%)	48,0	6,32	11,98
	Кальцит (90%) и гидроксиапатит (10%)	Кальцит (70-90%), карбонатапатит (10-30%)	83,0	8,23	9,02
	Кальцит (10%) и гидроксиапатит (90%)	Кальцит (30-50%), карбонатапатит (50-70%)	38,0	10,33	24,70

Таблица 4

Результаты анализа исследуемого конкремента в зависимости от диаметра частиц конкремента

Состав исследуемого конкремента	Состав конкремента с диаметром частиц $\geq 0,8$ мм	Состав конкремента с диаметром частиц 0,2 - 0,8 мм	Состав конкремента с диаметром частиц $\leq 0,1$ мм
Струвит, брушит и вевеллит (70%/20%/10%)	Аморфный фосфат кальция, струвит и урат аммония (40%/40%/20%)	Струвит, карбонатапатит и урат аммония (65%/30%/5%)	Струвит, брушит и вевеллит (70%/20%/10%)
Вевеллит, карбонатапатит и октакальция фосфат пентагидрат (65%/25%/10%)	Вевеллит, карбонатапатит и белок (33%/33%/33%)	Октакальция фосфатпентагидрат, карбонатапатит и вевеллит (40%/30%/30%)	Вевеллит, карбонатапатит и октакальция фосфат пентагидрат (60%/30%/10%)
Мочевая кислота безводная и дигидрат мочевиной кислоты (85%/15%)	Мочевая кислота безводная, урат аммония и белок (80%/10%/10%)	Мочевая кислота безводная и урат натрия (75%/25%)	Мочевая кислота безводная и дигидрат мочевиной кислоты (85%/15%)
Брушит, вевеллит и карбонатапатит (70%/20%/10%)	Карбонатапатит, вевеллит и урат аммония (70%/20%/10%)	Брушит, карбонатапатит и белок (75%/20%/5%)	Брушит, карбонатапатит и вевеллит (70%/20%/10%)
Струвит, карбонатапатит и вевеллит (70%/25%/5%)	Кальцит, карбонатапатит и аморфный фосфат кальция (33%/33%/33%)	Струвит, карбонатапатит и ньюберит (40%/30%/30%)	Струвит, карбонатапатит и урат аммония (65%/25%/10%)

некоторые химические вещества было затруднительно измерить, например, дигидрат мочевой кислоты и оксалат кальция тригидрат из-за своей термической нестабильности. После анализа 50 000 конкрементов были получены 195 спектров смесей из двух компонентов и 286 спектров смесей из трех компонентов. Для создания библиотеки смесей из трех компонентов были подготовлены следующие пропорции: 33/33/33, 40/30/30, 40/40/20, 50/30/20, 50/40/10, 60/20/20, 70/20/10 и 80/10/10 и следующие компоненты: оксалат кальция моногидрат, оксалат кальция дигидрат, карбонатапатит, кальцит, брушит, струвит, витлокит, аморфный фосфат кальция, октакальция фосфат пентагидрат, мочева кислота безводная, дигидрат мочевой кислоты, урат аммония, урат натрия, цистин, протеины, триглицериды и опал. Окончательная версия библиотеки смесей содержит 1059 и 4565 оцифрованных спектров для смесей из двух и трех компонентов, соответственно [10]. Полученная расширенная библиотека спектров позволяет выявлять в том числе минорные компоненты, содержащиеся в незначительной доле, что имеет большое значение в понимании различий биохимических нарушений или клинических патологий в каждом случае.

Долгое время для анализа конкремента было принято использовать различные методики, включая рентгенофазовый анализ [11,12], однако последние годы, лидирующие позиции стал занимать метод ИК-спектроскопии. Для выполнения исследования данным методом требуется малое количество исследуемого вещества, что позволяет проводить анализ конкремента даже при самом незначительном содержании образца. Так, исследование, проведенное в 2018 г. группой ученых из Пакистанского университета показало, что при сравнении химического метода с ИК-спектроскопией для анализа состава уролитов в популяции, более информативные результаты были получены методом ИК-спектроскопии. В данном исследовании было проанализировано более 400 конкрементов, расхождения были получены по 77 конкрементам, при этом более широкий спектр компонентов каждого уролита выявили с помощью метода ИК-спектроскопии [13].

На первом этапе исследования мы измеряли чистые соли без примесей, затем смешивали их в разных пропорциях, согласно возможному составу различных смешанных уролитов. Исследовалось содержание целевого компонента, под которым понимали наиболее часто встречающиеся на практике компоненты, а именно: оксалат кальция, мочевую кислоту и карбонат кальция.

Для качественного анализа конкремента не менее важен этап пробоподготовки, который состоит в том, чтобы преобразовать мочевую кислоту в гомогенный порошок, для выявления максимального количества химических веществ в образце. После измельчения конкремента мы рекомендуем использовать лабораторное сито с диаметром ячейки 0,1 мм. Процедура пробоподготовки имеет большое значение, так как мочевые камни часто являются неоднородными по структуре, это обусловлено характерным эпитаксиальным ростом конкремента, когда происходит формирование одного слоя кристалла поверх слоя другого [14]. В таких случаях можно наблюдать различные минеральные компоненты на разломах конкрементов. Кроме того, в случае многослойных материалов спектрально анализируется только первый слой, ввиду особенностей анализа, производимого прибором ALPHA-P. Все указанные выше факты в совокупности

говорят о том, что особенно важно исследуемый конкремент растереть до мельчайших частиц, аккуратно перемешивать и затем полученный порошок исследовать методом ИК-спектроскопии. Таким образом, валидация метода требует стандартизации пробоподготовки и преаналитического этапа, что позволит получать достоверный результат.

Воспроизводимость метода ИК-спектроскопии зависит от дисперсности обследуемого образца и его доли в случае измерения смесей. Для минорных компонентов в смесях коэффициент вариации в основном варьировался от 2,20% до 11,98% и не превышал 31,94%.

Соответственно, современные методы анализа химического состава конкремента позволяют получить более точный результат, который оказывает большое влияние на выбор дальнейшего лечения пациентов с МКБ.

Выводы:

Метод обладает высокой воспроизводимостью при измерении чистых солей.

В смешанных солях «мажорный» компонент, составляющий половину и более состава конкремента, определяется с минимальным коэффициентом вариации, однако, по мере снижения доли компонента его значение увеличивается.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 7-10, 13 см. REFERENCES)

1. Голощапов Е.Т., Эмануэль В.Л. Биофизические технологии в профилактике мочевого камнеобразования. *Урологические ведомости*. 2016; 4: 48–50.
2. Голованов С.А., Сивков А.В., Дрозжева В.В., Анохин Н.В. Метаболические факторы риска и формирование мочевых камней. Исследование I: влияние кальцийурии и урикурии. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017; 1: 52–7.
3. Лебедев Д.Г., Розенгауз Е.В., Лапин С.В., Бурлака О.О., Хвастовский В.М., Гелиг В.А. Возможности двухэнергетической спиральной компьютерной томографии в анализе химического состава конкремента при мочекаменной болезни. *Лучевая диагностика и терапия*. 2017; 3(8): 110–1.
5. Руднева А.А., Гойхман А.Ю., Лятун И.И., Козлов А.В. Опыт использования сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного анализа для изучения состава мочевых камней. *Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта*. 2015; (1): 117–22.
6. Кабалык М.А., Дубиков А.И. Способ обнаружения микрокристаллов в суставном хряще и других биологических тканях. Патент РФ № RU 2510504 C2; 2014.
11. Хасигов А.В., Коган М.И., Белоусов И.И. Сравнительный анализ химического состава коралловидных конкрементов в регионах юга России. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2011; 5(128): 168–71.
12. Капанадзе Л.Б., Серова Н.С., Руденко В.И., Александрова К.А., Новиков И.А. Результаты применения двухэнергетической компьютерной томографии в диагностике мочекаменной болезни. *REJR*. 2018; 8(2): 94–104. DOI:10.21569/2222-7415-2018-8-2-94-104.
14. Голованов С.А., Андриухин М.И., Поликарпова А.М., Сивков А.В., Меринов Д.С., Просянных М.Ю. Многоточечный анализ минерального состава коралловидных камней в изучении особенностей их формирования. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017; 3: 52–7.

REFERENCES

1. Goloshchapov E.T., Emanuel V. L. Biophysical technologies in prevention of urine stone formation. *Urologicheskie Vedomosti*. 2016; 4: 48–50. (in Russian)
2. Golovanov S.A., Sivkov A.V., Drozhzheva V.V., Anokhin N.V. Metabolic risk factors and urinary calculi formation. Study I: Ef-

- fects of Calciuria and Uricuria. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2017; 1: 52–7. (in Russian)
3. Lebedev D. G., Rozengauz E. V., Lapin S. V., Burlaka O. O., Hvas-tovskiy V. M., Gelig V. A. The advantages of dual-energy computed tomography to determine the composition of kidney stones in pa-tients with urolithiasis. *Luchevaya diagnostika i terapiya*. 2017; 3 (8):110–1. ISSN: 2079-5343. (in Russian)
4. Monica S. C. Morgan, Margaret S. Pearle Medical management of renal stones. *BMJ*. 2016; 352: i52.
5. Rudneva A.A., Goikhman A.Yu., Lyatun I.I., Kozlov A.V. Experience in using scanning electron microscopy and energy dispersive analy-sis to study the composition of urinary stones. *Vestnik Baltiyskogo Federal'nogo Universiteta I. Kanta*. 2015; 1: 117–22. (in Russian)
6. Kabalyk M. A., Dubikov A. I. Method for detecting microcrystals in articular cartilage and other biological tissues. Patent RF № RU 2510504 C2; 2014. (in Russian)
7. Kumar N., Singh P., Kumar S. Physical, X-ray diffraction and scan-ning electron microscopic studies of uroliths. *Indian Journal of Bio-chemistry and Biophysics*. 2006; 43: 226–32.
8. Türk C., Skolarikos A., Neisius A., Petrik A., Seitz C., Thomas K. et al. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2021. ISBN 978-94-92671-13-4.
9. Visith Thongboonkerd Proteomics of Crystal – Cell Interactions: A Model for Kidney Stone Research. *Cells*. 2019; 8(9):1076.
10. Estepa L.M., Levillain P., Lacour B., Daudon M. Infrared analysis of urinary stones: A trial of automated identification. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999; 37(11–12): 1043–52.
11. Khasigov A.V., Kogan M.I., Belousov I.I.. Comparative analysis of the chemical composition of staghorn calculus in the south region of Russia. *Kubanskiy nauchnyi meditsinskiy vestnik*. 2011; 5(128): 168–71. (in Russian)
12. Kapanadze L.B., Serova N.S., Rudenko V.I., Aleksandrova K.A., Novikov I.A. Results of application of dual-energy computed to-mography in the diagnosis of urolithiasis. *REJR*. 2018; 8(2): 94-104. DOI:10.21569/2222-7415-2018-8-2-94-104. (in Russian)
13. Khan A.H., Imran S., Talati J., Jafri L. Fourier transform infrared spectroscopy for analysis of kidney stones. *Investig. Clin. Urol*. 2018; 59(1):32–7.
14. Golovanov S.A., Andryukhin M.I., Polikarpova A.M., Sivkov A.V., Merinov D.S., Prosiannikov M.U. Multipoint analysis of the coral calculus mineral composition in the study of the peculiarities of their formation. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2017; 3: 52–7. (in Russian)

ГЕМАТОЛОГИЯ

© ГАБРИЛЬЧАК А.И., 2021

Габрильчак А.И.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЦИТОВ И МЕГАКАРИОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЕ

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

Изучены показатели мегакариоцитарной формулы и индексов тромбоцитов периферической крови у 237 человек с диагнозами идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) и миелодиспластический синдром (МДС). Проведен корреляционный анализ между субпопуляциями мегакариоцитов и показателями тромбоцитов. Пороговые значения для MPV, PCT и PDW определяли ROC-анализом с построением ROC-кривой, расчётом площади под кривой (AUC) и порога отсечения CutOff. Полученные значения позволяют проводить дифференциальный диагноз между ИТП и МДС по тромбоцитарным показателям периферической крови без исследования костного мозга.

Ключевые слова: идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; мегакариоциты; средний объем тромбоцита; тромбокрит; ширина распределения тромбоцитов; миелодиспластический синдром.

Для цитирования: Габрильчак А.И. Диагностическое значение показателей тромбоцитов и мегакариоцитарной формулы костного мозга при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (12): 739-746. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-739-746>

Для корреспонденции: Габрильчак Анастасия Ивановна, ассистент каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.07.2021

Принята к печати 01.09.2021

Опубликовано 22.12.2021

Gabrilchak A.I.

DIAGNOSTIC VALUE OF PLATELET PARAMETERS AND MEGAKARYOCYTE FORMULA OF BONE MARROW IN IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

The parameters of the megakaryocyte formula and peripheral blood platelet indices were studied in 237 people with diagnoses of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and myelodysplastic syndrome (MDS). A correlation analysis was performed between megakaryocyte subpopulations and platelet counts. The threshold values for MPV, PCT and PDW were determined by ROC analysis with the construction of the ROC curve, the calculation of the area under the curve (AUC) and the cutoff threshold. The obtained values make it possible to make a differential diagnosis between ITP and MDS by platelet parameters of peripheral blood without examining the bone marrow.

Key words: idiopathic thrombocytopenic purpura; megakaryocyte; mean platelet volume; plateletcrit; platelet distribution width; myelodysplastic syndrome.

For citation: Gabrielchak A.I. Diagnostic value of platelet parameters and megakaryocyte formula of bone marrow in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 739-746 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-739-746>

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

Information about author:

Gabrilchak A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2474-3127>.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.07.2021

Accepted 01.09.2021

Published 00.12.2021

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – первичная иммунная тромбоцитопения – это аутоиммунное заболевание, которое обусловлено выработкой антител к структурам мембраны тромбоцитов и/или мегакариоцитов, что приводит к повышенному распаду тромбоцитов и характеризуется изолированной тромбоцитопенией ниже $100,0 \times 10^9/\text{л}$ [1]. Заболевание обычно проявляется геморрагическим синдромом в виде петехиальной сыпи и экхимозов на коже и на поверхности слизистых оболочек, но может проявляться в виде серьезного желудочно-кишечного или носового кровотечения вплоть до жизнеугрожающих субарахноидальных кровоизлияний. До сих пор отсутствуют выработанные критерии ИТП, что делает это заболевание «диагнозом исключения» и диктует необходимость проведения комплексного обследования, с целью исключения других причин тромбоцитопении [2].

Тест на антитела к тромбоцитам не является специфическим, так как отсутствие антител к тромбоцитам не исключает ИТП, в тоже время они могут быть обнаружены у пациентов с заболеваниями печени или другими состояниями, не связанными с ИТП [3]. Изолированная тромбоцитопения также может быть характерным проявлением у 5-10% пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС) [4] или апластической анемией. Таким образом, для дифференциальной диагностики тромбоцитопении важнейшим оказывается исследование костного мозга.

Морфологическая картина костного мозга при ИТП ограничивается изменениями мегакариоцитарного ростка, а именно, гиперплазией мегакариоцитов (МКЦ), большинство из которых составляют базофильные формы, хотя в некоторых случаях мегакариоцитарный росток остается без изменений, как все показатели миелограммы в целом. В нормальном костном мозге мегакариоциты вытягивают длинные нити, называемые протромбоцитами, которые выступают через эндотелий сосудов в просвет синусоиды и высвобождают тромбоциты [5]. Сами протромбоциты являются выростами цитоплазмы мегакариоцита, мембраны которых формируются из системы демаркационных мембран. Существует прямая взаимосвязь между протяженностью системы демаркационных мембран, ветвлением протромбоцитов, зрелостью, а также уровнем полиплоидизации мегакариоцита и количеством тромбоцитов, образованных на один мегакариоцит [6]. При ИТП фрагментация цитоплазмы мегакариоцитов и образование протромбоцитов значительно снижаются, что выражается в снижении количества пластинкообразующих форм мегакариоцитов, свидетельствующих о нарушении процесса тромбоцитообразования.

При МДС мегакариоцитарный росток подвергается диспластическим изменениям, что приводит к появлению микромегакариоцитов, которые демонстрируют наиболее сильную корреляцию с клональными маркерами при МДС, гипоглобулярных форм, мегакариоцитов с множественными отделенными ядрами, диссоциации созревания ядра и цитоплазмы и гипогрануляции мегакариоцитов [7]. Поэтому исследование костного мозга в настоящее время является золотым стандартом для дифференциальной диагностики гипопродуктивных и гипердеструктивных форм тромбоцитопений [8]. Исследование костного мозга при диагностике ИТП имеет ряд своих ограничений. Ввиду инвазивности этого исследования, аспирация костного мозга, а особенно биоп-

сия трепанобиоптата, не может проводиться регулярно. Мегакариопоэтическая активность и динамика тромбопоэза остаются неясными при большинстве ИТП, особенно в некоторых рефрактерных случаях [9]. В то же время, согласно федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ИТП у детей от 2015 г., при изолированной тромбоцитопении и неизменной морфологии лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови выполнение костномозговой пункции не рекомендуется. В этих обстоятельствах неинвазивный и специфический тест, отражающий мегакариопоэтическую активность, был бы неоценим для диагностики, клинического мониторинга и лечения ИТП.

Известно, что увеличение объема тромбоцитов (MPV) может быть связано с повышенной выработкой тромбоцитов, высвобождаемых в кровоток из костного мозга [10]. Среди показателей тромбоцитов известно, что MPV коррелирует как с плоидностью мегакариоцитов, так и с процентом циркулирующих ретикулярных (с повышенным количеством РНК) тромбоцитов [11]. PDW отражает гетерогенность тромбоцитов. Было показано, что MPV и PDW можно использовать для дифференциальной диагностики эссенциальной тромбоцитемии и реактивного тромбоцитоза [10]. Таким образом, показатели тромбоцитов, включая средний объем тромбоцитов (MPV), тромбокрит (PCT) и ширину распределения тромбоцитов (PDW), могут предоставить важную информацию для оценки мегакариопоэтической активности и, вероятно, помочь отличить гипердеструктивную или гипопродуктивную тромбоцитопению.

