

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.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67

10 • 2022

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

ОКТАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостановская 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 05.09.2022.
Подписано в печать 30.09.2022.
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.wakc.ru,
www.pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 10. 557–620.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА,
А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ,
Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответст-
венный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

И.И. АНДРЕЕВА (Ростов-на-Дону), А.Н. АРИПОВ
(Ташкент), Т.В. ВАВИЛОВА (Санкт-Петербург),
I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль), А.Ж. ГИЛЬМА-
НОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красноярск), В.С. ГУДУМАК
(Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва), В.А. ДЕЕВ (Киев),
Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (Барнаул),
А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Швеция, Сток-
гольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург),
К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗЛОВ (Санкт-Петербург),
Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск),
А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Мо-
сква), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), 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 (Алма-
ты), С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ
(Москва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРО-
ВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 67
10 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

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,
L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA
(executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

I.I. Andreeva (Rostov-on-Don), 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. EL-
CHANINOVA (Barnaul), A.V. INDUTNY (Omsk), A. KALLNER
(Sweden, Stockholm), A.I. KARPITCHENKO (Sankt-Peter-
burg), K.P. KASHKIN (Moscow), A.V. KOZLOV (Sankt-Peter-
burg), G.V. KORSHUNOV (Saratov), G.M. KOSTIN (Minsk),
A.G. KOCHETOV (Moscow), N.E. KUSHLINSKII (Mos-
cow), G.G. LUNEVA (Kiev), 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 (Almaty),
S.V. TSVIRENKO (Ekaterinburg), A.N. SHIBANOV (Mos-
cow), V.L. EMANUEL' (Sankt-Peterburg), G.A. YAROVAYA
(Moscow)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гаранина В.Д., Щербинина А.Е., Калюжная Е.Н., Шароян Ю.А., Капустина А.А., Гапон Л.И., Ярославская Е.И.
Характеристика биомаркеров крови при проспективном наблюдении пациентов с сердечно-сосудистой патологией в сочетании с сахарным диабетом типа 2, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию561

Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Абаев В.М., Вотякова О.М., Османов Е.А., Кушлинский Н.Е.
Биохимический профиль множественной миеломы Бенс-Джонса570

ИММУНОЛОГИЯ

Мамонова И.А., Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю., Бондаренко А.С., Шпиняк С.П.
Оценка системного иммунного ответа у больных с воспалительными осложнениями протезирования крупных суставов.575

МИКРОБИОЛОГИЯ

Каргальцева Н. М., Борисова О. Ю., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Карпова Е.И., Данищук О.И., Сапронова Е.В., Петрачкова Е.А., Пименова А.С., Гадуа Н.Т., Чагина И.А.
Лабораторная диагностика внегоспитальной инфекции кровотока при терапевтической патологии. . .581

Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю.
Анализ уровня ортопедической реабилитации при изучении микробиома и оценке степени фиксации съёмных пластиночных протезов.588

Шпицына И.В., Осипова Е.В.
Влияние β-лактамов антибиотиков на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом.594

Садеков Т.Ш., Бойко А.Н., Омарова М.А., Роговский В.С., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Миронов А.Ю.
Оценка структуры микробиома человека при рассеянном склерозе по концентрациям микробных маркёров в крови600

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Арзуманян В.Г., Заборова В.А., Ильина И.В., Миронов А.Ю., Лепетинский И.С., Васильева Г.В.
Клиническая лабораторная диагностика возрастных изменений микробиоты стоп методом микроскопии607

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Сударинов А.Б., Сидорова Ю.С., Поспелова Т.И., Колесникова М.А., Капорская Т.С., Лыскова В.А.
Исследование мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови.613

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Petelina T.I., Musikhina N.A., Garanina V.D., Shcherbinina A.E., Kalyuzhnaya E.N., Sharoyan Y.A., Kapustina A.A., Gapon L.I., Yaroslavskaya E.I.*
Characterization of blood biomarkers in prospective follow-up of patients with cardiovascular pathology in combination with type 2 diabetes mellitus after COVID-19 associated pneumonia561
- Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Abaev V.M., Votyakova O.M., Osmanov E.A., Kushlinskii N.E.*
Biochemical profile of Bence-Jones type multiple myeloma570

IMMUNOLOGY

- Mamonova I.A., Babushkina I.V., Ulyanov V.Yu., Bondarenko A.S., Shpinyak S.P.*
Assessment of the systemic immune response in patients with inflammatory complications of large joint implants 575

MICROBIOLOGY

- Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Karpova E.I., Danishuk O.I., Sapronova E.V., Petrachkova E.A., Pimenova A.S., Gadua N.T., Chagina I.A.*
Laboratory diagnosis of community-acquired bloodstream infection in therapeutic pathology.581
- Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu.*
Analysis of the level of optopedical rehabilitation in studying the microbiome and evaluation of the degree of fixation of removable plated prosthesis.588
- Shipitsyna I. V., Osipova E. V.*
Influence of β -lactam antibiotics on the activity of *K. pneumoniae* bacteria biofilm forms isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis.594
- Sadekov T.Sh., Boyko A.N., Omarova M.A., Rogovsky V.S., Zhilenkova O.G., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu.*
Evaluation of the structure of the human microbiome in multiple sclerosis by the concentrations of microbial markers in the blood600

GENERAL CLINICAL METHODS

- Arzumanyan V. G., Zaborova M.A., Il'ina I.V., Mironov A. Yu., Lepetinsky I.S., Vasilieva G.V.*
Age changes of foot microbiome estimated by microscopy method607

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Mikhalev M.A., Olkhovik T.I., Sudarikov A.B., Sidorova Yu.S., Pospelova T.I., Kolesnikova M.A., Kaporskaya T.S., Lyskova V.A.*
Study of mRNA of *WT1*, *BAALC*, *EVI1*, *PRAME* and *HMG2* genes in whole blood samples.613

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гаранина В.Д., Щербинина А.Е., Калюжная Е.Н., Шароян Ю.А., Капустина А.А., Гапон Л.И., Ярославская Е.И.

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОМАРКЕРОВ КРОВИ ПРИ ПРОСПЕКТИВНОМ НАБЛЮДЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 АССОЦИИРОВАННУЮ ПНЕВМОНИЮ

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

Исследование особенностей и динамики лабораторных биомаркеров у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) при наличии сахарного диабета типа 2, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию, имеет большое клиническое значение для предупреждения риска нежелательных событий. В исследование включено 65 пациентов. Выделены 2 группы: 1-я группа пациенты с ССЗ (АГ в сочетании с ИБС) без сахарного диабета типа 2 (СД 2 (n=45)), 2-я – пациенты с ССЗ и СД 2 (n=20). Обследование пациентов проводилось на исходной точке в инфекционном моногоспитале и в точке 3 месяца после выписки из стационара. Оценивали: параметры общего анализа крови; биохимические и неспецифические воспалительные параметры крови; эластические свойства сосудистой стенки. Во 2-ой группе пациентов с СД2 было зарегистрировано превышение уровня лейкоцитарных показателей и изменение их индексных коэффициентов – повышение отношения NLR (нейтрофилы/лимфоциты) и снижение соотношения LYM/CRP (лимфоциты/С реактивный белок); из биохимических показателей – превышение исходных концентраций АСТ, АЛТ, ЛДГ, ферритина; из воспалительных неспецифических параметров – превышение уровня max CRP, высокочувствительного-СБР (вч-СРБ), интерлейкина 1β (ИЛ1β), фактора некроза опухоли – ФНОα и уровня NT-proBNP, что свидетельствует о наличии в данной группе пациентов более выраженного сосудистого воспалительного потенциала для развития сердечно-сосудистых событий в постковидном периоде. Методом множественной регрессии показано, что СД2 является независимым фактором риска повышения жесткости сосудистой стенки. Таким образом, динамический контроль лабораторных параметров имеет прогностическую ценность в оценке характера течения COVID-19 ассоциированной пневмонии у пациентов с ССЗ с наличием или отсутствием СД2 и может быть использован для разработки алгоритма мониторинга пациентов с целью своевременного предупреждения отсроченных сердечно-сосудистых событий.

Ключевые слова: COVID-19; биомаркеры; сердечно-сосудистые заболевания; сахарный диабет типа 2.

Для цитирования: Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гаранина В.Д., Щербинина А.Е., Калюжная Е.Н., Шароян Ю.А., Капустина А.А., Гапон Л.И., Ярославская Е.И. Характеристика биомаркеров крови при проспективном наблюдении пациентов с сердечно-сосудистой патологией в сочетании с сахарным диабетом типа 2, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 561-569. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-561-569

Для корреспонденции: Петелина Татьяна Ивановна, д-р мед.наук, вед. науч. сотр. отделения артериальной гипертензии и коронарной недостаточности научного отдела клинической кардиологии ТКНЦ; e-mail: petelina@infarkta.net

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.06.2022

Принята к печати 01.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Petelina T.I., Musikhina N.A., Garanina V.D., Shcherbinina A.E., Kalyuzhnaya E.N., Sharoyan Y.A., Kapustina A.A., Gapon L.I., Yaroslavskaya E.I.

CHARACTERISTICS OF BLOOD BIOMARKERS IN THE PROSPECTIVE FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY IN COMBINATION WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AFTER COVID-19 ASSOCIATED PNEUMONIA

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, 625026.

The study of the characteristics and dynamics of laboratory biomarkers in patients with cardiovascular diseases (CVD) with type 2 diabetes mellitus who underwent COVID-19-associated pneumonia is of great clinical importance for preventing the risk of adverse events. IN the study we used data from 65 patients in the present work. Patients were divided into 2 groups: group 1 included patients with CVD: arterial hypertension (AH) in combination with coronary artery disease (CAD) without DM2 (n=45), group 2 included patients with CVD and DM2 (n=20). Patients were examined at baseline in the infectious disease hospital and 3 months after discharge. During laboratory examination of blood biosamples we evaluated parameters of general blood test; biochemical and immunological parameters; elastic properties of the vascular wall. The analyzed leukocyte parameters and their index coefficients – increase in NLR ratio (neutrophils/lymphocytes) and decrease in LYM/CRP ratio (lymphocytes/CRP) were more significantly changed in DM2 group. Patients in both groups had a significant excess of baseline max CRP concentrations with decrease in parameters after 3 months, but with persistent excess values in group 2. Three months after discharge patients with

DM2 had levels of hs-CRP, IL-1 β and TNF α and NT-proBNP, that exceeded both the reference values and those in group 1, which reflected the presence of more pronounced vascular inflammatory potential for possible adverse events in this group of patients in post-COVID period. The method of multiple regression showed that DM2 is an independent risk factor for increased stiffness of the vascular wall. Thus, dynamic control of laboratory parameters has prognostic value in assessing the nature of the course of COVID-19 associated pneumonia in patients with CVD and DM2 developing an algorithm for personalized monitoring of patients in the post-COVID period with the aim of timely prevention of unwanted vascular complications.

Key words: COVID-19; biomarkers; cardiovascular diseases; diabetes mellitus.

For citation: Petelina T.I., Musikhina N.A., Garanina V.D., Shcherbinina A.E., Kalyuzhnaya E.N., Sharoyan Y.A., Kapustina A.A., Gapon L.I., Yaroslavskaya E.I. Characterization of blood biomarkers in prospective follow-up of patients with cardiovascular pathology in combination with type 2 diabetes mellitus after COVID-19 associated pneumonia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 561-569 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-561-569

For correspondence: Petelina Tatiana Ivanovna, MD, Leading Researcher of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency of the Scientific Department of Clinical Cardiology, Tyumen Cardiological Research Center; e-mail: petelina@infarkta.net

Information about the authors:

Petelina T.I., <https://orcid.org/0000-0001-6251-4179>;
Musikhina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9607-7245>;
Garanina V.D., <https://orcid.org/0000-0002-9232-5034>;
Shcherbinina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2056-2217>;
Kalyuzhnaya E.N., <https://orcid.org/0000-0003-4212-0433>;
Sharoyan Y.A., <https://orcid.org/0000-0002-5923-7227>;
Kapustina A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0587-0991>;
Gapon L.I., <https://orcid.org/0000-0002-3620-0659>;
Yaroslavskaya E.I., <https://orcid.org/0000-0003-1436-8853>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.06.2022

Accepted 01.07.2022

Published 14.10.2022

Введение. Получив статус пандемии, новая коронавирусная инфекция показала, как SARS-CoV-2 может влиять на пациентов, вовлеченных в другие неинфекционные эпидемии, уже многие годы набирающие темп [1,2].

Известно, что уязвимыми категориями людей, подверженных COVID-19, являются пациенты с тяжелыми хроническими заболеваниями, такими, как болезнь сердца и сосудов (ишемическая болезнь сердца (ИБС), артериальная гипертензия (АГ), цереброваскулярные заболевания), обструктивные заболевания легких, хроническая болезнь почек, и конечно же, сахарный диабет. По данным ряда литературных источников известно, что риски заболеть COVID-19 у больных с СД не превышают таковые риски в общей популяции, однако, если человек с СД уже инфицирован, то болезнь у него течет гораздо тяжелее, чем у пациентов, не имеющих СД, и частота смертельных исходов у пациентов с СД значимо выше [3,4]. Отягощение течения COVID-19 при ССЗ и СД неоднократно анализировалось в научных статьях [1-6]. В опубликованном метаанализе Wang и соавт., включавшим 1558 больных с COVID-19, было показано, что сопутствующие заболевания существенно повышают риски тяжелого течения вирусного заболевания: наличие АГ повышало риски в 2,29 раза, ХОБЛ – в 5,97 раза, сердечно-сосудистой патологии – в 2,93 раза ($p < 0,001$). Однако необходимо отметить и то, что на фоне развившейся инфекции было зарегистрировано утяжеление течения самих соматических заболеваний, в том числе как АГ и ИБС, так и СД2.

Целью нашей работы стало проведение проспективного исследования биомаркеров крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, перенесших COVID-19 – ассоциированную пневмонию, в группах с наличием и отсутствием сахарного диабета типа 2 и выявление индикаторов развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в постковидном периоде.

Материал и методы. Исследование представляет собой промежуточный этап «Проспективного наблюдения пациентов, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию», соответствует стандартам клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинской Декларации. Протокол одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике при Тюменском кардиологическом научном центре Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (протокол № 159 от 23.07.2020 г.). Исследование зарегистрировано в международном реестре клинических исследований Национального института здоровья США (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04501822). Пациенты идентифицировались по данным медицинской информационной системы 1С моноинфекционного госпиталя в период с апреля 2020 г. по июль 2021 г. Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов обследования в научных целях.

В данное исследование были включены 65 из 380 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 ассоциирован-

ную пневмонию. Нами были выделены две группы пациентов. В 1-ю группу вошли пациенты с ССЗ (АГ в сочетании с ИБС) без СД2 ($n=45$), средний возраст $60,89 \pm 6,56$ лет. Во 2-ю группу – пациенты с ССЗ и СД2 ($n=20$), средний возраст $62,45 \pm 4,84$ лет.

Работа с клинико-анамнестической базой данных позволила выделить пациентов двух групп, сопоставимых по возрасту, длительности заболевания АГ и ИБС, степени выраженности АГ и функциональному классу стенокардии напряжения (ФКП-III), индексу массы тела (ИМТ), наличию чрескожных вмешательств (ЧКВ), аорто-коронарного шунтирования (АКШ) и инфаркта миокарда (ИМ) в анамнезе, факту курения. Группы отличались только по параметру стенокардии напряжения ФК I, так как таких пациентов не было в группе с СД2 и количеству пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) 3 ст. во 2-й группе ($p<0,03$). В табл. 1 представлены

клинико-анамнестические данные пациентов на исходной точке обследования.

Диагнозы АГ, ИБС, СД типа 2 поставлены на основании данных анамнеза, данных медицинской информационной системы 1С моноинфекционного госпиталя, представленных медицинских документов, имеющихся на момент госпитализации и выданных при выписке из моногоспиталя, а также данных пациентов через 3 мес после выписки на основании результатов проведенного в ТКНЦ комплексного обследования, представленного ниже.

Проводимая терапия в группах была сопоставима по приему основных групп препаратов: ИАПФ (72,22% и 65,00%), бета-блокаторы (59,48% и 50,00%), статины (75,68% и 75,00%), дезагреганты (86,49% и 80,00%), диуретики (91,8% и 80,20%). В группе с СД2 проводилась дополнительно сахароснижающая терапия.

Таблица 1

Клинико-анамнестические данные пациентов с ССЗ, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию

Показатели		Пациенты с ССЗ без СД2 ($n=45$)	Пациенты с ССЗ и СД2 ($n=20$)	p
Возраст, годы		$60,89 \pm 6,56$	$62,45 \pm 4,84$	0,335
Пол:	муж.	22(57,89%)	13(59,09%)	0,928
	жен.	16(42,11%)	9(40,91%)	
АГ- длительность заболевания, годы		$11,80 \pm 8,57$	$11,00 \pm 7,14$	0,757
ИБС- длительность заболевания, годы		$8,53 \pm 6,93$	$9,44 \pm 8,20$	0,773
ИМ в анамнезе		5(13,2%)	8(36,4%)	0,052
АКШ в анамнезе		2(5,3%)	1(4,5%)	1,000
Чрескожные вмешательства в анамнезе		6(15,8%)	6(27,3%)	0,327
Курение на настоящий момент		1(2,6%)	1(4,5%)	0,577
Курил ранее		19(50,0%)	8(36,4%)	0,577
ИМТ кг/м ²		$30,55 \pm 5,61$	$32,93 \pm 5,05$	0,107
АГ мм рт.ст.	1ст.	3(8,11%)	1(4,55%)	0,376
	2ст.	12(32,43%)	4(18,18%)	0,304
	3ст.	22(59,46%)	17(77,27)	0,304
ИБС:	1ФК	5(35,71%)	0(0,0%)	0,041
	2ФК	8(57,14%)	12(92,31%)	0,077
	3ФК	1(7,14%)	1(7,69%)	1,000
ХСН:	0 ст.	6 (15,8%)	0(0,0%)	0,077
	1ст.	16(42,1%)	6(27,3%)	0,251
	2ст.	16(42,1%)	7(31,8%)	0,649
	3ст.	6(15,8%)	9(40,9%)	0,030
САД офисный исх., мм рт.ст.		$139,74 \pm 15,23$	$139,36 \pm 16,3$	0,929
ДАД офисный исх., мм рт.ст.		$83,33 \pm 8,66$	$78,00 \pm 9,80$	0,287
КТ легких исходно, % поражения	1ст.	4(10,8%)	2(9,1%)	0,304
	2ст.	10(27,0%)	4(18,2%)	0,304
	3ст.	18(48,6%)	13(59,1%)	0,304
	4ст.	5(13,5%)	3(13,6%)	0,304

Примечания. p – достоверность различий между группами. САД- систолическое артериальное давление, ДАД-диастолическое артериальное давление. Жирным шрифтом выделена значимая достоверность различий в показателях между группами.

Обследование пациентов проводилось на исходной точке в моногоспитале и в точке 3 мес после выписки из стационара. При лабораторном исследовании биообразцов крови оценивали: параметры общего анализа крови импедансным методом с технологиями проточной цитометрии на аппарате 5Diff анализатор «Mindrey BC 5800» (Китай); биохимические параметры – креатинин, печеночные ферменты, параметры липидного профиля, глюкозу натощак, креатинин-фосфокиназу, С-реактивный белок (СРБ) в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Швейцария) с помощью аналитических наборов «Roche Diagnostics GmbH» (Германия); концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ), интерлейкинов (ИЛ-1,6,8) – иммунотурбидиметрическим методом на полуавтоматическом анализаторе открытого типа «Clima MC-15» (Испания) и гомоцистеин на анализаторе «IMMULITE 2000» (Siemens Diagnostics, США); параметры коагулограммы на анализаторе «Destiny Plus» (Ирландия); показатель гликированного гемоглобина хроматографическим методом с помощью анализатора Bio-Rad D10 (США).

В обеих исследуемых группах проводилось суточное мониторирование артериального давления (СМАД), осуществляемое на аппарате BPLaB (производитель ООО «Петр Телегин») по стандартному протоколу; исследование эластических свойств сосудистой стенки методом сфигмографии на аппарате Vasera VS-1000 Series (Fukuda Denishi, Япония), с оценкой показателей: PWV-R PWV-L – скорость распространения пульсовой волны по артериям эластического типа справа и слева; AVI-R/L-лодыжечно-плечевой индекс; компьютерная томография легких (КТ).

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 21. В зависимости от распределения при сравнении показателей в 2-х независимых группах использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. При нормальном распределении данные представляли как среднее $\bar{M}$ и стандартное отклонение (SD), при распределении отличным от нормального, данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%;75%]. Парным критерием Стьюдента или критерием Вилкоксона рассчитывали динамику между связанными группами. Результаты оценивались как статистически значимые при двухстороннем уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы мы сравнили показатели общего анализа крови в группах больных ССЗ с отсутствием и наличием СД 2 типа, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию, на исходном этапе и через 3 мес после выписки из стационара.

Результаты общего анализа крови показали, что эритроцитарные параметры в 1-й и во 2-й группах пациентов на госпитальном этапе не имели значимых различий, при наличии явного превышения показателя СОЭ в обеих группах по сравнению с нормативными значениями (50,00[48,00;52,40] и

46,10[20,50;47,60] мм/ч, в 1-й и во 2-й группах, соответственно). Показатели эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов, стандартного отклонения ширины распределения эритроцитов значимо повысились к точке наблюдения – 3 мес после выписки из стационара ($p < 0,001$ для всех параметров). Уровень СОЭ значимо снизился в обеих группах, достигнув показателей референсных значений (14,50 [10,00; 23,00] и 13,50 [10,00; 20,00] мм/ч, соответственно).

Таким образом, в точке 3 мес после выписки из стационара у пациентов обеих групп, в целом, отмечена нормализация эритроцитарных показателей, при сохранении умеренной тенденции к превышению нормативного уровня эритроцитов, гемоглобина и гематокрита ($5,0 \times 10^{12}/л$, 143 г/л и 46%) во 2-й группе пациентов, которые могут являться индикаторами долгосрочного характера нарушений параметров эритроцитарного звена после перенесенной новой коронавирусной инфекции в группе пациентов с ССЗ и СД2. Наши данные согласуются с результатами ряда исследований [9, 10].

Анализ показателей лейкоцитарного звена в группах пациентов показал, что на исходном этапе наблюдения зарегистрировано значимое превышение показателя отношения NLR (нейтрофилы/лимфоциты) и снижение соотношения LYM/СРБ (лимфоциты/СРБ) в обеих группах пациентов. В точке 3 мес после выписки отмечено значимое снижение показателей отношения NLR ($p < 0,001$) и повышение LYM/СРБ в обеих группах пациентов ($p < 0,001$) (рис. 1).

Выявленные закономерности в повышении показателя NLR и снижении LYM/СРБ отражают особенности течения новой коронавирусной инфекции и выполняют роль прогностических индикаторов исхода заболевания. Полученные нами данные согласуются с данными многих научных работ [11, 12].

На рис. 2 отражена динамика количества нейтрофилов и эозинофилов в исследуемых группах пациентов, отмечено равнозначное снижение нейтрофилов и повышение эозинофилов к контрольной точке 3 месяца. Подобная динамика лейкоцитарных параметров, свидетельствует о выраженном защитном эффекте клеток крови в смягчении тяжести воспалительного заболевания и может быть полезным инструментом в принятии решения по тактике терапии.

Для параметров тромбоцитарного звена в обеих группах пациентов характерно повышение показателя MPV (средний объем тромбоцита) и процента P-LCC (крупных тромбоцитов), который, являясь индикатором воспалительного потенциала, нормализуется к точке 3 мес после выписки.

По данным научных публикаций, количество тромбоцитов может напрямую различать пациентов с COVID-19 по тяжести заболевания. Тромбоцитопения связана с трехкратным повышением риска тяжелой формы COVID-19, что может предполагать развитие внутрисосудистой коагулопатии, часто переходящей в диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС). Взаимодействие между эндотелиальными клетками, тромбоцитами и лейкоцитами

играют решающую роль в прокоагулянтном эффекте вирусных инфекций, особенно у пациентов с СД2, являясь причиной тяжелых исходов [13].

Интерес к отношению PLR (тромбоциты/лимфоциты) состоит в том, что он, отражая как агрегацию, так и воспалительные механизмы в период инфекционного процесса, может быть ценным параметром прогнозирования осложнений заболевания. Значение PLR на пике тромбоцитов во время лечения – это независимый фактор отражения динамики тяжести процесса. По данным Y. Zhang и соавт. [14,15], PLR пациентов отражает степень выраженности цитокинового шторма, что может являться новым показателем в мониторинге пациентов с COVID-19. В нашем исследовании исходно показатели были повышены больше во 2-й группе пациентов ($178,44 \pm 119,23$ и $250,11 \pm 200,27$, соответственно 1-й и 2-й группе), но

без значимой разницы между группами. В точке 3 мес после выписки показатели значимо снизились в обеих группах пациентов ($p=0,024$ и $p=0,031$, соответственно группам).

Из параметров гемостаза обратила на себя внимание только тенденция к превышению показателя D-димера в группе пациентов с СД2 $0,79 \pm 0,68$ мг/мл по сравнению с 1-й группой пациентов $0,42 \pm 0,50$ ($p=0,073$), характеризующая вероятность наличия потенциальной коагулопатии в обеих группах пациентов.

Исходные параметры и динамика биохимических показателей отражена в табл. 2.

Сравнительная характеристика размаха биохимических параметров у пациентов в обеих группах показала на исходном этапе превышение референсных значений аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

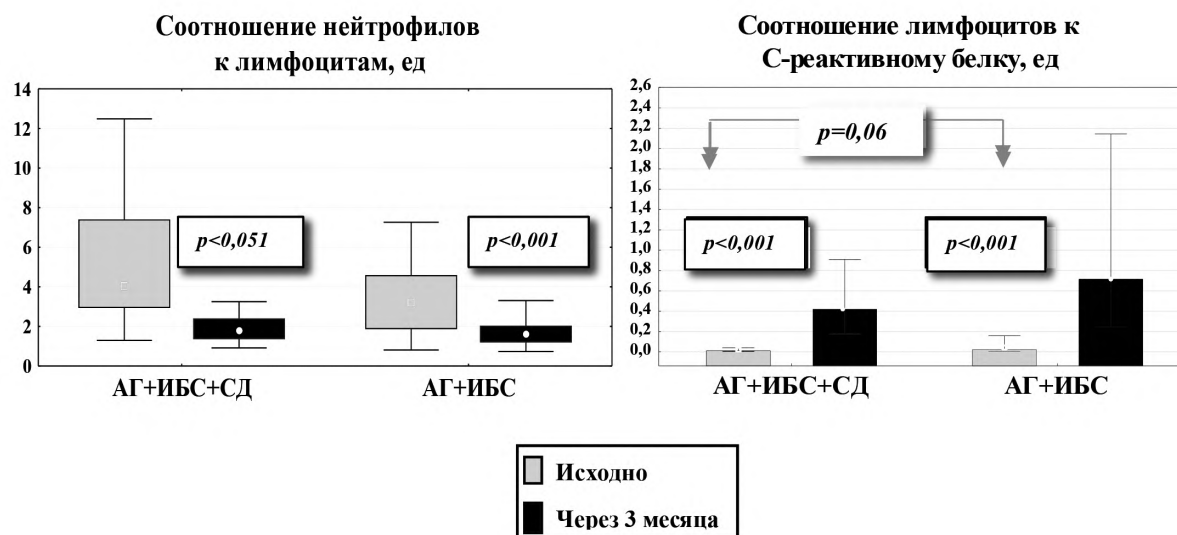


Рис. 1. Индексы соотношения нейтрофилов к лимфоцитам и лимфоцитов к СРБ в группах обследуемых пациентов.

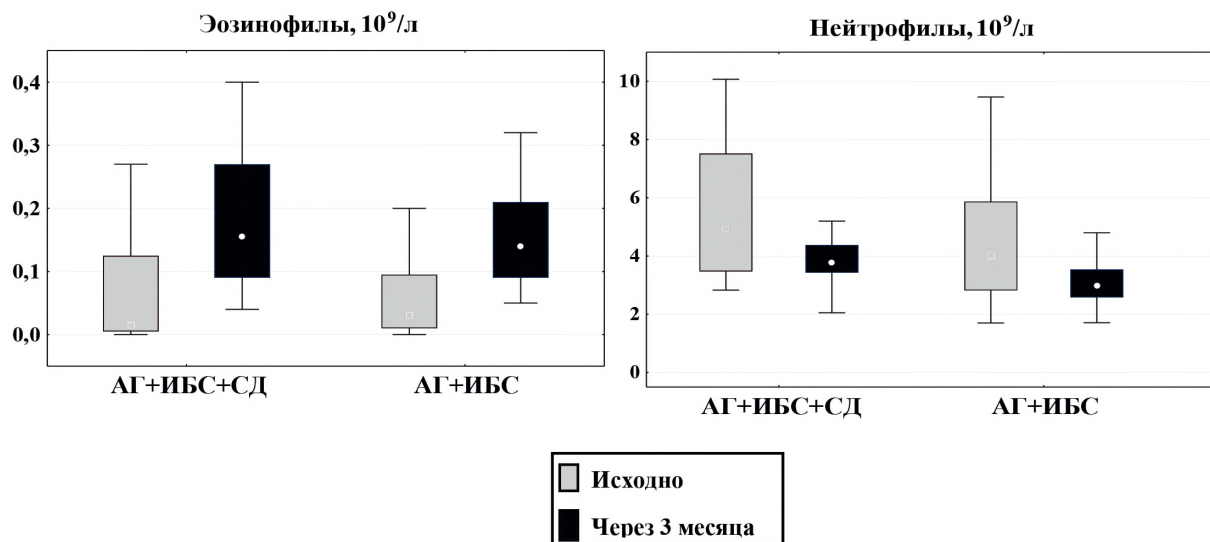


Рис. 2. Характеристика динамики уровня нейтрофилов и эозинофилов в группах обследуемых пациентов.

Таблица 2

Сравнительная характеристика биохимических показателей в группах пациентов с ССЗ при наличии и отсутствии СД 2 типа, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию

Показатели (N – нормативные значения)	Период обследования	Пациенты с ССЗ без СД2 (n=45)	Пациенты с ССЗ и СД2 (n=20)	p
АСТ, ед/л N муж. 0-35 жен. 0-31	Исходно	32,50 [20,00; 44,90]	24,10 [20,00; 47,50]	0,306
	Через 3 мес	20,70 [17,70; 26,20]	20,00 [17,00; 23,60]	0,318
	p	<0,001	0,007	
АЛТ, ед/л N муж. 0-45 жен. 0-34	Исходно	32,10 [22,50; 63,80]	25,30 [17,70; 31,40]	0,059
	Через 3 мес	23,70 [18,10; 32,00]	20,00 [16,50; 27,30]	0,268
	p	0,006	0,171	
ОХС, ммоль/л N 0-5	Исходно	4,5±1,6	3,7±1,3	0,109
	Через 3 мес	5,2±1,7	4,9±1,3	0,514
	p	0,001	<0,001	
ХСЛПН, ммоль/л N 0-3	Исходно	-	-	
	Через 3 мес	2,86 [2,09; 3,90]	2,96[2,45; 3,23]	0,628
Лактатдегидрогеназа, ед/л N 0-248	Исходно	358,00 [268,00; 483,00]	386,00 [222,00; 657,00]	0,727
	Через 3 мес	188,00 [167,50; 210,10]	197,60 [169,50; 213,50]	0,834
	p	<0,001	0,004	
Креатининфосфокиназа, ед/л N муж. 0-171 жен. 0-145	Исходно	89,00 [53,00; 150,00]	112,60[59,00; 165,00]	0,677
	Через 3 мес	110,70 [81,00; 149,50]	78,10[69,20; 111,00]	0,019
Триглицериды, ммоль/л N 0-1,7	Исходно	-	-	
	Через 3 мес	1,55±0,71	2,16±0,82	0,004
maxСРБ, мг/л N 0-5	Исходно	51,80 [18,00; 104,40]	86,10 [46,30; 147,60]	0,047
	Через 3 мес	3,00 [1,40; 5,00]	5,60 [1,90; 9,80]	0,011
	p	<0,001	<0,001	
Ферритин, мг/мл N муж. 30-400 жен. 15-150	Исходно	955,8±1030,8	708,0±285,9	0,552
	Через 3 мес	100,2±79,4	108,6±76,8	0,812
	p	<0,001	<0,001	
Глюкоза натощак, ммоль/л N 3,3-6,1	Исходно	8,05±2,02	12,62±5,61	<0,001
	Через 3 мес	5,41±0,70	7,86±2,11	<0,001
	p	<0,001	0,003	
HbA1c, % N 4,5-6,0	Исходно	-	-	
	Через 3 мес	6,0±0,6	7,5±1,1	0,010
Креатинин, мкмоль/л N муж. 70-115 жен. 44-80	Исходно	84,9±25,1	94,4±20,2	0,206
	Через 3 мес	76,6±13,1	78,8±14,1	0,550
	p	0,020	0,002	

Примечание. HbA1c – гликированный гемоглобин; p - критерий достоверности различий между группами 1 и 2 по горизонтали; внутри группы исходно и через 3 мес после выписки в динамике – по вертикали. Жирным шрифтом выделена значимая достоверность различий показателей в группах и между группами.

без значимой разницы между группами. При этом по всем параметрам отмечено значимое снижение параметров через 3 мес, с достижением нормативных значений. Уровень ОХС к периоду второй контрольной точки наблюдения достоверно повысился ($p<0,001$) в обеих группах, кроме этого, на точке 3 мес зарегистрированы повышенные параметры ХСЛПНП в обеих группах. Уровень обоих параметров в группах был выше рекомендуемых для пациентов с очень высоким риском развития сосудистых осложнений, что может

являться провоцирующим фактором прогрессирования атеросклеротического процесса.

Превышение глюкозы натощак выявлено в обеих группах пациентов, при этом значимое превышение параметров глюкозы и HbA1c во 2-й группе пациентов, как исходно, так и через 3 мес является закономерным проявлением гликемии у пациентов с СД2. У пациентов в 1-й группе повышенный уровень глюкозы не обусловлен наличием у них СД. Возможными причинами развития гипергликемии в дан-

ном случае могут являться: цитокиновый «шторм», стресс, гипоксия, нарушение микроциркуляции, усиление выработки глюкозы в печени, нарушение периферического усвоения глюкозы, нарушение функции островков Лангерганса, последствия фармакотерапии, что в итоге может привести к дисфункции β -клеток поджелудочной железы и нарушению синтеза инсулина [16, 17].

Зарегистрированное значимое превышение нормативных значений уровня ферритина может рассматриваться в качестве индикатора острого воспалительного процесса у пациентов на исходном этапе в обеих группах, с нормализацией параметров через 3 месяца ($p < 0,001$).

Необходимо также отметить, что в контрольной точке 3 мес у пациентов с ССЗ и СД2 были зарегистрированы превышающие, как референсные значения, так и показатели в 1-й группе, уровни СРБ ($p < 0,001$), высокочувствительного-СРБ (вЧ-СРБ), ИЛ1 β и ФНО α ($5,23 \pm 4,4$ и $7,43 \pm 5,7$ мг/л), ($2,16 \pm 1,0$ и $2,71 \pm 1,1$ пг/мл), ($5,65 \pm 2,4$ и $7,1 \pm 3,0$, пг/мл), которые отражают наличие у пациентов с СД2 в постковидном периоде более выраженного сосудистого воспалительного потенциала для развития возможных нежелательных событий. Размах значений NT-proBNP ($96,53$ [20,11;234,90] и $140,11$ [27,11;258,22] пг/мл) был выше референсных значений в обеих группах пациентов, без значимой разницы между ними. Это может определять данный параметр как индикатор воспалительного процесса, способствующего прогрессированию или возможной декомпенсации сердечной недостаточности у всех пациентов с ИБС, перенесших новую COVID-19 инфекцию, ассоциированную с пневмонией.

В настоящее время хорошо известно, что отдельные биохимические маркеры, обладающие провоспалительными свойствами, способны играть решающую роль в процессе ремоделирования сосудистой стенки за счет изменения эластично-вязких свойств крови и повышения жесткости артерий – интегрального фактора, определяющего сердечно-сосудистые риски. Существенную роль в изменении эластических свойств сосудистой стенки играет эндотелиальная дисфункция, лежащая в основе патогенеза макро- и микрососудистых осложнений сахарного диабета [18].

Оценка эластических свойств сосудистой стенки в обследуемых группах пациентов представлена в табл. 3.

Полученные результаты исследования указывают на превышение нормативных параметров PWV-R/L в обеих группах больных, со значимым превосходством во 2-й группе пациентов, что свидетельствует о более выраженном снижении эластических свойств сосудистой стенки у пациентов при наличии СД2.

Для изучения характера ассоциации представленных в работе исследуемых параметров, был проведен корреляционный анализ, по результатам которого у пациентов с гипергликемией были зарегистрированы множественные взаимосвязи глюкозы со средним объемом гемоглобина в эритроцитах ($r = -0,402$, $p = 0,037$), концентрацией СРБ ($r = 0,707$, $p = 0,050$), уровнем креатинина ($r = -0,670$, $p = 0,024$) на исходном этапе наблюдения и взаимосвязь глюкозы с объемом тромбоцитов ($r = -0,474$, $p = 0,030$), количеством лимфоцитов ($r = 0,434$, $p = 0,049$), уровнем АСТ ($r = -0,355$, $p = 0,029$) и концентрацией вЧСРБ ($r = 0,563$, $p = 0,001$) через 3 мес после выписки их моногоспиталя. Кроме этого, на второй точке обследования в группе с СД2 выявлена положительная взаимосвязь уровня среднесуточного АД с уровнем вЧСРБ ($r = 0,687$, $p = 0,001$), ИЛ-6 ($r = 0,636$, $p = 0,004$), а показателя PWV-L с уровнем ФНО α ($r = 0,739$, $p = 0,034$) и фибриногеном ($r = 0,561$, $p = 0,037$). Используемый параллельно метод множественной логистической регрессии позволил показать, что СД2 у пациентов АГ с ИБС является независимым фактором риска повышения жесткости сосудистой стенки (PWV-R,L – (ОШ 1,61 95% ДИ 1,04-2,49, $p = 0,031$).

Полученные в работе данные позволяют подтвердить ассоциацию гипергликемии с уровнем других биомаркеров и состоянием эластических свойств сосудистой стенки в исследуемых группах пациентов, как на исходном, так и в отдаленном периоде COVID-19, что еще раз позволяет акцентировать внимание на необходимости осуществления динамического наблюдения за пациентами с гипергликемией как в острый период инфекции, так и в постковидном периоде.

Обсуждение. За время пандемии COVID-19 установлено, что СД2 занимает второе место среди сопутствующих патологий после артериальной гипертензии

Таблица 3

Данные эластических свойств сосудистой стенки у пациентов с ССЗ, перенесших COVID-19 ассоциированную пневмонию, включенных в исследование

Показатели	Пациенты с ССЗ без СД2 (n=45)	Пациенты с ССЗ и СД2 (n=20)	p
PWV-R, м/с (N 10,0 м/с)	$14,50 \pm 2,05$	$15,78 \pm 2,42$	0,054
PWV-L, м/с	$14,60 \pm 1,93$	$16,18 \pm 2,67$	0,019
AVI-R (N> 0,9 <1,3)	$1,08 \pm 0,10$	$1,06 \pm 0,08$	0,486
AVI-L	$1,10 \pm 0,08$	$1,06 \pm 0,11$	0,155

Примечание. PWV-R, L- скорость пульсовой волны, AVI-L,R – плече-лодыжечный индекс; p- достоверность различий параметров между группами. Жирным шрифтом выделена значимая достоверность различий между группами.

и является предиктором тяжести течения и фактором неблагоприятного исхода заболевания [16].

На сегодняшний день полученные научные результаты однозначно констатируют, что при COVID-19 на фоне СД2 с самого начала заболевания имеет место развитие общебиологической реакции активного системного воспалительного ответа, проявляющегося цитокиновым и тромботическим штормом, определяющим степень тяжести состояния пациентов. Резкая активация гемостаза, внутрисосудистого свертывания и тромбообразования, как в крупных, так и в сосудах мелкого калибра жизненно важных органов, может определять исход заболевания [17,19].

Увеличение уровня глюкозы может сопровождаться значительным выбросом провоспалительных медиаторов и увеличивать экспрессию АПФ, усиливая гликозилирование и способствуя, тем самым, проникновению в клетки вируса SARS-CoV-2. Гипергликемия, вне зависимости от наличия или отсутствия у пациента СД, может ухудшать прогноз заболевания, повышая риск развития неблагоприятного исхода COVID-19. Принимая во внимание возможность потенциального диабетогенного эффекта COVID-19, необходимо учитывать вероятность развития СД как одного из долгосрочных осложнений COVID-19. В нашем исследовании был зарегистрирован 1 новый случай впервые выявленного СД в группе пациентов с АГ, имеющем на исходном этапе гипергликемию натощак. Таким образом, закономерен вывод, что пациенты с исходно выявленной гипергликемией нуждаются в проведении динамического наблюдения после перенесенного COVID-19 [19].

Выявленные нами изменения параметров внутриклеточных печеночных ферментов, вероятнее всего, обусловлены высоким тропизмом вируса SARS-CoV-2 к гепатоцитам, определяя таким образом нарушение функции печени, как одного из самых важных метаболических органов. По результатам исследования видно, что функция печени страдает одинаково на исходном этапе в обеих группах, что может быть обусловлено разными факторами, в том числе, иммунным дисбалансом, гипоксией, нарушением микроциркуляции, микротромбозами, гепатотоксичностью принимаемых препаратов и др. Положительный момент в том, что показатели функции печени постепенно возвращаются к норме уже к периоду контрольной точки 3 мес в обеих группах пациентов.

Изменение уровня биомаркеров, таких, как NLR, LYM/СРБ, СРБ, вЧСРБ, гомоцистеин и ФНОα, отражающих закономерный воспалительный процесс, и сохраняющийся повышенный уровень отдельных параметров в постковидном периоде, свидетельствуют о наличии персистирующего воспалительного процесса, требующего динамического наблюдения, особенно в группе с СД2, для выявления случаев нежелательных сердечно-сосудистых осложнений.

Заключение. Таким образом, на основании проведенных исследований мы отметили, что факт наличия СД2 четко ассоциирован как с изменением отдельных гематологических и биохимических параметров крови на исходном и в постковидном периоде, так и с состоянием эластических свойств сосудистой стенки у

пациентов с АГ и ИБС. Динамический контроль лабораторных параметров имеет прогностическую ценность в оценке характера течения COVID-19 и может быть использован для разработки алгоритма мониторинга пациентов с целью своевременного предупреждения отсроченных сердечно-сосудистых событий.

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

2. Чазова И.Е., Миронова О.Ю. COVID-19 и сердечно-сосудистые заболевания. *Терапевтический архив*. 2020; 92 (9): 4-7. DOI: 10.26442/00403660.2020.09.000742.
18. Попыхова Э.Б., Степанова Т.В., Лагутина Д.Д., Кириязи Т.С., Иванов А.Н. Роль сахарного диабета в возникновении и развитии эндотелиальной дисфункции. *Проблемы Эндокринологии*. 2020;66(1):47-55. DOI:10.14341/probl12212.
19. Костина О.В., Галова Е.А., Любавина Н.А., Преснякова М.В., Ведунова М.В. Характеристика изменений биохимических показателей крови при динамическом наблюдении у пациентов с COVID-19 и в постковидном периоде. *Профилактическая медицина*. 2022;25(5):86-92. DOI:10.17116/profmed2022505186.

REFERENCES

1. Clerkin K.J., Fried J.A., Raikhelkar J., Sayer G., Griffin J.M., Masoumi A. et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2020 May 19; 141 (20): 1648-55.
2. Grinevich V.B., Gubonina I.V., Doshchitsin V.L., Kotovskaya Yu.V., Kravchuk Yu.A., Ped V.I. et al. Features of the management of comorbid patients during a pandemic of a new coronavirus infection (COVID-19), national consensus. *Cardiovascular therapy and prevention*. 2020;19(4):64-9.
3. Buryachkovskaya L.I., Melkumyants A.M., Lomakin N.V., Antonova O.A., Ermishkin V.V. Damage to the vascular endothelium and erythrocytes in patients with COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469-76. DOI: 10.26442 / 20751753.2021.6.200939.
4. Chazova I.E., Mironova O.Yu. COVID-19 and cardiovascular diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2020; 92(9):4-7. DOI: 10.26442 / 00403660.2020.09.000742.(in Russian)
5. Kumar A., Arora A., Sharma P., Anikhindi S.A., Bansal N., Singla V. et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Jul-Aug; 14(4):535-45. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.04.044.
6. Ma R.C.W., Holt R.I.G. COVID-19 and diabetes. *Diabetic Medicine*. 2020 May; 37(5):723-5. DOI: 10.1111/dme.14300. Epub 2020 Apr 3. Diabet Med. 2020. PMID: 32242990.
7. Attri B., Gupta Y., Tandon N. COVID-19 and Diabetes Mellitus. *National Medical Journal of India*. 2021 May-Jun; 34(3):129-131. DOI: 10.25259/NMJI_429_21.Natl. Med. J. India. 2021. PMID: 34825533.
8. Shang J., Wang Q., Zhang H., Wang X., Wan J., Yan Y. et al. The Relationship Between Diabetes Mellitus and COVID-19 Prognosis: A Retrospective Cohort Study in Wuhan, China. *American Journal Emergency Medicine*. 2021 Jan; 134(1):e6-e14. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.05.033. Epub 2020 Jul 10. Am. J. Med. 2021. PMID: 32653423.
9. Ansovini R., Compagnucci L. The Hypothetical Role of Erythrocytes in COVID-19: Immediate Clinical Therapy. *Journal Biomedical & Research Environmental Science*. 2020 Jul 02; 1(3): 048-050. DOI: 10.37871/jels1119, Article ID: JELS1119.
10. Lu G., Wang J. Dynamic changes in routine blood parameters of a severe COVID-19 case. *Clin. Chim. Acta*. 2020 Sep; 508: 98-102. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.034. Epub. 2020 May 13. PMID: 32405079; PMCID: PMC7217800.
11. Vafadar Moradi E., Teimouri A., Rezaee R., Morovatdar N., Foroughia M., Layegh P. et al. Increased age, neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and white blood cells count are associated with higher

- COVID-19 mortality. *American Journal Emergency Medicine*. 2021 Feb;40:11-14. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.12.003. Epub. 2020 Dec 4. PMID: 33333477; PMCID: PMC7717776.
12. Seyit M., Avcı E., Nar R., Senol H., Yılmaz A., Ozen M. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio to predict the severity of COVID-19. *American Journal Emergency Medicine*. 2021 Feb; 40:110-4. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.11.058. Epub 2020 Dec 6. PMID: 33309506; PMCID: PMC7719281.
13. Delshad M., Safaroghli-Azar A., Pourbagheri-Sigaroodi A., Pook B., Shokouhi S., Bashash D. et al. Platelets in the perspective of COVID-19; pathophysiology of thrombocytopenia and its implication as prognostic and therapeutic opportunity. *International Immunopharmacology*. 2021; 99:107995. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107995. Epub. 2021 Jul 21. PMID: 34304001; PMCID: PMC8295197.
14. Salamanna F., Maglio M., Landini M.P., Fini M. Platelet functions and activities as potential hematologic parameters related to Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Platelets*. 2020 Jul 3; 31(5):627-32. DOI: 10.1080/09537104.2020.1762852. Epub. 2020 May 13. PMID: 32397915.
15. Zhang Y., Zeng X., Jiao Y., Li Z., Liu Q., Ye I. et al. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thrombosis Research*. 2020; 193:110-5. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.06.008. Epub. 2020 Jun 5. PMID: 32535232; PMCID: PMC7274097.
16. Accili D. Can COVID-19 cause diabetes? *Nature Metabolism*. 2021; 3(2):123-5.
17. Hayden M.R. An Immediate and Long-Term Complication of COVID-19 May Be Type 2 Diabetes Mellitus: The Central Role of B-cell Dysfunction, Apoptosis and Exploration of Possible Mechanisms. *Cells*. 2020; 9(11):2475. DOI:10.3390/cells 9112475.
18. Popykhova E.B., Stepanova T.V., Lagutina D.D., Kiriyazi T.S., Ivanov A.N. The role of diabetes in the onset and development of endothelial dysfunction. *Problemy Endokrinologii*. 2020; 66(1):47-55. DOI:10.14341/probl12212. (in Russian)
19. Kostina O.V., Galova E.A., Lyubavina N.A., Presnyakova M.V., Vedunova M.V. Characteristics of changes in blood biochemical parameters during dynamic observation in patients with COVID-19 and in the post-COVID period. *Profilakticheskaya meditsina*. 2022; 25(5):86-92. DOI:10/1717116/profmed20222505186. (in Russian)

Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Абаев В.М., Вотякова О.М., Османов Е.А., Кушлинский Н.Е.

БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ БЕНС-ДЖОНСА

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115552, Москва, Россия

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную опухоль, возникающую из патологических плазматических клеток, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин – парапротеин. Отличительной особенностью миеломы Бенс-Джонса является экскреция с суточной мочой моноклональных свободных легких цепей иммуноглобулинов, при отсутствии секреции моноклональных интактных иммуноглобулинов.

Цель исследования - комплексный анализ биохимических показателей в сыворотке крови и суточной моче у больных ММ Бенс-Джонса с использованием электрофоретических и иммунотурбидиметрических методов для оценки их чувствительности в качестве биомаркеров.

Обследованы 50 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом ММ иммунохимического типа Бенс-Джонса. В качестве контроля обследованы 28 человек без онкологических заболеваний. Выявление моноклональной секреции в сыворотке крови и суточной моче проводили методом иммунофиксационного электрофореза на электрофоретической системе Hydrasys 2 (Sebia). Определение свободных легких цепей иммуноглобулинов (СЛЦ) выполняли иммунотурбидиметрическим методом (Binding Site) на анализаторе Advia 1800 (Siemens). Исследование иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, а также β 2-микроглобулина и С-реактивного белка проводилось на анализаторе Cobas 6000 (Roche). У обследованных больных ММ медиана экскреции в суточной моче белка Бенс-Джонса составила 0,49 г/сут (0,06-2,45 г/сут). В сыворотке крови в 86% случаев выявлено наличие парапротеинемии, представленной легкими цепями иммуноглобулинов типа κ и λ . При этом частота выявления моноклональной секреции в сыворотке крови при миеломе Бенс-Джонса типа λ составляла 95,7%, что было статистически значимо выше, чем частота выявления моноклональной секреции типа κ – 77,8%. У больных с выявленной парапротеинемией экскреция белка Бенс-Джонса с суточной мочой (медиана 0,82 г/сут) была статистически значимо выше, чем у больных без выявленного в сыворотке крови моноклонального компонента (медиана 0,04 г/сут). Полученные методом иммунотурбидиметрии уровни СЛЦ в сыворотке крови при миеломе Бенс-Джонса соответствующего типа превышали референсные уровни в 100% случаев. Медиана уровня κ -СЛЦ достигала 4358 мг/л, λ -СЛЦ – 2225 мг/л, что статистически значимо превышало уровни контроля. Медианы концентрации IgG, IgA и IgM у пациентов с миеломой Бенс-Джонса были статистически значимо ниже, чем в контрольной группе, тогда как медианы β 2-микроглобулина и С-реактивного белка были достоверно выше, чем в контроле.

Проведенный анализ показал высокую диагностическую эффективность электрофоретического и иммунотурбидиметрического анализа моноклональной секреции у больных с ММ Бенс-Джонса, при этом анализ СЛЦ продемонстрировал максимальную чувствительность. При ММ Бенс-Джонса выявлены биохимические признаки вторичного иммунодефицита и общевоспалительного синдрома.

Ключевые слова: множественная миелома; моноклональная секреция; парапротеины; белок Бенс-Джонса; свободные легкие цепи иммуноглобулинов.

Для цитирования: Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Абаев В.М., Вотякова О.М., Османов Е.А., Кушлинский Н.Е. Биохимический профиль множественной миеломы Бенс-Джонса. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 570-574. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-570-574

Для корреспонденции: Любимова Нина Васильевна, д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клин. биохимии; e-mail: biochimia@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Abaev V.M., Votyakova O.M., Osmanov E.A., Kushlinskii N.E.

BIOCHEMICAL PROFILE OF BENCE-JONES TYPE MULTIPLE MYELOMA

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115552, Moscow, Russia

Multiple myeloma (MM) is a malignant tumor occurring from plasma cells that produce an abnormal monoclonal immunoglobulin – a paraprotein. A distinctive feature of Bence-Jones myeloma is the excretion of monoclonal free light chains of immunoglobulins with 24h urine, and the absence of monoclonal intact immunoglobulins secretion. Comprehensive analysis of biochemical parameters in blood serum and 24h urine in patients with Bence-Jones multiple myeloma using electrophoretic and immunoturbidimetric methods to assess their sensitivity as biomarkers. 50 patients with a morphologically confirmed diagnosis of MM of the Bence-Jones immunochemical type were examined. 28 people without oncological diseases were examined as a control. Detection of monoclonal secretion in blood serum and daily urine was performed by immunofixation electrophoresis on the Hydrasys 2 electrophoretic system (Sebia). The determination of free light chains of immunoglobulins (FLC) was performed by the immunoturbidimetric method (Binding Site) on an Advia 1800 analyzer (Siemens). Analysis of IgG, IgA, IgM, β 2-microglobulin and C-reactive protein was performed on Cobas 6000 analyzer (Roche). The median excretion of Bence-Jones protein in 24h urine of MM patients was 0.49 g/24h (0.06-2.45 g/24h). In the blood serum, in 86% of cases, the presence of paraproteinemia, represented by κ and λ type light chains of immunoglobulins was detected. At the same time, the frequency of detection of monoclonal secretion in blood serum in Bence-Jones type λ myeloma was 95.7%, which was statistically significantly higher than the frequency of detection of monoclonal secretion of type κ – 77.8%. In patients with identified paraproteinemia, Bence-Jones protein excretion in

daily urine (median 0.82 g/day) was statistically significantly higher than in patients without a monoclonal component detected in blood serum (median 0.04 g/24h). The levels of FLC in blood serum obtained by immunoturbidimetry in Bence-Jones myeloma of the corresponding type were higher than the reference levels in 100% of cases. The median level of κ -FLC reached 4358 mg/l, λ -FLC – 2225 mg/l, which was statistically significantly higher than the control levels. The median concentrations of IgG, IgA and IgM in patients with Bence-Jones myeloma were statistically significantly lower than in the control group, while the medians of β 2-microglobulin and C-reactive protein were significantly higher than in the control.

Our investigation showed high diagnostic efficiency of electrophoretic and immunoturbidimetric analysis of monoclonal secretion in patients with Bence-Jones MM, while FLC analysis demonstrated maximum sensitivity. Bence-Jones MM revealed biochemical signs of secondary immunodeficiency and general inflammatory syndrome.

Key words: multiple myeloma; monoclonal secretion; paraprotein; Bence-Jones protein; immunoglobulin free light chains.

For citation: Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Abaev V.M., Votyakova O.M., Osmanov E.A., Kushlinskii N.E. Biochemical profile of Bence-Jones type multiple myeloma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 570-574 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-570-574>

For correspondence: Lyubimova Nina Vasilyevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Lyubimova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>;

Timofeev Yu.S., <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>;

Abaev V.M., <https://orcid.org/0000-0002-3060-6674>;

Votyakova O.M., <https://orcid.org/0000-0003-0210-3727>;

Osmanov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>;

Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.07.2022

Accepted 28.07.2022

Published 14.10.2022

Введение. Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную опухоль, возникающую из патологических плазматических клеток, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин – парапротеин [1].

В диагностике ММ применяются диагностические критерии, предложенные Международной рабочей группой по изучению ММ, куда помимо выявления морфологического субстрата – клональных плазматических клеток, входит биохимическое выявление моноклональной секреции в сыворотке крови и суточной моче. Парапротеины отражают патологическую пролиферацию клеток множественной миеломы, что является основанием для их использования в качестве биохимического маркера [2, 3].

По своей биохимической природе парапротеины представляют собой моноклональные иммуноглобулины (интактные или их фрагменты), которые продуцируются одним патологическим клоном клеток. Парапротеины могут быть представлены в виде нескольких вариантов: интактных иммуноглобулинов, их свободных легких цепей (СЛЦ) или же сочетания интактных иммуноглобулинов и СЛЦ. Выделяют пять типов тяжелых цепей иммуноглобулинов – G, M, A, D, E и два типа легких цепей – κ - и λ . Для обозначения выявляемых в сыворотке крови и моче моноклональных свободных легких цепей иммуноглобулинов часто используется термин белок Бенс-Джонса [2].

Выявление и идентификация моноклональной секреции методом иммуноэлектрофореза в течение длительного времени остается одним из основных методов диагностики и мониторинга терапии множественной миеломы [4, 5]. Определение конкретного типа парапротеинемии осуществляется методом им-

мунофиксации со специфическими антисыворотками к конкретным типам тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов [6].

Дополнительные диагностические возможности обеспечивает появление метода иммунотурбидиметрического определения СЛЦ иммуноглобулина, который позволяет с высокой точностью в автоматизированном формате определить концентрации κ - и λ -СЛЦ [7, 8, 9, 10, 11].

Существует ряд иммунохимических вариантов множественно миеломы, включающую миелому с секрецией интактных иммуноглобулинов различных классов (G,A,M,D,E), миелому Бенс-Джонса и несекретирующую миелому [4, 12].

Отличительной особенностью миеломы Бенс-Джонса является экскреция с суточной мочой моноклональных свободных легких цепей иммуноглобулинов типа κ - или λ , при отсутствии секреции моноклональных интактных иммуноглобулинов [4, 13, 14].

Для ММ Бенс-Джонса часто характерно тяжелое течение, связанное с развитием протеинурии переполнения и почечной недостаточностью. При этом диагностика миеломы Бенс-Джонса может представлять некоторые сложности, в сравнении с другими иммунохимическими вариантами миеломы, при которых имеется выраженный моноклональный пик в сыворотке крови [4, 12, 14]. Поэтому исследование биохимического профиля при миеломе Бенс-Джонса является важной задачей для оценки особенностей патогенеза и течения данного иммунохимического варианта.

Цель исследования – комплексный анализ биохимических показателей в сыворотке крови и суточной моче у больных ММ Бенс-Джонса с использованием электро-

форетических и иммунотурбидиметрических методов для оценки их чувствительности в качестве маркеров.