Цель настоящего исследования – определить возможность оценки мегакариопоэтической активности при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре по индексам тромбоцитов периферической крови.

Материал и методы. Настоящее исследование является ретроспективным, проводилось в период с 2014 по 2021 гг. на базе кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Материалом служили образцы периферической крови и костного мозга 237 человек.

1-я группа – 146 человек с клиническим диагнозом идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (код МКБ-10 D69.3), которые состояли на стационарном лечении в Самарском областном гематологическом центре, возраст от 18 до 90 лет. Во 2-ю группу вошли 71 человек с миелодиспластическим синдромом (код МКБ-10 D46). 3-я группа была выбрана как группа сравнения, в нее вошли 20 человек с диагнозом железодефицитная анемия (код МКБ-10 D50.0) с рефрактерным течением, которым с целью исключения других злокачественных заболеваний была проведена костномозговая пункция. Демографические данные по группам представлены в табл.1. Все пациенты дали письменное информированное согласие на проведение исследования. Данное исследование одобрено этическим комитетом (выписка из протокола № 202 заседания Комитета по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете от 09.10.2019 г.)

Критериями включения для 1-й группы является наличие изолированной тромбоцитопении ниже $100 \times 10^9/\text{л}$ с отсутствием морфологических и функциональных аномалий тромбоцитов после исключения возможных других причин для тромбоцитопении [1]. Критериями включения для группы с МДС, согласно рекоменда-

ям ВОЗ от 2018 г., стали стабильная цитопения в одном или более ростках в периферической крови и дисплазия $\geq 10\%$ от всех клеток в одном или более ростках кроветворения, выявленная при морфологическом исследовании костного мозга [4].

Образцы периферической крови были получены до начала лечения ИТП в пробирки фирмы «VACUTANER» (США) с использованием антикоагулянта ЭДТА. На гематологическом анализаторе Sysmex XT-2000i (Sysmex Corporation, Япония) определялось количество лейкоцитов (WBC), эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), тромбоциты (PLT) и показатели тромбоцитов, включая тромбокрит (PCT), средний объем тромбоцитов (MPV), анизоцитоз тромбоцитов (PDW).

Анализ мегакариопоза. Аспирация костного мозга была выполнена до начала терапии. У всех пациентов все мазки были независимо рассмотрены двумя морфологами. Определяли клеточность костного мозга, лейко-эритробластическое соотношение и дифференциальный подсчет клеток под увеличением в 1000 раз. Количество и морфологические особенности мегакарицитов подсчитывали на 250 полей зрения, что соответствует площади 2,5-3,5 см². Распределение мегакарицитов на различные стадии было основано на размере, долях и структуре хроматина ядра, разной окраске цитоплазмы и характера зернистости [13]. Были выделены следующие стадии: мегакариобласт – клетка размером 8-24 мкм, с гиперхромным ядром с нуклеолами, с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, скудной базофильной цитоплазмой в виде узкого ободка; промегакариоцит – диаметром 20-40 мкм, с более крупным ядром с небольшой тенденцией к полиморфизму, с базофильной беззернистой цитоплазмой, иногда с отростками; базофильный мегакариоцит – размер более 30 мкм, содержащий дольчатое ядро и обильную, но менее интенсивно базофильную цитоплазму; полихроматофильный мегакариоцит – размер более 40-60 мкм, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, большое многолопастное ядро, светло-голубая обильная цитоплазма содержит многочисленные азурофильные гранулы; оксифильный мегакариоцит – клетки диаметром 60-120 мкм, с резко пикнотичным многолопастным ядром, розовой цитоплазмой и обильной азурофильной зернистостью. Поскольку в мазках костного мозга было обнаружено мало мегакариобластов, мы объединили мегакариобласты и промегакариоциты в незрелые мегакариоциты.

Выделяли инволютивные мегакариоциты с разреженным ядром и большой зоной бледно-розовой цитоплазмы; голаядерные и дегенеративные формы (мегакариоциты с гиперсегментацией ядра и вакуолизацией цитоплазмы). Оценивали явление эмпириопозиса – проникновение одной клетки в другую без повреждения. Морфологически исследовали активность мегакариоцитов по количеству пластинкообразующих и пластинкосодержащих форм мегакариоцитов. Определяли мегакариоциты с признаками диспоза (микроформы и формы с гиполобулярным ядром, мегакариоциты с множеством ядер).

Индекс созревания мегакариоцитов определяли как отношение процента мегакариобластов, промегакариоцитов и базофильных мегакариоцитов к проценту полихроматофильных и оксифильных мегакариоцитов.

Статистический анализ. Сравнение показателей крови и костного мозга между тремя группами было

статистически проанализировано с помощью тестов Краскелла-Уоллиса, Манна-Уитни и хи-квадрата из-за ненормального распределения. Все исследуемые группы характеризовались медианными значениями и межквартильными диапозонами. Взаимосвязи показателей тромбоцитов и мегакариоцитарных параметров были проверены с помощью ранговой корреляции Спирмена.

Диагностическую эффективность показателей тромбоцитов определяли ROC-анализом с построением ROC-кривой, расчётом площади под кривой (AUC) и порога отсечения CutOff. Пороговое значение MPV, PCT и PDW для оценки вида тромбоцитопении определяли по значению CutOff. Различия считались статистически значимыми при значении p менее 0,05. Статистическая обработка данных производилась в программе MedCalc версия 20.009.

Результаты. Показатели тромбоцитов периферической крови сравнивали между группами ИТП, МДС и группой сравнения (см. табл. 1). Количество тромбоцитов значительно снижено в группе с ИТП ($p < 0,0001$). В то же время количество тромбоцитов в группе с МДС ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,0001$). Самый низкий уровень PCT был обнаружен в группе ИТП (медиана – 0,07, $p < 0,0001$), а самый высокий в группе сравнения (медиана – 0,27, $p < 0,0001$). Напротив, средний объем тромбоцита был значительно выше в группе ИТП, составляя 11,85 фл ($p < 0,001$), что превышает возрастную норму (7,2-11,7 фл) [14]. В группе МДС значения MPV находились в референсном диапазоне (медиана – 9,35 фл), но занимают достоверно более высокое значение, чем в группе сравнения (8,1 фл, $p < 0,001$). PDW отражает анизоцитоз тромбоцитов и в норме не превышает 16,0%. Самое высокое значение PDW в группе с ИТП (22,3%, $p < 0,001$), в группе с МДС уровень ниже группы сравнения.

Морфологическая оценка костного мозга выявила значительное увеличение количества мегакариоцитов в группе ИТП ($p < 0,001$), тогда как группа с МДС показала схожие значения с группой сравнения. Что касается дифференцировки мегакариоцитов, то количество мегакариобластов и промегакариоцитов достоверно выше в группе ИТП ($p < 0,05$). Самое большое количество базофильных мегакариоцитов наблюдается в группе ИТП, составляя медиану 9,0%, что достоверно выше, чем в группах с МДС и группе сравнения ($p < 0,01$). В отличие от этого, процентная доля полихроматофильных и оксифильных мегакариоцитов значительно ниже в группе с ИТП, по сравнению с группой сравнения и МДС ($p < 0,0001$). Таким образом, в группе ИТП наблюдается задержка созревания мегакариоцитарного ростка на полихроматофильных формах, в то время как в группе с МДС созревание мегакариоцитов не изменяется. Максимальное количество «голаядерных» форм мегакариоцитов составило в группе ИТП (медиана – 21,0%), тогда как в других группах они единичны ($p < 0,0001$).

Наблюдалось значительное снижение количества пластинкообразующих МКЦ в группе ИТП (медиана – 8,0%) и МДС (медиана – 13,5%, $p < 0,0001$) при сопоставлении с группой сравнения, при этом в группах с ИТП такая ситуация сохраняется и для пластинкосодержащих МКЦ, а при миелодиспластическом синдроме имеет обратную тенденцию, превышая значения контрольной группы ($p < 0,0001$). Инволютивные формы МКЦ и явление эмпириопозиса единичны во всех группах, кроме группы ИТП ($p < 0,05$), для дегенератив-

Т а б л и ц а 1

Показатели периферической крови и костного мозга у пациентов с ИТП и МДС

Показатели	Взрослые ИТП (n=146) Ме [25%, 75%]	МДС (n=71) Ме [25%, 75%]	Группа сравнения (n=20) Ме [25%, 75%]	Отличие, p
Возраст, годы	56 [42-66]	68,5 [60,0-77,0]	56 [40-65]	
Соотношение мужчины/женщины	46/100	47/24	10/10	
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9/\text{л}$	7,50* [5,52-10,28]	3,62** [1,69-5,70]	6,70 [4,70-9,10]	< 0,0001
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}/\text{л}$	4,79* [4,22-5,25]	2,83 [2,34-3,73]	3,82*** [3,12-4,19]	< 0,0001
Гемоглобин (HGB), г/л	135,67* [125,0-147,0]	91 [84-96]	76,00*** [61,90-87,00]	< 0,0001
Тромбоциты (PLT), $\times 10^9/\text{л}$	24,50* [12,00-62,25]	113** [65,0-161,0]	304,00*** [198,0-442,0]	< 0,0001
Тромбокрит (PCT), %	0,07* [0,03-0,11]	0,12** [0,08-0,16]	0,27*** [0,20-0,32]	< 0,0001
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	11,85* [8,94-13,98]	9,35 [6,48-10,00]	8,10*** [6,78-9,50]	< 0,0001
Анизоцитоз тромбоцитов (PDW), %	22,30* [20,80-23,70]	14,9 [12,5-20,73]	18,40*** [11,10-19,20]	< 0,0001
Всего мегакариоцитов на 250 полей зрения	37,00* [17,00-61,00]	20,00 [7,0-30,0]	21,00*** [10,00-33,00]	< 0,0001
Незрелые мегакариоциты, %	2,00* [0,00-5,00]	0,50 [0,0-2,00]	1,00 [0,25-2,00]	0,0057
Мегакариоциты базофильные, %	9,00* [5,00-18,50]	3,0 [0,0-12,00]	6,00*** [2,00-8,00]	< 0,0001
Мегакариоциты полихроматофильные, %	40,00* [32,50-48,00]	58,00 [50,0-70,0]	53,00*** [42,00-61,00]	< 0,0001
Мегакариоциты оксифильные, %	15,00 [9,00-23,50]	20,00 [12,00-34,00]	28,00*** [22,00-45,00]	< 0,0001
Инволютивные формы, %	2,00 [1,00-4,00]	1,00 [0,0-4,00]	1,00*** [0,00-3,00]	< 0,0001
Голоядерные, %	21,00* [11,50-28,50]	4,5** [0,00-10,00]	8,00*** [6,00-11,00]	< 0,0001
Дегенеративные, %	1,00 [0,00-3,00]	0,50 [0,00-2,00]	1,00 [0,00-1,00]	0,6839
Эмпириополезис, %	3,00 [2,00-6,00]	3,00 [2,00-6,00]	2,00*** [0,00-3,00]	0,0018
Микромегакариоциты, %	4,00* [1,00-8,00]	17,00** [2,00-70,00]	0,00*** [0,00-0,00]	< 0,0001
Мегакариоциты с множеством ядер, %	0,00* [0,00-0,00]	24,5** [6,00-40,00]	0,00 [0,00-0,00]	< 0,0001
Пластинообразующие формы, %	8,00 [3,00-17,00]	13,5** [2,0-20,0]	41,00*** [32,00-63,00]	< 0,0001
Пластинокосодержащие формы, %	30,00* [22,00-38,00]	47,0** [39,0-62,0]	34,00 [21,00-44,00]	< 0,0001
Индекс созревания мегакариоцитов	0,22* [0,10-0,43]	0,04 [0,02-0,13]	0,09*** [0,02-0,14]	< 0,0001

Пр и м е ч а н и е . * – $p < 0,05$ при сравнении групп ИТП и МДС; ** – $p < 0,05$ при сравнении контрольной группы с МДС; *** – $p < 0,05$ при сравнении контрольной группы с ИТП.

ных форм достоверных различий между сравниваемыми группами не выявлено. Мегакариоциты с признаками диспоэза встречались в группах с ИТП и МДС, только при миелодиспластическом синдроме явление носило выраженный характер, тогда как при ИТП такие формы единичны ($p<0,0001$). В том числе при ИТП не обнаружены мегакариоциты с множеством ядер.

Для оценки взаимосвязи между показателями тромбоцитов и мегакариопоэзом использовалась ранговая корреляция Спирмена (табл. 2). В группе ИТП выявля-

на корреляция между MPV и количеством тромбоцитов ($r=0,233$, $p<0,05$), а также между PDW и количеством тромбоцитов ($r=0,328$, $p<0,001$). В то же время в группе МДС не было обнаружено значимых корреляций между количеством тромбоцитов и MPV или PDW ($p>0,05$). Наблюдались слабые отрицательные корреляции в группе ИТП между количеством мегакариоцитов костного мозга и общим числом тромбоцитов в периферической крови ($r=-0,208$, $p<0,05$), тромбокритом ($r=-0,210$, $p<0,05$) и MPV ($r=-0,181$, $p<0,05$). Сильные взаимосвязи в группе

Таблица 2

Корреляции показателей тромбоцитов и параметров мегакариоцитов при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и миелодиспластическом синдроме

Показатели			PLT	Всего мегакариоцитов	Незрелые мегакариоциты	Мегакариоциты базофильные	Мегакариоциты полихроматофильные	Мегакариоциты оксифильные	Инволютивные мегакариоциты	Голоядерные мегакариоциты	Дегенеративные мегакариоциты	Эмбриополезис	Микро- мегакариоциты	Мегакариоциты с множеством ядер	Пластинкообразующие МКЦ	Пластинкосоержащие МКЦ
ИТП	PLT	<i>r</i>	-	-0,208	-0,117	-0,050	-0,010	0,140	-0,039	0,065	-0,08	-0,02	-0,107	0,060	0,333	0,029
		<i>p</i>	-	0,020	0,195	0,550	0,862	0,120	0,660	0,469	0,323	0,765	0,239	0,489	0,0002	0,745
	PCT	<i>r</i>	0,351	-0,210	0,180	0,047	-0,157	0,042	-0,006	0,167	0,016	0,020	-0,063	0,094	0,284	-0,119
		<i>p</i>	0,0004	0,036	0,075	0,638	0,121	0,679	0,949	0,098	0,869	0,833	0,531	0,369	0,004	0,239
	MPV	<i>r</i>	0,233	-0,181	0,184	-0,040	-0,027	0,064	-0,07	0,123	0,021	0,106	-0,015	-0,025	0,268	-0,02
		<i>p</i>	0,011	0,048	0,045	0,644	0,762	0,484	0,431	0,184	0,819	0,251	0,864	0,784	0,003	0,825
	PDW	<i>r</i>	0,328	-0,114	0,145	-0,035	-0,031	0,043	-0,259	0,111	0,099	-0,071	-0,066	-0,067	0,266	0,003
		<i>p</i>	0,0003	0,218	0,117	0,700	0,686	0,641	0,004	0,233	0,284	0,443	0,474	0,465	0,003	0,968
	МДС	<i>r</i>	-	0,416	-0,111	0,425	0,050	-0,09	0,564	0,246	-0,522	-0,185	-0,406	-0,153	0,553	-0,246
		<i>p</i>	-	0,075	0,642	0,061	0,819	0,702	0,009	0,390	0,018	0,435	0,070	0,518	0,011	0,295
	PCT	<i>r</i>	0,310	0,755	-0,856	0,903	0,030	-0,333	0,230	0,216	-0,577	0,184	-0,452	-0,024	-0,214	0,590
		<i>p</i>	0,243	0,0007	0,0000	0,0000	0,981	0,207	0,391	0,422	0,019	0,503	0,078	0,929	0,425	0,016
Группа сравнения	MPV	<i>r</i>	-0,236	-0,085	-0,169	0,325	0,115	-0,182	-0,584	-0,644	-0,174	-0,462	0,248	0,460	-0,219	0,449
		<i>p</i>	0,315	0,721	0,475	0,161	0,628	0,442	0,006	0,002	0,462	0,040	0,290	0,041	0,353	0,046
	PDW	<i>r</i>	0,217	-0,310	0,580	-0,069	0,317	-0,041	0,324	-0,058	0,548	-0,109	-0,483	-0,339	0,285	-0,492
		<i>p</i>	0,387	0,211	0,011	0,783	0,200	0,869	0,190	0,817	0,018	0,666	0,042	0,168	0,252	0,038
	PLT	<i>r</i>	-	0,029	-0,207	0,008	0,202	-0,066	-0,021	-0,333	0,069	0,266	0	0,086	0,393	-0,247
		<i>p</i>	-	0,906	0,395	0,971	0,406	0,785	0,930	0,163	0,776	0,271	0	0,726	0,095	0,308
	PCT	<i>r</i>	0,828	0,049	-0,069	0,207	0,274	-0,222	-0,111	-0,232	0,228	0,121	0	-0,051	0,202	0,025
		<i>p</i>	0,000	0,851	0,790	0,424	0,287	0,391	0,672	0,369	0,379	0,644	0	0,848	0,435	0,921
	MPV	<i>r</i>	0,050	0,107	-0,290	-0,407	-0,352	0,395	0,111	-0,093	0,221	0,261	0	0,151	-0,064	0,162
		<i>p</i>	0,838	0,663	0,228	0,083	0,139	0,094	0,655	0,703	0,362	0,279	0	0,538	0,794	0,508
	PDW	<i>r</i>	-0,321	0,049	-0,020	0,207	-0,138	-0,008	-0,103	0,278	-0,049	0,266	0	-0,129	0,134	-0,307
		<i>p</i>	0,180	0,851	0,932	0,424	0,574	0,971	0,674	0,248	0,839	0,271	0	0,598	0,585	0,201

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения $p<0,05$, указывающие на статистически значимые различия групп.