Материал и методы. Обследовали 50 пациентов с морфологически-подтвержденным диагнозом ММ до проведения специфического лечения. Все обследованные пациенты имели иммунохимический тип миеломы Бенс-Джонса. В группе больных было 19 женщин и 31 мужчина, медиана возраста составила 62,5 года (интерквартильный интервал 55,6-69,1). В качестве контрольной группы обследовали 28 человек без онкологических заболеваний, медиана возраста 58,3 года (51,2-68,2).

Комплексное иммунохимическое и биохимическое исследование включало современные электрофоретические и иммунотурбидиметрические методы. Выявление моноклональной секреции в сыворотке крови и экскреции белка Бенс-Джонса в суточной моче проводили методом иммунофиксационного электрофореза в геле с применением тест-систем Hydragel 2/4 IF, Hydragel 2/4 Bence Jones на полуавтоматической электрофоретической системе Hydrasys 2 (Sebia). Определение сывороточных концентраций СЛЦ иммуноглобулинов κ - и λ -типа проводили иммунотурбидиметрическим методом с использованием высокочувствительных методов «Freelite Human Lambda» и «Freelite Human Kappa» (Binding Site) на автоматическом биохимическом анализаторе Advia 1800 (Siemens).

Анализ биохимических показателей, включая иммуноглобулины класса G, A, M, β_2 -микроглобулин (β_2 -МГ) и С-реактивного белка выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas 6000 (Roche).

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 10 (Statsoft) с применением непараметрических методов анализа (критерий

Манн-Уитни, критерий Фишера). Результаты определения анализируемых показателей приведены в виде медианы с квартилями. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведено комплексное иммунохимическое обследование больных с миеломой Бенс-Джонса, результаты которого приведены в таблице.

Согласно данным электрофоретического исследования суточной мочи у 50 больных множественной миеломой медиана экскреции белка Бенс-Джонса составила 0,49 г/сут (0,06-2,45 г/сут), а максимальная экскреция белка Бенс-Джонса достигала 15,1 г/сут. У 27 из обследованных больных выявлялся белок Бенс-Джонса типа κ и у 23 – типа λ . Стоит отметить, что медиана суточной экскреции белка Бенс-Джонса типа λ – 0,98 г/сут была несколько выше, чем в группе с экскрецией белка Бенс-Джонса типа κ – 0,25 г/сут, однако различия не носили статистически значимого характера.

При этом экскреция общего белка в суточной моче больных была статистически значимо выше ($p = 0,02$) у больных с миеломой Бенс-Джонса типа λ (медиана 4,03 г/сут), по сравнению с типом κ (медиана 1,32 г/сут). Подобная закономерность может быть связана с биохимическими особенностями легких цепей иммуноглобулинов типа λ , которые образуют димеры, более негативно действующие на проницаемость гематоренального барьера, что приводит к усилению протеинурии.

У всех пациентов проводили электрофоретическое исследование с иммунофиксацией в сыворотке крови. Проведенный анализ в 86% случаев выявил наличие парапротеинемии, представленной легкими цепями иммуноглобулинов. При этом частота выявления моно-

Результаты биохимических исследований в сыворотке крови и суточной моче больных миеломой Бенс-Джонса различных типов

Показатель	Множественная миелома Бенс-Джонса			Контроль (n=28)	Референсные интервалы
	Все пациенты (n=50)	κ -тип (n=27)	λ -тип (n=23)		
Парапротеинурия Бенс-Джонса, г/сут	0,49 (0,06-2,45)	0,25 (0,04-1,4)	0,98 (0,2-3,8)	Не выявлено	-
Парапротеинемия, г/л	2,1 (1,5-3,3)	2,2 (1,2-3,8)	2,08 (1,7-2,6)	Не выявлено	-
Парапротеинемия, частота	86%	77,8%	95,7%	0%	-
κ -СЛЦ, мг/л	-	4358* (946-7282)	-	14,2 (11,1-16,2)	3-21,5
λ -СЛЦ, мг/л	-	-	2225* (690-5308)	10,5 (9,4-12,9)	5-27
IgG, г/л	6,2* (5,3-8,0)	6,9* (5,3-8,6)	5,8* (5,0-7,6)	10,5 (9,6-12,5)	7-16
IgA, г/л	0,75* (0,3-1,4)	0,93* (0,5-1,3)	0,4* (0,1-1,5)	2,08 (1,3-3,1)	0,7-4
IgM, г/л	0,23* (0,15-0,4)	0,31* (0,19-0,5)	0,18* (0,12-0,3)	1,05 (0,7-1,3)	0,4-2,3
β_2 -микроглобулин, мг/л	4,5* (2,6-10,5)	4,3* (2,5-9,6)	4,6* (3,2-11,4)	1,5 (1,4-1,9)	0,8-2,4
С-реактивный белок, мг/л	5,25* (1,1-14,4)	5,4* (1,5-12,0)	4,7* (1,0-15,1)	0,6 (0,4-1,6)	<6,0

Примечание. * – Отличия от контрольной группы статистически значимые ($p < 0,001$).

клональной секреции в сыворотке крови при миеломе Бенс-Джонса типа λ составляла 95,7%, что было выше, чем частота выявления моноклональной секреции типа κ – 77,8%, различия носили характер статистической тенденции ($\chi^2 = 0,07$). У 14% больных моноклональный компонент в сыворотке крови не был выявлен, что может наблюдаться при миеломе Бенс-Джонса.

Далее провели более детальный анализ с учетом наличия парапротеинемии. Так, у больных с выявленной парапротеинемией экскреция белка Бенс-Джонса с суточной мочой (медиана 0,82 г/сут) была статистически значимо выше ($p=0,01$), чем у больных без выявленного в сыворотке крови моноклонального компонента (медиана 0,04 г/сут). Таким образом, наличие парапротеина Бенс-Джонса в сыворотке крови ассоциировано с его более высокой экскрецией с суточной мочой, что может в целом отражать более высокую иммунохимическую активность опухоли и, как следствие, более тяжелое течение заболевания.

Помимо электрофореза с иммунофиксацией проводили иммунотурбидиметрическое определение СЛЦ в сыворотке крови. Оценка секреции κ - и λ -СЛЦ проводили у пациентов с соответствующими моноклональными СЛЦ, тип которых был верифицирован по данным иммунофиксационного электрофореза сыворотки крови и суточной мочи. У больных миеломой Бенс-Джонса типа κ медиана уровня κ -СЛЦ достигала 4358 мг/л, что статистически значимо ($p=0,000001$) превышало концентрации в сыворотке крови практические здоровых доноров (медиана 14,2 мг/л). Максимальная концентрация κ -СЛЦ в сыворотке крови составила 39480 мг/л, что более чем в 1800 раз превышало верхнюю границу нормы (21,5 мг/л). Аналогичная картина получена при исследовании λ -СЛЦ, медиана которых – 2225 мг/л также была статистически значимо выше ($p=0,000007$), чем в контрольной группе (медиана 10,6 мг/л). Максимальный уровень λ -СЛЦ достигал 20375 мг/л, что более чем в 750 раз превышало референсное значение (27 мг/л). Важно отметить, что полученные методом иммунотурбидиметрии уровни СЛЦ в сыворотке крови при миеломе Бенс-Джонса соответствующего типа превышали референсные уровни в 100% случаев, тогда как парапротеинемия выявлялась методом иммунофиксации у 86% больных.

В таблице представлены результаты определения иммуноглобулинов классов G, A, M, а также β 2-микроглобулина и С-реактивного белка в сыворотке крови больных ММ и в контрольной группе. Так, медианные концентрации IgG – 6,2 г/л, IgA – 0,75 г/л и IgM – 0,23 г/л у пациентов с миеломой Бенс-Джонса были статистически значимо ниже ($p<0,000001$), чем в контрольной группе (IgG – 10,5 г/л, IgA – 2,08 г/л, IgM – 1,05 г/л). Это может быть связано с избыточной секрецией патологическим клоном моноклональных СЛЦ, что приводит к нарушению физиологической продукции интактных иммуноглобулинов, снижению их концентрации в кровеносном русле и как следствие к развитию иммунодефицитных состояний.

Концентрации белков острой фазы: β 2-микроглобулина (медиана 4,5 мг/л) и С-реактивного белка (медиана 5,25 мг/л) у больных с миеломой

Бенс-Джонса были статистически значимо выше ($p<0,000001$), чем в контрольной группе (1,51 и 0,6 мг/л, соответственно), что может быть обусловлено неспецифическим системным воспалительным ответом. При этом в группе ММ Бенс-Джонса частота повышения β -микроглобулина достигала 80,8%, тогда как частота повышения С-реактивного белка составила 43,7%.

Для большей наглядности особенностей диагностики миеломы Бенс-Джонса и места биохимических маркеров в обследовании этой сложной категории больных нами представляется клиническое наблюдение.

Клиническое наблюдение. Больной М.И., 45 лет, диагноз: множественная миелома с секрецией белка Бенс-Джонса κ типа, распространенным остеодеструктивным процессом, III В стадия.

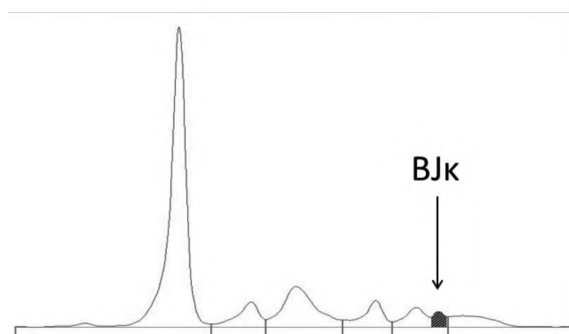
При иммунохимическом обследовании больного нами выявлена парапротеинемия Бенс-Джонса типа κ (1,3 г/л) и крайне выраженная гиперсекреция κ -СЛЦ – 9940 мг/л. При этом у пациента был снижен общий белок сыворотки крови (60 г/л), а также отмечен иммунодефицит по IgG (6,53 г/л), IgA (0,12 г/л) и IgM (0,16 г/л). Уровень β 2-микроглобулина был повышен до 6,37 мг/л. Общий белок в суточной моче пациента достигал 12,9 г/сут, главным образом за счет белка Бенс-Джонса типа κ в количестве 10 г/сут, который выявлен при иммунофиксации. Электрофореграмма и результаты иммунофиксации представлены на рисунке.

Выявленные при биохимическом обследовании пациента гипопроотеинемия с парапротеинемией, гиперпротеинурия с парапротеинурией Бенс-Джонса, а также снижение всех классов интактных иммуноглобулинов подтверждают тяжелое течение опухолевого процесса.

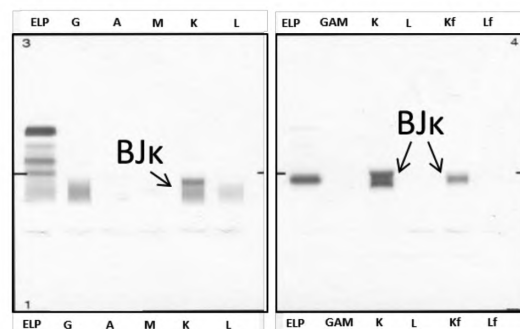
Пациенту назначали различные схемы химиотерапии, однако имела место резистентность к проводимому лечению. На этом фоне пациенту проводили гемодиализацию (ГДФ) с использованием высокоселективных фильтров ЕМІС2 для элиминации СЛЦ, однако устойчивого снижения κ -СЛЦ после сеансов ГДФ так и не было достигнуто. В то же время уровни κ -СЛЦ снизились до 35-50 мг/л на фоне 3 курсов по схеме VMD (Bortezomib/Velcade, 1,3 мг/м² на 1, 8, 22, 29 день; Melphalan, 9 мг/м² на 1-4 дни; Dexamethasone, 20 мг на 1, 2, 8, 9, 22, 23, 29, 30 дни; каждые 6 недель), и последующих 3 курсов химиотерапии (Doxorubicin 60 мг/м² и Cyclophosphamide 600 мг/м² в 1-й день, каждый 21 день), однако уровни κ -СЛЦ никогда не достигали нормы. Их циркуляция в избыточной концентрации способствовала дальнейшему поражению фильтрационной функции почек. При этом общее состояние пациента ухудшалось и через год наступила смерть от почечно-печеночной недостаточности. Стоит отметить, что парапротеинемия и протеинурия Бенс-Джонса, исследованные методом электрофореза с иммунофиксацией, практически не изменялись в ходе лечения, отражая резистентный характер течения заболевания.

Таким образом, полученные нами результаты о высокой чувствительности иммунофиксационного элек-

Электрофорез белковых фракций сыворотки крови



Иммунофиксация



Сыворотка крови

Суточная моча

Результаты иммуноэлектрофоретического анализа сыворотки крови и суточной мочи пациента с множественной миеломой Бенс-Джонса.

трофореза суточной мочи и анализа СЛЦ в сыворотке крови при миеломе Бенс-Джонса согласуются с данными ряда других авторов [2, 6, 11, 15]. При этом нами получены результаты, свидетельствующие о наличии биохимических признаков иммуносупрессии за счет снижения концентраций интактных иммуноглобулинов в результате гиперсекреции моноклональных СЛЦ, которые не принимают участие в их синтезе. Другой биохимической особенностью ММ Бенс-Джонса является формирование неспецифического воспалительного ответа, заключающегося в гиперсекреции С-реактивного белка и β 2-микроглобулина, что ранее широко не освещалось в литературе на достаточных выборках с использованием современных биохимических методов.

Заключение. Проведенный нами комплексный анализ сыворотки крови и суточной мочи больных с ММ Бенс-Джонса показал высокую диагностическую эффективность выявления моноклональной секреции методом электрофореза белковых фракций с иммунофиксацией. Наиболее чувствительным методом диагностики моноклональной секреции при миеломе Бенс-Джонса в сыворотке крови является иммунотурбидиметрическое определение СЛЦ иммуноглобулинов с использованием автоматического биохимического анализатора. При ММ Бенс-Джонса выявлены биохимические признаки вторичного иммунодефицита (снижение иммуноглобулинов класса G, A, M) а также общевоспалительного синдрома (повышение С-реактивного белка и β 2-микроглобулина). Таким образом, биохимический анализ при ММ Бенс-Джонса позволяет верифицировать тип моноклональной секреции и оценить тяжесть течения заболевания, как на этапе первичного обследования, так и в процессе динамического наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gupta N., Sharma A., Sharma A. Emerging biomarkers in Multiple Myeloma: A review. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 503:45-53.
- Willrich M.A., Katzmann J.A. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54(6):907-19.

- Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Harvey T.C., Drayson M.T. Serum test for assessment of patient with Bence Jones myeloma. *Lancet.* 2003; 361(9356):489-91.
- Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15(12):538-48.
- Durie B.G., Rajkumar S.V., Landgren O., Blade J., Merlini G. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia.* 2010; 24(6):1121-7.
- Misra A., Mishra J., Chandramohan J., Sharma A., Raina V., Kumar R., Soni S., Chopra A. Old but still relevant: high resolution electrophoresis and Immunofixation in Multiple Myeloma. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2016; 32(1):10-7.
- Lubimova N.V., Turko T.A., Votyakova O.M., Kushlinskii N.E. Serum immunoglobulin free light chains in patients with monoclonal gammopathies. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153(2):249-54.
- Bradwell A.R. Serum free light chain measurement move to center stage. *Clin. Chem.* 2005; 51(5):805-7.
- Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T. et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.* 2001; 47(4):673-80.
- Katzmann J.A., Clark R.J., Abpaham R.S., Bryant S., Lymp J.F., Bradwell A.R. et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.* 2002; 48(9):1437-44.
- Martellosio J.P., Leleu X., Roblot P., Martin M., Puyade M. Free light chains assay: Indications and methods. *Rev. Med. Interne.* 2019; 40(5):297-305.
- Lyubimova N.V., Timofeev Y.S., Abaev V.M., Votyakova O.M., Kushlinskii N.E. Immunochemical Diagnosis of Multiple Myeloma. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 165(1):84-7.
- Reddy A., Rapiti N., Gounden V. Comparison of 24-hour versus random urine samples for determination and quantification of Bence Jones protein in a South African population. *Afr. J. Lab. Med.* 202; 10(1):1228.
- Delgado J.C. Value of Urinary Free Light Chain Testing for Monitoring of Bence Jones Proteinuria. *J. Appl. Lab. Med.* 2019; 3(6):1059-60.
- Murray D.L., Seningen J.L., Dispenzieri A., Snyder M.R., Kyle R.A., Rajkumar S.V. et al. Laboratory persistence and clinical progression of small monoclonal abnormalities. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012; 138(4):609-13.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Мамонова И.А., Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю., Бондаренко А.С., Шпиняк С.П.

ОЦЕНКА СИСТЕМНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРОТЕЗИРОВАНИЯ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, г. Саратов, Россия

Одной из наиболее частых причин развития асептической нестабильности имплантируемых конструкций у пациентов с терминальными стадиями остеоартроза является нарушение иммунорегуляторных процессов ремоделирования костной ткани на фоне хронического воспалительного ответа, формирующегося под влиянием компонентов износа эндопротеза. Изучены особенности системного иммунного ответа у больных с воспалительными осложнениями, возникающими в позднем послеоперационном периоде после тотального протезирования крупных суставов. Проведение факторного анализа позволило определить наиболее значимые иммунологические механизмы, сопряженные с развитием асептической нестабильности имплантата. Выделены патогенетически значимые компоненты, участвующие в формировании клеточного и гуморального иммунного ответа у больных с признаками воспалительной активности в позднем послеоперационном периоде. Полученные результаты могут найти применение при разработке диагностических и прогностических критериев выраженности системного воспалительного ответа при осуществлении предоперационного мониторинга состояния пациентов, нуждающихся в эндопротезировании крупных суставов, а также быть использованы при выявлении развития асептической нестабильности имплантата.

Ключевые слова: остеоартроз; иммунный статус; эндопротезирование суставов; асептическая нестабильность; факторный анализ.

Для цитирования: Мамонова И.А., Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю., Бондаренко А.С., Шпиняк С.П. Оценка системного иммунного ответа у больных с воспалительными осложнениями протезирования крупных суставов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 575-580. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-575-580>

Для корреспонденции: Мамонова Ирина Александровна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; e-mail: mamonova.83@rambler.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР «Разработка средств, эффективных в отношении плёнокообразующих микроорганизмов при лечении инфекционных осложнений эндопротезирования суставов» (номер государственной регистрации 121032300172-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.06.2022

Принята к печати 29.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Mamonova I.A., Babushkina I.V., Ulyanov V.Yu., Bondarenko A.S., Shpinyak S.P.

ASSESSMENT OF THE SYSTEMIC IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY COMPLICATIONS OF LARGE JOINT IMPLANTS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education V.I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 410012, Saratov, Russia

One of the most common reasons for the progressing of aseptic instability of implanted structures in patients with end-stage osteoarthritis is a disorder of immunogenulatory processes of bone tissue remodeling along with chronic inflammatory response influenced by endoprosthesis wear components. This research features the specifics of systemic immune response in patients with inflammatory complications in late postoperative period after total replacements of large joints. The factor analysis enabled determining the most significant immunological mechanisms associated with the progressing of implant aseptic instability. Pathogenetically significant components involved in the formation of cellular and humoral immune responses in patients with signs of inflammatory activity in late postoperative period have been identified. Our findings can be used in designing diagnostic and prognostic criteria for systemic inflammatory response severity in preoperative monitoring of the condition of patients in need of large joint arthroplasties, and also in detecting the progress of implant aseptic instability.

Key words: osteoarthritis; immune status; joint replacement; aseptic instability; factor analysis.

For citation: Mamonova I.A., Babushkina I.V., Ulyanov V.Yu., Bondarenko A.S., Shpinyak S.P. Assessment of the systemic immune response in patients with inflammatory complications of large joint implants. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 575-580 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-575-580>

For correspondence: Mamonova I.A., Cand. Sci. Biol. (PhD), Junior Researcher in the Department of Fundamental, Experimental and Clinical Research; e-mail: mamonova.83@rambler.ru

Information about authors:

Mamonova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3941-4334>;

Babushkina I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6740-1050>;

Ulyanov V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9466-8348>;
Bondarenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6345-1851>;
Shpinyak S.P., <https://orcid.org/0000-0002-0345-6287>.

Acknowledgment. *The research was performed within the project 'Designing of medications effective against film-forming microorganisms in the treatment of joint arthroplasty infectious complications' Pathogenetic specifics, regulatory mechanisms and prognostic value of systemic symptoms of articular and osseous tissue metabolism disorders in early stages of osteoarthritis», Reg. No. 121032300172-2.*

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

Received 22.06.2022

Accepted 29.07.2022

Published 14.10.2022

Введение. Ежегодно в России растет количество пациентов с патологией крупных суставов (остеоартрозом), нуждающихся в проведении операции по тотальному эндопротезированию [1]. Увеличение числа инвазивных вмешательств по имплантации искусственного сустава влечет рост ревизионных операций. Асептическая нестабильность компонентов протезированного сустава относится к наиболее часто встречающимся осложнениям, основным патогенетическим механизмом развития которой считается поддержание хронического воспаления, вызванного реакцией иммунной системы организма на частицы износа имплантата [2]. Наряду с этим, основной причиной септического воспаления является наличие инфекционного процесса в области имплантации [3]. Трудности диагностики имплантат-ассоциированной инфекции обусловлены способностью возбудителей формировать микробную биопленку. Выделение микроорганизмов при этом становится затруднительным, что влечет неправильную постановку диагноза и, как следствие, приводит к выбору ошибочной тактики оперативного лечения [4, 5]. В связи с этим, в настоящее время актуальным направлением исследовательской работы является изучение механизмов развития асептического воспаления с целью определения патогенетически важных показателей, имеющих диагностическое значение.

Основной причиной возникновения асептической нестабильности протезированного сустава является развитие в околопротезной ткани клеточной реакции на продукты износа компонентов эндопротеза, протекающей по IV типу гиперчувствительности [6]. Такого рода изменения затрагивают непосредственно очаг воспаления, материал из которого может быть использован для иммунологического исследования, позволяющего определить характер патологического процесса. Однако, получение образцов для исследования возможно только с использованием инвазивных методов в условиях хирургического стационара, что не всегда может быть реализовано при проведении рутинных диагностических мероприятий [7]. Наряду с этим в ряде работ охарактеризованы иммунологические изменения, носящие системный характер у пациентов с хроническим воспалительным процессом, ассоциированным с развившейся асептической нестабильностью протезированного сустава. В частности показано, что провоспалительные цитокины (IL-8, IL-1 β , TNF- α), локализованные в основном в области их активации, могут достигать системного

кровообращения через капиллярный кровоток, а повышение их концентрации в сыворотке крови [8], может косвенно свидетельствовать об активации процессов резорбции кости.

Цель исследования – оценить особенности системного иммунного ответа и определить патогенетически значимые предикторы, отражающие особенности иммунных реакций у больных с асептической нестабильностью компонентов протезированного коленного сустава.

Материал и методы. В исследование были включены 20 больных с асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов (16 мужчин и 4 женщины), проходивших лечение в НИИТОН СГМУ в период с 2019 по 2020 г. Средний возраст больных составил 66,2 $\pm$ 10,3 года. Диагноз «асептическая нестабильность эндопротеза сустава» был подтвержден клинически: жалобы пациентов на боль в области хирургического вмешательства, появляющаяся как при физических нагрузках, так и в покое, результатами рентгенологического, общеклинического, бактериологического обследования, а также итогами оперативного вмешательства по удалению компонентов протезированного устройства. Критериями исключения пациентов из исследуемой группы являлось наличие ревматоидного артрита, проведение внутрисуставных инъекций кортикостероидов не менее чем за 3 нед до проводимого исследования. В контрольную группу были включены 20 практически здоровых добровольцев (13 мужчин и 7 женщин) той же возрастной группы (69,8 $\pm$ 13,3 года) без патологий опорно-двигательного аппарата, аллергических, аутоиммунных, инфекционно-воспалительных заболеваний, которые не являлись носителями вирусов гепатита В и С, ВИЧ.

Взятие крови для проведения иммунологического исследования осуществляли до проведения оперативного вмешательства. Определение абсолютного количества T-, B-, и NK-клеток периферической крови проводили с помощью набора моноклональных антител «BD Multitest 6-Color TBNK Reagent» (BD, США) на цитометре «BD FACS Canto II» (BD, США). Количественную оценку содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови осуществляли иммунотурбидиметрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе открытого типа «Sapphire-400» (Hirose Electronic Sistem Co., Япония) с помощью набора реагентов «Immunoglobulin A, M, G (FS)» (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Германия). Уро-

вень цитокинов в сыворотке крови определяли методом ИФА с применением набора реагентов «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) на приборе «Epoch» (BioTechUSA, США).

Проведение исследования одобрено протоколом Комитета по этике ФГБУ ВО Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского № 7 от 02.02.21 г. При выполнении работы руководствовались этическими стандартами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. От пациентов было получено информированное согласие на публикацию результатов обследования без раскрытия их личности.

Обработка полученных данных проводилась с помощью методов непараметрической статистики с применением пакета программ Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Анализ параметров с распределением, отличным от нормального, проводился непараметрическими методами. Показатели представлены в форме $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, где Me – медиана, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – 25 % и 75 % квартили. Для оценки достоверности различий применяли

U-критерий Манна-Уитни. Факторный анализ методом главных компонент проводили с помощью программного комплекса SPSS (11-2018). Пригодность данных к факторному анализу и значимость полученной факторной модели проверяли с помощью критериев Кайзера-Майера-Олкина (значения должны входить в диапазон от 0,5 до 1) и критерия Бартлетта (модель пригодна для анализа при $p < 0,05$). Для выделения факторов использовался метод главных компонент, для выявления наилучшего состава факторов применялся метод вращения варимакс с нормализацией Кайзера.

Результаты. Результаты оценки иммунограмм больных асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов представлены в табл. 1.

Установлено достоверное снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3+CD19-) периферической крови больных с асептической нестабильностью компонентов имплантированных суставов по сравнению с группой практически здоровых добровольцев ($p=0,0006$), как за счет Т-хелперов (CD3+CD4+) ($p=0,0001$), так и за счет цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) ($p=0,0019$), что свидетельствует о недостаточности клеточного иммунитета связанного с развитием воспалительного процесса. Показатель абсолютного количества В-клеток (CD3-CD19+) периферической крови у контрольной группы пациентов также оказался выше ($p=0,00001$).

Таблица 1

Показатели иммунной системы больных асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов, $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$

Показатели	Контрольная группа ($n=20$)	Группа пациентов с асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов ($n=20$)
CD3+CD19-, (10^9 /л)	1,78 (1,43; 1,81)	1,4 (1,34; 1,44) $p=0,0006$
CD3+CD4+, (10^9 /л)	0,96 (0,95; 1,12)	0,77 (0,71; 0,84) $p=0,0001$
CD3+CD8+, (10^9 /л)	0,66 (0,39; 0,75)	0,47 (0,44; 0,53) $p=0,0019$
CD3-CD16+CD56+, (10^9 /л)	0,17 (0,15; 0,29)	0,29 (0,11; 0,49)
CD3-CD19+, (10^9 /л)	0,32 (0,27; 0,34)	0,15 (0,14; 0,16) $p=0,00001$
IgA (мг/дл)	101,00 (93,00; 115,50)	138,5 (114,50; 165,00) $p=0,0154$
IgM (мг/дл)	153,7 (131,00; 181,30)	129,1 (113,50; 137,00) $p=0,0005$
IgG (мг/дл)	1667,30 (1496,80; 1800,30)	1401,90 (1244,00; 1525,00) $p=0,0133$
ФНО α (пг/мл)	4,71 (4,01; 5,93)	10,1 (7,8; 12,5) $p=0,0001$
ИЛ-4 (пг/мл)	0,19 (0,07; 0,26)	0,2 (0,1; 0,3)
ИЛ-10 (пг/мл)	15,38 (11,96; 20,51)	10,60 (9,09; 12,90) $p=0,0001$
ИЛ-6 (пг/мл)	6,98 (4,93; 8,53)	20,30 (17,30; 25,50) $p=0,0001$

Примечание. n – число обследованных; Me – медиана; $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ – 25 % и 75% квартили; p – достоверность различий показателей к контрольной группе пациентов.

Достоверного различия абсолютного содержания НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) между группами не установлено, однако обнаружена тенденция к повышению этого показателя у больных асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов.

Асептическая нестабильность компонентов протезированных суставов сопровождалась увеличением содержания сывороточного иммуноглобулина А ($p=0,0154$), а также снижением иммуноглобулинов классов М ($p=0,0005$) и G ($p=0,0133$).

У пациентов с нестабильностью эндопротеза, по сравнению с группой практически здоровых добровольцев, отмечалось увеличение в сыворотке крови цитокинов ИЛ-6 ($p=0,0001$) и ФНОα ($p=0,0001$). Кроме того, обращает на себя внимание снижение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10 ($p=0,0001$) наряду с увеличением количества провоспалительных цитокинов. Статистически значимых различий в концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови больных с асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов и группой практически здоровых добровольцев не установлено.

Проведен факторный анализ данных иммунологического обследования пациентов с асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов. Применение данного метода статистического исследования дает возможность выделить главный компонент, состоящий из совокупности патогенетических факторов, оказывающих наиболее выраженное влияние друг на друга, что позволяет объяснить наблюдаемые связи между переменными и выявить скрытые закономерности, указывающие на особенности формирования иммунного ответа больных с асептической нестабильностью компонентов протезированного сустава.