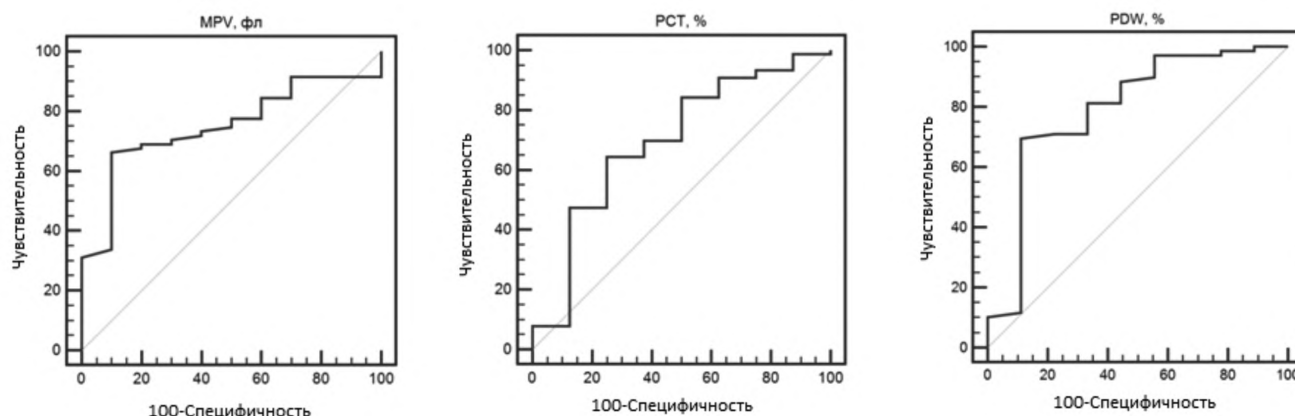
МДС выявлены между PCT и количеством мегакариоцитов в костном мозге ($r=0,755$, $p<0,001$), количеством незрелых мегакариоцитов ($r=-0,865$, $p<0,0001$), а также базофильных форм мегакариоцитов ($r=0,903$, $p<0,0001$). В группе ИТП наблюдались положительные корреляции между пластинкообразующими формами мегакариоцитов и количеством тромбоцитов периферической крови ($r=0,333$, $p<0,001$), PCT ($r=0,284$, $p<0,01$), MPV ($r=0,268$, $p<0,01$), а также PDW ($r=0,266$, $p<0,01$).

В группе с МДС определены положительные взаимосвязи между количеством тромбоцитов в периферической крови и инволютивными мегакариоцитами ($r=0,564$, $p<0,01$) и, также как и в группах с ИТП, с пластинкообразующими формами мегакариоцитов ($r=0,553$, $p<0,05$). Отрицательная взаимосвязь обнаружена в группе МДС между количеством тромбоцитов и дегенеративными формами мегакариоцитов ($r=-0,522$, $p<0,05$). Показатель MPV показал сильные отрицательные взаимосвязи с инволютивными мегакариоцитами ($r=-0,586$, $p<0,01$), «голоядерными» формами ($r=-0,644$, $p<0,01$) и явлением эмпириополезиса ($r=-0,462$, $p<0,05$), в то время как между мегакариоцитами с множеством мелких ядер и MPV взаимосвязь положительная ($r=0,460$, $p<0,05$). Показатель анизоцитоза тромбоцитов PDW коррелирует с дегенеративными формами ($r=0,548$, $p<0,05$) и микроформами мегакариоцитов ($r=-0,483$, $p<0,05$). В группе сравнения не было обнаружено корреляции между показателями тромбоцитов и стадиями созревания мегакариоцитов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в группе ИТП MPV, PCT и PDW коррелируют с пластинкообразующими мегакариоцитами, что имеет важное значение для диагностики ИТП. Для диагностики МДС важным маркером является диспоэз в костном мозге, по нашим данным, корреляции с формами диспоэза мегакариоцитов выявлены для PDW и MPV.

Для оценки клинических показателей тромбоцитов в сравниваемых группах применялся анализ ROC-кривых. Чувствительность и специфичность MPV, PCT и PDW при различных пороговых значениях были перечислены в табл. 3. Площадь под кривой ROC (AUC) MPV, PCT и PDW в группе ИТП при сравнении с МДС составили 0,750, 0,696 и 0,795, соответственно (см. рисунок). Индекс Юдена был максимальным в точке отсечения.

Для MPV было установлено, что точка отсечения более 10,7 фл имеет хорошую прогностическую ценность при диагностике ИТП. Чувствительность составила 66,2%, специфичность – 90,0%, отношение правдоподобия положительного результата теста (Positive LR) – 6,62 и отрицательного результата (Negative LR) – 0,38, прогностичность положительного результата (PPV) 89%, отрицательного результата (NPV) – 70%. Соответственно, при пороговом значении PDW более 20,8% пациентов с ИТП можно отличить от МДС с 69,57% чувствительностью и специфичностью 88,89%. Расчетный PPV и NPV составили 94% и 70,6%, Positive LR – 6,26 и Negative LR – 0,34. Среднюю прогностическую ценность показала ROC-кривая для PCT. Для этого показателя была получена точка отсечения менее 0,086% с



ROC-кривые для моделей прогноза диагностической эффективности показателей MPV, PCT и PDW между группами ИТП и МДС.

Таблица 3

Анализ ROC-кривых для моделей прогноза диагностической эффективности показателей тромбоцитов между группами ИТП и МДС

Показатели	AUC	SE	Significance level P (Sig)	95% CI of AUC		Cutoff point	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive LR	Negative LR
				Lower	Upper					
MPV	0,750	0,055	0,0001	0,648	0,835	>10,7	66,2	90,0	6,62	0,38
PCT	0,696	0,0784	0,0125	0,591	0,787	≤0,086	64,47	75,00	2,58	0,47
PDW	0,795	0,0514	0,0001	0,695	0,874	>20,8	69,57	88,89	6,26	0,34

Примечание. AUC – площадь под кривой; SE – стандартная ошибка; Significance level P (Sig) – асимптотическая значимость; 95% CI of AUC – асимптотический 95 % доверительный интервал; Lower Bound – нижняя граница; Upper Bound – верхняя граница, Cutoff point – точка отсечения; Sensitivity (%) – чувствительность; Specificity (%) – специфичность; Positive LR – положительное отношение правдоподобия; Negative LR – отрицательное отношение правдоподобия.

чувствительностью 64,47% и специфичностью 75,0%. PPV составила 67,1%, NPV – 60,6%, Positive LR – 2,58, а Negative LR – 0,34. Построенные ROC-кривые для MPV, PCT и PDW сдвинуты в верхнюю левую часть графика, что указывает на их высокую прогностическую ценность.

Обсуждение. В нормальном костном мозге легко найти зрелые мегакариоциты, обладающие скоплениями тромбоцитов внутри или на краю цитоплазмы, демонстрирующими нормальное образование тромбоцитов мегакариоцитами. В патогенезе ИТП аутоантитела образуются в ответ на бактериальные или вирусные инфекции, вакцинации или лекарства, а также аутоиммунные реакции, опосредованные Т-клетками [12]. Аутоантитела могут ингибировать или ослаблять дифференцировку мегакариоцитов из гемопоэтических стволовых клеток CD34, полученных из пуповинной крови. Мы обнаружили снижение пластинкообразующих мегакариоцитов у пациентов с ИТП, а также задержку созревания мегакариоцитарного ростка. При ИТП низкое количество тромбоцитов индуцирует компенсаторное увеличение количества мегакариоцитов в костном мозге, что проявляется обнаруженной гиперплазией мегакариопоэза. При МДС количество мегакариоцитов в костном мозге и созревание ростка не изменяется, но сопровождается появлением форм диспоэза. Таким образом, исследование миелограммы помогает при дифференциальном диагнозе ИТП и МДС.

При ИТП мегакариоциты продуцируют тромбоциты в ответ на повышенную деструкцию [9]. Новые сгенерированные тромбоциты имеют увеличенный размер. Соответственно, была обнаружена положительная корреляция между повышением MPV и пластинкообразующими мегакариоцитами при ИТП, в то время как при МДС взаимосвязь между MPV и формами диспоэза мегакариоцитов носила отрицательный характер. На основании этих данных можно сделать вывод, что MPV отражает мегакариопоэз, и было показано, что MPV значительно выше в группе ИТП по сравнению с МДС и группой сравнения. Более того, в точке отсечения MPV 10,7 фл мы смогли отличить ИТП от МДС с 89% PPV и 70% NPV.

Показатель PDW положительно коррелировал с пластинкообразующими мегакариоцитами при ИТП. Для МДС он показал интересное соотношение: положительную корреляцию для незрелых и дегенеративных мегакариоцитов и отрицательную для микроформ. Видимо такое соотношение и объясняет то, что этот показатель не отличался от группы сравнения и возрастной нормы при МДС. Наоборот, при ИТП показатель анизоцитоза тромбоцитов значительно выше, что демонстрирует диагностическую ценность PDW для идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Таким образом, полученное путем ROC-анализа значение показателя PDW 20,8% помогает в дифференциальном диагнозе между ИТП и МДС с 94% PPV и 70,6% NPV.

При ИТП и МДС значительно снижается количество тромбоцитов в периферической крови, что взаимосвязано с низкими значениями PCT. Показатель отражает долю объема крови, занимаемую тромбоцитами. Тромбоцит является расчетным и вычисляется как сумма прямо измеренных объемов тромбоцитов (PCT = $PLT \times MPV$). Соответственно, изменения этого показателя сопряжены с количеством и объемом тромбоци-

тов, что и было продемонстрировано в виде сильных корреляционных связей между PLT и PCT. Нами было получено, что при ИТП уровень тромбоцита значительно ниже, чем при МДС. Но при ROC-анализе полученная площадь под кривой была ниже 0,7, что говорит о среднем качестве модели, поэтому этот показатель не рекомендуется использовать для дифференциальной диагностики ИТП и МДС.

Заключение. В соответствии с предыдущими исследованиями наши результаты демонстрируют, что MPV и PDW имеют диагностическую ценность для выявления тромбоцитопении, возникающей в результате повышенного потребления или разрушения тромбоцитов в периферическом русле, и тромбоцитопении, возникающей в результате диспластической продукции вследствие миелосупрессии [14,15]. Ограничение использования показателей тромбоцитов в качестве диагностического маркера для ИТП заключается в том, что MPV и PDW могут не регистрироваться автоматическим анализатором у пациентов со значительным снижением количества тромбоцитов, или при наличии ряда интерференций, когда анализатор не может адекватно разграничить популяции эритроцитов от тромбоцитов (фрагментация эритроцитов, присутствие микроэритроцитов) [10,15]. В этих условиях исследование костного мозга является незаменимым.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5-7, 9-15 см. REFERENCES)

1. Меликян А.Л., Пустовая Е.И., Цветаева Н.В., Птушкин В.В., Грицаев С.В., Голенков А.К. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых (редакция 2016 г.). *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(1, прил.1): 1-60.
2. Ковалева Л.Г., Пустовая Е.И., Сафонова Т.И. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) взрослых. Первичная иммунная тромбоцитопения (ИТП) взрослых. Болезнь Верльгофа. М.: Нью Мун; 2014.
4. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Кохно А.В., Семочкин С.В., Афанасьев Б.В., Морозова Е.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению миелодиспластических синдромов взрослых. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61 (1S)(4): 1-32.
8. Мазуров А.В., Хаспекова С.Г., Васильев С.А. Диагностика тромбоцитопений. *Терапевтический архив*. 2018; 90 (7): 4-13.

REFERENCES

1. Melikyan A.L., Pustovaya E.I., Tsvetaeva N.V., Ptushkin V.V., Gritsaev S.V., Golenkov A.K. et al. National clinical recommendations for the diagnosis and therapy of idiopathic thrombocytopenic purpura (primary immune thrombocytopenia) in adults (2016). *Gematologiya I transfuziologiya*. 2017; 62(1, suppl.1): 1-60. (in Russian)
2. Kovaleva L.G., Pustovaya E.I., Safonova T.I. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) in adults. Primary immune thrombocytopenia (ITP) in adults. Verlgof's Disease. Moscow: Nye Mun; 2014. (in Russian)
3. Liebman H.A., Pullarkat V. Diagnosis and management of immune thrombocytopenia in the era of thrombopoietin mimetics. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2011; 384-90.
4. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Kokhno A.V., Semochkin S.V., Afanas'ev B.V., Morozova E.V. et al. National clinical recommendations for the diagnosis and treatment of myelodysplastic syndromes adults. *Gematologiya I transfuziologiya*. 2016; 61 (1S) (4): 1-32. (in Russian)
5. Italiano J.E., Shivdasani R.A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1:1174-82.

6. Patel S.R., Richardson J.L., Schulze H., Kahle E., Galjart N., Drabek K. et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*. 2005; 106(13): 4076 – 85.
7. Hofmann W.K., Kalina U., Koschmieder S., Seipelt G., Hoelzer D., Ottmann O.G. Defective megakaryocytic development in myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 2000; 38:13–9.
8. Mazurov A.V., Khaspekova S.G., Vasil'ev S.A. Diagnosis of thrombocytopenia. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018; 90 (7): 4-13. (in Russian)
9. Strauss G., Vollert C., von Stackelberg A., Weimann A., Gaedicke G., Schulze H. Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2011; 57:641–7.
10. De Luca G., Venegoni L., Iorio S., Secco G.G., Cassetti E., Verdoia M. et al. Platelet distribution width and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study. *Platelets*. 2010; 21:508–14.
11. Smith N.M., Pathansali R., Bath P.M. Altered megakaryocyte-platelet-haemostatic axis in patients with acute stroke. *Platelets*. 2002; 13:113–20.
12. Houwerzijl E.J., Blom N.R., van der Want J.J., Esselink M.T., Koornstra J.J., Smit J.W. et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004; 103:500–6.
13. Khan M. I., Ullah I. Diagnostic importance of mean platelet volume, platelet distribution width and platelet large cell ratio as screening tool in immune thrombocytopenia. *Porto Biomedical Journal*. 2020; 5(6): e094.
14. Chandra H., Chandra S., Rawat A., Verma S.K. Role of mean platelet volume as discriminating guide for bone marrow disease in patients with thrombocytopenia. *Int. J. Lab. Hematol*. 2010; 32:498–505.
15. Kaito K., Otsubo H., Usui N., Yoshida M., Tanno J., Kurihara E. et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol*. 2005; 128:698–702.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бычкова Н.В.^{1,2}, Селиванов П.А.³, Калинина Н.М.^{1,2}

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ЙОДСОДЕРЖАЩИМ РЕНТГЕНОКОНТРАСТНЫМ ВЕЩЕСТВАМ В ТЕСТЕ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

¹ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никитина МЧС России 194044, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГКУЗ 3 Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, 192171, г. Санкт-Петербург, Россия

Использование йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ необходимо в медицинской практике. У ряда пациентов возникают нежелательные побочные эффекты различной природы и тяжести при введении этих препаратов. Рутинное аллергологическое обследование не обеспечивает адекватную диагностику реакций на препараты этой группы. Цель работы – оценить возможности теста активации базофилов для подтверждения сенсibilизации к неионным йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам, а также для выбора безопасного альтернативного препарата у пациентов с отягощенным анамнезом. Тест активации базофилов методом проточной цитометрии был проведен 184 пациентам ВЦЭРМ им. А.М. Никитина МЧС России и 32 волонтерам с использованием препаратов ультравист, омнипак, оптирей. Оценивали наличие сенсibilизации на основании индекса активации базофилов, а также спонтанную и индуцированную анти-IgE антителами активацию базофилов и популяцию Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа. У волонтеров не было выявлено сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам. У пациентов со средней степенью реакции гиперчувствительности in vivo сенсibilизация in vitro к препаратам выявлена в 4 раза чаще, чем при легкой степени (51% по сравнению с 13,5%). У пациентов с системными реакциями на введение известного препарата сенсibilизация in vitro подтверждена в 86% случаев, при этом частота выявления сенсibilизации к препаратам не различалась. Спонтанная активация базофилов у пациентов и Т-лимфоциты 2 типа были в 2 раза выше, чем у волонтеров. У пациентов чаще выявляли низкую (менее 30%) активацию базофилов на анти-IgE антитела. Специфичность теста активации базофилов с рентгеноконтрастными веществами составила 100% при чувствительности 94,1%. У большинства пациентов была возможность подобрать контрастное вещество, не вызывающее сенсibilизацию. Включение в алгоритм обследования спонтанной и индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов и популяции Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа позволит врачу осуществлять персонализированный подход к ведению пациентов с отягощенным анамнезом.

Ключевые слова: тест активации базофилов; реакции гиперчувствительности; йодсодержащие рентгеноконтрастные вещества; Т-лимфоциты 2 типа иммунного ответа.

Для цитирования: Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М. Клиническая значимость выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии.

Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (12): 747-754

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-747-754>

Для корреспонденции: Бычкова Наталья Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клин. иммунологии ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никитина МЧС России, доц. каф. иммунологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова; e-mail: BNV19692007@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 02.07.2021

Принята к печати 02.09.2021

Опубликовано 22.12.2021

Bychkova N.V.^{1,2}, Selivanov P.A.³, Kalinina N.M.^{1,2}

CLINICAL IMPLICATION OF DETECTING SENSITIZATION TO IODINATED RADIOCONTRAST MEDIA IN THE BASOPHIL ACTIVATION TEST BY FLOW CYTOMETRY

¹The Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine» EMERCOM of Russia, 194044, St. Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov the Ministry of Russian Federation for Medicine, 197022, St. Petersburg, Russia;

³Military Hospital of the National Guard Troops of the Russian Federation, 192171, St. Petersburg, Russia

The use of iodinated radiocontrast media is necessary for visualization. A number of patients have adverse effects of various nature and severity when these drugs are administered. Routine allergy tests do not provide adequate diagnosis of reactions to drugs in this group. The aim of this work is to assess the capabilities of the basophil activation test to confirm sensitization to non-ionic iodinated radiocontrast media, as well as to select a safe alternative drug in patients with a burdened history. Basophil activation test by flow cytometry was performed in 184 patients The Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine»

EMERCOM of Russia and 32 volunteers using ultravist, omnipack, and optiray. The presence of sensitization was assessed based on the basophil activation index, as well as spontaneous and anti-IgE antibody-induced activation of basophils and the population of T-lymphocytes type 2 immune response. The volunteers showed no sensitization to iodinated radiocontrast media. In patients with a medium degree of hypersensitivity reaction in vivo, in vitro sensitization to drugs was detected 4 times more often than in patients with a mild degree (51% versus 13.5%). In patients with systemic reactions to the administration of a known drug, in vitro sensitization was confirmed in 86% of cases, while the frequency of detection of sensitization to drugs did not differ. Spontaneous activation of basophils in patients and type 2 T-lymphocytes were 2 times higher than in volunteers. Patients were more likely to have low (less than 30%) activation of basophils for anti-IgE antibodies. The specificity of the basophil activation test with iodinated radiocontrast media was 100% with a sensitivity of 94.1%. Most patients were able to select a non-sensitizing contrast. Inclusion in the algorithm of spontaneous and anti-IgE antibody-induced activation of basophils and a population of T-lymphocytes type 2 immune response will allow the doctor to carry out a personalized approach to the management of patients with a burdened history.

Key words: *basophil activation test; hypersensitivity reactions; iodinated radiocontrast media; T-lymphocytes type 2 immune response.*

For citation: Bychkova N.V., Selivanov P.A., Kalinina N.M. Clinical implication of detecting sensitization to iodinated radiocontrast media in the basophil activation test by flow cytometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 747-754 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-747-754>

For correspondence: *Bychkova N.V.*, candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of clinical immunology of the The Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine» EMERCOM of Russia, Assistant-Professor of the Department of Immunology Saint-Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov the Ministry of Russian Federation for Medicine; e-mail: BNV19692007@yandex.ru

Information about authors:

Bychkova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6907-2817>;

Selivanov P.A., <https://orcid.org/0000-0001-8076-8332>;

Kalinina N.M., <https://orcid.org/0000-0003-1752-6888>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 02.07.2021

Accepted 02.09.2021

Published 22.12.2021

Введение. В клинической практике использование контрастных веществ необходимо для лучшей визуализации при проведении исследований различными методами – магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии, урографии, коронарографии и др. Для многих из них необходимо использование йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ (йРКВ), которые являются химическими модификациями 2,4,6-трийодированного бензольного кольца. йРКВ разделяют на ионные и неионные, классифицируют по их химическим и физическим свойствам – осмоляльность, ионизация в растворе, химическая структура [1]. В результате введения йРКВ у ряда пациентов развиваются нежелательные побочные эффекты различной природы и тяжести. Частота легких анафилактических реакций при введении высокоосмолярных ионных йРКВ может достигать до 12,7%, а низкоосмолярных неионных йРКВ составляет 0,7-3,1% [2]. Риск развития тяжелых реакций на ионные йРКВ составляет 0,1-0,4%, на неионные на порядок ниже [3]. Наибольшее распространение в настоящее время имеют неионные йРКВ ввиду их большей безопасности. Согласно данным М.Н. Kim и соавт. [4], частота встречаемости реакций немедленной гиперчувствительности на введение неионных йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ составила 2,1%, при этом в 0,01% встречались тяжелые реакции. В Российской популяции [5] частота выявления реакций на йодсодержащие препараты была схожей и составила 2%. При этом, согласно данным А.В. Матвеева и соавт. [6], йРКВ вошли в пятерку фармакологических препаратов, вызвавших анафилактический шок при использовании.

В литературе продолжают дискуссии о том, какова природа реакции гиперчувствительности на йРКВ.

В настоящее время превалирует мнение [7], что многие побочные реакции на йРКВ являются аллергическими, и могут протекать в виде разной степени анафилаксии либо отсроченных кожных реакций. Основными клиническими проявлениями неблагоприятных реакций на йРКВ, согласно данным А.В. Матвеева и соавт. [6], были реакции гиперчувствительности немедленного типа.

Согласно практическому руководству Американской академии аллергии [8] объективными симптомами анафилактической реакции являются крапивница, ангионевротический отек, бронхоспазм, выраженное падение давления и шок. Реакции гиперчувствительности замедленного типа на йРКВ обычно проявляются в виде макулопапулезных экзантем, реже в виде фиксированной лекарственной сыпи, острого генерализованного экзантематозного пустулеза, лекарственной эозинофилии, синдрома Стивенса-Джонсона (токсический эпидермальный некролиз), васкулита и йододермии [9].

Многим пациентам требуется неоднократное введение йРКВ, например, для мониторинга терапии либо при повторных оперативных вмешательствах. Следовательно, необходимо подтвердить или опровергнуть наличие сенсibilизации к конкретному препарату, а также подобрать безопасное йРКВ. Для диагностики аллергических реакций на лекарственные препараты в Российской Федерации рекомендованы [10] кожные тесты, провокационное тестирование, оценка уровня специфических иммуноглобулинов Е, активации базофилов и некоторые другие. Согласно К. Brocowski и соавт. [11], положительные кожные пробы на йРКВ были не более, чем у половины пациентов с документированными реакциями *in vivo*. Провокационное тестирование редко используется и в России, и в мире из-за высокого риска

развития анафилактических реакций [12] при проведении тестирования. Диагностика аллергии на йРКВ с помощью определения специфических иммуноглобулинов Е к основному действующему веществу затруднительна ввиду того, что лекарственная аллергия не всегда протекает по IgE-зависимому 1 типу реакций гиперчувствительности [13], а также коммерческие наборы в России не зарегистрированы.

Таким образом, сохраняется необходимость поиска новых методов диагностики сенсибилизации к йРКВ. По немногочисленным литературным данным [14, 15] тест активации базофилов, предложенный в последние годы 20-го века, показал свою эффективность как для подтверждения гиперчувствительности к йРКВ, так и для подбора оптимального препарата для повторного исследования после подтвержденных реакций на йРКВ. При этом в литературе высказывается мнение [16], что ввиду редкости IgE-зависимых реакций на йРКВ данный тест не может с высокой точностью предсказывать риск развития неблагоприятной реакции на введение препаратов данной группы.

Целью нашей работы было оценить возможности теста активации базофилов методом проточной цитометрии для подтверждения сенсибилизации к неионным йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам, а также для выбора безопасного йРКВ у пациентов с отягощенным анамнезом.

Материал и методы. В исследование были включены 184 пациента ВЦЭРМ им. А.М. Никитова МЧС России (52 мужчины и 132 женщины, от 29 до 81 года, $62,9 \pm 12,6$) и 32 волонтера (12 мужчин и 20 женщин, от 24 до 76 лет, $56,3 \pm 14,6$). Все пациенты были разделены на 4 группы по анамнестическим данным. 1-я группа – 79 человек с местной реакцией на раствор йода или биологически активные добавки с йодом. У этих пациентов была диагностирована, в основном, легкая степень тяжести реакций (в 95% случаев) с симптомами зуда, покраснения, ожога кожи, локализованными уртикарными высыпаниями [17]. 2-я группа – 59 человек с системными реакциями на введение йРКВ (омнипак, ультравист, оптирей, йонамиро, урографин). У этих пациентов была диагностирована, в основном, средняя степень тяжести реакций (в 76% случаев) с симптомами зуда, раздражения тканей, генерализованной крапивницей, отеками, в том числе гортани, бронхоспазмом [17]. У 8 пациентов (3-я группа) реакция на йРКВ была расценена как токсическая с выраженной слабостью, рвотой, тошнотой, в 1 случае было нарушение ритма во время операции на сердце, у 1 пациента была токсикодермия. Срок давности возникновения реакций на йодсодержащие препараты составил от 2 нед до 40 лет. 38 пациентов, составивших 4-ю группу, предъявляли жалобы на разнообразные симптомы гиперчувствительности при приеме лекарственных средств, не содержащих йод. Все пациенты проходили обследование в связи с предстоящим проведением исследований с использованием йРКВ.

Волонтеры не имели реакций гиперчувствительности в анамнезе, онкологических заболеваний, в момент исследования отсутствовали острые и не было обострения хронических заболеваний.

Тест активации базофилов проводили методом проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter) с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER) согласно инструкции производителя. Постановку теста осуществляли в течение

не более 2 ч от момента забора крови в вакутейнеры с гепарином лития. Идентификацию базофилов осуществляли в многоцветном протоколе (см. рисунок) с использованием коктейля моноклональных антител CD3/CD294(CRTH2)/CD203c, а их активацию оценивали на основании возрастания экспрессии CD203c после стимуляции *in vitro*. Исследовали 500 базофилов.

Для каждого пациента в тесте оценивали несколько параметров. Во-первых, спонтанную активацию базофилов в пробе с буферным раствором, а именно долю клеток с высокой экспрессией CD203c от общего количества базофилов $SSlowCD3-CD294^+CD203c^+$. Во-вторых, для контроля способности базофилов к активации использовали стимуляцию клеток анти-IgE антителами с определением доли клеток с высокой экспрессией CD203c (положительный контроль).

В-третьих, оценивали индекс активации базофилов на йРКВ – отношение количества активированных базофилов $SSlowCD3-CD294^+CD203c^{++}$ в пробе с препаратом к данному параметру в пробе с буферным раствором. В качестве стимулов в тесте использовали 3 неионных йодсодержащих рентгеноконтрастных препарата – ультравист 300 (163 исследования, действующее вещество йопромид), омнипак 300 (112 исследований, действующее вещество йогексол), оптирей 300 (94 исследования, действующее вещество йоверсол). У 43 пациентов в тесте активации базофилов были исследованы одновременно 2 препарата, а у 19 – все 3. Тест на йРКВ считали положительным при индексе активации базофилов более 1,05. В-четвертых, измеряли относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа $FSSlowSSlowCD3^+CD294^+$ от общего пула лимфоцитов $FSSlowSSlow$.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Microsoft Office Excel 2016», пакета Statistica 12.0 («StatSoft», США). Данные представлены в виде средних значений (M) с расчетом ошибки среднего (m). Сравнение выборок с определением достоверности различий проводили с использованием t -критерия Стьюдента при нормальном распределении, а также с использованием критерия Манна-Уитни при отклонении распределения от нормального. При проведении частотного анализа использовали точный критерий Фишера (ϕ). Для оценки тесноты связи между признаками использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Теснота связи рассчитывалась по коэффициенту корреляции R_s . Оценивали силу связи между признаками, $R_s \leq 0,3$ – показатель слабой тесноты связи; $R_s \geq 0,4 < 0,7$ – показатель умеренной тесноты связи; $R_s \geq 0,7$ – показатель высокой тесноты связи. Учитывались лишь связи с силой $R_s \geq 0,6$. Чувствительность и специфичность метода оценивали по стандартной методике ROC-анализа. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Оценка сенсибилизации *in vitro* на неионные йодсодержащие рентгеноконтрастные препараты. В группе волонтеров не было отмечено активации базофилов на йРКВ *in vitro*. У обследованных пациентов частота выявления сенсибилизации в тесте активации базофилов как минимум к 1 препарату составила 21%. Достаточно часто у пациентов была выявлена сенсибилизация к одному из препаратов при отсутствии реакции на альтернативное контрастное вещество. Частота выявления сенсибилизации на изученные препа-

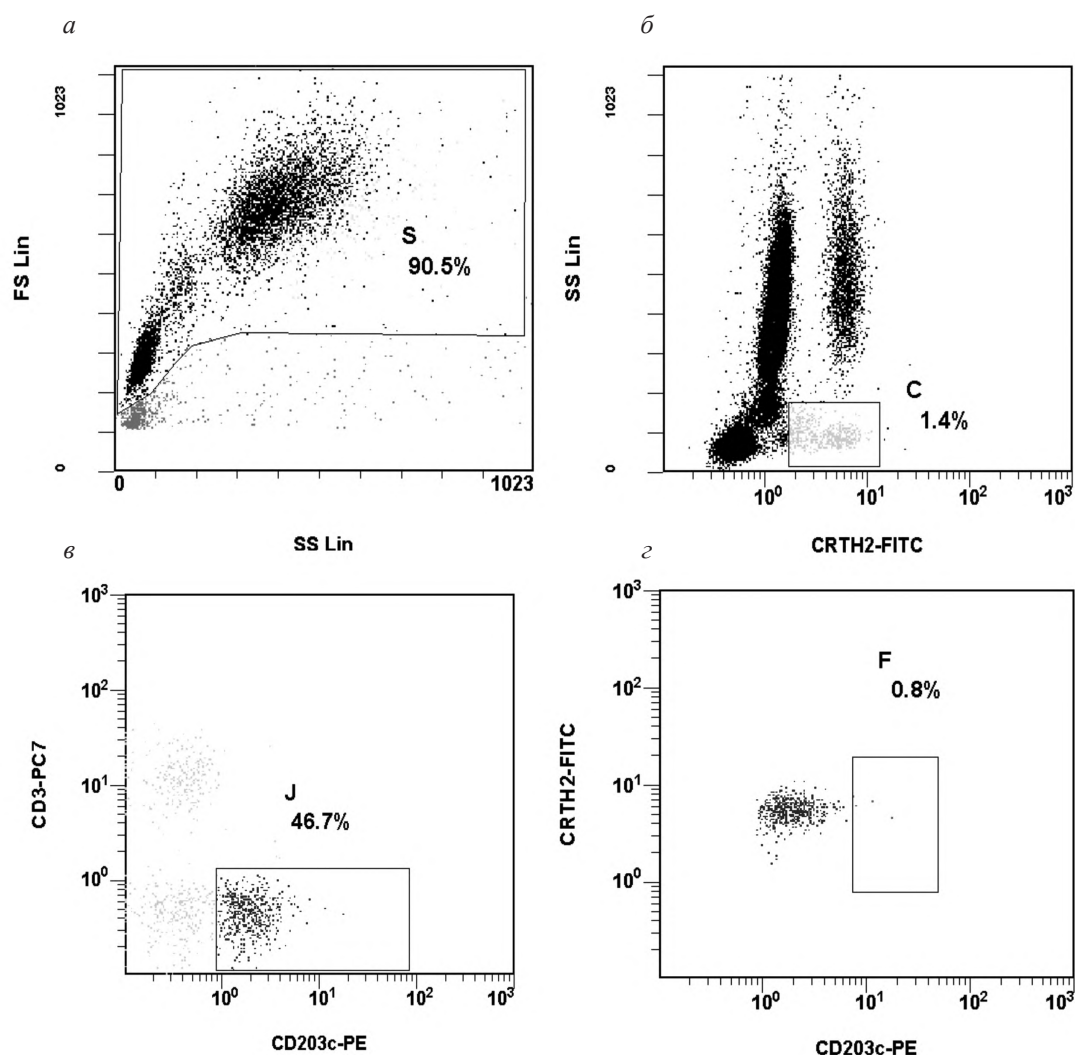
раты была схожей – 12% (19 из 163) на ультравист, 13% (15 из 112) на омнипак и 14% (13 из 94) на оптирей.

В исследовании выявлены значимые различия частоты сенсibilизация *in vitro* как минимум к одному йРКВ в группах пациентов, выделенных на основании интегральных анамнестических данных (табл.1).

У пациентов с местными реакциями гиперчувствительности на йодсодержащие препараты в анамнезе частота выявления сенсibilизации в тесте *in vitro* на йРКВ была в два раза ниже, чем в группе больных с системными реакциями на введение рентгеноконтрастного вещества (см. табл.1). У волонтеров и пациентов с токсическими реакциями на введение йРКВ тест активации базофилов всегда был отрицательным. У пациентов с лекарственной гиперчувствительностью без указания на клинические симптомы при приеме йРКВ сенсibilизация *in vitro* на препараты встречалась крайне редко, что значительно отличалось от показателей 1-й и 2-й обследованных групп.

Была исследована частота выявления сенсibilизация *in vitro* к йРКВ у пациентов в зависимости от степени тяжести реакции *in vivo* при использовании йодсодержащих препаратов. Легкая степень реакции была определена у 89 человек, средняя – у 49. У пациентов со средней степенью реакции *in vivo* сенсibilизация *in vitro* к йРКВ выявлена в 4 раза чаще, чем при легкой степени (51% по сравнению с 13,5% соответственно, $p < 0,01$ $\phi^*_{\text{эмп}} = 4,71$ по критерию Фишера). Аналогично предыдущим данным, разница в частотах встречаемости сенсibilизации к различным йРКВ отсутствовала и в группах, разделенных на основании тяжести реакции *in vivo*.

Следует отметить, что у пациентов со средней степенью реакций в анамнезе на препараты, содержащие йод, наблюдалась тенденция к наличию сенсibilизации *in vitro* одновременно к нескольким йРКВ по сравнению с группой пациентов с легкой степенью (8,1% и 2,2% соответственно, $p = 0,06$).



Алгоритм поэтапного гейтирования популяции активированных базофилов.