Построена повернутая матрица компонентов (табл. 2). В результате проведенного анализа выделено два фактора (КМО=0,510 и критерии Бартлетта=0,047<0,050), объясняющих 77,600 % всех отклонений в совокупности показателей. Контраст между факторами составил 14 %, что свидетельствует о наличии различий выделенных компонентов.

Обсуждение. Первый наиболее значимый компонент матрицы с факторной нагрузкой 1,98 показыва-

ет сильную положительную корреляцию концентрации сывороточного ФНОα (+0,879) с абсолютным количеством НК-клеток (+0,762) и отрицательная – с абсолютным содержанием Т-лимфоцитов периферической крови (-0,731). Значения первого компонента указывают на наиболее выраженные изменения, связанные с формированием клеточного иммунного ответа.

Известно, что ФНОα секретируется тканевыми макрофагами и обеспечивает экспрессию адгезивных молекул, тем самым опосредуя миграцию эффекторных клеток через сосудистую стенку и инфильтрацию ими тканей [9]. В.Л. Нерцус [10] и М.С. Couto и соавт. [11] выявили присутствие Т-лимфоцитов в псевдокапсулярной ткани больных с нестабильными эндопротезами. Миграция этих клеток в очаг воспаления происходит из местных кровеносных сосудов. В ряде исследований показана экспрессия Р-селектина, Е-селектина (ЕСАМ-1), ICAM-1, VCAM-1, CD 44 эндотелиальными клетками сосудов псевдокапсулярной ткани больных асептической нестабильностью протезированных суставов [10, 12]. Экспрессия Е-селектина указывает на миграцию Т-клеток в очаг воспаления из кровеносных сосудов [13], что объясняет их присутствие в параимплантарном пространстве у больных асептической нестабильностью суставов и снижение абсолютного количества клеток в системном кровотоке. Повышение уровня ФНОα в системном кровотоке связано с гиперпродукцией цитокина в очаге воспаления.

Известно, что ФНОα, наряду с ИЛ-6, является ключевым провоспалительным цитокином участвующим в развитии реакции организма на имплантированное устройство, способствует клеточной пролиферации, стимулирует образование остеокластов и увеличивает резорбцию кости вокруг протезов. ФНОα участвует в регуляции резорбции костной ткани по гормон независимому провоспалительному пути и стимулирует остеобласты для выработки остеорезорбтивных факторов, таких как ИЛ-6 и простагландин E₂ (PGE₂) [14-16]. Высокие концентрации ФНОα были установлены в образцах перепротезной ткани, имеющей зоны остеолитиза, взятых у пациентов с нестабильностью эндопротеза крупных суставов [17].

Таблица 2

Факторный анализ показателей иммунной системы больных асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов

Показатели	Компонент	
	1	2
Фактор некроза опухолей (ФНОα)	0,879	-
Абсолютное количество НК-клеток (CD3-CD16+CD56+)	0,762	-
Абсолютное количество Т-лимфоцитов (CD3+CD19-)	-0,731	-
Имуноглобулин М	-	0,750
Интерлейкин-4 (ИЛ- 4)	-	0,669
Собственные значения	1,980	1,255
% объясненной дисперсии	39,593	25,109

Прямая корреляция ФНО α с содержанием НК-клеток показывает роль этого класса лимфоцитов в развитии асептической нестабильности протезированного сустава. Известно, что НК-клетки вызывают лизис чужеродных клеток и собственных изменённых клеток организма в отсутствии молекул главного комплекса гистосовместимости класса I на поверхности, вне зависимости от содержания антител и системы комплемента. В проведенном нами исследовании не наблюдалось статистически значимых различий абсолютного содержания НК-клеток в периферической крови больных асептической нестабильностью компонентов протезированных суставов и практически здоровых добровольцев. Однако прослеживалась тенденция к повышению этого показателя у пациентов с нестабильным эндопротезом. Аналогичные данные были получены С. Case и соавт. [18] при обследовании больных, перенесших ревизионное эндопротезирование.

Второй компонент матрицы объединил 25,109 % дисперсии, и показал сильную корреляцию между показателями концентрации иммуноглобулинов М (+0,750) и содержанием интерлейкина-4 (0,669) сыворотки крови. Значения второго компонента отражают наиболее выраженные изменения гуморального звена иммунной системы больных с асептической нестабильностью компонентов протезированного сустава.

Известно, что В-лимфоциты являются главными клетками иммунной системы, обеспечивающими реализацию гуморального иммунного ответа за счет синтеза иммуноглобулинов различных классов. Это процесс регулируется Th2-лимфоцитами и опосредуется вырабатываемыми лимфоцитами цитокинами: ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. У больных с асептической нестабильностью протезированного сустава отмечалось снижение содержания В-лимфоцитов периферической крови, а также сывороточных иммуноглобулинов класса М и G на фоне нормального содержания цитокина ИЛ-4. Данный факт может указывать на истощение гуморального иммунного ответа, что возможно, связано с сенсibilизацией организма продуктами износа имплантируемой конструкции, которые, по мнению ряда авторов, попадают и в системный кровоток [13, 19]. Данный факт подтверждается отсутствием В-лимфоцитов, в том числе и плазматических клеток, в очаге воспаления, вызванном асептической нестабильностью протезированных суставов [13]. Вместе с тем следует отметить, что уровень иммуноглобулина А у больных с асептической нестабильностью суставов оказался выше, чем в контрольной группе, что, по мнению некоторых авторов, может в совокупности с другими факторами указывать на усиление процессов резорбции костной ткани [20].

Заключение. Таким образом, проведенное нами исследование продемонстрировало наличие существенных различий в показателях клеточного, гуморального иммунитета и цитокинового профиля периферической крови пациентов с асептической нестабильностью протезированных суставов по сравнению с группой практически здоровых добровольцев. Полученные в результате проведенного исследования

данные открывают перспективу для разработки новых интегральных методов, позволяющих провести своевременную диагностику и определиться с тактикой оперативного лечения пациентов с нестабильностью протезированного сустава. В качестве диагностических критериев для разработки алгоритма диагностики могут быть использованы следующие показатели: абсолютное количество Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов периферической крови, а также уровень ФНО α сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 8, 10-19 см. REFERENCES)

1. Вороков А.А., Бортулев П.И., Хайдаров В.М., Линник С.А., Ткаченко А.Н. Эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов: показания к операции. *Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста*. 2020; 8(3): 355-64.
2. Чепелева М.В., Чегуров О.К., Кузнецова Е.И., Швед Н.С. Показатели иммунитета у пациентов с асептической нестабильностью коленного сустава. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(8): 18-21.
3. Бабушкина И.В., Бондаренко А.С., Ульянов В.Ю., Мамонова И.А. Формирование биоплёнок грамотрицательными бактериями при имплантатассоциированной инфекции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 169(3): 338-41.
4. Фёдоров Е.А. Лечение глубокой перипротезной инфекции тазобедренного сустава с использованием бактериофаготерапии (экспериментально-клиническое исследование). Дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск; 2021.
5. Бабушкина И.В., Мамонова И.А., Бондаренко А.С., Ульянов В.Ю., Норкин И.А. Особенности клеточного иммунитета при имплантатассоциированных инфекциях, вызванных биоплёнкообразующими микроорганизмами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(10): 467-70.
7. Брагина С.В. Современные возможности ранней лабораторной диагностики перипротезного остеолиза как предиктора развития асептической нестабильности эндопротеза тазобедренного сустава (обзор литературы). *Гений ортопедии*. 2020; 26(2): 261-5.
9. Ашкинази В.И., Маянская И.В., Толкачёва Н.И., Федулова Э.Н., Широкова Н.Ю., Васильева Е.А., Шумилова О.В. Молекулы адгезии при деструктивно-воспалительном процессе в кишечнике у детей с язвенным колитом. *Вопросы современной педиатрии*. 2013; 12(4): 52-6.
20. Дмитриева Л.А., Коршунова Е.Ю., Лебедев В.Ф. Иммунопатологические проявления у больных с тяжёлыми формами коксартроза. *Медицинская иммунология*. 2009; 11(2-3): 161-8.

REFERENCES

1. Vorokov A.A., Bortulev P.I., Khaidarov V.M., Linnik S.A., Tkachenko A.N. Total hip and knee arthroplasty: On the issue of indications for surgery. *Ortopediya, travmatologiya i vosstanovitel'naya khirurgiya detskogo vozrasta*. 2020; 8(3): 355-63. DOI: 10.17816/PTORS34164. (in Russian)
2. Chepeleva M.V., Chegurov O.K., Kuznetsova E.I., Shved N.S. The indicators of immunity in patients with aseptic instability of knee joint. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 59(8): 18-21. (in Russian)
3. Babushkina I.V., Bondarenko A.S., Ulyanov V.Yu., Mamonova I.A. Biofilm formation by gram-negative bacteria during implant-associated infection. *Byulleten'eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 169(3): 338-41. (in Russian)
4. Fedorov E.A. Treatment of deep periprosthetic infection of the hip joint using bacteriophage therapy (experimental clinical study). Diss. Novosibirsk; 2021. (in Russian)
5. Babushkina I.V., Mamonova I.A., Bondarenko A.S., Ulyanov V.Yu., Norkin I.A. Cell immunity in implant-associated infections caused

- by biofilm-forming microorganisms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 170(10): 467-70. (in Russian)
6. Holt G., Murnaghan C., Reilly J., Meek R.M. The biology of aseptic osteolysis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2007; (460): 240-52. DOI: 10.1097/BLO.0b013e31804b4147
7. Bragina S.V. Modern possibilities with early laboratory diagnosis of periprosthetic osteolysis predating aseptic loosening in total hip arthroplasty (literature review). *Geniy Ortopedii*. 2020; 26(2): 261-5. DOI 10.18019/1028-4427-2020-26-2-261-265. (in Russian).
8. Hundrić-Haspl Z., Pecina M., Haspl M., Tomicic M., Jukic I. Plasma cytokines as markers of aseptic prosthesis loosening. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2006; (453): 299-304. DOI: 10.1097/01.blo.0000229365.57985.96.
9. Ashkinazi V.I., Mayanskaya I.V., Tolkacheva N.I., Fedulova E.N., Shirokova N.Yu., Vasil'eva E.A., Shumilova O. Adhesion molecules in intestinal destructive-inflammatory process in the children with ulcerative colitis. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2013; 12(4): 52-6. (in Russian)
10. Hercus B.J. Modelling T lymphocyte reactions to biomedical materials. University of London; 2005.
11. Couto M., Vasconcelos D.P., Sousa D.M., Sousa B., Conceição F., Neto E. et al. The mechanisms underlying the biological response to wear debris in periprosthetic inflammation. *Front. Mater.* 2020; (7): 274. DOI: 10.3389/fmats.2020.00274.
12. McFarlane T., Revell P.A. The expression of CD44 in archival paraffin embedded interface tissues of failed orthopaedic implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; (15): 315-319. DOI: 10.1023/B:JMSM.0000021094.50889.5c.
13. Revell P.A. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *J. R. Soc. Interface*. 2008; 5(28): 1263-78. DOI:10.1098/rsif.2008.0142.
14. Wang C.T., Lin Y.T., Chiang B.L., Lee S.S., Hou S.M. Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials*. 2010; 31(1): 77-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.017.
15. Möller B., Villiger P.M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 27(4): 391-408. DOI: 10.1007/s00281-006-0012-9.
16. Caicedo M., Jacobs J.J., Hallab N.J. Inflammatory bone loss in joint replacements: the mechanisms. *Journal Musculoskeletal Medicine*. 2010; 27(6): 209-16.
17. Syggelos S.A., Aletras A.J., Smirlaki I., Skandalis S.S. Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013: 230805. DOI: 10.1155/2013/230805.
18. Case C.P., Langkamer V.G., Lock R.J., Perry M.J., Palmer M.R., Kemp A.J. Changes in the proportions of peripheral blood lymphocytes in patients with worn implants. *J. Bone Joint Surg Br.* 2000; 82(5): 748-54. DOI: 10.1302/0301-620x.82b5.9946.
19. Daniel J., Ziaee H., Pradhan C., Pynsent P.B., McMinn D.J. Blood and urine metal ion levels in young and active patients after Birmingham hip resurfacing arthroplasty: four-year results of a prospective longitudinal study. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2007; 89(2): 169-173. DOI: 10.1302/0301-620X.89B2.18519.
20. Dmitrieva L.A., Korshunova E.Y., Lebedev V.F. Immunopathologic manifestations in patients with severe forms of coxarthrosis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11(2-3): 161-168. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-161-168. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Каргальцева Н.М.¹, Борисова О.Ю.¹, Кочеровец В.И.², Миронов А.Ю.^{1,5}, Карпова Е.И.³, Данишук О.И.³, Сапронова Е.В.⁴, Петрачкова Е.А.⁴, Пименова А.С.¹, Гадуа Н.Т.¹, Чагина И.А.¹

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА ПРИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава РФ», 119991, Москва, Россия;

³ООО «Клиника Данишука», 107045, Москва, Россия;

⁴СПБ ГБУЗ «Городская поликлиника № 75», специализированная централизованная бактериологическая лаборатория, 196135, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА», 115682, Москва, Россия

Внегоспитальные инфекции кровотока (ВГИК) возникают во внебольничной обстановке (44%) и увеличивают число случаев общей летальности при инфекции кровотока (ИК) на 7,2% в год. Развитие ВГИК зависит как от коморбидных и полиморбидных заболеваний, так и от возраста пациентов. Источниками ВГИК являются респираторный, гепатобилиарный, желудочно-кишечный, урогенитальный тракты, стоматологические вмешательства в полости рта. Этиология ВГИК характеризуется выделением коагулазонегативных стафилококков (КНС) (32%), E. coli (27%). Цель исследования: изучить ВГИК у терапевтических пациентов. В исследование включены внегоспитальные пациенты (n=382). Внутривенно отбирали 4,5 мл крови в закрытую вакуумную систему для получения лейкоцитарного слоя крови, из которого готовили мазки для микроскопии и сеяли на чашки Петри с кровяным агаром для культивирования в аэробных и анаэробных условиях. Клинические изоляты идентифицировали методом масс-спектрометрии. Для экспресс-диагностики ИК использована микроскопия мазка крови. ИК диагностирована у 183 (48,0%) из 382 внегоспитальных пациентов. Этиология ВГИК изучена на 297 клинических изолятах микроорганизмов. ВГИК чаще осложняла основное заболевание у женщин и лиц молодого возраста. Спектр возбудителей ВГИК включал аэробные и анаэробные бактерии и грибы. Среди бактерий чаще выделяли грамположительные кокки с преобладанием S. epidermidis (25,7%). В анаэробных условиях дали рост 70% всех выделенных возбудителей. ВГИК характеризовалась ассоциацией (33,5%) от двух до четырёх видов микроорганизмов в одной гемокультуре. При микроскопии мазков крови микроорганизмы обнаружены в 97,1% случаев, включая ассоциации бактерий и грибов (66,9%). ВГИК развивалась после контурной пластики, при заболеваниях органов дыхания, мочеполовой системы, полости рта, кожи и подкожной клетчатки. Микробиологическое исследование лейкоцитарного слоя крови является альтернативным методом клинической лабораторной диагностики ВГИК, включающим микроскопию мазка крови и посев крови, обладающим высокой диагностической эффективностью (97,1% и 48%, соответственно), который может служить вариантом замещения импортных гемокультуральных автоматизированных систем.

Ключевые слова: инфекция кровотока; внегоспитальные терапевтические больные; лейкоцитарный слой; гемокультура; мазок крови.

Для цитирования: Каргальцева Н. М., Борисова О. Ю., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Карпова Е.И., Данишук О.И., Сапронова Е.В., Петрачкова Е.А., Пименова А.С., Гадуа Н.Т., Чагина И.А. Лабораторная диагностика внегоспитальной инфекции кровотока при терапевтической патологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 581-587. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-581-587>

Для корреспонденции: Каргальцева Наталья Михайловна, канд. мед. наук, науч. сотр.; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.05.2022

Принята к печати 26.05.2022

Опубликовано 14.10.2022

Kargaltseva N.M.¹, Borisova O.Yu.¹, Kocherovets V.I.², Mironov A.Yu.^{1,5}, Karpova E.I.³, Danishuk O.I.³, Sapronova E.V.⁴, Petrachkova E.A.⁴, Pimenova A.S.¹, Gadua N.T.¹, Chagina I.A.¹

LABORATORY DIAGNOSIS OF COMMUNITY-ACQUIRED BLOODSTREAM INFECTION IN THERAPEUTIC PATHOLOGY

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

³LLC «Danishuk's clinic», 107045, Moscow, Russia;

⁴SPB GBUZ «City Polyclinic № 75», specialized centralized bacteriological laboratory, 196135, St. Petersburg, Russia;

⁵Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, 125212, Moscow, Russian Federation

Community-acquired bloodstream infections (CBSIs) occur in the out-of-hospital setting (44%) and increase the overall mortality from bloodstream infections (BSIs) by 7.2% per year. The development of CBSIs depends on both comorbid and polymorbid diseases and the patients' age. The causes of CBSIs are: respiratory, hepatobiliary gastrointestinal and urogenital tracts and dental interventions. The etiology of CBSIs is characterized by the isolation of coagulase-negative staphylococci (CNS) (32%), E. coli (27%). To investigate community-acquired bloodstream infection in therapeutic patients. The study included out-of-hospital patients (n=382). 4.5 ml of blood were taken intravenously into a closed vacuum system in order to obtain a buffy coat of blood, which was put on glasses for microscopy and Petri dishes with blood agar for cultivating under aerobic and anaerobic conditions. Microorganisms were identified by mass spectrometry. Microscopy of blood smears was used for rapid diagnosis of infection in the bloodstream. BSI was diagnosed in 183 (48.0%) out of 382 out-of-hospital patients. The etiology of CBSIs was studied on 297 isolated strains of microorganisms. CBSIs rather often complicated the underlying disease in women and young people. The spectrum of CBSI pathogens included aerobic and anaerobic bacteria and fungi. Gram-positive cocci with the leadership of S. epidermidis (25.7%) were more often isolated among bacteria. 70% of all isolated pathogens grew under anaerobic conditions. CBSIs were characterized by polymicrobiality (33.5%) of two to four different microorganisms in one blood culture; the species of associates of polymicrobial blood cultures are shown. Microscopic examination of blood smears revealed microorganisms in 97.1% of cases, including associations of bacteria with fungi (66.9%). CBSIs occurred after contour plastic, in diseases of the respiratory system, genitourinary system, oral cavity, skin and subcutaneous tissue. Microbiological examination of the buffy coat is an alternative microbiological method of CBSIs diagnosis, which includes microscopy and blood cultivating and has a high diagnostic efficiency (97.1% and 48% respectively). It can become an option for replacing imported blood culture automated systems.

Key words: bloodstream infection; out-of-hospital therapeutic patients; buffy coat; blood culture; blood smear.

For citation: Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Karpova E.I., Danishuk O.I., Saprionova E.V., Petrachkova E.A., Pimenova A.S., Gadua N.T., Chagina I.A. Laboratory diagnosis of community-acquired bloodstream infection in therapeutic pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 581-587 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-581-587>

For correspondence: Kargaltseva N. M., Ph.D. (Medicine), researcher; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Information about authors:

Kargaltseva N.M., <https://orcid.org/0000-0002-3245-5486>;
Borisova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Kocherovets V.I., <https://orcid.org/0000-0001-7720-670X>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Karpova E.I., <https://orcid.org/0000-0003-0510-1022>;
Danishuk O.I., <https://orcid.org/0000-0002-0022-4923>;
Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Chagina I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2867-9548>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.05.2022

Accepted 26.05.2022

Published 14.10.2022

Введение. Внегоспитальные инфекции кровотока (ВГИК) развиваются во внебольничной обстановке за 48 час до поступления пациента в стационар [1]. За счёт ВГИК увеличивается число случаев общей летальности при инфекции кровотока (ИК) на 7,2% в год [2]. Наблюдается рост количества эпизодов ВГИК (44%) и уровень летальности: при диализе (16%), инвазивных микозах у онкогематологических больных (20%), иммунодефицитных состояниях (57%), пневмонии (63,2%), целлюлите (37%) [2–8].

В развитии ВГИК играют роль коморбидные и полиморбидные заболевания при: ревматизме, остеомиелите, инфекции кожи и мягких тканей, пневмонии, сердечно-сосудистых заболеваниях, диабете [9, 10]. Возраст является фактором риска развития ВГИК: с 19 до 64 лет (43%) и с 65 до 79 лет (28%), и связан с показателями инвалидности и смертности, больше страдают мужчины, чем женщины, из-за курения и употребления алкоголя [1, 2, 11, 12]. У больных до 60 лет отмечено преобладание грамположительной бактериемии (Б) (54,3%) над грамотрицательной (47,6%) с летальностью до 35,3% случаев, у больных старше 60 лет – грамотрицательной бактериемии (52,4%) над

грамположительной (45,7%) с более высокой летальностью (44,9%). В случае *Staphylococcus aureus* бактериемии летальность больных до 60 лет составляла 41,9%, старше 60 лет – 60,6% случаев. По данным ВОЗ внебольничная пневмония представляет серьёзную проблему из-за стёртого характера клинических симптомов, инвалидности и летальности [13]. К прогностическим факторам ВГИК относят сопутствующую патологию (30%), опухоли, онкогематологические заболевания (24,2%), иммунокомпрометированных пациентов (31%) [1, 12].

Источником Б при ВГИК являются: респираторный (20%), гепатобилиарный (8%), желудочно-кишечный (13%), мочеполовой тракты (58%), кишечник (30,5%), полость рта [14, 15]. Одонтогенная Б развивается вслед за чисткой зубов обычной зубной щёткой спустя 5 мин (61%), через 15-30 мин или спустя 5-8 час после любой манипуляции в полости рта: удаление зуба (60%), зубных камней (88%) [15].

Классификация ИК включает: 1) истинную ВГИК (36%); 2) инфекцию у пациента, недавно выписанного из стационара (11%); 3) инфекцию, ассоциированную с инвазивными процедурами, выполненными до или во

время госпитализации (4%); 4) инфекцию у больных, поступивших из дома престарелых (7%); 5) госпитальную инфекцию кровотока (ГИК) (41%). ВГИК разделяют на 4 группы (А, В, С, D) и дополнительно группу «С», включающую 5 подгрупп (С1, С2, С3, С4, С5) [2].

Ведущими возбудителями ВГИК являются коагулазонегативные стафилококки (КНС) (32%), *Escherichia coli* (27%), *Staphylococcus aureus* (21,3%), *Klebsiella pneumoniae* (8,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,3%), *Enterococcus faecalis* (5,2%), грибы [2, 16 -18]. В развивающихся странах Юга и Юго-Восточной Азии в этиологии ВГИК преобладают (70,7%) грамотрицательные палочки: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* [1, 2, 19 – 21]. В развитых странах возбудителем ВГИК является *Streptococcus pneumoniae* на фоне хронических заболеваний лёгких (31%) и сердечной недостаточности (15,6%) [2, 22]. *K. pneumoniae* – частый возбудитель ВГИК, ассоциированный с коморбидными состояниями и инвазивными процедурами (90%) [2, 22]. *Rhodococcus equi* и *Sarcina ventriculi*, постоянно циркулирующие в крови у населения Финляндии, отнесены к редкому рецессивному наследственному заболеванию в Финляндии [23].

В России микробиологическое исследование крови до 2020 г. проводили согласно Приказу Минздрава СССР № 535 от 1985 г.¹. Отечественные техники получения гемокультуры не показали оптимального решения проблемы, что требовало кардинально изменить методологию диагностики ИК. С этой целью использованы принципы оптимизации гемокультивирования при диагностике ВГИК [24-26]. Для экспресс-диагностики ИК используют микроскопию мазка крови, которая начала применяться более века назад [27-29]. Разработана техника приготовления мазка крови из лейкоцитарного слоя пробы цельной крови, поскольку лейкоцитарный слой – концентрат микроорганизмов, находящихся в данной пробе крови. В мазках крови обнаруживают бактерии, дрожжевые клетки и псевдогифы грибов рода *Candida*, наблюдают явление фагоцитоза. По результатам микроскопии мазка крови диагностируют заболевания и назначают эмпирическую антимикробную терапию до получения результатов посева крови при бабезиозе, *Mycobacterium avium complex* диссеминированной инфекции, СПИДе, токсоплазмозе, системном кандидозе, пневмококковой бактериемии, гистоплазмозе, лейшманиозе, малярии, лепре [30, 31]. Гемокультура подтверждает результаты микроскопического исследования крови. Разработанная техника микроскопии диагностирует бактериозы, микозы, паразитозы [27].

Цель исследования – оптимизация лабораторной диагностики инфекции кровотока у внегоспитальных пациентов терапевтического профиля.

Материал и методы. В исследование включены внегоспитальные пациенты ($n=382$), проходившие микробиологическое исследование крови в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 75» специализированной

централизованной бактериологической лаборатории и клинко-диагностическом центре ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора в период 2000-2019 гг. с заболеваниями различных систем организма: органов дыхания, кожи и подкожной клетчатки, органов пищеварения, мочеполовой, полости рта, осложнениями после пластической хирургии, лихорадкой неясного происхождения по направлениям клиницистов из лечебно-профилактических организаций по подозрению ИК. Для сбора информации использована разработанная карта, включающая: анамнез, клинические и клинко-лабораторные данные.

Посев и микроскопию лейкоцитарного слоя периферической крови проводили согласно МР². Внутривенно отбирали 4,5 мл крови в закрытую вакуумную систему для крови с цитратом натрия. После центрифугирования лейкоцитарный слой наносили на предметные стекла для окраски по Граму с последующей микроскопией и сеяли на чашки Петри с кровяным агаром для культивирования в аэробных и анаэробных условиях [26]. Посевы инкубировали при 37° С. Колонии микроорганизмов, выросшие на плотной питательной среде, изучали с использованием стереоскопических микроскопов МСП-1 (ЛОМО, Россия), SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия), объектив PlanApo S 1,0×FWD 60 мм и окуляр PI 10×23 Br foc. Культуральные свойства выросших микроорганизмов изучали по характеру выросших колоний, наличию гемолиза. Морфологические и тинкториальные свойства изучали микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Биохимические свойства определяли по выявлению ферментативной активности с помощью коммерческих биохимических тест-систем и на бактериологическом анализаторе AutoSCAN-4 (Siemens Healthcare Diagnostics MicroScan, Германия). Клинические isolates идентифицировали методом MALDI-ToF масс-спектрометрии при помощи VITEK[®] MS (bioMérieux, Франция) и анализатора микробиологического «BactoSCREEN» («Литех», Россия), включающий MALDI масс-спектрометр и программное обеспечение для управления анализом и идентификации микроорганизмов «BactoSCREEN-ID». Для микроскопии использовали микроскоп МИКРОМЕД-1, иммерсионный объектив МИ 90-1,25 и окуляр К 7* (ЛОМО, Россия), Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 x 23 Br foc, Carl Zeiss, Германия).

Для статистической обработки данных использован пакет программ статистического анализа Statistica 10. При сравнении использован критерий χ^2 (хи-квадрат) или критерий Фишера.

Результаты. ИК анализировали у внегоспитальных терапевтических пациентов по результатам микроскопического и культурального исследования проб крови 382 пациентов. ИК верифицирована выделением гемокультуры у 183 (48,0%) больных и обнаружением микроорганизмов в 329 (97,1%) мазках из

¹Приказ Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

²Методические рекомендации «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга; 2010 г.

339 мазков крови внегоспитальных пациентов. Этиология ВГИК изучена на 297 клинических изолятах и 329 мазках крови с положительными результатами.

Из клинических симптомов у внегоспитальных больных отмечали повышенную температуру тела (61,7%) и озноб (81,4%). Гендерные и возрастные особенности внегоспитальных больных с подтвержденной ВГИК представлены в табл. 1.

ВГИК чаще осложняла основное заболевание у женщин (65,6%), чем у мужчин (34,4) ($p < 0,001$), и у лиц молодого возраста (74,9%). Микроорганизмы, выделенные из крови больных при ВГИК, представлены в табл. 2.

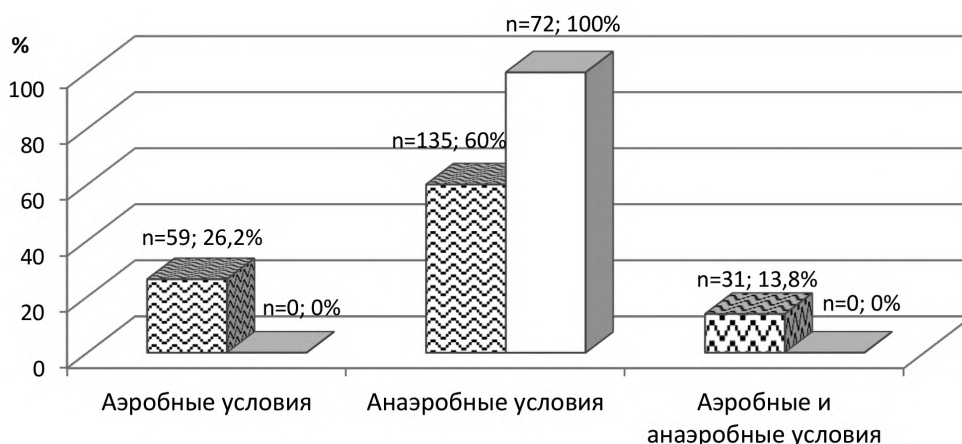
Спектр возбудителей ВГИК включал аэробные и анаэробные бактерии (73,4% и 24,2%, соответственно) и грибы (2,4%). Чаще выделялись грамположительные кокки (51,4%) с преобладанием *S.epidermidis* (25,7%), реже – *S. aureus* (4,4%). Зарегистрирован рост грамотри-

цательных палочек (9,6%), включая *E. coli* (0,3%). Грибы рода *Candida* высевались чаще плесневых грибов.