а – гейт S. Отсечение дебриса по параметрам прямого FS и бокового SS светорассеяния; б – гейт C. Выделение области исследования, где находятся клетки, позитивные по CD294 (CRTH2) с низкими/средними показателями бокового SS светорассеяния для отсекаания эозинофилов и CD294⁺ клеток; в – гейт J. Определение популяции базофилов на основании экспрессии CD203c для отсекаания провоспалительных моноцитов и Т-лимфоцитов 2 типа, экспрессирующих CD294; г – гейт F. Определение популяции активированных базофилов с фенотипом SS^{low}CD3⁺CD294⁺CD203c⁺⁺, гиперэкспрессирующих молекулу CD203c, от общего числа базофилов SS^{low}CD3⁺CD294⁺CD203c⁺.

Среди 59 пациентов с системными реакциями гиперчувствительности на йРКВ у 21 индивидуума был известен и исследован в тесте активации базофилов йодсодержащий рентгеноконтрастный препарат, при введении которого они испытали симптомы средней тяжести реакции. У оставшихся 37 человек реакция *in vivo* была на урографин (20 человек), либо они не знали, какой именно препарат им вводили для визуализации, либо знали, но не планировали подтверждать сенсibilизацию лабораторно и выбирали другое (другие) йРКВ для подбора препарата с целью последующего его применения.

У 18 из 21 пациентов (86%) в тесте *in vitro* была подтверждена сенсibilизация к известному йРКВ. Время между аллергической реакцией и проведением тестирования составило от 2 недель до 2 лет.

После осуществления предварительного тестирования препаратов *in vitro* у 184 пациентов, 124 обследуемым были проведены вмешательства с использованием йРКВ, на которые не было выявлено сенсibilизации. 60 человек либо отказались от проведения исследований с контрастированием ($n=12$) либо на данный момент находились в листе ожидания ($n=48$).

Среди 124 пациентов, согласно катamnестическим данным, не было выявлено тяжелых и средней тяжести реакций гиперчувствительности на введение рекомендованных йРКВ после тестирования *in vitro*. У 3 человек (2%) с системными проявлениями гиперчувствительности в анамнезе отмечены неблагоприятные реакции (отек мягких тканей лица и крапивница легкой степени) при введении рентгеноконтрастных препаратов, к которым не было выявлено сенсibilизации в тесте активации базофилов.

В нашем исследовании специфичность теста активации базофилов с рентгеноконтрастными веществами составила 100% при чувствительности 94,1%.

Оценка спонтанной и индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов и Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа. Спонтанная активация базофилов в группе волонтеров была значимо ниже, чем у обследованных пациентов ($1,5 \pm 0,1\%$ против $2,7 \pm 0,1\%$, $p < 0,01$). Полученное на основании ROC-анализа пороговое значение для разделения групп волонтеров и пациентов – 2,3% – обладало низкой чувствительностью в 50% при специфичности 93,7%.

Средние значения индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов у пациентов и волонтеров значимо не различались ($55,9 \pm 1,9\%$ и $64,3 \pm 3,4\%$). При проведении частотного анализа выявлено, что у пациентов чаще наблюдались низкие значения этого

показателя. Так, у обследованных больных в 37 случаях из 184 (20,1%) количество активированных анти-IgE антителами базофилов было ниже 30%, в то время как в группе сравнения таких было 2 человека из 32 (6,3%) ($p < 0,05$ $\phi^* \text{эмп} = 2,21$ по критерию Фишера). Полученное на основании ROC-анализа пороговое значение для разделения групп волонтеров и пациентов – 36,8% – обладало низкой чувствительностью в 27,2% при специфичности 93,7%.

При анализе данных выявлено, что относительное количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа было в 2 раза выше в группе пациентов по сравнению с группой сравнения ($1,9 \pm 0,1$ и $0,9 \pm 0,1$, $p < 0,01$). Полученное на основании ROC-анализа пороговое значение для разделения групп волонтеров и пациентов – 1,5% – обладало низкой чувствительностью в 50,5% при специфичности 100%.

В различных группах пациентов, выделенных на основании анамнестических данных, значимых различий спонтанной и индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов, а также количества Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, не выявлено (табл. 2), наиболее близкие к группе сравнения значения показателей наблюдались в группе обследованных лиц с токсическими реакциями на введение йРКВ.

Обсуждение. При необходимости визуализации с применением йРКВ пациентов опрашивают о наличии в анамнезе неблагоприятных реакций на йодсодержащие препараты. В случае указания на отягощенный анамнез повышается риск развития реакций гиперчувствительности на введение йРКВ, но он не носит абсолютный характер. Для минимизирования рисков неблагоприятных реакций предложено проведение теста активации базофилов с планируемым к применению йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратом накануне проведения исследования.

Использование теста активации базофилов для определения сенсibilизации к йРКВ обоснованно из-за участия базофилов в развитии реакций гиперчувствительности [18]. Помимо IgE-опосредованных реакций, неспецифическое связывание йРКВ с рецепторами на тучных клетках и базофилах может приводить к дегрануляции клеток и прямому высвобождению гистамина. При непрямой активации возможно задействование компонентов системы комплемента и кининового каскада, поскольку описаны рецепторы на базофилах к компонентам комплемента [19, 20].

Изучив карты-извещения о нежелательных реакциях на йРКВ за 2009-2018 гг. в Республике Крым, А.В. Мат-

Таблица 1

Частота выявления сенсibilизация *in vitro* к йРКВ в различных группах обследованных

Группы обследованных	Частота выявления сенсibilизации к йРКВ n (%)
1-я группа, пациенты с местными реакциями гиперчувствительности на йодсодержащие препараты, $n=79$	18 (22,7) *, **
2-я группа, пациенты с системными реакциями гиперчувствительности на йРКВ, $n=59$	26 (44,0) *, ***
3-я группа, пациенты с токсическими реакциями на йРКВ, $n=8$	2 (5,2) **, ***
4-я группа, пациенты с симптомами лекарственной гиперчувствительности, $n=38$	0
5-я группа, волонтеры, $n=32$	0

Примечание. * - $p < 0,01$ $\phi^* \text{эмп} = 2,66$ (критерий Фишера) между 1 и 2-й группами; ** - $p < 0,01$ $\phi^* \text{эмп} = 2,69$ (критерий Фишера) между 1 и 3-й группой; *** - $p < 0,01$ $\phi^* \text{эмп} = 4,75$ (критерий Фишера) между 2 и 3-й группами.

веев и соавт. [6] выявили, что подавляющее большинство пациентов с реакциями гиперчувствительности на йРКВ (82,6%) не имели отягощенного анамнеза, только у 13% были зарегистрированы проявления лекарственной аллергии. В то же время S.Y.Lee и соавт. [21] указывают на важность анамнестических данных – основным фактором риска развития реакций на йРКВ является отмечавшаяся ранее реакция на введение йодсодержащих рентгеноконтрастных препаратов. Дополнительно повышение риска наблюдается у пациентов с сахарным диабетом, хронической крапивницей и лекарственной гиперчувствительностью [22]. Наши данные согласуются с результатами коллег: частота выявления сенсибилизации *in vitro* к йРКВ выше у пациентов с гиперчувствительностью к йодсодержащим препаратам, особенно йРКВ, по сравнению не только с волонтерами, но и пациентами с симптомами лекарственной гиперчувствительности к другим группам фармакологических препаратов. В дополнение мы выявили, что частота встречаемости сенсибилизации к йРКВ у пациентов с системными реакциями на введение препарата, а особенно с более тяжелыми реакциями при применении данной группы веществ, значимо выше, чем у обследуемых с местными реакциями на йодсодержащие препараты и биодобавки и легкой степенью тяжести реакции гиперчувствительности на введение йРКВ. В нашем исследовании не было выявлено превалирования частоты встречаемости сенсибилизации *in vitro* ни к одному из тестируемых препаратов. У пациентов со средней тяжестью реакций *in vivo* наблюдалась тенденция к наличию сенсибилизации к нескольким йРКВ, при этом у большинства обследованных лиц была возможность подобрать йРКВ, не вызывающее сенсибилизацию. 2 случая подбора альтернативного контрастного вещества пациентам с неблагоприятными реакциями на йРКВ с помощью теста активации базофилов были описаны J.Borras и соавт. [23]. Таким образом, наличие в анамнезе неблагоприятных реакций на йодсодержащие препараты не запрещает использование в случае необходимости йРКВ при условии проведения адекватной диагностики.

При лабораторном подтверждении реакции гиперчувствительности к известному йРКВ в работе P.Pinnobrhun и соавт. [14] специфичность теста активации базофилов составила 88,4-100% при невысокой чувствительности 46-61,5%. В работе M. Salas и соавт. [15] чувствительность составила 62,5% при 100% специфич-

ности. В нашем исследовании мы подтвердили в тесте активации базофилов наличие гиперчувствительности к конкретному препарату в 86% случаев. Неполное совпадение лабораторных данных с анамнезом может быть связано с длительным временем между реакцией *in vivo* и проведением тестирования, другим механизмом развития реакции гиперчувствительности, а также с тем, что реакция могла быть на другие препараты, использованные при проведении, например, оперативного вмешательства при аортокоронарном шунтировании.

Значительно выше 94,1% в нашем исследовании была определена чувствительность теста активации базофилов для прогнозирования риска развития реакций гиперчувствительности на планируемый к применению йРКВ. Ни у одного пациента не было выявлено тяжелых и средней тяжести реакций гиперчувствительности на подобранный йРКВ, 2% (3 человека) обследованных пациентов предъявили жалобы на легкие отсроченные реакции при применении йРКВ, не вызвавших активации базофилов *in vitro*.

Помимо выявления в тесте активации базофилов сенсибилизации к конкретному препарату дополнительно оценивались спонтанная и индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов, а также количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа. Оценка данных параметров при использовании теста для выявления сенсибилизации будет способствовать комплексной диагностике состояния пациента и определению типа превалирующего иммунного ответа.

Согласно нашим данным в группе пациентов спонтанная активация базофилов была значимо выше, чем у волонтеров, что свидетельствует о постоянно протекающем, но не всегда клинически выраженном, аллергическом воспалении у лиц с отягощенным анамнезом.

Базофилы волонтеров всегда активно отвечают на неспецифический стимул, запускающий IgE-опосредованную реакцию дегрануляции. У 20% пациентов в тесте *in vitro* количество активированных базофилов в ответ на анти-IgE антитела было меньше 30%, что крайне редко наблюдалось среди здоровых лиц. При этом у 15% пациентов значение этого параметра было ниже 25%, ни у одного волонтера таких низких цифр выявлено не было. Известно, что снижение активации клеток на стимул, вплоть до ее полного отсутствия, может быть обусловлено проведением исследования в рефрактерный период в случае гиперактивации базофилов

Таблица 2

Спонтанная и индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов, популяция Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа в различных группах пациентов ($M \pm m$)

Группы пациентов	Спонтанная активация базофилов, %	Индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов, %	Относительное количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, %
1-я группа, пациенты с местными реакциями гиперчувствительности на йодсодержащие препараты, $n=79$	2,8 $\pm$ 0,2	57,0 $\pm$ 3,1	2,0 $\pm$ 0,2
2-я группа, пациенты с системными реакциями гиперчувствительности на йРКВ, $n=59$	3,0 $\pm$ 0,3	55,7 $\pm$ 3,0	1,9 $\pm$ 0,2
3-я группа, пациенты с токсическими реакциями на йРКВ, $n=8$	2,4 $\pm$ 0,3	52,4 $\pm$ 5,1	2,0 $\pm$ 0,2
4-я группа, пациенты с симптомами лекарственной гиперчувствительности, $n=38$	1,9 $\pm$ 0,5	64,8 $\pm$ 6,5	2,1 $\pm$ 0,5

in vivo, снижением реактивности клеток на фоне приема глюкокортикостероидов или других препаратов, обладающим супрессивным действием [24], индивидуальными особенностями нарушения проведения сигнала от комплекса FcεRI-IgE с участием тирозинкиназы Syk [25], модулированием активности эффекторных клеток через ингибиторный рецептор CD300a [26], а также другими неизвестными на данный момент факторами. В случае активации базофилов анти-IgE антителами менее, чем на 10% по сравнению со спонтанной активацией, невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном [27]. Выраженное снижение активации базофилов на анти-IgE антитела, даже при отсутствии выявленной специфической сенсибилизации к йРКВ, должно рассматриваться аллергологом-иммунологом как отягчающий фактор при наблюдении и лечении пациента.

В нашем исследовании в периферической крови всех групп пациентов выявлено значительное повышение Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD294⁺. Ранее увеличение этой популяции клеток было описано при рассеянном склерозе, спонтанной крапивнице [28], атопическом дерматите и эозинофильно-воспалительных заболеваниях кишечника [29]. Эти клетки имеют фенотип антиген-активированных Т-лимфоцитов эффекторных/памяти CD45RA⁺CD45RO⁺CD25⁺ [30] и характеризуются определенным профилем внутриклеточных цитокинов (синтез IL4, IL5, IL13 и отсутствие синтеза IFNγ) [31]. Интерлейкин 4 направляет иммунный ответ в сторону 2 типа с участием активатора транскрипции STAT6 [32]. Показано, что Т-лимфоциты, экспрессирующие CD294, могут быть как Т-хелперами, так и Т-цитотоксическими, продуцирующими интерлейкин 4 [33]. Они индуцируют синтез IgE плазмócитами [28,32], а также влияют на рост и дифференцировку тучных клеток, базофилов и эозинофилов.

Высокий уровень Т-лимфоцитов с экспрессией CD294 у пациентов свидетельствует о поляризации иммунного ответа в сторону 2 типа. Ранее гуморальный тип ответа в противовес клеточному 1 типу рассматривался как защитный при гельминтозах, а также был характерен при индукции аллергического воспаления. Согласно современной точке зрения [34], дополнительно в сферу компетенции 2 типа иммунного ответа входит контроль хронических воспалительных заболеваний, метаболического гомеостаза, репарации и фиброзирование тканей и др.

Недостаточная для разделения обследованных групп чувствительность пороговых значений спонтанной и индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов, а также относительного количества Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, свидетельствует о значительной гетерогенности значений этих показателей у пациентов. Данный факт требует индивидуального подхода к интерпретации данных каждого обследуемого ввиду множества факторов, которые могут влиять на изменение этих показателей. Определяющими могут быть индивидуальные особенности организма пациента, наличие недавней анафилактической реакции и проведенная терапия.

Заключение. Проведенное исследование показало высокую чувствительность и специфичность теста активации базофилов как для подтверждения имевшейся в анамнезе гиперчувствительности к йодсодержащим рентгеноконтрастными препаратами, так и для подбора

альтернативного контрастного вещества в случае отягченного анамнеза. Не было выявлено превалирования частоты встречаемости сенсибилизации *in vitro* ни к одному из тестируемых препаратов, реакция гиперчувствительности определяется индивидуальными особенностями организма пациента.

Включение в алгоритм обследования дополнительных параметров для комплексной оценки состояния пациента, а именно спонтанной и индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов и популяции Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, позволит врачу осуществлять персонифицированный подход к ведению пациентов с отягченным реакциями гиперчувствительности анамнезом. Выявление выраженных отклонений показателей от средних значений здоровой популяции будет влиять на тактику ведения пациента.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 7-9, 11-16, 19-27, 29-32, 34 см. REFERENCES)

1. Шавкатов М.З., Назаренко В.А. Анализ распространенности лекарственной аллергии у пациентов хирургического стационара. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2019; 9 (1): 540. (ISSN 2224-6150).
2. Матвеев А.В., Крашенинников А.Е., Егорова Е.А. Изучение безопасности рентгеноконтрастных соединений на основании карт-извещений о нежелательных реакциях, зарегистрированных в Республике Крым. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2020; 101(6): 344-53. <https://doi.org/10.20862/0042-4676-2020-101-6-344-353>.
3. Хаитов Р.М., Ильина Н.И., ред. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению лекарственной аллергии. В кн.: Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019; 190-213.
4. Хлудова Л.Г. Реакции гиперчувствительности на контрастные средства. *Астма и аллергия*. 2019; 2: 8-11.
5. Бычкова Н.В. Активация базофилов: теоретические аспекты и применение в диагностике аллергических заболеваний. *Медицинская иммунология*. 2021; 23 (3): 481-94. doi: 10.15789/1563-0625-BAT-2174.
6. Бычкова Н.В., Синельникова Н.А., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. CD3+CD294+ лимфоциты как маркеры Th2 и Th2 иммунного ответа. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(S): 239-40.
7. Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. Увеличение Т-цитотоксических 2 лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+CD294+ у пациентов с тяжелыми кожными проявлениями лекарственной аллергии. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(4): 687-9.