Эффективность применения анаэробных условий при бактериологическом исследовании крови представлена на рисунке.

Из 297 клинических изолятов 225 штаммов факультативно-анаэробных микроорганизмов дали рост в аэробных (26,2%), анаэробных (60,0%) и в аэробно-анаэробных (13,8%) условиях культивирования. Дополнительно получено 72 штамма облигатных анаэробов. Анаэробная атмосфера дополнительно обеспечила рост 207 штаммам (70%) факультативных и строгих анаэробов, как потенциальных возбудителей ИК.

ВГИК характеризовалась смешанными гемокультурами (33,5%). Число ассоциантов в одной пробе крови составляло от двух до четырёх видов. Видовой спектр смешанных гемокультур представлен в табл. 3.



Выделение микроорганизмов при разных газовых условиях культивирования

Таблица 1

Внегоспитальные больные с ВГИК

Показатели	Внегоспитальные больные с ИК (n=183)				
	Пол		Возраст, годы		
	мужчины	женщины	(10-44 лет)	(45-60 лет)	(61-75 лет)
Абс.	63	120	137	36	10
%	34,4	65,6	74,9	19,7	5,5
95% ДИ	27,9-41,6	58,4-72,1	68,1-80,6	14,6-26,0	3,0-9,8

Таблица 2

Микроорганизмы, выделенные из крови внегоспитальных больных

Показатели	Характеристика штаммов микроорганизмов (n=297)								
	Аэробные			Анаэробные			Грибы		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Всего (n=297)	218	73,4	68,1-78,1	72	24,2	19,7-29,4	7	2,4	1,1-4,8
Индекс встречаемости С, % (n=206)	105,8			35,0			3,4		
Бактерии (n=290)									Грибы (n=7)
Показатели	Грамм ⁺ кокки	Грамм ⁺ палочки	Грамм ⁻ короткие палочки		Грамм ⁻ палочки	Дрожжи		Плесени	
Количество	149	107	6		28	4		3	
%	51,4	36,9	2,1		9,6	4/7		3/7	
95% ДИ	45,6-57,1	31,5-42,6	1,0-4,4		6,8-13,6	-		-	

Видовой спектр смешанных гемокультур у больных с ВГИК

Вид микроорганизмов	Количество штаммов (n=159)		Индекс встречаемости С, % (n=69)
	абс.	%	
Аэробные микроорганизмы	116	73,0	168,1
Грамположительные кокки	69	43,4	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	4,4	10,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36	22,6	52,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1,9	4,3
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	1,3	2,9
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	1,9	4,3
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	0,6	1,4
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0,6	1,4
<i>Streptococcus mitis</i>	8	5,0	11,6
<i>Streptococcus mutans</i>	1	0,6	1,4
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	1,3	2,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	1,9	4,3
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1,3	2,9
Грамположительные палочки, в том числе:	20	12,6	29,0
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1	0,6	1,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	4	2,5	5,8
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	2	1,3	2,9
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1	0,6	1,4
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1	0,6	1,4
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1	0,6	1,4
<i>Corynebacterium</i> spp.	6	3,8	8,7
<i>Tsukamurella paurometabola</i> ****	1	0,6	1,4
Грамположительные аэробы, в том числе:	1	0,6	1,4
<i>Nocardia</i> spp.	1	0,6	1,4
<i>Actinomyces</i> spp.	1	0,6	1,4
Грамположительные споровые палочки:	2	1,3	2,9
<i>Bacillus cereus</i>	1	0,6	1,4
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0,6	1,4
Грамотрицательные кокки и кокко-бактерии:	5	3,1	7,2
<i>Neisseria flavescens</i>	1	0,6	1,4
<i>Branhamella catarrhalis</i> **	1	0,6	1,4
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	1,9	4,3
Грамотрицательные палочки, в том числе:	20	12,6	29,0
<i>Escherichia coli</i>	1	0,6	1,4
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,6	1,4
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	2,5	5,8
<i>Serratia marinorubra</i> *	2	1,3	2,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1,3	2,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2,5	5,8
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,6	1,4
<i>Burkholderia cepacia</i> ***	4	2,5	5,8
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0,6	1,4
Анаэробные микроорганизмы	38	23,9	55,1
Грамположительные кокки	4	2,5	5,8
<i>Peptococcus</i> spp.	4	2,5	5,8
Грамположительные палочки	33	20,8	47,8
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	1,3	2,9
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	31	19,5	44,9
Грамотрицательные палочки	1	0,6	1,4
<i>Fusobacterium</i> spp.	1	0,6	1,4
Грибы	5	3,1	7,2
<i>Candida albicans</i>	1	0,6	1,4
<i>Rhodotorula</i> spp.	1	0,6	1,4
<i>Aspergillus niger</i>	3	1,9	4,3

Примечание. * – *Serratia marinorubra* (до 1980 г. *S.rubidaea*); ** – *Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*); *** – *Burkholderia cepacia* (до 1993 г. *Pseudomonas cepacia*; **** – *Tsukamurella paurometabola* (до 1988 г. *Corynebacterium paurometabolum*); ***** – *Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Среди ассоциантов смешанных гемокультур преобладали аэробные грамположительные кокки (43,4%). Индекс встречаемости (ИВ), используемый в медицине, подтвердил их лидерство (100,0%). Ведущими ассоциантами по ИВ являлись *S. epidermidis* (52,2%) и *S. aureus* (10,1%). Ассоциантами смешанных гемокультур также являлись анаэробные бактерии (23,9%) и грибы (3,1%).

Для оценки диагностической эффективности микроскопического метода проанализированы результаты микроскопии 339 мазков лейкоцитарного слоя крови внегоспитальных пациентов. Микроорганизмы обнаружены в 329 мазках крови (97,1%) в разных соотношениях: бактерии (31,0%), грибы (2,1%), ассоциации бактерий с грибами (66,9%). Ассоциация бактерий с грибами приобретает важное патогенетическое значение [32]. Микроскопическая техника исследования крови позволила обнаружить элементы диморфных грибов рода *Candida* в виде дрожжевых клеток и гиф (69,0%), не дающих рост в гемокультурах.

Обсуждение. В России гемокультивирование при диагностике ИК проводилось до 2020 г. согласно Приказу Минздрава СССР № 585, на ручных и автоматизированных импортных гемокультуральных системах и показывало низкую диагностическую эффективность, что послужило толчком к разработке альтернативного метода диагностики ИК. В крови циркулирует малое количество микроорганизмов, поэтому необходимо использовать концентрат микроорганизмов, которым является лейкоцитарный слой пробы крови. Анаэробная техника при гемокультивировании показана, как основополагающий приём, для выделения факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных микроорганизмов [33, 34].

ВГИК диагностирована у 48% пациентов, чаще у женщин и у лиц молодого возраста. Этиология ВГИК характеризуется выделением аэробных и анаэробных бактерий и грибов. Среди аэробов преобладает *S. epidermidis*. Полимикробность гемокультур (33,5%) при ВГИК внегоспитальных терапевтических пациентов определяется числом ассоциантов от двух до четырёх в одной пробе крови. Анаэробные условия гемокультивирования способствуют выделению 70% потенциальных возбудителей ВГИК и повышению эффективности выделения возбудителей из крови на 40%. Экспрессный результат микроскопического метода при диагностике ВГИК имеет важное клиническое значение в обнаружении бактерий, дрожжевых клеток, нитей псевдомонелии грибов, ассоциаций бактерий с грибами на фоне отсутствия выделения их из крови.

Заключение. Сочетание микроскопического и культурального методов для диагностики ВГИК у терапевтических пациентов можно отнести к альтернативным методам клинической лабораторной диагностики ИК. Применение лейкоцитарного слоя крови имеет ряд преимуществ: минимальный объём взятия крови (4,5 мл), удобная доставка материала (пробирка), временной резерв от момента взятия крови до исследования (4 часа), одномоментное использование

микроскопического и культурального методов микробиологической диагностики, сокращение времени получения результата, повышение диагностического потенциала ИК. Сочетание микроскопического и культурального методов диагностики ИК является вариантом замещения импортных гемокультуральных автоматизированных систем закрытого типа и флаконов к ним при микробиологическом исследовании крови [35].

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 7, 11-14, 16-17, 19-25, 27-30 см. REFERENCES)

3. Дворецкий Л.И., Яковлев С.В. Инфекционная патология в клинике внутренних болезней. *Терапевтический архив*. 2018; 11: 112-9.
4. Лычёв В.Г., Клестер Е.Б. Пневмония, связанная с оказанием медицинской помощи, и внебольничная пневмония: сравнительная характеристика, оптимизация лечения. *Фундаментальные исследования*. 2012; 7: 111-5.
5. Полибин Р.В., Миндлина А.Я., Герасимов А.А., Брико Н.И. Сравнительный анализ смертности от инфекционных болезней в Российской Федерации и некоторых странах Европы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 94(3): 4-10.
6. Полухина О.В., Суборова Т.Н., Кузин А.А., Петров А.Н., Осовских В.В., Гранов Д.А. и др. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(1): 43-8.
8. Миронов А. Ю., Савицкая К.И., Воробьёв А.А. Микрофлора гнойно-септических заболеваний у больных в Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5: 11-5.
9. Белялов Ф.И. Проблема коморбидности при заболеваниях внутренних органов. *Вестник современной клинической медицины*. 2010; 3(2): 44-7.
10. Тарловская Е.И. Проблема полиморбидности – вызов современной медицине. *Терапия*. 2017; 2: 4-14.
15. Недосеко В.Б., Гончаров А.П. Профилактика последствий транзиторной бактериемии. *Клиническая стоматология*. 2002; 3: 27-8.
18. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Леонова Л.В., Никитина Л.Ю. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей инфекций кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(11): 790-3. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793.
26. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю. Метод получения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(3): 185-90. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190.
31. Федоренко А.С., Лукьянова П.М., Бурбелло А.Т., Каргальцева Н.М., Добрынина Н.В. Подбор антибактериальной терапии по данным экспресс-микроскопии и посева лейкоцитарного слоя крови. *Ремедиум. Журнал о рынке лекарств и медицинской техники*. 2011; 4: 141-2.
32. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Иванов А.М. Полимикробность гемокультур – современная тенденция в этиологии инфекции кровотока. *Практическая медицина*. 2012; 56(1): 56-61.
33. Воробьёв А.А., Миронов А.Ю., Пашков Е.П. Современные методы лабораторной диагностики инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробными бактериями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1996; 1: 14-6.
34. Миронов А. Ю. Современные подходы к лабораторной диагностике анаэробной неклостридиальной инфекции (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 8: 25-35.
35. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.

REFERENCES

1. Son J.S., Song J-H., Ko K.S., Yeom J.S., Ki H.K., Kim S-W. et al. Bloodstream infections and clinical significance of healthcare-associated bacteremia: a multicenter surveillance study in Korean hospitals. *J. Korean. Med. Sci.* 2010; 25(7): 992-8.
2. Laupland K.B., Church D.L. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4): 647-64.
3. Dvoretzkiy L.I., Yakovlev S.V. Infectious pathology in the clinic of internal diseases. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2018; 11: 112-9. (in Russian)
4. Lychev V.G., Klester E.B. Health care-associated pneumonia and community-acquired pneumonia: comparative characteristics, optimization of treatment. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2012; 7: 111-5. (in Russian)
5. Polibin R.V., Mindlina A.Ya., Gerasimov A.A., Briko N.I. Comparative analysis of mortality from infectious diseases in the Russian Federation and some European countries. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2017; 94(3): 4-10. (in Russian)
6. Poluhina O.V., Suborova T.N., Kuzin A.A., Petrov A.N., Osovskih V.V., Granov D.A. i dr. Spectrum of causative agents of bacteremia in patients with immunodeficiency states of various origins. *Infektsiya i immunitet.* 2014; 4(1): 43-8. (in Russian)
7. Dalgaard L.S., Norgaard M., Jespersen B., Jensen-Fangel S., Ostergaard L.J., Schonheyder H.C. et al. Risk and prognosis of bloodstream infections among patients on chronic hemodialysis: a population-based cohort study. *Plos One.* 2015; 10(4): 1-14.
8. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'ev A.A. Microflora of purulent-septic diseases in patients in the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2000; 5: 11-5. (in Russian)
9. Belyalov F.I. The problem of comorbidity in diseases of the internal organs. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny.* 2010; 3(2): 44-7. (in Russian)
10. Tarlovskaya E.I. The problem of polymorbidity is a challenge to modern medicine. *Terapiya.* 2017; 2: 4-14. (in Russian)
11. Holmbom M., Giske C.G., Fredrikson M., Balkhed A.O., Claesson C., Nilsson L.E. et al. 14-year survey in a Swedish country reveals a pronounced increase in bloodstream infections (BSI). Comorbidity – an independent risk factor for both BSI and mortality. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0166527.
12. Jensen U.S., Knudsen J.D., Wehberg S., Gregson D.B., Laupland K.B. Risk factors for recurrence and death after bacteraemia: a population-based study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17(8): 1148-54.
13. Reddy B.C., Preeti K.N., Reddy C.M. A study of prognosis and outcome of community acquired pneumonia in a tertiary care centre. *Int. J. Current. Microbiology and Applied Sciences.* 2015; 4(8): 763-9.
14. Huson M.A.M., Stolp S.M., van der Poll T., Grobusch M.P. Community –acquired bacterial bloodstream infections in HIV – infected patients: a systematic review. *Clin. Inf. Dis.* 2014; 58(1): 79-92.
15. Nedoseko V.B., Goncharov A.P. Prevention of the consequences of transient bacteremia. *Klinicheskaya stomatologiya.* 2002; 3: 27-8. (in Russian)
16. Diekema D.J., Hsueh P.R., Mendes R.E., Pfaller M.A., Rolston K.V., Sader H.S. et al. The microbiology of bloodstream infections: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy.* 2019; 63(7): 1-10.
17. Takeshita N., Kawamura J., Kurai H., Araoka H., Yoneyama A., Fujita T. et al. Unique characteristics of community-onset healthcare-associated bloodstream infections: a multi-centre prospective surveillance study of bloodstream infections in Japan. *J. Hosp. Infect.* 2017; 96(1): 29-34.
18. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Leonova L.V., Nikitina L.Yu. Etiological structure and biological properties of causative agents of bloodstream infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2016; 61(11): 790-3. DOI 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793. (in Russian)
19. Courjon J., Demonchy E., Degand N., Risso K., Ruimy R., Roger P-M. Patients with community-acquired bacteremia of unknown origin: clinical characteristics and usefulness of microbiological results for therapeutic issues: a single-center cohort study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16: 40-7.
20. Dat V.Q., Long N.T., Hieu V.N., Phuc N.D.H., Kinh N.V., Trung N.V. et al. Clinical characteristics, organ failure, inflammatory markers and prediction of mortality in patients with community acquired bloodstream infection. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18: 535-43.
21. Kanoksil M., Jatapai A., Peacock S.J. Epidemiology, microbiology and mortality associated with community-acquired bacteremia in northeast Thailand: A multicenter surveillance study. *Plos One.* 2013; 8(1): e54714.
22. Laupland K.B., Kibsey P.C., Gregson D.B., Galbraith J.C. Population-based laboratory assessment of the burden of community-onset bloodstream infection in Victoria, Canada. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141(1): 174-80.
23. Tuuminen T., Suomala P., Vuorinen S. *Sarcina ventriculi* in blood: the first documented report since 1872. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 169-72.
24. Dilnessa T., Demeke G., Mengistu G., Bitew A. Emerging blood culture technologies for isolation of blood pathogens at clinical microbiology laboratories. *J. Med. Microb. Diagn.* 2016; 5(2): 1-7.
25. Lagier J-C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(1): 208-36.
26. Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu. Method for obtaining blood culture in the diagnosis of bloodstream infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(3): 185-90. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190. (in Russian)
27. Hirai Y., Asahata S., Ainoda Y., Fujita T., Miura H., Hizuka N. et al. Candidemia diagnosed from peripheral blood smears: case report and review of literature 1954-2013. *Mycopathologia.* 2015; 180(1-2): 111-16.
28. Leitao T.M.J.S., Fiho A.M.P.O., Filho J.E.P.S., Tavares B.M., Mesquita J.R.L., Farias L.A.B.G. et al. Accuracy of buffy coat in the diagnosis of disseminated histoplasmosis in AIDS-patients in an endemic area of Brazil. *J. Fungi.* 2019; 5(2): 47-55.
29. Takihi I.Y., Sandes A.F. Killers on the road: *Klebsiella* and *Pseudomonas* bacteremia detected on peripheral blood smear. *Blood.* 2013; 122(11): 1851.
30. Year H., Poulain D., Lefebvre A., Camus D., Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57: 196-8.
31. Fedorenko A.S., Lukyanova P.M., Burbello A.T., Kargaltseva N.M., Dobrinina N.B. Selection of antibacterial therapy according to express microscopy and culture of the blood leucolayer. *Remedium. Zhurnal o rynke lekarstv i meditsinskoy tekhniki.* 2011; 4: 141-2. (in Russian)
32. Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Ivanov A.M. Polymicrobialilty of blood cultures is a modern trend in the etiology of bloodstream infection. *Prakticheskaya meditsina.* 2012; 56(1): 56-61. (in Russian)
33. Vorob'ev A.A., Mironov A.Yu., Pashkov E.P. Modern methods of laboratory diagnostics of infections caused by non-spore-forming anaerobic bacteria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 1996; 1: 14-6. (in Russian)
34. Mironov A.Yu. Modern approaches to laboratory diagnostics of anaerobic non-clostridial infection (lecture). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2011; 8: 25-35. (in Russian)
35. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. Status and trends in the development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Чеснокова М.Г.^{1,2}, Чесноков В.А.³, Миронов А.Ю.^{4,5}

АНАЛИЗ УРОВНЯ ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКРОБИОМА И ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ФИКСАЦИИ СЪЁМНЫХ ПЛАСТИНОЧНЫХ ПРОТЕЗОВ

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования РФ, 644050, Омск, Россия;

³БУЗОО ГСП № 4, 644030, Омск, Россия;

⁴ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Широкое использование традиционного съёмного протезирования объясняется относительной простотой технологических этапов изготовления и обуславливает его доступность. Развитию протезного стоматита полости рта способствуют неудовлетворительная фиксация и стабилизация съёмных ортопедических конструкций. Биоплёнки микробиома, сформированные на поверхности стоматологических ортопедических конструкций могут способствовать сокращению их срока эксплуатации и возникновению воспалительного процесса полости рта микробной этиологии при зубном протезировании в процессе ортопедической реабилитации. Цель исследования: оценить уровень адаптации пациентов при ортопедической реабилитации на основании изучения микробиома и оценки степени фиксации съёмных пластиночных протезов. Проведена оценка видовой и количественной характеристики микробиома протезов на этапах ортопедической реабилитации, преобладали факультативно-анаэробные виды, относящиеся к родам Staphylococcus, Micrococcus, Enterococcus, Streptococcus, Klebsiella, отмечена элиминация микроорганизмов родов Bifidobacterium и Lactobacterium, выделены грибы Candida albicans. Анализ показателя индекса фиксации протезов показал повышение в зависимости от продолжительности пользования.

Ключевые слова: микробиом; дрожжеподобные грибы; съёмные протезы, ортопедическая реабилитация; фиксация.

Для цитирования: Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю. Анализ уровня ортопедической реабилитации при изучении микробиома и оценке степени фиксации съёмных пластиночных протезов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 588-593. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-588-593>

Для корреспонденции: Чеснокова Марина Геннадьевна, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2022

Принята к печати 26.05.2022

Опубликовано 14.10.2022

Chesnokova M. G.^{1,2}, Chesnokov V. A.³, Mironov A. Yu.^{4,5}

ANALYSIS OF THE LEVEL OF ORTHOPEDIC REHABILITATION WHEN ASSESSING THE DEGREE OF FIXATION OF REMOVABLE PLATED PROSTHESIS AND STUDYING THE MICROBIOME

¹FGBOU VO OmsSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation «Omsk State Medical University», 644099, Omsk, Russian Federation;

²FGBOU VO «Omsk State Technical University» of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 644050, Omsk, Russia;

³BUZOO GSP No. 4, 644030, Omsk, Russian Federation;

⁴FBUN G. N. Gabrichovsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russian Federation;

⁵Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies FMBA, 115682, Moscow, Russian Federation

The widespread use of traditional removable prosthetics is explained by the relative simplicity of the technological stages of manufacture and determines its availability. The development of prosthetic stomatitis of the oral cavity is facilitated by poor fixation and stabilization of removable orthopedic structures. Microbiome biofilms formed on the surface of dental orthopedic structures can help reduce their service life and cause an inflammatory process of the oral cavity of microbial etiology during dental prosthetics in the process of orthopedic rehabilitation. The purpose of the study: to assess the level of adaptation of patients during orthopedic rehabilitation based on the study of the microbiome and the assessment of the degree of fixation of removable lamellar dentures. Qualitative and quantitative characteristics of the microbiome of prostheses at the stages of orthopedic pealiation were assessed; facultative anaerobic species belonging to the genera Staphylococcus, Micrococcus, Enterococcus, Streptococcus, Klebsiella prevailed; noted the elimination of microorganisms of the genera Bifidobacterium and Lactobacterium, yeast-like fungi of the species Candida albicans were isolated. An analysis of the index of fixation of prostheses showed an increase depending on the duration of use; a good level of fixation of prostheses was established in groups of patients.

Key words: microbiome; yeast-like fungi; removable dentures; orthopedic rehabilitation; fixation.

For citation: Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Analysis of the level of optopedical rehabilitation in studying the microbiome and evaluation of the degree of fixation of removable plated prosthesis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 588-593 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-588-593>

For correspondence: Chesnokova Marina Gennad'evna, doctor of Medical Sciences, professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Information about authors:

Chesnokova M.G., <https://orcid.org/0000-0001-9055-977X>;

Chesnokov V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4100-9354>;

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.05.2022

Accepted 26.05.2022

Published 14.10.2022

Широкое использование традиционного съёмного протезирования объясняется относительной простотой технологических этапов изготовления и обуславливает его доступность [1-4]. В пожилом возрасте процесс адаптации пациентов к съёмным протезам на этапах ортопедической реабилитации становится более длительным [5, 6]. Актуально изучение адаптации пациентов на этапах проведения ортопедической реабилитации при оценке степени фиксации полных съёмных пластиночных протезов в пожилом возрасте.

Съёмные протезы нуждаются в профессиональном гигиеническом уходе [7, 8]. Неудовлетворительное гигиеническое состояние полости рта может быть обусловлено плохим уходом за ортопедическими конструкциями и вести к долговременной ретенции пищевых частиц, являющихся субстратом для жизнедеятельности микроорганизмов, в межпроксимальных зонах, в придесневой области, на спинке языка, на элементах протеза [9, 10]. Сдвиг микробного равновесия полости рта в сторону патогенных видов микробиоты способствует развитию воспалительного процесса слизистой оболочки, что усугубляется травматизацией её при имеющейся недостаточной некачественной фиксации съёмного протеза [11, 12]. Значительная часть условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) полости рта, присутствующих в биоопле в составе биоплёнок, обладает определённым потенциалом патогенности (адгезивной активностью, колонизационным фактором, персистенцией, антибиотикорезистентностью) и защищена от действия неблагоприятных факторов среды существования [13, 14]. При применении полных съёмных пластиночных протезов пациентами, вероятность развития протезных стоматитов на слизистой оболочке протезного ложа может колебаться от 15 до 70% [15].

Основными факторами развития воспалительных процессов в полости рта являются неудовлетворительная фиксация и стабилизация съёмных ортопедических конструкций, плохой гигиенический уход за протезом, длительное использование съёмной ортопедической конструкции, массивная микробная обсеменённость полости рта и протеза.

Нарушение фиксации и стабилизации протеза возникают при неблагоприятных анатомических усло-

виях, несоответствии поверхности протезного ложа челюсти с прилегающим базисом протеза [16, 17].

Дисбаланс микробиома, обусловленный выраженными сдвигами видового и количественного содержания УПМ, появлением патогенных видов микроорганизмов, сопровождающихся увеличением концентрации УПМ микробиоты, может обуславливать возникновение воспалительного процесса после протезирования и в дальнейшем приводить к формированию и поддержанию хронической инфекции в полости рта [18].

Особую актуальность представляет изучение микробиологической характеристики протеза на поверхности которого происходит колонизация микробиома полости рта на определённых стадиях ортопедической реабилитации.

Цель исследования: оценка уровня адаптации пациентов при ортопедической реабилитации на основе изучения микробиома и оценки степени фиксации съёмных пластиночных протезов.

Материал и методы. Обследованы 82 пациента с диагнозом «полное отсутствие зубов» по МКБ-10 K00.01, возраст от 60 до 70 лет. Пациенты подразделены на 2 группы по продолжительности ношения полных съёмных зубных протезов. В 1-ю группу вошли 41 пациент со сроком ношения протеза до одного года, во 2-ю группу – 41 пациент со сроком эксплуатации протеза от 1 до 2-х лет. Критерии включения пациентов в группы исследования: возраст от 60 до 70 лет; полное отсутствие зубов на обеих челюстях; информированное согласие пациентов на участие в исследовании. Критерии исключения пациентов из исследования: частичное отсутствие зубов (частичная вторичная адентия) на одной или обеих челюстях; наличие стоматологической ортопедической конструкции: несъёмной (коронки, мостовидные протезы) и/или съёмной (бюгельные, пластиночные протезы с кламмерной системой фиксации); возраст моложе 60 и старше 70 лет; хронический генерализованный пародонтит тяжёлой степени; некачественно изготовленные съёмные протезы; наличие заболеваний, сопровождающихся ухудшением мануальных навыков; тяжёлые заболевания в стадии декомпенсации; нежелание участвовать в исследовании. Пациенты групп

исследования не имели различий по сравниваемым параметрам: возрасту, гендерной структуре, наличию тех или иных сопутствующих заболеваний, типу протеза, удельному весу комплаентных (правильно эксплуатирующих протез и соблюдающих гигиену) пациентов.

Для микробиологического исследования проводили взятие биоматериала с поверхности съёмных зубных протезов при помощи стерильного тупфера, который помещали в транспортную среду. В бактериологической лаборатории готовили двукратные разведения исходного материала 10^{-3} - 10^{-12} для посева на соответствующие питательные среды. Видовую идентификацию выделенных чистых культур осуществляли на основании изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, антигенных свойств в соответствии с определителем Берджи. Количественное содержание микроорганизмов выражали через десятичный логарифм величины выросших колоний (Lg КОЕ/мл). Микологическое исследование на выявление грибов рода *Candida* осуществляли посевом биоматериала на плотную питательную среду Сабуро, для селективной изоляции использована среда Candiselect 4 (Biorad, Франция). Для идентификации грибов рода *Candida* использован колориметрический тест Аухасолор 2 (BioRad, Франция).

Стоматологические методы применяли на стоматологическом приёме на базе БУЗОО ГКСП № 4 г. Омска. После получения от пациентов информированного добровольного согласия на исследование осуществляли сбор анамнеза, заполняли форму Ф.043/У (медицинскую карту стоматологического больного), устанавливали тип и продолжительность использования имеющихся протезов, сроки адаптации, степень фиксации, наличие дискомфорта, количество коррекций. Определяли индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому – А.А. Леонтьеву [8] по оценочным критериям (плохая фиксация – при показателе индекса 81-100%, неудовлетворительная – 61-80%; удовлетворительная – 41-60%; хорошая – 21-40%, очень хорошая фиксация – 20% и менее).

Биометрический анализ осуществляли с использованием пакетов Statistica 6.0, БИОСТАТИСТИКА. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. При этом значения p могли ранжироваться по 3 уровням достигнутых статистически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Результаты. Микробиологическое исследование биоматериала поверхности зубных протезов на этапах ортопедической реабилитации установило видовой и количественный спектр микробиоты. Идентифицированы микроорганизмы, являющиеся представителями различных родов и семейств. В микробиоме преобладали факультативно-анаэробные виды, относящиеся к родам *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*.

Бактериологическое исследование биоматериала поверхности зубных протезов в 1-й группе пациентов установило элиминацию микроорганизмов родов *Bifidobacterium* и *Lactobacterium*, выявило микроор-

ганизмы рода *Micrococcus* в 24,39% случаев в концентрации $1,0 \pm 0,28$ КОЕ/мл, перцентиль (P) 10,00 (P 10,00)-0,00, перцентиль 90,00 (P 90,00)--4,00 КОЕ/мл (рис. 1).

Staphylococcus epidermidis идентифицирован в 36,59% случаев при среднем содержании $1,52 \pm 0,33$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-5,00 КОЕ/мл, *Staphylococcus saprophyticus* в 19,51% случаев при содержании $0,9 \pm 0,3$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл. *Staphylococcus haemolyticus* выявляли в 12,19% в концентрации $0,56 \pm 0,24$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-3,00 КОЕ/мл.