REFERENCES

1. Trcka J., Schmidt C., Seitz C.S., Bröcker E.B., Gross G.E., Trautmann A. Anaphylaxis to iodinated contrast material: nonallergic hypersensitivity or IgE-mediated allergy? *AJR Am. J. Roentgenol*. 2008; 190(3):666-70. doi: 10.2214/AJR.07.2872.
2. Wolf G.L., Arenson R.L., Cross A.P. A prospective trial of ionic vs nonionic contrast agents in routine clinical practice: comparison of adverse effects. *AJR Am. J. Roentgenol*. 1989; May;152(5):939-44. doi: 10.2214/ajr.152.5.939.
3. Caro J.J., Trindade E., McGregor M. The risks of death and of severe nonfatal reactions with high- vs low-osmolality contrast media: a meta-analysis. *AJR Am. J. Roentgenol*. 1991;156(4):825-32. doi: 10.2214/ajr.156.4.1825900.
4. Kim M.H., Park C.H., Kim D.I., Kim K.M., Kim H.K., Lim K.H. et al. Surveillance of contrast-media-induced hypersensitivity reactions using signals from an electronic medical recording system. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(3):167-71. doi: 10.1016/j.anai.2012.01.012.
5. Shavkatov M.Z., Nazarenko V.A. Analysis of the prevalence of drug allergy in surgical hospital patients. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2019; 9 (1): 540. (ISSN 2224-6150). (in Russian)

6. Matveev A.V., Krashennnikov A.E., Egorova E.A.. Study of the safety of radio-opaque compounds based on cards-notifications of adverse reactions registered in the Republic of Crimea. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 2020; 101(6): 344–53. <https://doi.org/10.20862/0042-4676-2020-101-6-344-353>. (in Russian)
7. Trautmann A., Brockow K., Behle V., Stoevesandt J. Radiocontrast Media Hypersensitivity: Skin Testing Differentiates Allergy From Nonallergic Reactions and Identifies a Safe Alternative as Proven by Intravenous Provocation. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*. 2019;7(7):2218–2224. doi: 10.1016/j.jaip.2019.04.005.
8. Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology. The diagnosis and management of anaphylaxis: an updated practice parameter. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005;115 (3) (Suppl. 2): S483–523. doi: 10.1016/j.jaci.2005.01.010. Erratum in: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008 Jul;122(1):68.
9. Tasker F., Fleming H., McNeill G., Creamer D., Walsh S. Contrast media and cutaneous reactions. Part 2: Delayed hypersensitivity reactions to iodinated contrast media. *Clin. Exp. Dermatol.* 2019;44(8):844–860. doi: 10.1111/ced.13991.
10. Khaitov R.M., Il'ina N.I., eds. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of drug allergy In: Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu lekarstvennoy allergii. V kn.: Klinicheskie rekomendatsii. Allergologiya i klinicheskaya immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2019; 190–213. (in Russian)
11. Brockow K., Romano A., Aberer W., Bircher A.J., Barbaud A., Bonadonna P. et al European Network of Drug Allergy and the EAACI interest group on drug hypersensitivity. Skin testing in patients with hypersensitivity reactions to iodinated contrast media – a European multicenter study. *Allergy*. 2009;64(2):234–41. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01832.x.
12. Aberer W., Bircher A., Romano A., Blanca M., Campi P., Fernandez J. et al European Network for Drug Allergy (ENDA); EAACI interest group on drug hypersensitivity. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003;58(9):854–63. doi: 10.1034/j.1398-9995.2003.00279.x.
13. Brockow K., Przybilla B., Aberer W., Bircher A.J., Brehler R., Dickel H. et al. Guideline for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: S2K-Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Dermatological Society (DDG) in collaboration with the Association of German Allergologists (AeDA), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Contact Dermatitis Research Group (DKG), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Center for Documentation of Severe Skin Reactions and the German Federal Institute for Drugs and Medical Products (BfArM). *Allergo J. Int.* 2015;24(3):94–105. doi: 10.1007/s40629-015-0052-6.
14. Pinnobphun P., Buranapraditkun S., Kampitak T., Hirankarn N., Klaewsongkram J. The diagnostic value of basophil activation test in patients with an immediate hypersensitivity reaction to radiocontrast media. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(5):387–93. doi: 10.1016/j.anai.2010.12.020.
15. Salas M., Gomez F., Fernandez T.D., Doña I., Aranda A., Ariza A. et al. Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*. 2013;68(9):1203–6. doi: 10.1111/all.12214.
16. Chirumbolo S. Basophil activation test (BAT) in the diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*. 2013;68(12):1627–8. doi: 10.1111/all.12323.
17. Khludova L.G. Hypersensitivity reactions to contrast media. *Astma i allergiya*. 2019; 2: 8–11. (in Russian)
18. Bychkova N.V. Basophil activation: theoretical aspects and application in the diagnosis of allergic diseases. *Meditinskaya immunologiya*. 2021; 23 (3): 481–94. doi: 10.15789/1563-0625-BAT-2174. (in Russian)
19. Decuyper I.I., Mangodt E.A., Van Gasse A.L., Claesen K., Uyttebroek A., Faber M. et al. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity Anno 2017: Potentials and Limitations. *Drugs R D*. 2017;17(2):265–278. doi: 10.1007/s40268-017-0176-x.
20. Mangodt E.A., Van Gasse A.L., Decuyper I., Uyttebroek A., Faber M.A., Sabato V. et al. In vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity: Should We Go with the Flow. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2015;168(1):3–12. doi: 10.1159/000440663.
21. Lee S.Y., Kang D.Y., Kim J.Y., Yoon S.H., Choi Y.H., Lee W. et al. Incidence and Risk Factors of Immediate Hypersensitivity Reactions Associated With Low-Osmolar Iodinated Contrast Media: A Longitudinal Study Based on a Real-Time Monitoring System. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2019;29(6):444–450. doi: 10.18176/jiaci.0374.
22. Park H.J., Park J.W., Yang M.S., Kim M.Y., Kim S.H., Jang G.C. et al. Re-exposure to low osmolar iodinated contrast media in patients with prior moderate-to-severe hypersensitivity reactions: A multicentre retrospective cohort study. *Eur. Radiol.* 2017;27(7):2886–2893. doi: 10.1007/s00330-016-4682-y.
23. Borrás J., El-Qutob D., Lopez R., Enrique E.. Hypothesized Epitope Localization in Hypersensitivity Reactions to Iodinated Contrast Media. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2019;29(1):82–83. doi: 10.18176/jiaci.0341.
24. Sturm G.J., Kranzelbinder B., Sturm E.M., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*. 2009;64(9):1319–26. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02004.x.
25. Patil S.U., Shreffler W.G. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin. Exp. Immunol.* 2012;167(1):59–66. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x.
26. Zenarruzabeitia O., Vitallé J., Eguizabal C., Simhadri V.R., Borrego F. The Biology and Disease Relevance of CD300a, an Inhibitory Receptor for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine. *J. Immunol.* 2015;194(11):5053–60. doi: 10.4049/jimmunol.1500304.
27. Ebo D.G., Bridts C.H., Hagendorens M.M., Aerts N.E., De Clerck L.S., Stevens W.J. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2008;74(4):201–10. doi: 10.1002/cyto.b.20419.
28. Bychkova N.V., Sinel'nikova N.A., Chinenova L.V., Kalinina N.M. CD3+CD294+ lymphocytes as markers of Th2 and Tc2 immune response. *Meditinskaya immunologiya*. 2017; 19(S): 239–40. (in Russian)
29. Mitson-Salazar A., Prussin C. Pathogenic Effector Th2 Cells in Allergic Eosinophilic Inflammatory Disease. *Front Med. (Lausanne)*. 2017; 4:165. doi: 10.3389/fmed.2017.00165.
30. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O. et al. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J. Immunol.* 1999;162(3):1278–86. PMID: 9973380. 2.
31. Nagata K., Hirai H., Tanaka K., Ogawa K., Aso T., Sugamura K. et al. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Lett.* 1999; 459(2):195–9. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01251-x.
32. Haase P., Voehringer D. Regulation of the humoral type 2 immune response against allergens and helminths. *Eur. J. Immunol.* 2021; 51(2):273–9. doi: 10.1002/eji.202048864.
33. Bychkova N.V., Chinenova L.V., Kalinina N.M. Increase in T-cytotoxic 2 lymphocytes with CD3 + CD8 + CD294 + phenotype in patients with severe skin manifestations of drug allergy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2017; 11(4): 687–9. (in Russian)
34. Gause W.C., Rothlin C., Loke P. Heterogeneity in the initiation, development and function of type 2 immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20(10):603–14. doi: 10.1038/s41577-020-0301-x.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Водолажский Д.И., Маяковская А.В., Кубышкин А.В., Алиев К.А., Фомочкина И.И.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, Симферополь, Россия

В обзоре приведены классические и современные взгляды на молекулярно-генетические маркеры, обуславливающие наследственную предрасположенность к раку молочной железы и яичников. Компьютеризированный поиск литературы проводился в электронных базах данных MEDLINE, Scopus, и Web of Science, опубликованных в период с января 1994 г. по май 2021 г., с использованием ключевых слов: «hereditary breast and ovarian cancer», «BRCA» и «DNA repair». Приведены современные взгляды на роль герминальных мутаций в генах предрасположенности к наследственному раку молочной железы (нРМЖ) и наследственному раку яичников (нРЯ): BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, CHEK2, PTEN, ATM и PPM1D. Герминальные мутации в рассматриваемых генах в 90% клинических случаев являются причиной инициирования малигнизации тканей и многократно увеличивают риск развития наследственных РМЖ и РЯ. Рассмотрены роль комплекса генов, участвующих в репарации повреждений ДНК с использованием механизма гомологичной рекомбинации и роль утраты гетерозиготности в этих генах, увеличивающая уровень хромосомной нестабильности и приводящей к повышению риска злокачественной трансформации клеток. В обзоре подчеркивается комплексный характер патогенеза и значительный полиморфизм генетических мишеней для нРМЖ и нРЯ. На основании проведенного анализа для предотвращения ложно-отрицательных результатов диагностики делается вывод о необходимости использования NGS-панелей для комплексного скрининга генов наследственной предрасположенности к этим онкологическим заболеваниям в условиях популяционного полиморфизма. Приведены данные по клинической значимости каждой группы генов наследственной предрасположенности к нРМЖ и нРЯ, а также продемонстрирована возможная роль метилирования промоторных участков генов и состояния митохондриальной ДНК в развитии этой патологии. Целью данного обзора служило расширение кругозора специалистов в области онкологии и клинической диагностики в условиях стремительно расширяющегося спектра молекулярно-генетических маркеров нРМЖ и нРЯ.

Ключевые слова: обзор; наследственный РМЖ; наследственный РЯ; пенетрантность; SNP; BRCA 1/2; MRN; NBS1; митохондриальная ДНК; SNP.

Для цитирования: Водолажский Д.И., Маяковская А.В., Кубышкин А.В., Алиев К.А., Фомочкина И.И. Клиническая значимость полиморфизма генов наследственной предрасположенности к раку молочной железы и яичников (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (12): 760-767. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767>

Для корреспонденции: Маяковская Анастасия Владимировна, мл. науч. сотр., Центральная научно-исследовательская лаборатория; e-mail: anastasiia.maiakovska@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания № FZEG-2020-0060 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий».

Поступила 24.08.2021

Принята к печати 31.08.2021

Опубликовано 22.12.2021

Vodolazhsky D.I., Mayakovskaya A.V., Kubyshkin A.V., Aliev K.A., Fomochkina I.I.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENE POLYMORPHISMS FOR HEREDITARY PREDISPOSITION TO BREAST AND OVARIAN CANCER (REVIEW OF LITERATURE)

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, 295051, Simferopol, Russia

The review presents classical and modern views on the molecular genetic causes underlying hereditary predisposition to breast and ovarian cancer. A computerized literature search was carried out in the electronic databases MEDLINE, Scopus, and Web of Science, published between January 1994 and May 2021, using the keywords: «hereditary breast and ovarian cancer», «BRCA» and «DNA repair». Current views on the role of germline mutations in genes for susceptibility to breast cancer (BC): BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, CHEK2, PTEN, ATM, and PPM1D are presented. The role of a complex of genes involved in homologous DNA repair and causing other hereditary oncological diseases is considered. The role of the loss of heterozygosity in these genes, which increases the level of chromosomal instability and leads to an increased risk of malignant transformation, is considered. Germinal mutations in the genes under consideration in 90% of clinical cases are the cause of initiation of tissue malignancy and greatly increase the risk of developing hereditary breast cancer and OC. The review emphasizes the complex nature of pathogenesis and significant polymorphism of genetic targets for hereditary breast cancer and OC. It is concluded that it is

necessary to use NGS panels for complex screening of genes of hereditary susceptibility to these oncological diseases. The review provides data on the clinical significance of each group of genes of hereditary predisposition in the pathogenesis of breast cancer and OC, and also demonstrates the possible role of methylation of the promoter regions of genes and the state of mitochondrial DNA in the development of these pathologies. The purpose of this review was to broaden the horizons of specialists in the field of oncology and clinical diagnostics in the context of the rapidly expanding spectrum of molecular genetic markers of hereditary breast and ovarian cancers.

Key words: review; hereditary breast cancer; hereditary ovarian cancer; penetrance; SNP; BRCA 1/2; MRN; NBS1; mitochondrial DNA; SNP.

For citation: Vodolazhsky D.I., Mayakovskaya A.V., Kubyshev A.V., Aliev K.A., Fomochkina I.I. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (12): 760-767 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767>

For correspondence: Mayakovskaya A.V., junior researcher, Central Research Laboratory; e-mail: anastasiia.maiakovska@gmail.com

Information about authors:

Vodolazhsky D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1114-8732>;
Mayakovskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0157-0550>;
Kubyshev A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1309-4005>;
Aliev K. A., <http://orcid.org/0000-0003-3911-1245>;
Fomochkina I.I., <https://orcid.org/0000-0003-3065-5748>.

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

Acknowledgments. This work was financially supported by state task No FZEG-2020-0060 of the Russian Ministry of Science in the field of scientific research on the topic «Algorithms for molecular-genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies».

Received 24.08.2021
Accepted 31.08.2021
Published 22.12.2021

Введение. По данным ВОЗ, рак молочной железы (РМЖ) ежегодно диагностируется приблизительно у 1 млн 400 тысяч женщин¹. В Российской Федерации в 2019 г. РМЖ занимал 21,2% в структуре всех онкологических заболеваний и является ведущей онкологической патологией среди женщин. Рак яичников (РЯ) представлен в существенно меньшей степени (4,1%). Годовой прирост показателей заболеваемости РМЖ в 2019 г. по сравнению с 2018 г. составил 2,5%. В структуре онкологической заболеваемости женщин злокачественные новообразования органов репродуктивной системы женщин занимают 38,8%, поэтому решение этой проблемы имеет важнейшее значение для решения демографических и экономических задач [1]. Предрасположенность пациентов к наследственным заболеваниям РМЖ и РЯ известна как «синдром наследственного рака молочной железы и яичников» (Hereditary Breast and Ovarian Cancer – НВОС или НРМЖЯ). Принято считать, что синдром НРМЖЯ является результатом герминальных мутаций в генах *BRCA1* или *BRCA2*. Однако и другие гены или их аллельные состояния с более низкой степенью пенетрантности могут быть связаны с клиническим фенотипом НРМЖЯ. Растет понимание того, что взаимосвязь между кластером генов *BRCA* и анемией Фанкони (АФ), генов репарации ошибочно спаренных оснований (MMR) и статусом генов репарации ДНК играет ключевую роль в патогенезе синдромов предрасположенности к возникновению этих опухолей [2].

Наследственные РМЖ и РЯ составляют 5–10% от всех случаев этих заболеваний. Пожизненный риск развития РМЖ у носителей герминальных мутаций в генах *BRCA1/2* составляет 60–80% и, соответственно, для рака яичников – 20–40% [3].

Целью данного обзора служило расширение знаний специалистов в области онкологии и клинической диагностики стремительно расширяющегося спектра молекулярно-генетических маркеров наследственных РМЖ и РЯ.

Проведен компьютеризированный поиск литературы в электронных базах данных MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), Scopus (<https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic#basic>), Web of Science (https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) опубликованных в период с января 1994 г. по май 2021 г. с использованием ключевых слов: «hereditary breast and ovarian cancer», «BRCA» и «DNA repair». В зависимости от поисковой базы данных использовались различные комбинации терминов. Каждый ген был также связан со страницами NCBI Entrez Gene [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. Для детализации в каждой статье был произведен поиск ссылок на дополнительные источники.

Нарушение систем репарации ДНК. Генетические и эпигенетические мутации, сопровождающиеся утратой функций генов, участвующих в репарации повреждений ДНК, приводят к повышенному риску развития широкого спектра онкологических заболеваний, в том числе НРМЖ и НРЯ [4]. Далеко не во всех случаях НРМЖ и НРЯ удаётся обнаружить герминальные мутации в генах *BRCA1/2*, особенно с использованием стандартных клинических наборов. Для объяснения этого феномена была предложена концепция «BRCAness». Каноническое определение фенотипа онкопатологии BRCAness (BRCA-подобный) – это наличие дефектов в системе репарации ДНК, в частности гомологичной рекомбинации, имитирующие функциональную утрату генов *BRCA1* или *BRCA2* (за исключением синонимичных

¹Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries Freddie Bray, BSc, MSc, PhD; Jacques Ferlay, ME; Isabelle Soerjomataram, MD, MSc, PhD et al. CA CANCER J. CLIN.; 2018.

замен) [3]. Клетки, несущие мутации в генах *BRCA1/2*, проявляют признаки нарушения путей репарации ДНК, что вызывает у них повышенную геномную нестабильность, которая может быть ответственной за повышенную чувствительность к ДНК-повреждающим агентам (например, препаратам платины), и ингибиторам поли(АДФ) – рибозо-полимеразы (PARP) [4]. С точки зрения клинической значимости герминальных мутаций, ответственных за предрасположенность к развитию нРМЖ и нРЯ, их обычно классифицируют на 3 группы: мутации в генах высокой пенетрантности, мутации в генах средней и низкой степени пенетрантности. Однако клиническое значение мутаций в генах нРМЖ и нРЯ определяется также и таким показателем, как частота встречаемости данной мутации в популяции.

Мутации в генах высокой степени пенетрантности. К этой категории традиционно относятся мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, а также мутации в генах *TP53*, *STK11*, *PTEN* и *CDH1*. Наличие герминальных мутаций в этих генах ассоциировано приблизительно с 20% всех случаев нРМЖ и нРЯ [5].