Staphylococcus aureus найден в биоматериале в 12,19% случаев при среднем значении концентрации $0,44 \pm 0,19$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-3,00 КОЕ/мл.

Под *Streptococcus* представлен видами *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus viridans* в 19,51% и 24,4% случаев, соответственно, в концентрации $0,95 \pm 0,31$ и $1,07 \pm 0,32$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-5,00 КОЕ/мл.

Бактерии рода *Enterococcus* идентифицированы до вида *E. faecalis* в 17,07% случаев в концентрации $0,73 \pm 0,25$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл. Выявлены бактерии рода *Klebsiella*, относящиеся к виду *K. pneumoniae*, в 14,63% исследованного биоматериала в содержании $0,75 \pm 0,29$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-5,00 КОЕ/мл. *Corynebacterium* spp. выявлены в 58,54% случаев в концентрации $0,85 \pm 0,28$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл.

Микологические исследования показали присутствие грибов рода *Candida*, относящихся к виду *Candida albicans* в 12,19% случаев при среднем содержании $0,58 \pm 0,23$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл.

При обследовании пациентов 2-й группы наиболее часто на поверхности протезов идентифицировали УПМ рода *Staphylococcus* виды *S. epidermidis* в 31,7%, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* в 17,07% случаев и 9,76% случаев, соответственно. *S. aureus* выявлены в 7,32% случаев, *Micrococcus* spp. выявлены в исследуемом биоматериале в 26,83% случаев. В микробиоме идентифицированы *S. viridans* в 19,51% и *K. pneumoniae* в 14,63% случаев, отмечена элиминация бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacterium*.

Определение количества выявляемых микроорганизмов позволило установить, что ряд членов изучаемого микробиома выделялись в высоком содержании, преобладали по концентрации *S. epidermidis* $1,49 \pm 0,34$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-5,00 КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. в концентрации $1,07 \pm 0,28$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл (рис. 2).

S. viridans выявлен в количестве $1,37 \pm 0,38$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-6,00 КОЕ/мл, *K. pneumoniae* – в количестве $0,80 \pm 0,3$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-5,00 КОЕ/мл.

S. aureus выявлен в количестве $0,27 \pm 0,15$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-3,00 КОЕ/мл, *S. saprophyticus* – в количестве $0,78 \pm 0,28$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-4,00 КОЕ/мл. *S. haemolyticus* при содержании $0,41 \pm 0,2$, P 10,00-0,00, P 90,00-3,00 КОЕ/мл., *S. salivarius* в 21,95% случаев в количестве $1,20 \pm 0,35$ КОЕ/мл, P 10,00-0,00, P 90,00-6,00 КОЕ/мл.

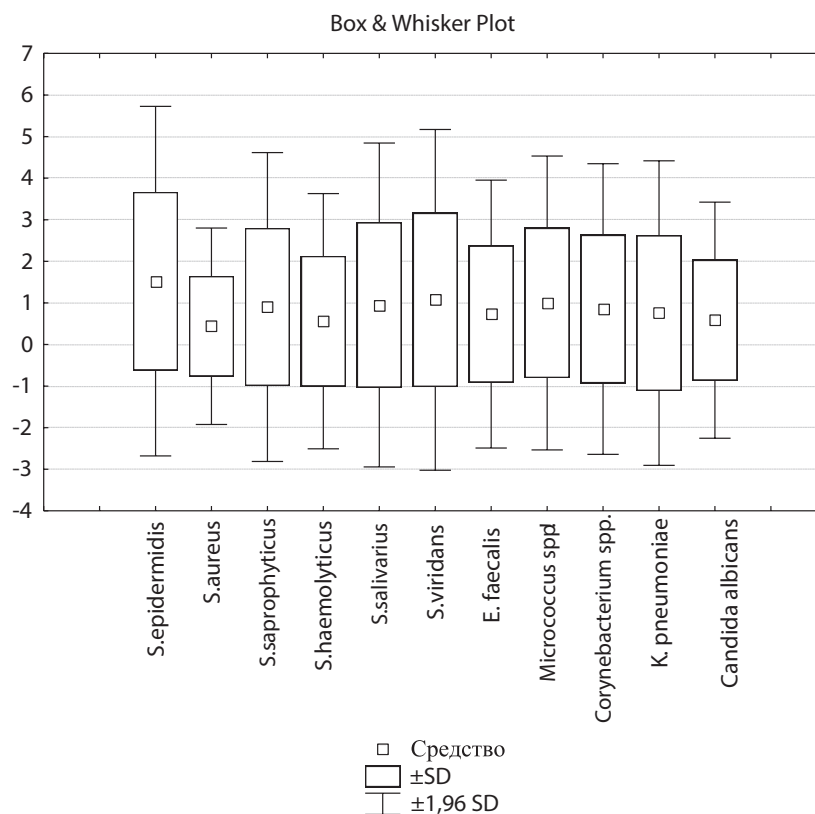


Рис. 1. Спектр уровня содержания структуры микробиома поверхности протезов пациентов 1-й группы при ортопедической реабилитации. По оси абсцисс – виды микроорганизмов; по оси ординат – концентрация выявленных микроорганизмов, десятичный логарифм величины выросших колоний (lg KOE/мл)..

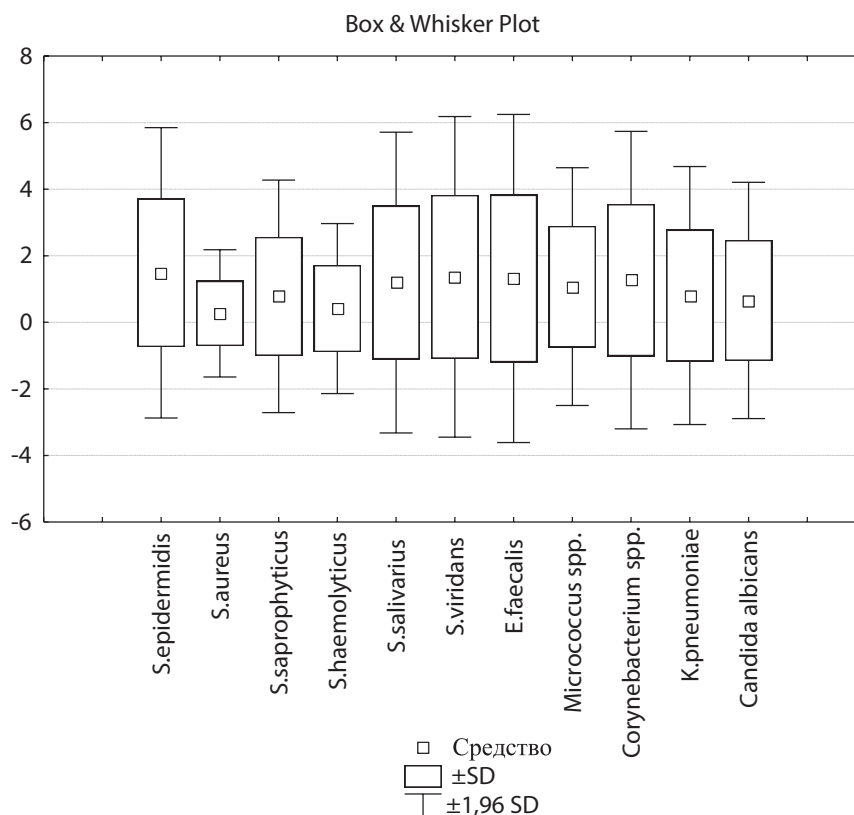


Рис. 2. Спектр уровня содержания структуры микробиома поверхности протезов пациентов 2-й группы при ортопедической реабилитации. По оси абсцисс – виды микроорганизмов; по оси ординат – концентрация выявленных микроорганизмов, десятичный логарифм величины выросших колоний (lg KOE/мл).

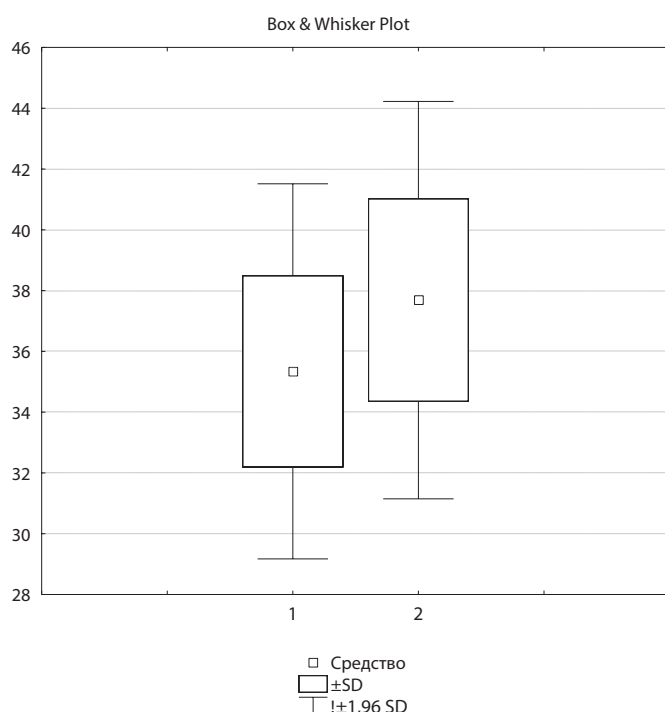


Рис. 3. Уровень показателя индекса фиксации протезов С.Б. Улитовского-А.А. Леонтьева в группах обследования. По оси абсцисс – группы пациентов, где: 1 – с продолжительностью ношения протезов до 1 года; 2 – с продолжительностью ношения протезов 1-2 года; по оси ординат – среднее значение критерия индекса фиксации протезов С.Б. Улитовского-А.А. Леонтьева (в %).

Enterococcus spp. идентифицированы до вида *E. faecalis* в 21,95% случаев в количестве $1,32 \pm 0,35$ КОЕ/мл, $P 10,00-0,00$, $P 90,00-6,00$ КОЕ/мл. Представители рода *Corynebacterium* spp. выделены в 24,39% случаев в количестве $1,27 \pm 0,35$ КОЕ/мл, $P 10,00-0,00$, $P 90,00-5,00$ КОЕ/мл.

Установлены статистически значимые различия содержания микроорганизмов в биоматериале групп пациентов при различной продолжительности ношения съёмных протезов. Во 2-й группе зарегистрировано повышение количества *S. viridans* ($U=15,500$, $Z=1,169$; $p=0,00008$), *E. faecalis* ($U=32,000$, $Z=-3,527$; $p=0,00042$), *S. salivarius* ($U=1,000$, $Z=-2,296$; $p=0,00037$), снижение количества *S. aureus* ($U=32,000$, $Z=-3,527$; $p=0,021$), *S. saprophyticus* ($U=3,000$, $Z=2,140$; $p=0,032$).

Присутствие грибов рода *Candida*, относящихся к виду *Candida albicans*, определено в 14,63% случаев при среднем содержании $0,65 \pm 0,28$ КОЕ/мл, $P 10,00-0,00$, $P 90,00-4,00$ КОЕ/мл. Различия в концентрации выявленных грибов *C. albicans* в биоматериале обеих групп обследованных пациентов отсутствует ($U=45,00$, $Z=0,47$; $p=0,635$).

Анализ суммы количественных оценок фиксации протезов в группах обследованных пациентов показал значимое повышение показателя в группах. В группе пациентов при ношении протезов до 1 года среднее значение данного показателя составило $24,59 \pm 0,37$, медиана – 23,0, $P 10,0-23,0$, $P 90,0-27,0$.

У пациентов с длительностью ношения протезов от 1 года до 2 лет среднее значение показателя составило $26,31 \pm 0,4$, медиана – 27,0, $P 10,0-23,0$, $P 90,0-29,0$. Уровень показателя суммы количественных оценок критериев фиксации протезов в группах обследования пациентов с длительностью ношения до 1 года и от 1-2 лет различается ($T=0,00$, $Z=2,8460$; $p=0,0044$).

Соответствующий характер изменений установлен в отношении показателя индекса фиксации протезов С. Б. Улитовского-А. А. Леонтьева в группах обследования ($T=0,00$, $Z=2,8460$; $p=0,0044$) (рис. 3).

В группе пациентов с длительностью ношения протезов до 1 года среднее значение индекса фиксации составило $35,34 \pm 0,5$, медиана – 33,0, $P 10,0-33,0$, $P 90,0-39,0$. В группе обследования с длительностью ношения протезов от 1 до 2-х лет, среднее значение индекса фиксации соответствовало $37,69 \pm 0,6$, медиана – 39,0, $P 10,0-33,0$, $P 90,0-41,0$.

Обсуждение. Культуральное исследование биоматериала поверхности зубных протезов показало более частое выявление и увеличение концентрации представителей изучаемого микробиома во 2-й группе пациентов со сроком ношения протеза от 1 до 2-х лет. Особенности видового спектра регистрировали на фоне низкой содержания бактерий рода *Corynebacterium*, элиминации бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacterium*. Установлены особенности микробной колонизации поверхности полных съёмных зубных протезов в наблюдаемых группах пациентов с различной продолжительностью ношения. При возрастании срока эксплуатации протеза происходит угнетение жизнедеятельности представителей нормальной микрофлоры полости рта с нарушением равновесия между ней и организмом с последующим развитием дисбактериоза. Проведение оценки фиксации протезов позволило установить хороший уровень её фиксации в группах обследованных пациентов. Установлено повышение показателей суммы количественных оценок критериев фиксации и индекса фиксации в зависимости от продолжительности использования протезов.

Заключение. Установлен видовой спектр микробиома поверхности съёмных зубных протезов пациентов на этапах проведения ортопедической реабилитации.

Отмечено отсутствие различий в концентрации выявленных грибов *C. albicans* в биоматериале обеих групп обследованных пациентов.

Изучение индекса фиксации протезов С. Б. Улитовского – А. А. Леонтьева в группах обследованных пациентов с различной длительностью ношения протеза позволило установить хороший уровень фиксации и повышение уровня показателя во 2-й группе обследования с длительностью ношения от 1 до 2-х лет.

Результаты изучения микробиома и индекса фиксации съёмных пластиночных протезов у пациентов с различной длительностью ношения демонстрируют значимость проведения микробиологического мониторинга при оценке ортопедической реабилитации пациентов в пожилом возрасте и позволяют

использовать результаты в клинической практике при комплексном изучении эффективности ортопедического лечения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4 см. REFERENCES)

1. Жолудев С.Е., Гетте С.А. Решение проблемы адаптации к съёмным конструкциям зубных протезов при полной утрате зубов (клинический случай). *Проблемы стоматологии*. 2016; 12(3): 46-51.
5. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Мусиенко А.И., Нестерова К.И. Оценка гигиенического состояния полости рта у лиц с превышением индекса массы тела на этапах ортопедической реабилитации съёмными протезами. *Пародонтология*. 2019; 24 (3):269-73.
6. Фастовец Е. А., Сапалёв С.А. Сравнительная клинко-функциональная оценка эффективности протезирования больных с полным отсутствием зубов на нижней челюсти полными съёмными протезами и съёмными протезами с опорой на имплантаты. *Вестник стоматологии*. 2019; 1 (106): 28-32.
7. Василенко Р. Э. Клиническое применение армированных протезов у пациентов с полной вторичной адентией верхней челюсти. *Современная стоматология*. 2019; 3: 75-8.
8. Арутюнян М. Р., Коннов В. В. Результаты определения индекса фиксации съёмного протеза Улитовского-Леонтьева у пациентов с акриловыми и нейлоновыми протезами. *Современные инновации*. 2016; 10 (12):38-40.
9. Берсанов Р.У., Олесева В.Н., Новоземцева Т.Н., Шмаков Н.А., Юффа Е.П., Лесняк А.В. Субъективная удовлетворенность протезированием и объективное качество зубных протезов в зависимости от сроков их эксплуатации. *Российский стоматологический журнал*. 2015; 4: 52-4.
10. Трунин Д.А., Тлустенко В.П., Садыков М.И. Результаты ортопедического лечения больных с полным и частичным отсутствием зубов. *Российский стоматологический журнал*. 2017; 21 (5): 266-70.
11. Воронов И.А., Автандилов Г.А. Роль стафилококков в полости рта в биодеструкции съёмных протезов. *Евразийский союз ученых*. 2015; 111 (20):113-8.
12. Хабилов, Н.Л., Акбаров А.Н., Салимов О.Р. Влияние съёмных пластиночных протезов на микробиоценоз полости рта. *Medicus*. 2016; 6: 82-5.
13. Парёв В.Н., Ипполитов Е.В., Николаева Е.Н. Генетические маркеры резистентности к антибиотикам у биоплёнокоформирующих штаммов возбудителей анаэробной инфекции. *Национальные приоритеты России*. 2016; 2 (20): 136-41.
14. Харсеева Г. Г., Фролова Я. Н., Миронов А. Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.
15. Чеснокова М. Г. Чесноков В. А., Миронов А. Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 308-13.
16. Чесноков В. А., Чеснокова М. Г. Микробиота слизистой оболочки полости рта и поверхности съёмных акриловых пластиночных протезов при ортопедической реабилитации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 126-8.
17. Чепуркова О. А., Чеснокова М. Г., Недосеко В. Б., Миронов А. Ю. Candida-ассоциированный пародонтит. Диагностика, лечение. Омск: Вариант-Омск; 2012.
18. Садыков М.И. Трунин Д.А., Нестеров А.М. Иммунологический и микробиологический статус полости рта у пациентов пожилого возраста при использовании съёмных пластиночных протезов. *Наука и инновации в медицине*. 2016; 2 (2): 50-4.

REFERENCES

1. Zholudev S.E., Gette S.A. Solving the problem of adaptation to removable dentures in case of complete loss of teeth (clinical case). *Problemy stomatologii*. 2016; 12(3): 46-51. (in Russian)
2. Naito M., Yuasa H., Nomura Y., Nakayama T., Hamajima N., Hanada N. Oral health status and health-related quality of life: a systematic review. *Journal of Oral Science*. 2006; 48 (1):1-7.
3. Naito M., Nakayama T., Fukuhara S. Quality of life assessment and reporting in randomized controlled trials: a study of literature published from Japan. *Health Quality Life Outcomes*. 2004; 2: 31.
4. Joshi P. Prosthetic rehabilitation in a partially edentulous patient with lost vertical dimension: clinical report. *Nepal Journal of Medical Sciences*. 2013; 2(1): 77-80.
5. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Musienko A.I., Nesterova K.I. Evaluation of the hygienic state of the oral cavity in persons with excess body mass index at the stages of orthopedic rehabilitation with removable dentures. *Parodontologiya*. 2019; 24 (3):269-73. (in Russian)
6. Fastovets E. A., Sapalyov S.A. Comparative clinical and functional assessment of the effectiveness of prosthetics in patients with a complete absence of teeth in the lower jaw with complete removable dentures and removable dentures supported by implants. *Vestnik stomatologii*. 2019;1 (106): 28-32. (in Russian)
7. Vasilenko R. E. Clinical use of reinforced prostheses in patients with complete secondary edentulous maxilla. *Sovremennaya stomatologiya*. 2019;3: 75-8. (in Russian)
8. Arutyunyan M. R., Konnov V. V. The results of determining the Ulitovsky-Leontiev removable denture fixation index in patients with acrylic and nylon dentures. *Sovremennye innovatsii*. 2016; 10 (12):38-40. (in Russian)
9. Bersanov R.U., Olesova V.N., Novozemtseva T.N., Shmakov N.A., Yuffa E.P., Lesnyak A.V. Subjective satisfaction with prosthetics and objective quality of dentures depending on their service life. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2015; 4: 52-4. (in Russian)
10. Trunin D.A., Tlustenko V.P., Sadykov M.I. Results of orthopedic treatment of patients with complete and partial absence of teeth. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2017; 21 (5): 266-70. (in Russian)
11. Voronov I.A., Avtandilov G.A. The role of staphylococci in the oral cavity in the biodegradation of removable dentures. *Evraziyskiy soyuz uchenykh*. 2015; 111 (20):113-8. (in Russian)
12. Habilov N.L., Akbarov A.N., Salimov O.R. Influence of removable plate dentures on the microbiocenosis of the oral cavity. *Medicus*. 2016; 6: 82-5. (in Russian)
13. Carev V.N., Ippolitov E.V., Nikolaeva E.N. Genetic markers of antibiotic resistance in biofilm-forming strains of anaerobic infection pathogens. *Natsional'nye prioriteti Rossii*. 2016; 2 (20): 136-41. (in Russian)
14. Kharseeva G.G., Frolova Ya.N., Mironov A.Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronicity of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)
15. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Application of scanning electron microscopy to study the biofilms of *Candida albicans* on the surface of base plastics of removable orthopedic structures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(5): 308-13. (in Russian)
16. Chesnokov V.A., Chesnokova M.G. Microbiota of the oral mucosa and the surface of removable acrylic laminar prostheses for orthopedic rehabilitation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(2): 126-8. (in Russian)
17. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Yu. Candida associated parodontitis. Diagnostics. Treatment. Омск:Variant-Omsk; 2012. (in Russian)
18. Sadykov M.I. Trunin D.A., Nesterov A.M. Immunological and microbiological status of the oral cavity in elderly patients using removable lamellar dentures. *Nauka i innovatsii v meditsine*. 2016; 2 (2): 50-4. (in Russian)

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2022

Шипицына И.В., Осипова Е.В.

ВЛИЯНИЕ β -ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ НА АКТИВНОСТЬ БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ *K. PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

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

Одной из причин появления высокорезистентных штаммов связывают со способностью бактерий формировать биопленки на различных поверхностях. Образование возбудителями биопленки приводит к снижению активности антибиотика, увеличению времени для выработки бактериями генов стрессового ответа, и, как следствие, повышению анти-микробной толерантности.

Цель работы: исследовать влияние имипенема и цефепима на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом. Объект исследования – клинические штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из ран пациентов хроническим остеомиелитом. В контрольной серии оценивали уровень биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* через 48 ч культивирования на покровных стеклах и 96-луночных полистироловых планшетах. Во второй и третьей сериях на биопленочную форму бактерий *K. pneumoniae* воздействовали имипенемом и цефепимом и через 24 ч оценивали активность биопленкообразования согласно разработанным ранее критериям. Структура формирующейся биопленки на поверхности покровного стекла во всех сериях эксперимента была представлена одиночными адгезированными клетками и микроколониями различного размера. Культивирование с антибиотиками приводило к уменьшению количества микроколоний размером от 10 до 10 000 мкм² во второй и третьей сериях, однако значимые различия с показателями контрольной серии были установлены только при воздействии цефепима. Интенсивность пленкообразования *K. pneumoniae* в контрольной серии планшетным способом составляла 0,350 (0,334; 0,368) ед. опт. пл. При культивировании биопленок совместно с антибактериальными препаратами, биопленкообразующая активность через 24 ч эксперимента была значимо ниже показателей контрольной группы во всех опытных сериях. Бактерии *K. pneumoniae*, выделенные у пациентов хроническим остеомиелитом, при культивировании на полистироловых планшетах и на поверхности покровных стекол активно формируют биопленку, проявляя высокоадгезивные свойства. Показано, что исследуемые антибиотики оказывают бактериостатическое действие на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae*. Бактерицидного действия имипенема и цефепима на биопленочные формы не выявлено.

Ключевые слова: биопленка; резистентность; хронический остеомиелит; антибиотики.

Для цитирования: Шипицына И.В., Осипова Е.В. Влияние β -лактамов антибиотиков на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 594-599. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-594-599>

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд.биол. наук, науч. сотр. отдела доклинических и лабораторных исследований; e-mail: ivschimik@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 30.06.2022

Принята к печати 27.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.

INFLUENCE OF β -LACTAM ANTIBIOTICS ON THE ACTIVITY OF *K. PNEUMONIAE* BACTERIA BIOFILM FORMS ISOLATED FROM WOUNDS OF PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Centre «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, 640014, Kurgan, Russian Federation

One of the reasons for the emergence of highly resistant strains is associated with the ability of bacteria to form biofilms on various surfaces. The formation of a biofilm by pathogens leads to a decrease in the activity of the antibiotic, an increase in the time for the production of stress response genes by bacteria, and, as a result, an increase in antimicrobial tolerance.

To investigate the effect of imipenem and cefepime on the activity of biofilm forms of *K. pneumoniae* bacteria isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis.

The object of the study is clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis. In the control series, the level of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains was assessed after 48 hours of cultivation on coverslips and 96-well polystyrene plates. In the second and third series, the biofilm form of *K. pneumoniae* bacteria was exposed to imipenem and cefepime, and after 24 hours the activity of biofilm formation was assessed according to previously developed criteria.

The structure of the emerging biofilm on the surface of the coverslip in all series of the experiment was represented by single adherent cells and microcolonies of various sizes. Cultivation with antibiotics led to a decrease in the number of microcolonies ranging in size from 10 to 10,000 μm^2 in the second and third series, however, significant differences from the control series were found only when exposed to cefepime. The intensity of film formation of *K. pneumoniae* in the control series by the tablet method was 0.350 (0.334; 0.368) units opt.pl. When cultivating biofilms together with antibacterial drugs, the biofilm-forming activity after 24 hours of the experiment was significantly lower than in the control group in all experimental series. *K. pneumoniae* bacteria isolated from patients with chronic osteomyelitis, when cultivated on polystyrene plates and on the surface of coverslips, actively form a biofilm, exhibiting highly adhesive properties. The studied antibiotics were shown to have

a bacteriostatic effect on biofilm forms of K. pneumoniae bacteria. The bactericidal effect of imipenem and cefepime on biofilm forms was not revealed.

Key words: *biofilm; resistance; chronic osteomyelitis; antibiotics.*

For citation: Shipitsyna I. V., Osipova E. V. Influence of β -lactam antibiotics on the activity of *K. pneumoniae* bacteria biofilm forms isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 594-599 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-594-599>

For correspondence: Shipitsyna I. V., Ph.D., researcher of the department of preclinical and laboratory studies; e-mail: ivschi-mik@mail.ru

Information about authors:

Shipitsyna I. V., <https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>;
Osipova E. V., <https://orcid.org/0000-0003-2408-4352>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 30.06.2022

Accepted 27.07.2022

Published 14.10.2022

Введение. Остеомиелит – воспалительное деструктивное заболевание кости, вызываемое бактериями, микобактериями или грибами, возникающее, в большинстве случаев, в результате контактного распространения инфекции из прилежащей инфицированной ткани, гематогенного распространения, или обусловленное наличием открытых ран [1-4]. Для лечения остеомиелита большое значение имеет посев гнойного отделяемого на наличие микрофлоры с последующим определением чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам [3-5]. Недостаточное проникновение антибиотика в очаг воспаления; ослабление защитных механизмов пациента, применение лекарственных веществ, снижающих эффект препарата, возрастные особенности и другие причины могут приводить к несовпадению результатов терапии с данными антибиотикограмм, полученными для выделенных микроорганизмов [4-6]. Активность антибиотиков, в отличие от других лекарственных средств, величина непостоянная, зачастую снижается в связи с формированием у возбудителей приобретенной устойчивости [6]. Одной из распространенных причин резистентности инфекционных агентов к антимикробным препаратам и одним из факторов формирования хронических инфекционных процессов является биопленка, которая служит резервуаром для патогенных микроорганизмов, обеспечивает им физиологическую и функциональную стабильность [7-10]. Доказано, что биопленка является предпочтительной формой существования бактерий [8-11]. Поэтому выбор антибактериального препарата должен основываться не только на результатах антибиотикочувствительности возбудителей, находящихся в планктонном состоянии, но и на эффективности данных препаратов в отношении биопленочных форм бактерий.

Цель работы: исследовать влияние имипенема и цефепима на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом.

Материал и методы. Исследованы клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae* ($n=32$). Бактерии выделены из ран 24 пациентов с хроническим остеомиелитом, находившихся на лечении в гнойном центре ФГБУ «НМИЦ ТО» им. акад. Г.А. Илизарова в 2021-2022 гг.

Видовую идентификацию и определение чувствительности к антимикробным препаратам: цефепим (Cpm), имипенем (Im), проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе MicroScan WalkAway Plus System («Siemens», США) с использованием грамотрицательных 96-луночных панелей с субстратами для идентификации и антибиотиками – Neg Breakpoint Combo 44 (NBC 44). В качестве контроля использован референсный штамм *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Было проведено три серии эксперимента. В первой (контрольной) серии оценивали уровень биопленкообразования клинических штаммов *K. pneumoniae* через 48 ч культивирования на покровных стеклах и 96-луночных полистироловых планшетах. Во второй и третьей (опытных) сериях на формирующуюся (24 – часовую) биопленочную форму бактерий *K. pneumoniae* воздействовали антибактериальными препаратами: имипенемом и цефепимом в концентрации 10 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно и через 24 ч оценивали активность биопленкообразования согласно разработанным ранее критериям [11,12].

Показатели описательной статистики, в том числе медианы (Me) и квартилей (Q_{25} — Q_{75}), и критерия Вилкоксона, используемого для определения статистической значимости различий между группами, определяли с помощью программы Gnumeric 1.12.17. Различия между группами считали существенными при $p<0,05$.

Клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Хельсинской декларации, с разрешения комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова».

Результаты. При анализе антибиотикограмм бактерий *K. pneumoniae* 25% изолятов были резистентны к имипенему, 85% – к цефепиму. Среди чувствительных к имипенему штаммов 42% ($n=25$) изолятов обладали высокой биопленкообразующей способностью, 46% – средней, 12% – низкой. Чувствительные к цефепиму штаммы ($n=5$) характеризовались только средней биопленкообразующей способностью.

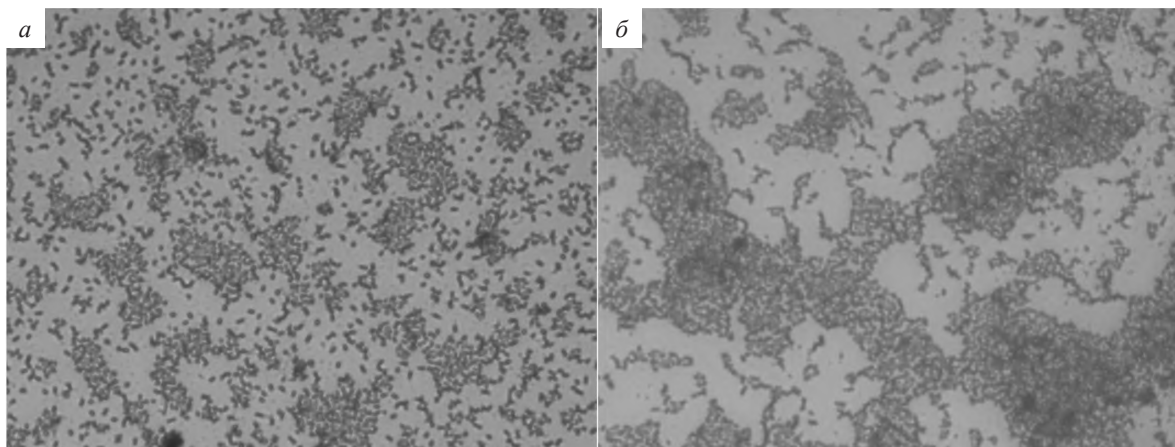


Рис. 1. Формирование биопленки штаммами *K. pneumoniae* на поверхности покровного стекла (1 серия).

a – через 24 ч эксперимента; *б* – через 48 ч эксперимента. Световая микроскопия.

Ув. x400. Окраска генциановым фиолетовым.

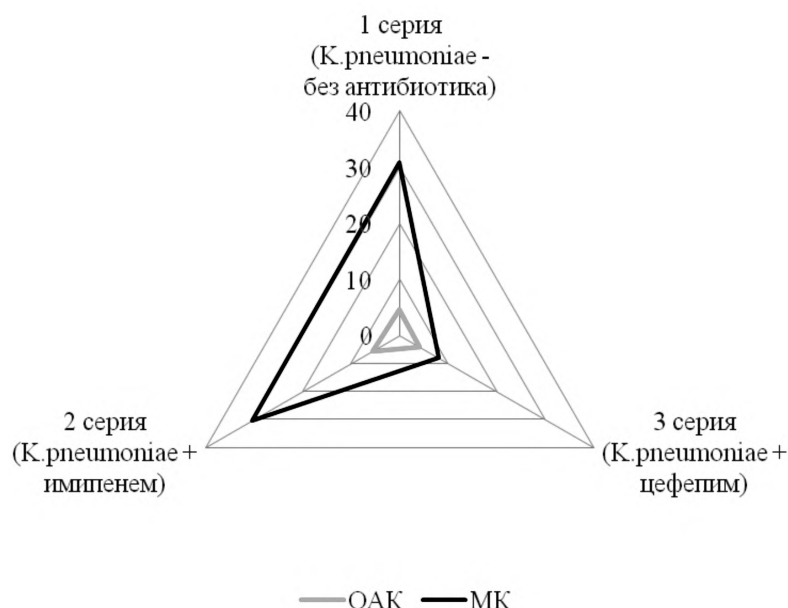


Рис. 2. Соотношение долей ОАК и МК в сериях эксперимента через 48 часов.

Среди резистентных к имипенему штаммов 49,1% ($n=8$) изолятов обладали высокой биопленкообразующей способностью, 46,8% – средней, 4,1% изолятов – низкой. Среди резистентных к цефепиму штаммов ($n=27$) высокая активность к биопленкообразованию была выявлена у 46% исследуемых штаммов, средняя активность у 44%, низкая – у 10% штаммов.

В течение 48 ч все выделенные клинические изоляты *K. pneumoniae* формировали биопленку на поверхности полистироловых планшетах и покровных стеклах (рис. 1, *a, б*).

Структура формирующейся биопленки на поверхности покровного стекла во всех сериях эксперимента была представлена одиночными адгезированными клетками (ОАК) и микроколониями (МК) различного

размера. Суммарная доля ОАК и МК в контрольной серии и в серии с имипенемом на биопленку не отличались ($p=0,29$) (рис. 2).

После добавления цефепима к формирующейся биопленке наблюдали значимое снижение показателя ($p=0,000006$), изменение которого происходило за счет уменьшения доли МК ($p=0,00002$) (рис. 3). В этой же серии наблюдали минимальные значения доли ОАК в площади поля зрения, однако существенных различий с другими сериями не установлено.

В структуре формирующейся биопленки во всех сериях преобладали МК размером от 10 до 100 мкм². Добавление антибиотиков приводило к уменьшению количества микроколоний размером от 10 до 10000 мкм² во второй и третьей сериях, однако значимые различия с показателями контрольной серии

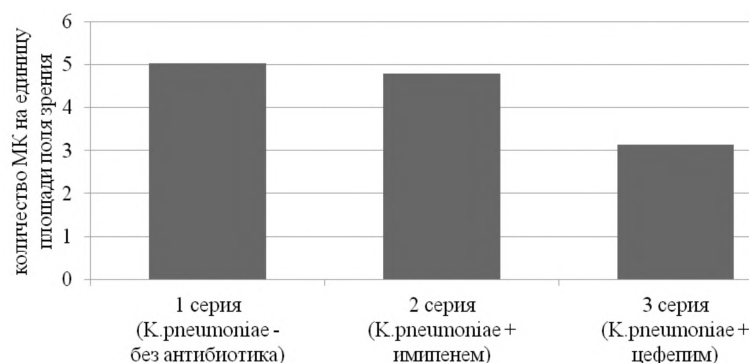


Рис. 3. Соотношение количества МК в сериях эксперимента через 48 часов.

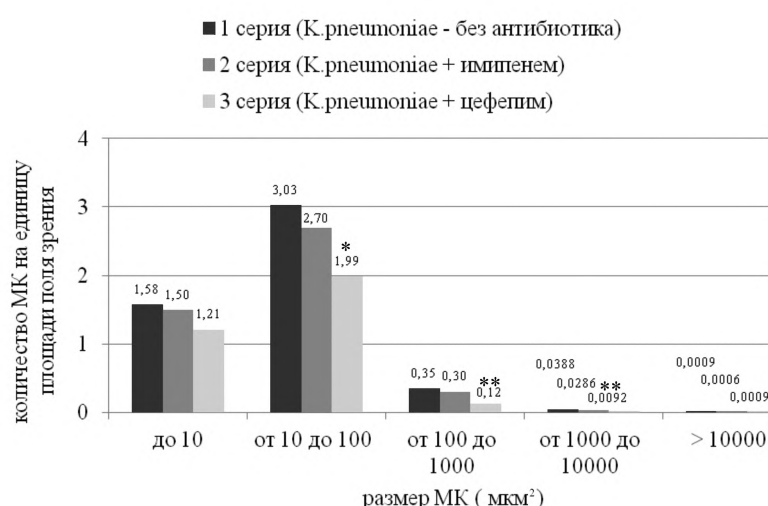


Рис. 4. Соотношение МК различного размера в сериях эксперимента через 48 часов.

* – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с 1-й серией.

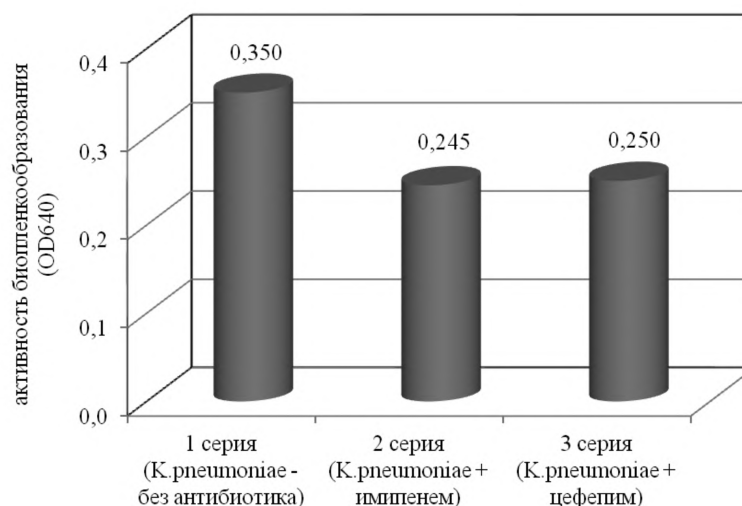


Рис. 5. Интенсивность биопленкообразования штаммами *K. pneumoniae* через 48 часов.

были установлены только после воздействия на биопленку цефепима (рис. 4).

Средняя интенсивность пленкообразования бактерий *K. pneumoniae* в контрольной серии планшет-

ным способом составляла 0,350 (0,334; 0,368) ед. опт. пл. При культивировании биопленок совместно с антибактериальными препаратами, интенсивность пленкообразования была значимо ниже показателей

контрольной группы (рис. 5). Имипенем и цефепим не оказывали бактерицидного действия на биопленочные формы бактерий, о чем свидетельствуют значения оптической плотности: 0,245 (0,221; 0,311) ед. опт. пл. ($p=0,000019$) и 0,250 (0,219; 0,290) ед. опт. пл. ($p=0,000021$) соответственно.

Обсуждение. Бактерии *K. pneumoniae* относят в группу клинически значимых патогенов с высоким уровнем антибактериальной устойчивости (ESKAPe) [13, 14]. По данным разных авторов за последние годы наблюдается активный рост антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* к защищенным пенициллинам, цефалоспорином III – IV поколений, карбапенемам [13–15]. Это связано, в первую очередь, с главным механизмом резистентности, распространением ESBL CTX-M-типа, гидролизующих цефепим; OXA-48, гидролизующих цефалоспорины III и IV поколений, азтреонам, карбапенемы; металло- β -лактамаз NDM-1, VIM и IMP типа, эффективно гидролизующих множество β -лактамов [13, 15]. Резистентность *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам может реализовываться и по средствам формирования биопленки [7, 12, 16]. Биопленка – это барьер, препятствующий диффузии антибактериальных веществ в её матрикс [7, 9–10]. Доказано, что β -лактамы антибиотиков деактивируются уже в поверхностных слоях биопленки, сформированных β -лактамазопозитивными *K. pneumoniae* [13–15]. Экзополисахаридный матрикс биопленок обеспечивает защиту бактериальных клеток от проникновения гликопептидов и аминогликозидов [13]. Формирование возбудителями биопленки приводит к снижению активности антибиотика, увеличению времени для выработки бактериями генов стрессового ответа, и, как следствие, повышению антимикробной толерантности.

Заключение. Согласно проведенному нами исследованию, бактерии *K. pneumoniae*, выделенные у пациентов хроническим остеомиелитом, при культивировании на полистироловых планшетах и на поверхности покровных стекол активно формируют биопленку, проявляя высокоадгезивные свойства. Среди штаммов, резистентных к имипенему и цефепиму, выявлены, преимущественно, высоко- и среднеадгезивные изоляты. Показано, что исследуемые антибиотики оказывают угнетающее действие на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae*. Бактерицидного действия имипенема и цефепима на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae* не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 12 см. REFERENCES)

1. Новомлинский В.В., Малкина Н.А., Андреев А.А., Глухов А.А., Микulich Е.В. Современные аспекты диагностики и лечения остеомиелита (обзор литературы). *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 5:122.
2. Миронов С.П., Цискарашвили А.В., Горбатюк Д.С. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Гений ортопедии*. 2019; 25(4):610–21. DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621.
3. Винник Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика (обзор литературы). *Московский хирургический журнал*. 2014; 2:50–3.
4. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани. *Клини-*

ческая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012; 14(2):118–31.

5. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Леончук Д.С., Судницын А.С. Мониторинг ведущей грамотрицательной микрофлоры и антибиотикорезистентности при остеомиелите. *Гений ортопедии*. 2020; 2(4): 544–547. DOI:10.18019/1028-4427-2020-26-4-544-547.
7. Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биопленки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38–42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6.
8. Окулич В.К., Плотников Ф. В., Кабанова А. А. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2012; (4): 70–82.
9. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками. *Вестник РАМН*. 2011; 10: 31–9.
10. Глушанова Н.А., Блинова А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека. *Медицина в Кузбассе*. 2015; 14(2): 30–5.
11. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Розова Л.В. Адгезивная способность клинических штаммов *Enterobacter cloacae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам. *Новости хирургии*. 2017; 25(3): 273–8. DOI:10.18484/2305-0047.2017.3.273.
13. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биопленок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений ортопедии*. 2018; 24(4): 478–81. DOI:10.18019/1028-4427-2018-24-4-478-481.
14. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *KMAX*. 2020; 22(1): 4–19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19.
14. Покудина И.О., Коваленко К.А. Распространенность и вклад в антибиотикоустойчивость β -лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016, 12 (2): 295–8.
16. Анганова Е.В., Ветохина А.В., Распопина Л.А., Кичигина Е.Л., Савилов Е.Д. Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 5:70–7. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-70-77.
17. Плотников, Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку. *Новости хирургии*. 2014; 22(5): 575–81.

REFERENCES

1. Novomlinsky V.V., Malkina N.A., Andreev A.A., Glukhov A.A., Mikulich E.V. Modern aspects of diagnosis and treatment of osteomyelitis (literature review). *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 5:122. (in Russian)
2. Mironov S.P., Tsiskarashvili A.V., Gorbatiuk D.S. Chronic post-traumatic osteomyelitis as a problem of modern traumatology and orthopedics (literature review). *Geniy ortopedii*. 2019; 25(4): 610–21. DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621. (in Russian)
3. Vinnik Yu.S. Chronic osteomyelitis: diagnosis, treatment, prevention (literature review). *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 2:50–3. (in Russian)
4. Privolnev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Topical use of antibiotics in the treatment of bone infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14 (2): 118–31. (in Russian)
5. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Leonchuk D.S., Sudnitsyn A.S. Monitoring of the leading gram-negative microflora and antibiotic resistance in osteomyelitis. *Geniy ortopedii*. 2020; 2(4): 544–7. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-544-547. (in Russian)
6. Koller K.-P. Antibiotics. Targets, Mechanisms and Resistance. Edited by Claudio O. Gualerzi, Letizia Brandi, Attilio Fabbretti

- ti, and Cynthia L. Pon.. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014; 53: 3062. DOI:10.1002/anie.201400593
7. Savilov E.D., Anganova E.V., Noskova O.A., Dukhanina A.V. Bacteria Biofilms in Purulent-Septic Infections. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6. (in Russian)
 8. Okulich V.K., Plotnikov F.V., Kabanova A.A. The role of microbial biofilms in the pathogenesis of infectious processes at the present stage. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2012; (4): 70–82. (in Russian)
 9. Romanova Yu.M., Didenko L.V., Tolordava E.R. Biofilms of pathogenic bacteria and their role in the chronicity of the infectious process. Search for means of combating biofilms. *Vestnik RAMN*. 2011; 10: 31–9. (in Russian)
 10. Glushanova N.A., Blinova A.I., Alekseeva N.B. Bacterial biofilms in infectious pathology of human. *Meditsina v Kuzbasse*, 2015; 14(2): 30-5. (in Russian)
 11. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Rozova L.V. Adhesive ability of clinical strains of *Enterobacter cloacae* isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis and their sensitivity to antimicrobial drugs. *Novosti khirurgii*. 2017; 25(3): 273-8. DOI:10.18484/2305-0047.2017.3.273. (in Russian)
 12. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018; 45: 131-9. DOI: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
 13. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Genij ortopedii*. 2018; 24(4): 478-81. DOI:10.18019/1028-4427-2018-24-4-478-481. (in Russian)
 14. Chebotar' I. V., Bocharova Y.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. Why *Klebsiella pneumoniae* becomes the leading opportunist pathogen. *KMAKH*. 2020; 22(1): 4-19. DOI: 10.36488/cmac.2020.1.4-19. (in Russian)
 15. Pokudina I.O., Kovalenko K.A. Prevalence and contribution to antibiotic resistance of β -lactamases in outpatient isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016; 12(2): 295-8. (in Russian)
 16. Anganova E.V., Vetokhina A.V., Raspopina L.A., Kichigina E.L., Savilov E.D. The state of antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 5:70-7. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-70-77. (in Russian)
 17. Plotnikov, F.V. Complex treatment of patients with purulent wounds depending on the ability of pathogens to form a biofilm. *Novosti khirurgii*. 2014; 22(5): 575–81. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Садеков Т.Ш.¹, Бойко А.Н.^{2,3}, Омарова М.А.^{2,3}, Роговский В.С.^{2,3}, Жиленкова О.Г.¹, Затевалов А.М.¹, Миронов А.Ю.^{1,4}

ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ МИКРОБИОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ ПО КОНЦЕНТРАЦИЯМ МИКРОБНЫХ МАРКЁРОВ В КРОВИ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, 117513, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Исследована взаимосвязь рассеянного склероза (РС) и состояния микробиома человека, а именно: изменение представленности филофитов микробиоты, доли кокковой микрофлоры, доли анаэробной, грамотрицательной, протеолитически активной микрофлоры, концентрации маркёров бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови. Микробиом исследован методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) микробных маркёров (ММ) в крови. При РС определено статистически значимое увеличение в крови концентраций общего уровня ММ бактериальных плазмалогена и эндотоксина, что может быть связано с увеличением проницаемости стенки кишечника. При РС увеличивается доля кокков, грамотрицательной, анаэробной микрофлоры с протеолитическим типом метаболической активности. Изменяются корреляционные связи представленности филофитов микробиоты, за счёт переключения прямой связи Proteobacteria-Bacteroidetes на Proteobacteria-Firmicutes. При РС увеличивается количество Actinobacteria и Proteobacteria, снижается количество Firmicutes. Заболевание РС может быть связано с патологическими изменениями структуры микробиома и нарастанием эндотоксемии, что может являться одним из факторов патогенеза заболевания. Предложены новые лабораторные маркёры для диагностики и прогнозирования течения РС.

Ключевые слова: микробиота; рассеянный склероз; ГХ-МС; кровь; эндотоксемия; микробные маркёры; бактериальный эндотоксин и плазмалоген.

Для цитирования: Садеков Т.Ш., Бойко А.Н., Омарова М.А., Роговский В.С., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Миронов А.Ю. Оценка структуры микробиома человека при рассеянном склерозе по концентрациям микробных маркёров в крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 600-606. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-600-606

Для корреспонденции: Садеков Тимур Шамилович., мл. науч. сотр. лаб. биологии бифидобактерий; e-mail: sadekov@gabrich.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Статья выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 22-15-00284.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.06.2022

Принята к печати 20.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Sadekov T.Sh.¹, Boyko A.N.^{2,3}, Omarova M.A.^{2,3}, Rogovskii V.S.^{2,3}, Zhilenkova O.G.¹, Zatevalov A.M.¹, Mironov A.Yu.^{1,4}

EVALUATION OF THE STRUCTURE OF THE HUMAN MICROBIOME IN MULTIPLE SCLEROSIS IN BLOOD MICROBIAL MARKER CONCENTRATIONS

¹G.N. Gabrichovsky research institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzora, Moscow, Russia;

²Federal State Budgetary Institution «Federal center of brain research and neurotechnologies» of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

⁴Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

The relationship between multiple sclerosis and the state of the human microbiome was studied, namely, the change in the representation of microbiota phylotypes, the proportion of coccal flora, the proportion of anaerobic, gram-negative, proteolytically active microflora, as well as the concentration of markers of bacterial plasmalogen and endotoxin in the blood. Microbiome studies were carried out by gas chromatography – mass spectrometry of microbial markers in the blood. A statistically significant increase in blood concentrations of the total level of microbial markers of bacterial plasmalogen and endotoxin was determined in multiple sclerosis, which may be associated with an increase in the permeability of the intestinal wall. In multiple sclerosis, the proportion of coccal, gram-negative, anaerobic microflora with a proteolytic type of metabolic activity increases. The correlations of the representation of microbiota phylotypes change due to the switching of the direct relationship Proteobacteria-Bacteroides to Proteobacteria-Firmicutes. In multiple sclerosis, Actinobacteria and Proteobacteria increase and Firmicutes decrease. Conclusion. The multiple sclerosis disease may be associated with pathological changes in the structure of the microbiome and the growth of endotoxemia, which may be one of the factors in the pathogenesis of the disease. New laboratory markers for diagnosing and predicting the course of MS have been proposed.

Key words: microbiota; multiple sclerosis; GC-MS; blood; endotoxemia; microbial markers; bacterial endotoxin and plasmalogen.

For citation: Sadekov T.Sh., Boyko A.N., Omarova M.A., Rogovsky V.S., Zhilenkova O.G., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu. Evaluation of the structure of the human microbiome in multiple sclerosis by the concentrations of microbial markers in the blood. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 600-606 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-600-606>

For correspondence: Sadekov T.Sh.; junior researcher of the laboratory of *Bifidobacterium* biology; e-mail: sadekov@gabrigh.ru

Information about authors:

Sadekov T.Sh., <https://orcid.org/0000-0001-5337-0054>;
Boyko A.N., <https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>;
Omarova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6744-2191>;
Rogovskii V.S., <https://orcid.org/0000-0002-3682-6571>;
Zhilenkova O.G., <https://orcid.org/0000-0003-3206-6648>;
Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor. This research was funded by the Russian Science Foundation, grant 22-15-00284.

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

Received 30.06.2022
Accepted 20.07.2022
Published 14.10.2022

Введение. Рассеянный склероз (РС) – хроническое иммунноопосредованное воспалительное заболевание ЦНС, являющееся одной из самых частых неврологических причин инвалидизации среди лиц молодого и среднего возраста [1]. Наблюдается тенденция к увеличению распространённости РС, в 2016 г. в мире зарегистрировано более 2 млн случаев РС, что на 10% больше, чем в 1990 г. [2]. Этиология и патогенез РС во многом остаются неясными. Принципиальной задачей становится поиск новых лабораторных маркёров для диагностики и прогнозирования течения РС.

Одним из перспективных подходов в изучении этиологии и патогенеза РС является изучение микроэкологических нарушений в организме человека – анализ специфических маркёров микробиоты (ММ), составляющих широкий спектр жирных кислот с нечётным числом углеродных атомов, разветвлёнными цепями и гидроксильными группами. Известно более 250 таких маркёров (в организме человека их всего около 25). Они могут распределяться по всему организму и быть обнаружены даже в низких концентрациях при помощи метода газовой хроматографии с масс-селективным детектированием ионов (ГХ-МС) [3-5, 7]. Исследование микробиома человека при РС становится актуальной задачей современной медицины и практического здравоохранения.

Цель исследования – изучить структуру и состояние микробиома человека при РС по концентрациям ММ в крови.

Материал и методы. Проведено обсервационное исследование образцов крови у 53 пациентов амбулаторного наблюдения консультативно-диагностического центра при Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Возраст пациентов составил 48±17 лет. В основную группу включены пациенты с диагнозом РС, установленным на основании клинико-инструментальных данных (диагноз подтверждён данными магнитно-резонансной томографии по критериям McDonald 2017 г., наличием характерных олигоклональных полос в цереброспинальной жидкости). В группу сравнения включены пациенты, не имеющие

в анамнезе диагноза РС (Н). Группы сопоставимы по возрасту. Гендерные различия не учитывались. Работа проводилась в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г., «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждённой приказом Минздрава РФ № 226 от 19.06.2003 г. Пациенты дали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство и публикацию полученных результатов.

Для определения концентрации химических соединений в венозной крови, относящихся к ММ, использован метод ГХ-МС. Из цельной венозной крови с помощью реакции кислого метанолиза и экстракции гексаном выделены жирнокислотные соединения. Разделение, идентификацию, расчёт концентрации проводили на хроматографе МАЭСТРО 7820А, совмещённым с квадрупольным селективным масс-спектрометром (Agilent Technologies, США) с диапазоном масс 2-1000 а.е.м., имеющем разрешающую способность 0,5 а.е.м. во всём рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг (пикограмм) по метил-стеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг в режиме селективных ионов, на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0,20 мм. Режим анализа – программированный, скорость нагрева термостата колонки – 5 град/мин в диапазоне 130-320° С. Масс-спектрометр квадрупольный, с ионизацией электронами (70 эВ) работает в режиме масс-фрагментографии (МФ) селективных ионов (multiple ions monitoring – MIM), при периодическом детектировании до 30 ионов в пяти интервалах времени. Газ-носитель – гелий. Расчёт концентраций проведён по методу внутреннего стандарта с использованием программы, поставляемой производителем хроматографа [6, 8].

Рассчитанные концентрации группировали исходя из свойств ассоциированного с ними микроорганизма по следующим параметрам.

Распределение проводилось по 4-м основным филотипам: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*,

Firmicutes. Определены группы, относящиеся к коккам и бациллам. Отдельно выделено царство *Fungi*. В соответствии с типом дыхания определены группы ММ анаэробных и аэробных микроорганизмов, грамотрицательных и грамположительных, имеющих выраженную протеолитическую и сахаролитическую катаболическую активность. Чтобы снизить дисперсию значений, концентрацию рассчитывали как представленность определённой группы в общем пуле концентраций ММ в %. Для интегральных характеристик использованы соотношения: *Bacteroidetes* к *Firmicutes* (B/F) – характеристика структуры микробиома [9]; сумма концентраций ММ кокков к бациллам (C/B); Анаэробный индекс – анаэробы к аэробам (АИ); Соотношение концентраций ММ грамотрицательной микрофлоры к грамположительной (Грамм/Грамм⁺); Протеолитический индекс (ПИ). Концентрация бактериального плазмалогена оценена по концентрации октадеценового альдегида (18:1a), входящего в состав клеточной стенки микроорганизмов индигенной нормобиоты, родов *Bifidobacterium spp.* и *Eubacterium spp.* Симбионтная микробиота является резервуаром плазмалогена, который входит в состав мембран анаэробных бактерий. Для оценки концентрации эндотоксина в крови методом ГХ-МС суммируются концентрации компонентов липида А – гидроксикислот: 3h12, 2h12, hi13, 3h13, 3h14, 2h14, 2hi15, 3hi15, h16, 3hi17, h18, h15, ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий: *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides hypermegas*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori* [10].

Статистические методы, использованные в работе, относятся к методам простой описательной ста-

тистики. Для характеристики выборок генеральной совокупности использовано среднее – медианное значение и интерквартильный разброс. Для оценки статистической значимости средних значений сравниваемых групп использован U-критерий Манна-Уитни. Взаимосвязь показателей оценена с помощью корреляционного анализа Пирсона [11].

Результаты. Для оценки общего уровня концентраций ММ сравнена сумма концентраций всех определяемых ММ в крови в группе РС и группе норма (Н). Сравнена концентрация ММ бактериального плазмалогена и эндотоксина (рис. 1, а-в).

В группе РС статистически значимо увеличены концентрации в крови для общего уровня ММ (ОУ), концентрации ММ бактериального плазмалогена (Пл) и эндотоксина (Эн). Увеличение концентраций может быть связано с увеличением проницаемости стенки кишечника и развитием эндотоксемии. Рассмотрены взаимные корреляции этих показателей и критерия структуры микробиома (B/F). Результат представлен на рис. 2, а, б в виде схемы, указывающей силу и направленность корреляционных связей.

Тонкой чёрной линией обозначена статистически не значимая корреляционная связь, толстой чёрной линией – прямая корреляционная связь, пунктирной линией обозначена обратная корреляционная связь.

При РС изменяются корреляционные связи между исследуемыми критериями. В группе Н уровень плазмалогена связан с общим уровнем ММ в крови, уровень эндотоксина связан со структурой микробиома. Между общим уровнем ММ в крови и структурой микробиома отмечается обратная корреляционная связь, то есть увеличение общего уровня связано со снижением доли бактериоидов в микробиоме. При РС эта корреляция не отмечена, наблюдается прямая кор-

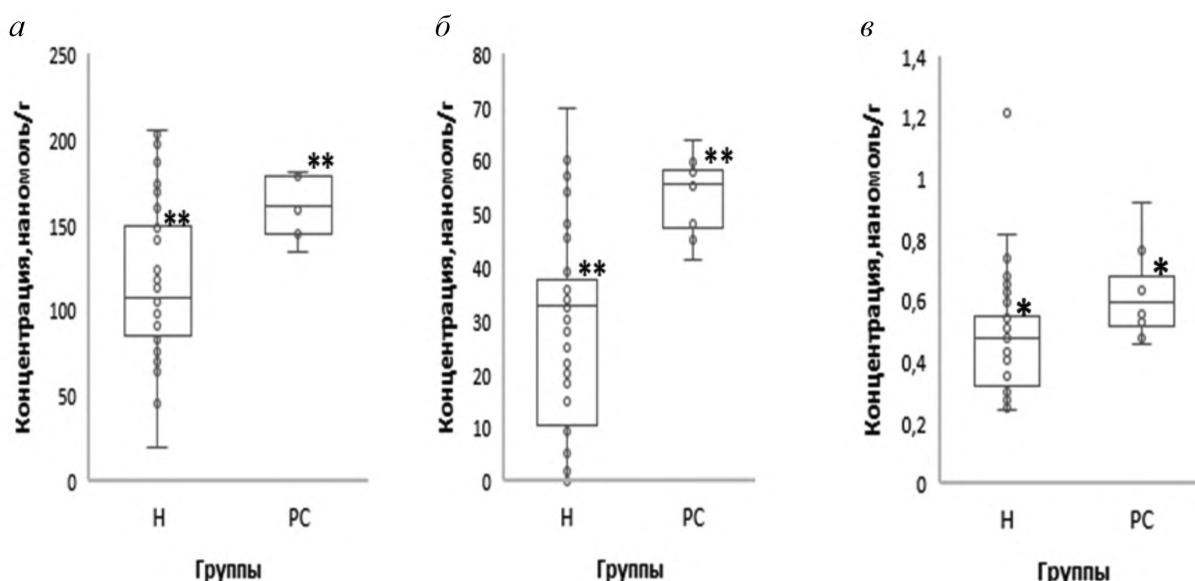


Рис. 1. Концентрации общего уровня ММ, ММ бактериальных плазмалогена и эндотоксина в крови у пациентов с РС и в группе сравнения. а – общий уровень; б – плазмалоген; в – эндотоксин.