Гены *BRCA1* и *BRCA2*. Риск развития нРМЖ и нРЯ у носителей этих герминальных мутаций приблизительно в 10–20 раз выше (Relative Risk или $RR \geq 10$), чем у пациентов, не несущих этих мутаций в генах *BRCA*. Средняя распространенность носителей мутаций в генах *BRCA* в мировой популяции составляет от 1:800 до 1:1000 [6]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* принадлежат к семейству генов-супрессоров опухолей, поскольку они обладают способностью выполнять репарацию двух-цепочечных разрывов ДНК с использованием механизмов гомологичной рекомбинации (HR). По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=BRCA1%5Bgene%5D>) для гена *BRCA1* на сегодняшний день известны 12126 генетических полиморфизмов, а для гена *BRCA2* – 13810. Таким образом полиморфизм генов *BRCA1/2* демонстрирует очень высокие показатели. Это наглядно свидетельствует о большом разнообразии аллельных вариантов и очень высокой степени полиморфизма этих генов, которые могут быть использованы в клинических исследованиях и которые не могут быть обнаружены с использованием стандартных клинических RT-PCR наборов. Однако не все эти полиморфизмы имеют статус патогенных.

В одном из исследований были объединены мета-данные родословных из 22 исследований с участием 8139 первичных случайных пациентов, с женским (86%), мужским (2%) РМЖ или эпителиальным РЯ (12%), у 500 (6%) из которых были обнаружены герминальные мутации в генах *BRCA1* или *BRCA2*. Средний кумулятивный относительный риск развития (RR) заболевания у носителей мутации *BRCA1* к возрасту 70 лет составлял в среднем 65% для РМЖ и 39% – для РЯ. Соответствующие оценки для *BRCA2* составляют 45% и 11% соответственно. Также, по данным этого исследования (мета-анализ) RR развития РМЖ значительно снижается с возрастом для носителей мутации *BRCA1*, но не для носителей мутации *BRCA2* [7].

Ген *STK11*. Функция STK11 при малигнизации клеток, как правило, инактивирована. Сигнальный путь STK11-AMPK служит контрольной точкой метаболизма в клетке, останавливая рост клеток в условиях низких уровней внутриклеточной АТФ, например, в условиях с низким содержанием питательных веществ. Одним из центральных митогенных путей, который подавляется

передачей сигналов STK11 и AMPK, является сигнальный путь комплекса mTOR. Активация передачи сигналов STK11-AMPK может способствовать уменьшению риска развития опухоли [8].

При наличии функционально значимых герминальных мутаций в гене *STK11* пожизненный риск развития РМЖ к 60 годам в среднем составляет 32–54%. Также носители мутаций в гене *STK11* имеют совокупный риск развития любого другого онкологического заболевания в течение жизни до 85%. Ген *STK11* действует как опухолевый супрессор. Утрата или понижение активности *STK11* связана с очень агрессивным *HER2/neu* позитивным РМЖ. При наличии герминальных мутаций в гене *STK11*, наблюдается манифестация синдрома Пейтца-Егерса (СПЕ, OMIM # 175200), а также РМЖ. СПЕ — это относительно редкое наследственное аутосомно-доминантное полипозное заболевание с повышенным риском онко-трансформации. Мутации в гене *STK11*, обнаруженные при СПЕ, активизируют экспрессию циклина D1, что приводит к увеличению клеточной пролиферации и росту опухолевой массы. Низкая экспрессия гена *STK11* при спорадическом РМЖ в значительной степени связана с более короткой выживаемостью пациентов. Описана 41-летняя пациентка с агрессивным РМЖ (СПЕ), которая имела не только герминальную мутацию в гене *STK11*, но и утрату гомологичного нормального аллеля этого гена. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=STK11+%5Bgene%5D>) для гена *STK11* на сегодняшний день известны 1782 генетических полиморфизмов, только часть из которых (но весьма немалая) имеет статус патогенных. [9]

Ген *PTEN*. Герминальные мутации в гене *PTEN* связаны с возникновением относительно редкого PTEN-ассоциированного наследственного синдрома развития гамартормных опухолей (The PTEN hamartoma tumor syndrome – PHTS). Это заболевание охватывает относительно широкий клинический спектр наследственных заболеваний, включая синдром Коудена (СК), Коуден-подобный синдром (КПС), синдром Банаян – Райли – Рувалькабы, а также синдром Протея и Протей-подобный синдромы. Оценочный риск развития РМЖ для женщин с герминальными мутациями в гене *PTEN* составляет 70–90% и клинически аналогичны тем, которые указаны для пациентов с герминальными мутациями в генах *BRCA1/2*. Пациенты с РМЖ с выявленной герминальной мутацией в гене *PTEN* подвергаются также повышенному риску развития рака эндометрия, щитовидной железы, почек и толстой кишки. В остальном синдром характеризуется множественными гамартромами желудочно-кишечного тракта, макроцефалией и доброкачественными опухолями, такими как липомы. Ген *PTEN* кодирует многофункциональный белок, участвующий в работе сигнального пути PI3K/AKT-mTOR. Истинная распространенность СК остается в значительной степени неизвестной, поскольку в литературе встречается такая оценка как 1 случай на 200 000 человек, что, вероятно, является заниженным показателем. Выяснение истинной распространенности PHTS оказалось трудным, поскольку многие люди могут оставаться не диагностированными из-за незначительных фенотипических проявлений и вариабельности их состояния. Около 80% пациентов, которые соответствовали строгим диагностическим критериям PHTS, имели герминальную мутацию в гене *PTEN*. Для пациентов с PHTS, у которых не была обнаружена герминальная мутация в гене *PTEN* за-

родышевой линии, можно предположить, что несколько других генов могут участвовать в качестве модификаторов риска развития этого онкологического заболевания. Также нельзя исключать и популяционный полиморфизм этого гена. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=PTEN+%5Bgene%5D>) для гена *PTEN* на сегодняшний день известны 2200 генетических полиморфизмов, часть из которых (но весьма немалая) имеет статус патогенных, несмотря на заявленный статус гамартомных [10].

Ген *SDHI*. Герминальные мутации в субъединицах комплекса сукцинат-дегидрогеназы, или в гене *SDHI*, встречаются приблизительно у 8% индивидуумов с СК и КПС с отрицательными результатами наличия мутаций в гене *PTEN*. У 6% пациентов, положительных по результатам тестов мутаций в гене *PTEN*, также были обнаружены герминальные мутации в гене *SDHI*. У лиц с наличием мутаций в гене *SDHI* повышен риск развития РМЖ, а также почек и щитовидной железы. Причем величина этого риска выше, чем у лиц с идентифицированной мутацией в гене *PTEN* [11].

Ген *CDH1*. Высокий риск развития РМЖ также связан с наличием герминальных мутаций в гене Е-кадгерина (*CDH1*, не путать с белком-активатором APC/C *CDH1*). Ген *CDH1* также относится к опухолевым супрессорам. Ген *CDH1* кодирует белок, который ответственен за межклеточную адгезию и супрессию клеточной инвазии. Функционально значимые герминальные мутации в гене *CDH1* встречаются у пациентов с наследственным диффузным раком желудка (НДРЖ). Носители усеченных вариантов этого белка имеют очень высокий риск развития диффузной карциномы желудка в молодом возрасте и, кроме того, RR развития РМЖ составляет величину равную 6,6. Существуют экспериментальные доказательства наличия лобулярного РМЖ как первого симптома HDGC. Значимые мутации в гене *CDH1* были выявлены у женщин с двусторонним дольковым РМЖ, у которых в семейном анамнезе не было диффузного рака желудка. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CDH1+%5Bgene%5D>) для гена *CDH1* на сегодняшний день известны 2744 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных [12].

Гены *AKT1* и *PIK3CA*. Приблизительно одиннадцать процентов пациентов с СК и КПС, не имеющие герминальных мутаций в генах *PTEN/SDHI/KILLIN*, являются носителями герминальных мутаций либо в гене *AKT1* (РАС-альфа серин/треонин-протеин киназа), либо в *PIK3CA*. В работе китайских исследователей на китайской популяции пациентов были изучены опухоли 507 пациентов с РМЖ из больниц Западного Китая в период с 2008 по 2013 годы. В свежемороженых опухолях были исследованы полные экзомы генов *AKT1* и *PIK3CA* с использованием метода NGS, а также была проанализирована взаимосвязь между наличием/отсутствием мутаций *PIK3CA/AKT1* и клинико-патологическими особенностями пациентов. Мутации в гене *AKT1* были обнаружены у 3,6% (18/507) пациентов. Опухоли, ассоциированные с мутациями в гене *AKT1*, имели люминальный молекулярно-биологический подтип и в большинстве случаев проявляли высокие уровни экспрессии гена *Ki67*. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=AKT1+%5Bgene%5D>) для гена *AKT1* на сегодняшний день известны 334 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус па-

тогенных. Мутации в гене *PIK3CA* проявлялись в 46,5% (236/507), и 6,9% пациентов (35/507) были носителями двух или трех вариантов аллелей *PIK3CA*. Наличие мутаций в гене *PIK3CA* также было связано с гормон-зависимым статусом опухоли. Прогноз пациентов с наличием одной мутации в гене *PIK3CA* (или *PIK3CA/AKT1*) существенно не отличался от прогноза пациентов с *PIK3CA* дикого типа (или *PIK3CA/AKT1*), в то время как у пациентов с двумя или тремя вариантами мутаций в гене *PIK3CA* (или *PIK3CA/AKT1*) имели место худшие показатели общей выживаемости. У пациентов с РМЖ в китайской популяции наблюдается высокая частота встречаемости соматических мутаций в гене *PIK3CA*. Мутационная нагрузка опухолей в генах *PIK3CA* и *AKT1* должна вызывать беспокойство, поскольку повышенная частота детектируемых мутаций в этих генах может быть связана с неблагоприятным прогнозом [13]. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=PIK3CA+%5Bgene%5D>) для гена *PIK3CA* на сегодняшний день известны 480 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных.

Таким образом, пациенты с отрицательным результатом теста на герминальные мутации в гене *PIK3CA* могут иметь изменения в других генах-модификаторах, не включенных в большинство панелей NGS и, тем более RT-PCR, специфичных для РМЖ.

Ген *TP53*. Синдром Ли – Фраумени (ЛФС) вызывается наличием герминальных мутаций в генах *TP53* (ЛФС1) и *CHEK2* (ЛФС2). Этот синдром приводит к очень ранней манифестации РМЖ. Более 70% семей с ЛФС1 имеют мутации в гене *TP53*. Важность распознавания этого синдрома заключается в том, что женщины с ЛФС имеют более высокий риск развития злокачественных новообразований, поэтому им не следует проходить лучевую терапию. Только <0,1% случаев РМЖ вызваны ЛФС1, однако в случаях с мутациями в гене *TP53*, RR развития РМЖ составляет от 18 до 60, по сравнению с общей популяцией лиц моложе 45 лет [14]. Бразильскими клиницистами было проведено исследование, связанное с комплексным нРМЖ и нРЯ, обусловленными наличием герминальных мутаций в генах *BRCA1/2*, *CHEK2* и *TP53*. Мутационный статус этих генов у 44 пациентов с высоким риском нРМЖ и нРЯ по данным семейного анамнеза был проверен методом HRM (High Resolution Melt) и подтвержден последующим секвенированием. В рамках проведенного исследования в генах *BRCA* были идентифицированы 46 вариантов герминальных мутаций, 38 из которых не имели клинического значения и 8 патогенных мутаций, включая новую патогенную мутацию в гене *BRCA1* (с.4688_4694delACCTGGGinsG). Наиболее распространенной патогенной мутацией была с.4829_4830delTG в гене *BRCA2*. Эта мутация ранее не была описана в популяции Бразилии, и в этом исследовании она встречалась с частотой 6,8%. Также была обнаружена мутация p.R337H в гене *TP53* у одного пациента с клиническим диагнозом комплексного нРМЖ и нРЯ и без клинических критериев синдрома Ли-Фраумени. В гене *CHEK2* был обнаружен неописанный патогенный вариант мутации с.485A>G. Таким образом, патогенные мутации были обнаружены у 29,5% пациентов: у 11,3% – в гене *BRCA1*, у 15,9% – в гене *BRCA2* и у 2,3% – в гене *TP53*. Авторы исследования пришли к выводу о том, что бразильская популяция является одной из самых неоднородных в мире, и знание мутационного профиля генов, связанных с комплекс-

ным нРМЖ и нРЯ, из разных регионов может способствовать определению более экономически эффективных стратегий профилактики, выявления и лечения рака [15]. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=TP53+%5Bgene%5D>) для гена *TP53* на сегодняшний день известны 2240 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных.

Гены средней пенетрантности. У значительной части женщин с наследственными РМЖ/РЯ или раком маточных труб, имеющих в семейном анамнезе наследственные заболевания, мутации в генах с высокой степенью пенетрантности (например, *BRCA 1/2*) не детектируются. Причина этого может заключаться в наличии герминальных мутаций в таких генах, как *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, гены анемии Фанкони, а также ген *PALB2*. Все эти гены также участвуют в репарации повреждений ДНК. Эти группы генетических вариантов, связанных с наследственными РМЖ и РЯ, имеют частоту встречаемости минорных аллелей (MAF) 0,005–0,01 и увеличивают RR развития данной патологии от 2 до 4 раз. Эти мутации не являются полностью пенетрантными, что означает, что у некоторых членов семьи, унаследовавших мутацию предрасположенности к раку, опухолевый процесс может не развиваться в течение всей жизни [16].

Ген ATM. Первоначально ген *ATM* был идентифицирован на основании его измененного мутационного статуса у пациентов с А-Т. Клетки от пациентов с атаксией-телеангиэктазией при воздействии ионизирующего излучения демонстрируют повышенное количество двунитевых разрывов ДНК и снижение выживаемости в клонированных анализах. А-Т возникает в результате биаллельных мутаций в гене *ATM*, которые приводят к низким или неопределяемым уровням продукции белка *ATM*. Из 1345 мутаций, зарегистрированных у пациентов с А-Т, перечисленных в базе данных мутаций *ATM*, более 80% укорачивают белок. Ген *ATM* кодирует белок – серин/треониновую протеинкиназу *ATM*, которая активируется при возникновении разрывов в ДНК, а также играет важную роль в фосфорилировании белков, регулирующих процессы апоптоза, репарации ДНК, блокировке клеточного цикла. Мутированный ген *ATM* приводит к наследственному заболеванию – атаксии-телеангиэктазии (А-Т), а также к развитию других злокачественных новообразований. Наблюдается приблизительно 25% увеличение риска развития РМЖ у пациентов, если они гетерозиготы по патогенному варианту гена *ATM*. Этим пациентам следует проходить ежегодный маммографический скрининг, начиная, по меньшей мере, с 40-летнего возраста. Более того, для женщин этой группы, имеющих отягощенный семейный анамнез РМЖ, необходимо проводить ранний скрининг методами магнитно-резонансной томографии и маммографии. Функционально значимые герминальные мутации в гене *ATM*, с клинической точки зрения, проявляют пенетрантность при РМЖ на уровне приблизительно 15%. Гетерозиготы *ATM* являются причиной повышенного риска развития РМЖ. Пациенты с А-Т имеют высокую частоту заболеваемости лимфо-пролиферативными заболеваниями, обычно развивающегося в первые два десятилетия жизни. У пожилых пациентов повышен риск развития солидных опухолей, включая РМЖ и рак желудка. У родственниц первой степени родства пациентов с А-Т наблюдается повышенная заболеваемость РМЖ. Последующие исследования семей с высоким риском развития РМЖ выявили статистически значимые

связи между гетерозиготностью мутаций в гене *ATM* (то есть мутациями, которые обычно вызывают А-Т) и РМЖ. Аналогичные ассоциации с наличием герминальных мутаций в гене *ATM* наблюдались также при семейном раке желудка и поджелудочной железы. Учитывая, что продукты ряда генов, которые уже вовлечены в риск развития нРМЖ, таких как *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2*, *CHEK2* и *NBN*, либо непосредственно фосфорилируются *ATM*, либо зависят от функции *ATM* для их индуцированного облучением фосфорилирования, значение *ATM*-мутаций в риске развития РМЖ, особенно у лиц, подвергшихся радиационному облучению, весьма высоко. [17] По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=ATM+%5Bgene%5D>) для гена *ATM* на сегодняшний день известны 10089 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных.

Ген BRIP1. *BRIP1* (также известный как *BACH1*) кодирует DEАН хеликазу, которая взаимодействует с доменом *BRCA1* и играет важную роль в *BRCA1*-зависимой ДНК репарации и функционировании точек контроля клеточного цикла, тем самым повышая восприимчивость носителей с мутациями в гене *BRCA1* к развитию РМЖ. Мутации в гене *BRIP1* увеличивают RR развития РМЖ в 2,0 раза. Носители би-аллельных мутаций в гене *BRIP1* подвержены риску заболевания, известного как АФ-Ж. Фенотип пациентов с АФ-Ж отличается от пациентов с биаллельными мутациями в *BRCA2* тем, что они имеют более низкую частоту возникновения солидных опухолей у детей [18]. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=BRIP1+%5Bgene%5D>) для гена *BRIP1* на сегодняшний день известны 3389 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных.

Ген PALB2. Ген *PALB2* кодирует белок, который повышает эффективность репарации ДНК за счет стабилизации и локализации *BRCA2*. Подобно би-аллельным мутациям в гене *BRCA2*, биаллельные мутации в гене *PALB2* приводят к АФ-Н [19]. *PALB2*-дефицитные клетки чувствительны к ингибиторам *PARP* [42]. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=PALB2+%5Bgene%5D>) для гена *PALB2* на сегодняшний день известны 3872 генетических полиморфизма, часть из которых имеет статус патогенных.

Ген CHEK2. Ген *CHEK2* кодирует опухолевый супрессор «чек-пойнт-киназу 2» и играет важную роль в передаче сигнала о повреждении ДНК белкам, которые принимают участие в репарации разрывов двухцепочечной ДНК путем добавления фосфатной группы в *BRCA1* и *p53*, блокировке клеточного цикла и апоптозе. Наследственные мутации в гене *CHEK2*, вносят свой вклад в виде умеренного риска развития РМЖ, рака предстательной железы и других онкологических заболеваний. Было выдвинуто предположение о генетической ассоциации маркеров между раком щитовидной железы и РМЖ. Исследуя возможную ассоциацию между наличием мутаций в гене *CHEK2* и раком щитовидной железы, были генотипированы 468 случайных пациентов с папиллярным раком щитовидной железы и 468 пациентов без рака, взятых в качестве контрольной группы для четырех основных мутаций гена *CHEK2* (1100delC, IVS2 + 1G>A, del5395 и I157T). Результаты продемонстрировали, что мутации в гене *CHEK2* являются предиктивными факторами развития рака щитовидной железы, РМЖ и удваивают RR развития рака

щитовидной железы и РМЖ. Наиболее распространённой герминальной мутацией в гене *CHEK2* является мутация с.1100delC, которая приводит к синтезу укороченного белка и увеличивает относительный риск для развития РМЖ [20]. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CHK2+++%5Bgene%5D>) для гена *CHEK2* на сегодняшний день известны 2534 генетических полиморфизма, часть из которых имеет статус патогенных.

Гены низкой пенетрантности. Герминальные мутации в генах высокой или средней пенетрантности не являются причиной наследственной предрасположенности к РМЖ. Уровень риска развития онкологических заболеваний у людей, являющихся носителями других мутаций, будет определяться серией однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) или вариантов генов с низкой пенетрантностью. Таким образом, предпринимаются попытки идентифицировать дополнительные гены или SNP, в том числе, обнаруженные при РМЖ. Известно, что некоторые из этих генов служат модификаторами *BRCA1* и *BRCA2*. Что касается самих этих генов (*BRCA1* и *BRCA2*), то в них было обнаружено не менее 90 подтвержденных SNP. Исследование риска развития РМЖ в течение жизни показало, что только пять из SNP у носителей мутации *BRCA2* необходимы для определения риска развития РМЖ, и эти SNP повышают его с 45% до 95%. Мутации в генах *RAD51C* и *RAD51D* группы *RAD51* были обнаружены у родственников пациентов с диагнозом РМЖ или РЯ, но не в семьях, которые страдают исключительно РМЖ [21].

Комплекс MRN. Комплекс *MRE11-RAD50-NBS1* (или MRN) известен как комплекс, играющий важную роль в репарации дву-нитевых разрывов ДНК (DSB), путём гомологичной рекомбинации и не гомологичного соединения концов ДНК (non-homologous end joining, NHEJ). В образовании этого комплекса участвуют димеры белков, кодируемых генами *MRE11A*, *RAD50* и *NBN*. Нарушение регуляции передачи сигналов о повреждении ДНК, контрольных точек и путей репарации связано с прогрессированием онкологических заболеваний и ответом на такие генотоксические виды терапии, как ионизирующее излучение и различные химиотерапевтические препараты. Ответ на повреждение ДНК, координируемый комплексом АТМ/MRN, обычно может быть активирован на ранних стадиях различных видов рака, и все больше данных свидетельствует о том, что повреждение ДНК и репликативный стресс, вызванный онкогенами, также могут активировать работу этого комплекса. Таким образом, эффективный ответ на повреждение ДНК считается потенциальным препятствием для развития онкологических заболеваний. Пациенты, несущие гены би-аллельного мутантного комплекса MRN, проявляют повышенную чувствительность к воздействию ионизирующего излучения в виде нарушения систем репарации двунитевых разрывов ДНК и нестабильности генома [22]. Гомозиготные герминальные мутации у пациентов в гене *NBS1* были идентифицированы как синдром неймегеновского или берлинского повреждения (Nijmegen breakage syndrom, NBS). Это редкая ауто-сомно-рецессивная врожденная патология, вызывающая хромосомную нестабильность и проявляющаяся в повышенном риске развития онкологических заболеваний.

NBS1. Среди трех генов, входящих в комплекс MRN (*MRE11*, *RAD50*, *NBS1*) наследственные мутации в гене *NBS1* представляют наиболее убедительные до-

казательства того, что *NBS1* действует как ген предрасположенности к развитию нРМЖ. Гетерозиготные герминальные мутации в генах комплекса MRN могут потенциально приводить к развитию различных типов онкологических заболеваний, таких как РМЖ и РЯ. Инактивирующие мутации в гене *MRE11A* могут приводить к недостаточной экспрессии всех белков комплекса MRN у пациентов с наследственным РМЖ, не имеющих мутаций в генах *BRCA1/2*. Подавление комплекса MRN и его функциональный дефект могут приводить к накоплению повреждений в ДНК, более высокой склонности к дестабилизации клеток и онко-трансформации клеток при развитии опухоли. Сверх-экспрессия белков комплекса MRN связана с устойчивостью к химиолучевому воздействию благодаря его жизненно важной роли в репарации двунитевых разрывов в ДНК. Экспрессия MRN является ключевым фактором, влияющим на ответ раковых клеток на химиотерапию, лучевую терапию и уровень апоптоза. Гомологичная рекомбинационная репарация двуцепочечных разрывов ДНК служит мишенью для разработки соответствующих терапевтических стратегий, например, использования ингибиторов PARP для онкологических заболеваний с мутациями в генах *BRCA1/2* [23]. Дефицит гомологичной рекомбинации, связанный с наличием мутаций в генах комплекса MRN, повышает чувствительность раковых клеток к терапии ингибиторами PARP и, таким образом, может быть применим для обеспечения прогнозирующего биомаркера терапии на основе PARP-ингибиторов. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=MRE11+%5Bgene%5D>) для гена *MRE11* на сегодняшний день известны 1174 генетических полиморфизма, часть из которых имеет статус патогенных. По данным базы ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=RAD50+%5Bgene%5D>) для гена *RAD50* на сегодняшний день известны 2555 генетических полиморфизмов, часть из которых имеет статус патогенных.

Роль митохондриальной ДНК в онкогенезе. Митохондриальная ДНК (мтДНК) является одним из важных регуляторов патогенеза РМЖ и РЯ. При уменьшении количества копий мтДНК снижается экспрессия митохондриальных генов, и ингибируются процессы окислительного фосфорилирования. С другой стороны, герминальные или соматические мутации в мтДНК, путем ингибирования процессов окислительного фосфорилирования, также могут приводить к повышенному риску развития РМЖ, возможно в силу того, что в клетках индуцируются гликолитические процессы, напоминающие эффект Варбурга [24]. Показана потенциальная роль соматических митохондриальных мутаций в развитии онкологических заболеваний. Чтобы проанализировать роль соматических мутаций в митохондриях при РМЖ и определить, коррелирует ли мутационная нагрузка митохондриальной ДНК (мтДНК) с общей выживаемостью (ОВ), была секвенирована полная мтДНК из 92 пар первичных опухолей молочной железы и периферической крови. Всего в опухолях было обнаружено 324 варианта герминальных и 173 соматические мутации. Наиболее распространенным аллелем герминальных мутаций был 663G (12S PНК). Гетероплазмическая нагрузка в опухолях была выше, чем в нормальных тканях. Соматические мутации в мтДНК обнаружены в 73,9% опухолей молочной железы; 59% этих мутаций были локализованы в кодирующей области (66,7% несинонимичных и 33,3% синонимичных мутаций). Хотя ген *COI*

продемонстрировал наибольшее количество мутаций, гены *ТРНК* (Т, С и W), *12S рРНК*, а также *АТР6* также продемонстрировали высокую частоту мутаций. Не было обнаружено никаких специфических мутационных профилей мтДНК, связанных с молекулярными подтипами РМЖ, и не было обнаружено корреляции между мутационной нагрузкой мтДНК и показателями общей выживаемости пациентов [25]. В другом исследовании продемонстрировано значительное более низкое количество копий мтДНК в образцах крови пациентов с РМЖ по сравнению с контрольной (здоровой) группой. В опухолевой ткани наблюдалось значительно большее количество копий мтДНК по сравнению с неопухолевой тканью, что может свидетельствовать об интенсификации процессов окислительного фосфорилирования в опухолевой ткани или о нарушении механизма регуляции копийности мтДНК [26].

Заключение. Рутинные методы клинической диагностики наследственных РМЖ и РЯ на современном этапе предполагают внедрение в клинику быстрых и экономичных методов исследований, таргетирующих ограниченное число генетических локусов с использованием метода RT-PCR [27]. Использование на практике этих методов не учитывает всего многообразия генетических полиморфизмов, ответственных за наследственные РМЖ и РЯ. Это подтверждается результатами полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Studies – GWAS) в клинико-популяционных исследованиях РМЖ и РЯ. Эти исследования позволили дополнительно выявить функционально значимые генетические аллели в генах с высокой (например, *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN* и *CDH1*), средней (*CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2*) или низкой степенью пенетрантности (*MRE11-RAD50-NBS1*, *RAD51*) в разных популяциях или субпопуляциях мира [28]. Эти аллели связаны с предрасположенностью к наследственным онкологическим заболеваниям молочной железы и яичников, вызванные нарушениями молекулярных и клеточных сигнальных путей, участвующих в регуляции многих биологических процессов. Поэтому в нашем обзоре приведены наглядные доказательства наличия многочисленных генетических модификаторов РМЖ и РЯ, которые могут играть существенную роль в патогенезе данного заболевания не только в качестве дополнительных маркеров этих заболеваний, но и в качестве маркеров популяционного полиморфизма уже известных вариантов генетических локусов. Выходом из сложившейся ситуации может быть только разработка и использование клинических наборов для тестирования десятков генов с использованием метода NGS. Однако, медико-генетическое тестирование (МГТ) с использованием метода NGS на сегодняшний день не является стандартом медико-генетического тестирования в РФ. В то же время в зарубежных клинических рекомендациях (NCCN, ESMO) технологии NGS уже рекомендованы для широкого использования в качестве, как основного, так и альтернативного метода тестирования в целях диагностики, определения характеристик и прогноза заболевания, выбора и оценки эффективности терапии. Необходимость внедрения комплексного медико-генетического профилирования с использованием NGS продиктовано множественностью потенциальных генетических мишеней и их популяционным полиморфизмом, обуславливающих предрасположенность к онкологическим заболеваниям и возможностью их использования в качестве

терапевтических мишеней. Только при реализации этого подхода в клинической практике можно будет говорить о персонализированной медицине максимально исключающей ложно-отрицательные выводы о генетической предрасположенности к наследственным онкологическим заболеваниям.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 26, 28, 29
см. REFERENCES)

1. Злокачественные новообразования в России в 2019 году. (Заболеваемость и смертность). Доступно по адресу: <http://www.demoscope.ru/weekly/2021/0889/biblio05.php>.
27. Шатова Ю.С., Чеботарева Е.А., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Водолажский Д.И., Дженкова Е.А. Некоторые клинико-морфологические и молекулярно-генетические аспекты у пациенток с клиническими признаками наследственного рака молочной железы. *Казанский медицинский журнал*. 2018. 99(2): 224-9. Doi: 10.17816/KMJ2018-224.

REFERENCES

1. Malignant neoplasms in Russia in 2019. (Morbidity and mortality). Available at: <http://www.demoscope.ru/weekly/2021/0889/biblio05.php>. (in Russian)
2. Kobayashi H., Ohno S., Sasaki Y., Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). *Oncology reports*. 2013. 30(3):1019-29.
3. Turner N., Tutt A., Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat.Rev. Cancer*. 2004. 4(10): 814-9. Doi: 10.1038/nrc1457.
4. Varol U., Kucukzeybek Y., Alacacioglu A., Somali I., Altun Z., Aktas S. et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J.BUON*. 2018; 23(4): 862-6.
5. Wendt C., Margolin S. Identifying breast cancer susceptibility genes – a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta. Oncol*. 2019. 58(2): 135-46. Doi: 10.1080/0284186X.2018.1529428.
6. Lee E.G., Kang H.J., Lim M.C., Park B., Park S.J., Jung S.Y. et al. Different Patterns of Risk Reducing Decisions in Affected or Unaffected *BRCA* Pathogenic Variant Carriers. *Cancer Res. Treat*. 2019. 51(1): 280-8. Doi: 10.4143/crt.2018.079.
7. Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S., Risch H.A., Eyfjord J.E., Hopper J.L. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet*. 2003. 72(5): 1117-30. Doi: 10.1086/375033.
8. Shackelford D.B., Shaw R.J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nat.Rev.Cancer*. 2009. 9(8): 563-75. Doi: 10.1038/nrc2676.
9. Nakanishi C., Yamaguchi T., Iijima T., Saji S., Toi M., Mori T. et al. Germline mutation of the *LKB1/STK11* gene with loss of the normal allele in an aggressive breast cancer of Peutz-Jeghers syndrome. *Oncology*. 2004. 67(5-6): 476-9. Doi: 10.1159/000082933.
10. Macken W.L., Tischkowitz M., Lachlan K.L. PTEN Hamartoma tumor syndrome in childhood: A review of the clinical literature. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet*. 2019. 181(4): 591-610. Doi: 10.1002/ajmg.c.31743.
11. Yehia L., Ni Y., Feng F., Seyfi M., Sadler T., Frazier T.W. et al. Distinct Alterations in Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites Associate with Cancer and Autism Phenotypes in Cowden Syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 2019. 105(4): 813-21. Doi: 10.1016/j.ajhg.2019.09.004.
12. Corso G., Intra M., Trentin C., Veronesi P., Galimberti V. *CDH1* germline mutations and hereditary lobular breast cancer. *Fam.Cancer*. 2016. 15(2): 215-9. Doi: 10.1007/s10689-016-9869-5. PMID: 26759166.
13. Deng L., Zhu X., Sun Y., Wang J., Zhong X., Li J. et al. Prevalence and Prognostic Role of *PIK3CA/AKT1* Mutations in Chinese Breast Cancer Patients. *Cancer Res. Treat*. 2019. 51(1): 128-40. Doi: 10.4143/crt.2017.598.

14. Schon K., Tischkowitz M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: *TP53*. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018. 167 (2): 417-23. Doi: 10.1007/s10549-017-4531-y.
15. Cipriano N.M. Jr, de Brito A.M., de Oliveira E.S., de Faria F.C., Lemos S., Rodrigues A.N. et al. Mutation screening of *TP53*, *CHEK2* and *BRCA* genes in patients at high risk for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) in Brazil. *Breast Cancer*. 2019. 26(3): 397-405. Doi: 10.1007/s12282-018-00938-z.
16. Lima Z.S., Ghadamzadeh M., Arashloo F.T., Amjad G., Ebadi M.R., Younesi L. Recent advances of therapeutic targets based on the molecular signature in breast cancer: genetic mutations and implications for current treatment paradigms. *J.Hematol.Oncol.* 2019. 12(1): 38. Doi: 10.1186/s13045-019-0725-6.
17. Tung N.M., Boughey J.C., Pierce L.J., Robson M.E., Bedrosian I., Dietz J.R. et al. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *J. Clin.Oncol.* 2020. 38(18): 2080-2106. Doi: 10.1200/JCO.20.00299.
18. Seal S., Thompson D., Renwick A., Elliott A., Kelly P., Barfoot R. et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene *BRIP1* are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat.Genet.* 2006. 38(11): 1239-41. Doi: 10.1038/ng1902.
19. Antoniou A.C., Casadei S., Heikkinen T., Barrowdale D., Pylkäs K., Roberts J. et al. Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *The New England Journal of Medicine*. 2014. 371 (6): 497-506. Doi:10.1056/NEJMoa1400382.
20. Siołek M., Cybulski C., Gąsior-Perczak D., Kowalik A., Kozak-Klonowska B., Kowalska A. et al. *CHEK2* mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int. J. Cancer*. 2015. 137(3): 548-52. Doi: 10.1002/ijc.29426.
21. Sullivan M.R., Bernstein K.A. RAD-ical New Insights into *RAD51* Regulation. *Genes (Basel)*. 2018. 9(12): 629. Doi: 10.3390/genes9120629.
22. Bian L., Meng Y., Zhang M., Li D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Mol. Cancer*. 2019. 18(1): 169. Doi: 10.1186/s12943-019-1100-5.
23. Pilié P.G., Gay C.M., Byers L.A., O'Connor M.J., Yap T.A. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond *BRCA*-Mutant Cancers. *Clin. Cancer Res.* 2019. 25(13): 3759-71. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0968.
24. Luo Y., Ma J., Lu W. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(16): 5598. Doi: 10.3390/ijms21165598.
25. Pérez-Amado C.J., Tovar H., Gómez-Romero L., Beltrán-Anaya F.O., Bautista-Piña V., Dominguez-Reyes C. et al. Mitochondrial DNA Mutation Analysis in Breast Cancer: Shifting From Germline Heteroplasmy Toward Homoplasmy in Tumors. *Front. Oncol.* 2020; 10: 572954. Doi: 10.3389/fonc.2020.572954.
26. Rai N.K., Panjwani G., Ghosh A.K., Haque R., Sharma L.K. Analysis of mitochondrial DNA copy number variation in blood and tissue samples of metastatic breast cancer patients (A pilot study). *Biochem.Biophys. Rep.* 2021. 26: 100931. Doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100931.
27. Shatova Yu.S., Chebotareva E.A., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Vodolazhskiy D.I., Dzhenkova E.A. Some clinical, morphological and molecular genetic aspects in patients with clinical signs of hereditary breast cancer. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018. 99(2): 224-9. Doi: 10.17816/KMJ2018-224. (in Russian)
28. Michailidou K., Lindström S., Dennis J., Beesley J., Hui S., Kar S. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature*. 2017. 551(7678): 92-4.
29. Nielsen F.C., van Overeem H.T., Sørensen C.S. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat. Rev.Cancer*. 2016. 16(9): 599-612.