Здесь и на рис.3: * – статистически значимые отличия от группы сравнения ($p < 0,05$), ** – статистически значимые отличия от группы сравнения ($p < 0,01$).

реляция общего уровня и концентрации эндотоксина, уровень эндотоксина коррелирует с уровнем плазмалогена. Повышение суммарной концентрации ММ в крови, маркёров бактериального плазмалогена и эндотоксина с учётом их взаимной корреляции с общим уровнем концентрации ММ в крови может указывать на увеличенную проницаемость кишечника.

Для оценки структуры микробиома исследована представленность основных фило-типов (рис. 3, а-г).

При РС статистически значимо повышается представленность *Actinobacteria* и *Firmicutes*, представленность *Proteobacteria* статистически значимо снижается относительно группы Н. Показатель *Bacteroidetes* в исследуемых группах не изменяется.

При РС прямая корреляционная связь *Proteobacteria-Bacteroidetes* меняется на прямую корреляционную связь *Proteobacteria-Firmicutes* и фило-тип *Bacteroidetes* оказывается не связан корреляцией с другими фило-типами. При нарушении структуры микробиома характерно снижение представленности *Bacteroidetes* в микробиоме, но при РС, как следует из рис. 3, статисти-чески значимого снижения не наблюдается. Происходит

снижение представленности *Proteobacteria* и рост *Firmicutes* и *Actinobacteria*, сопровождающийся обратными корреляциями представленности этих фило-типов.

Для характеристики микробиома рассмотрено со-отношение кокков и палочковидной микрофлоры. При РС отмечается рост представленности кокков и снижение представленности бацилл в микробиоме.

Соотношение кокков и палочковидной микрофлоры не связаны с другими показателями структуры микробиома корреляционной связью. Смещение соотно-шения С/В в область высоких значений происходит вне зависимости от изменения структуры микробио-ма. При РС увеличивается представленность грамположительной микрофлоры и снижается представленность грамотрицательной. Для выявления взаимосвя-зи с другими показателями структуры микробиома проведён корреляционный анализ (табл. 1).

Увеличение представленности грамположительных микроорганизмов в микробиоме при РС связано с увеличением представленности *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. В группе сравнения снижение представленности грам-положительных микроорганизмов связано с увеличени-

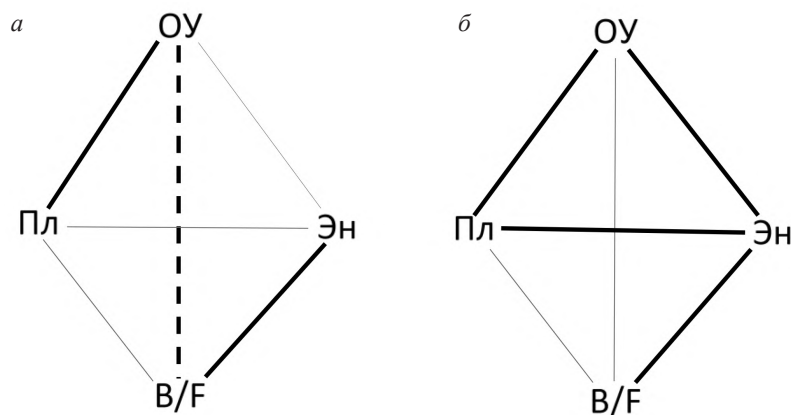


Рис. 2. Схема взаимных корреляций общего уровня, концентраций ММ бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови, показателя В/Ф у пациентов с РС и в группе сравнения.

а – группа сравнения; б – рассеянный склероз.

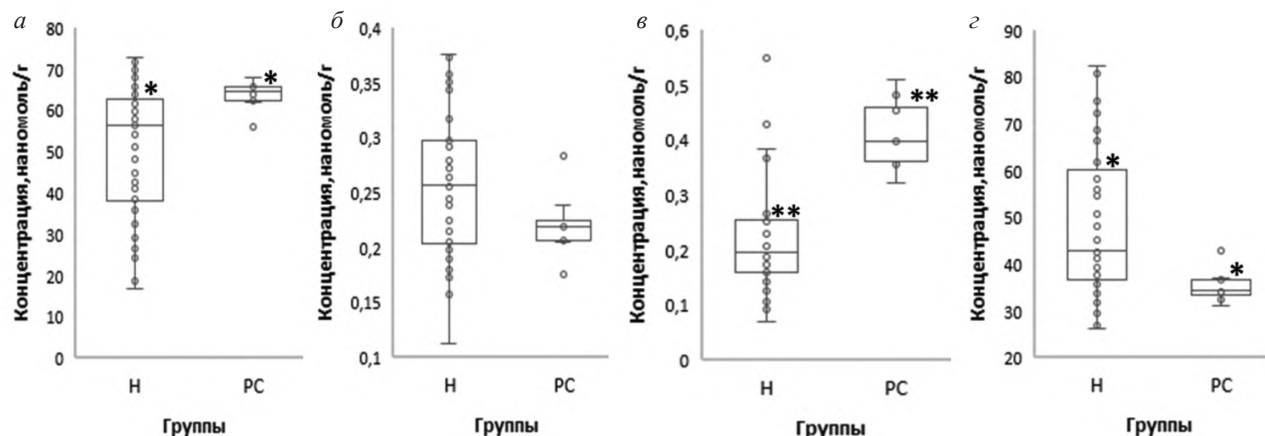


Рис. 3. Представленность ММ фило-типов микробиома у пациентов с РС и группы сравнения.

а – *Actinobacteria*; б – *Bacteroidetes*; в – *Proteobacteria*; г – *Firmicutes*.

Таблица 1

Корреляционный анализ соотношения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в микробиоме человека при РС и в группе сравнения

Показатели структуры микробиома	Группа сравнения	РС
Общий уровень микробных маркёров	-0,363	0,109
ММ бактериального плазмалогена	-0,356	0,121
ММ бактериального эндотоксина	0,616	0,655
Представленность <i>Actinobacteria</i>	-0,252	-0,696
Представленность <i>Bacteroidetes</i>	0,960	0,727
Представленность <i>Firmicutes</i>	0,198	0,684
Представленность <i>Proteobacteria</i>	0,959	0,945
Соотношение структуры микробиома В/Г	0,929	0,265
Представленность <i>Fungi</i>	-0,109	0,251
Соотношение С/В	0,062	0,504
Анаэробный индекс	-0,364	-0,590
Протеолитический индекс	-0,289	-0,509

Примечание. Здесь и в табл. 2,3: полужирным курсивом отмечены статистически значимые коэффициенты корреляции ($p < 0,05$).

Таблица 2

Корреляционный анализ соотношения анаэробных и аэробных микроорганизмов в микробиоме человека при РС и в группе сравнения

Показатели структуры микробиома	Группа сравнения	РС
Общий уровень ММ	0,313	0,446
ММ бактериального плазмалогена	0,552	0,140
ММ бактериального эндотоксина	-0,301	-0,009
Представленность <i>Actinobacteria</i>	0,542	0,511
Представленность <i>Bacteroidetes</i>	-0,369	-0,190
Представленность <i>Firmicutes</i>	-0,528	-0,505
Представленность <i>Proteobacteria</i>	-0,352	-0,688
Соотношение структуры микробиома В/Г	-0,268	0,145
Представленность <i>Fungi</i>	-0,407	-0,264
Соотношение С/В	0,132	0,121
Протеолитический индекс	0,516	0,566
Соотношение Грам ⁺ /Грамм ⁺	-0,364	-0,590

ем общего уровня ММ в крови и бактериального плазмалогена и снижением концентрации бактериального эндотоксина. В группе сравнения отмечается обратная корреляционная связь представленности анаэробной и грамположительной микрофлоры.

Для оценки структуры микробиома относительно функции дыхания микроорганизмов определено соотношение анаэробных (факультативные анаэробы) и аэробных микроорганизмов. При РС увеличивается представленность анаэробных микроорганизмов и снижается представленность аэробных. Увеличивается анаэробный индекс, представляющий соотношение концентраций ММ анаэробных и аэробных микроорганизмов. Для оценки взаимосвязи анаэробного индекса с другими показателями структуры микро-

биома проведён корреляционный анализ, результаты которого представлены в табл. 2.

Соотношение анаэробной и аэробной микрофлоры не связаны с другими показателями структуры микробиома корреляционной связью. Смещение соотношения анаэробного индекса в область высоких значений происходит вне зависимости от изменения структуры микробиома. В группе сравнения анаэробный индекс связан с общим уровнем ММ и концентрацией плазмалогена в крови прямой корреляционной связью, с концентрацией ММ эндотоксина – обратной. Прямая корреляционная связь отмечается для анаэробного индекса и представленности *Actinobacteria* и обратные корреляционные связи с другими флотипами и царством *Fungi*. Прямая корреляционная связь отмечается для анаэробного ин-

Таблица 3

Корреляционный анализ соотношения протеолитически активных и сахаролитически активных микроорганизмов в микробиоме человека при РС и в группе сравнения

Показатели структуры микробиома	Группа сравнения	РС
Общий уровень ММ	0,173	0,417
ММ бактериального плазмалогена	0,583	0,407
ММ бактериального эндотоксина	-0,204	0,172
Представленность <i>Actinobacteria</i>	0,748	0,856
Представленность <i>Bacteroidetes</i>	-0,231	-0,123
Представленность <i>Firmicutes</i>	-0,741	-0,858
Представленность <i>Proteobacteria</i>	-0,332	-0,537
Соотношение структуры микробиома В/Г	-0,095	0,420
Представленность <i>Fungi</i>	0,091	0,454
Соотношение С/В	-0,216	0,134
Соотношение Грам ⁺ /Грамм ⁺	-0,289	-0,509
Анаэробный индекс	0,516	0,566

декса и протеолитического индекса и обратная корреляционная связь для соотношения Грам⁺/Грамм⁺.

Для оценки протеолитической активности микробиоты рассмотрена представленность микроорганизмов проявляющих в большинстве случаев протеолитическую активность и микроорганизмов, с бродильным метаболизмом.

При РС увеличивается представленность протеолитически активных микроорганизмов и снижается представленность сахаролитических. Увеличивается протеолитический индекс, представляющий соотношение концентраций ММ протеолитически активных и сахаролитически активных микроорганизмов. Для оценки взаимосвязи протеолитического индекса с другими показателями структуры микробиома проведен корреляционный анализ (табл. 3).

При РС протеолитический индекс имеет прямую корреляционную связь с представленностью *Actinobacteria* и обратную с *Firmicutes*. В группе Н, кроме вышеописанной корреляционной связи отмечается прямая корреляционная связь протеолитического индекса с концентрациями ММ бактериального плазмалогена и анаэробного индекса. При РС происходит увеличение корреляции, следовательно, увеличение протеолитической активности *Actinobacteria* и усиление сахаролитической активности *Firmicutes*.

Обсуждение. РС – иммуноопосредованное заболевание ЦНС, сопровождающееся повреждением аксона [11] и дисбиозом кишечника [12]. Уровень всех измеряемых ГХ-МС ММ, ММ бактериальных плазмалогена и эндотоксина превышают значения показателей группы Н (см. рис. 1). Взаимные корреляции общего уровня плазмалогена и эндотоксина становятся статистически значимыми, и разрывается корреляция общего уровня с показателем структуры микробиома (см. рис. 2), что может свидетельствовать о таком состоянии слизистой оболочки, когда количество ММ уже не зависит от состава микробного сообщества.

Изменения структуры микробного сообщества сопровождаются увеличением представленности *Actinobacteria* и *Firmicutes* за счёт снижения представленности *Proteobacteria* (см. рис. 3). Микроорганизмы фило типа *Actinobacteria* связаны с протеолитической активностью микробиома, *Firmicutes* с сахаролитической (см. табл. 3). При РС прогрессирует протеолитически активная, агрессивная микрофлора при доминировании *Actinobacteria*. Снижение численности *Bacteroidetes* не происходит, но разрывается корреляционная связь с *Proteobacteria*. Филотипы *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* связаны прямой корреляцией с представленностью грамположительных микроорганизмов. При РС корреляционная связь *Bacteroidetes* и представленность грамположительных микроорганизмов ослабевает, но остается статистически значимой. При сохранении представленности фило типа *Bacteroidetes* в микробиоме зависимость изменения численности не связана с изменением количества микроорганизмов других фило типов, то есть фило тип исключается из «социальной» структуры сообщества. Дезорганизация микробного сообщества сопровождается увеличением представленности кокков, доля представленности которых в группе Н в 3 раза ниже, чем при РС (см. рис. 1). Отсутствие корреляционной связи кокков с количеством основных фило типов микробиома человека, указывает на критическое снижение колонизационной резистентности микробиома и как следствие замещение эндогенной микрофлоры просветной, преимущественно анаэробной.

Заключение. Исследование состояния микробиома человека по концентрациям ММ в крови позволяет охарактеризовать структуру микробного сообщества как экстракорпорального органа организма человека. Изменения, регистрируемые по соотношениям концентраций ММ не менее информативны, чем молекулярно-генетические методы, несмотря на более ограниченный набор базовых микроорганизмов. Из-

мерение концентраций ММ в крови позволяет охарактеризовать не столько структуру микробиома, но и оценить взаимосвязь микробиоты и организма, охарактеризовать барьерную функцию слизистых оболочек.

Показана важная роль барьерной функции слизистой оболочки ЖКТ в развитии эндотоксемии и закономерности изменения структуры микробиома. РС сопровождается 1,5-кратным увеличением концентраций ММ в крови, ММ бактериального плазмалогена и эндотоксина. Обратная корреляционная связь суммарной концентрации ММ и структуры микробного сообщества разрывается. Структура микробного сообщества при РС изменяется и характеризуется ростом *Actinobacteria*, протеолитической, анаэробной грамположительной микрофлоры. Трёхкратное увеличение представленности кокков, не имеющих корреляции с другими показателями структурности микробного сообщества указывает на развитие дисбиоза, то есть неуправляемого роста просветной микрофлоры при снижении колонизационной резистентности эндогенной микрофлоры, что подтверждается снижением корреляции «индикаторного» фило типа *Bacteroidetes*.

Можно заключить, что РС может быть связан с патологическими изменениями структуры микробиома и ростом эндотоксемии, что может являться одним из факторов патогенеза заболевания. Предложены новые лабораторные маркёры для диагностики и прогнозирования течения РС.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 11, 12 см. REFERENCES)

6. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М.: Медицина; 1978.
7. Миронов А. Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркёры патогенов. М.: Тираж; 2013. ISBN 978-5-905463-13-6.
8. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Бойко Н.Б. Количественный *in situ* анализ микробиоты кишечной стенки и фекалий методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004; 9: 67-8.
9. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012; 8(4): 42-54.
10. Самойлова М.В., Косырева Т.Ф., Анурова А.Е., Абрамович Р.А., Миронов А.Ю., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Ворopaева Е.А. Оценка микробиоценоза полости рта на основе ГХ-МС-определения плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(3): 186-92.

13. Боровиков В.П., Боровиков И.П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Филин; 1998.

REFERENCES

1. Beer S., Khan F., Kesselring J. Rehabilitation interventions in multiple sclerosis: an overview. *J. Neurol.* 2012 Sep; 259(9):1994-2008. DOI: 10.1007/s00415-012-6577-4.
2. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 May; 18(5):459-80. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
3. Osipov G.A., Verkhovtseva N.V. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. *Benef. Microbes.* 2011 Mar; 2(1):63-78. DOI: 10.3920/BM2010.0017.
4. Yang Y., Misra B.B., Liang L., Bi D., Weng W., Wu W. et al. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer. *Theranostics.* 2019 May 31; 9(14):4101-14. DOI: 10.7150/thno.35186.
5. Ktsoyan Z.A., Beloborodova N.V., Sedrakyan A.M., Osipov G.A., Khachatryan Z.A., Kelly D. et al. Profiles of Microbial Fatty Acids in the Human Metabolome are Disease-Specific. *Front. Microbiol.* 2011 Jan 20;1:148. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00148. eCollection 2010.
6. Mitraka B.M. Application of Gas Chromatography in Microbiology and Medicine. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
7. Mironov A. Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. Moscow: Tirazh; 2013. ISBN 978-5-905463-13-6. (in Russian)
8. Osipov G.A., Parfenov A.I., Verkhovtseva N.V., Ruchkina I.N., Boyko N.B. Quantitative *in situ* analysis of the microbiota of the intestinal wall and feces by Gas Chromatography – mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2004; (9). 67-8. (in Russian)
9. Beloborodova N.V. Integration of human metabolism and its microbiome in critical conditions. *Obshchaya reanimatologiya*. 2012; 8(4): 42-54. (in Russian)
10. Samoylova M.V., Kosyreva T.F., Anurova A.E., Abramovich R.A., Mironov A. Yu., Zhilenkova O.G. et al. Evaluation of microbiocenosis of the oral cavity based on GC-MS determination of plasmalogen and bacterial endotoxin in the oral fluid. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(3): 186-92. (in Russian)
11. Borovikov V.P., Borovikov I.P. Statistica. Statisticheskii analiz i obrabotka dannykh v srede Windows (Statistica. Statistical Analysis and Data Processing in the Windows Environment), Moscow: Filin; 1998. (in Russian)
12. Moreno B., Jukes J.P., Vergara-Irigaray N., Errea O., Villoslada P., Perry V.H., Newman T.A.. Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation. *Ann. Neurol.* 2011 Dec; 70(6):932-42. DOI:10.1002/ana.22550.
13. Miyake S., Kim S., Suda W., Oshima K., Nakamura M., Matsuoka T. et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS One.* 2015 Sep 14; 10(9): e0137429. DOI:10.1371/journal.pone.0137429.

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Арзуманян В.Г.¹, Заборова В.А.², Ильина И.В.³, Миронов А.Ю.^{5,6}, Лепетинский И.С.⁴, Васильева Г.В.¹

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОБИОТЫ СТОП МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;

²Кафедра спортивной медицины и медицинской реабилитации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), 119048, Москва, Россия;

³Кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «МГУП», 125080, Москва, Россия;

⁴ФГБУ «Морская Спасательная Служба», 125993, Москва, Россия;

⁵ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁶Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Несмотря на обилие исследований в области микозов стоп (tinea pedis), всегда открытым является вопрос о степени распространённости дерматофитных грибов в современной человеческой популяции, о наличии взаимосвязи между их встречаемостью и возрастом носителя. Группа обследованных включала 99 добровольцев от 14 до 73 лет. Чешуйки кожи собирали с пяточной области стопы, степень неблагоприятия данного локуса выражали в баллах от 0 до 3. В отличие от обычного лабораторного микроскопа с увеличением $\times 900$ использован $\times 1750$, что позволило оценить не только грибы, но и бактерии. Среднее обилие морфотипов микробов выражали в баллах. Установлено, что степень неблагоприятия локуса увеличивалась с возрастом (коэффициент Пирсона $r=0.954$). Палочковидные формы бактерий присутствовали у всех обследованных, но их обилие с возрастом увеличивалось (0,821). Кокки более характерны и обильно встречались в образцах кожных чешуек от молодых людей (-0,620). Встречаемость дерматофитных грибов увеличивалась с возрастом (0,891), при этом относительно высокие величины имели место у молодых людей (10.5% имели мицелиальные формы, 73.7% – споровые) и в группе без каких-либо симптомов неблагоприятия (7.7% и 76.9%), что позволяет рассматривать эти грибы в качестве нормальной микробиоты кожи стоп.

Ключевые слова: микробиом кожи стопы; микроскопия; дерматофиты.

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Заборова В.А., Ильина И.В., Миронов А.Ю., Лепетинский И.С., Васильева Г.В. Клиническая лабораторная диагностика возрастных изменений микробиоты стоп методом микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 607-612. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-607-612>

Для корреспонденции: Арзуманян Вера Георгиевна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. физиологии грибов и бактерий: e-mail: veraag@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова», при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физиологии грибов и бактерий НИИВС им. И.И. Мечникова Артемьевой Т. А. и Бутовченко Л. М. за помощь при проведении исследований

Поступила 10.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Arzumanyan V.G.¹, Zaborova V.A.², Il'ina I.V.³, Mironov A.Yu.^{5,6}, Lepetinsky I.S.⁴, Vasilyeva G.V.¹

AGE CHANGES OF FOOT MICROBIOME ESTIMATED BY MICROSCOPY METHOD

¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Moscow, Russia;

³Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia;

⁴Federal State Budgetary Institution «Marine Rescue Service» (MRS), Moscow, Russia;

⁵G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiologyµbiology, Moscow, Russia;

⁶Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

Despite of great number of investigations in the area of tinea pedis, question is opened: to what extent dermatophyte fungi are spread among modern population and does their occurrence interrelated with host age? Investigated group included 99 volunteers from 14 to 73 years old. Skin scales were collected from heel area of foot, and signs of heel skin trouble were expressed in points. In contrast to usual laboratory microscope magnification $\times 900$ we worked at $\times 1750$, what allowed to estimate not only fungal,

but bacterial forms too. Average abundances of microbial morphotypes were expressed in points. Heel skin trouble increased in the process of aging (Pirson's coefficient $r=0.954$). Bacilli occurred in all persons independently from age, but their abundance increased with aging (0.821). On the contrary cocci were more common and abundant in young person's feet (-0.620). Occurrence of dermatophytes increased with age (0.891), at that relatively high values took place in young persons (10.5% with mycelium and 73.7% with spores) and in group without any heel skin trouble symptoms (7.7% and 76.9%), what allow to refer these fungi to normal habitats of foot skin.

Key words: foot skin microbiome; microscopy; dermatophyte.

For citation: Arzumanyan V.G., Zaborova M.A., Il'ina I.V., Mironov A.Yu., Lepetinsky I.S., Vasilieva G.V. Age changes of foot microbiome estimated by microscopy method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 607-612 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-607-612>

For correspondence: Arzumanyan V.G., Sc.D., professor, head of laboratory of fungal and bacterial physiology; e-mail: veraar@mail.ru

Information about authors:

Arzumanyan V.G., <https://orcid.org/0000-0001-9769-1634>;
Zaborova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-5044-1152>;
Il'ina I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2548-0891>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Lepetinsky I.S., <https://orcid.org/0000-0002-0002-1720>;
Vasilieva G.V., <https://orcid.org/0000-0002-8350-6896>.

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

Funding. The study was carried out on the scientific equipment of the Collective Usage Center «I. I. Mechnikov NIVS», Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Science of Russia, Agreement No. 075-11-2021-676 dated 28.07.2021.

Acknowledgement. Authors express their thanks to Tamara Artemieva and Liubov Butovchenko for technical support and permanent care.

Received 10.07.2022
Accepted 28.07.2022
Published 14.10.2022

Введение. Микробиота стоп человека в норме описана давно и довольно подробно [1-6, 19], причём как бактерии – кокки и палочки, так и грибы – дрожжи и дерматофиты. Микробиоту стоп делят на нормальную и сопутствующую инфекционному процессу, однако, основываясь на экспериментальных данных, указывают, что «дерматофиты могут являться членами «остаточной» микрофлоры стопы, действуя в качестве резервуара инфекции в случае изменения условий со стороны носителя или внешней среды» [1]. Указаны пределы носительства – от 3-9% обследованных здоровых взрослых людей выделены культуры этих микроорганизмов. Другие авторы более категоричны в характеристике дерматофитов: «дерматофиты представляют собой группу патогенных грибов, вызывающих в основном поверхностные заболевания человека и других млекопитающих» [7, 19]. В отечественных исследованиях отмечено, что свыше 20% всего населения может являться носителями дерматофитных грибов, причём этот показатель неуклонно растёт [8, 19]. Остается открытым вопрос, насколько распространены дерматофиты в современной популяции в целом и связано ли их наличие с возрастом носителя? Цель исследования – оценка возрастных изменений состава грибной микробиоты кожи стопы с помощью метода микроскопии в сравнении со степенью неблагополучия данного локуса.

Материал и методы. В исследование включены 99 добровольцев (45 женщин и 54 мужчины) в возрасте от 14 до 73 лет, не обращавшихся к дерматологу по поводу микозов стоп и не имевших каких-либо жалоб, не принимавших участия в систематических занятиях спортом.

Исследован материал кожных чешуй с пяточной области стопы. Внешние признаки неблагополучия данного локуса выражали в баллах в соответствии со следующей шкалой: 0 – чистая, гладкая пятка; 1 – чистая, но с белым налётом или небольшим шелушением; 2 – с налётом, шелушением и утолщением; 3 – с налётом, шелушением, утолщением, трещинами.

Сбор кожных чешуй с пяточной области кожи стопы производили путём соскоба. Полученный материал (20 мг) помещали в пробирку Эппендорф и заливали 50 мкл 17% раствором едкого калия (КОН) с диметилсульфоксидом, после чего оставляли на ночь при комнатной температуре [9]. Полученный препарат микроскопировали при суммарном увеличении в 1750 раз (рис. 1). Обилие обнаруженных морфотипов грибов и бактерий в 10 полях зрения выражали в баллах: 0 – означало отсутствие; 1 балл – наличие в среднем 1-2 клеток в поле зрения; 2 балла – от 3 до 5; 3 балла – 6 и выше.

Для статистической обработки данных всю выборку добровольцев разделяли на 6 групп в соответствии с возрастом: 14-19 лет, 20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, старше 60 лет (см. таблицу); либо на 4 группы в соответствии со степенью неблагополучия локуса. Расчёт коэффициентов корреляции Пирсона (r) проводили с помощью программы Microsoft Excell. Расчёт коэффициентов Манна-Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [10].

Результаты. Первой задачей исследования являлась оценка наличия взаимосвязи между возрастом добровольцев и степенью неблагополучия кожи стоп

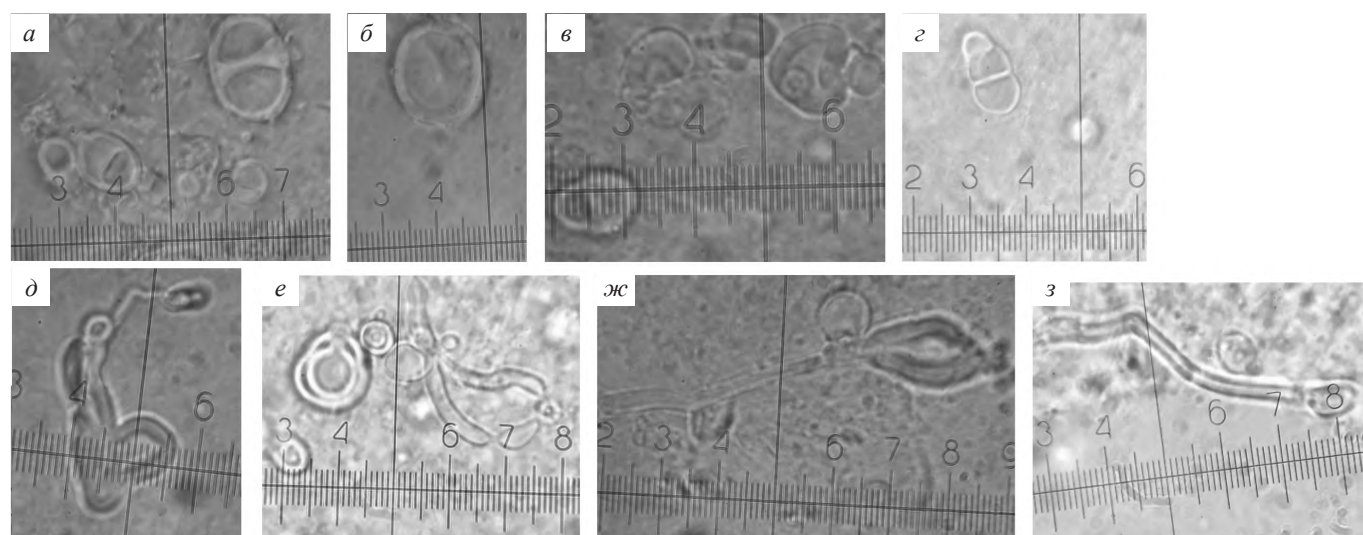


Рис. 1. Морфотипы дерматофитных грибов в чешуйках кожи стоп.

а–г – споры дерматофитов; д–з – дерматофитный мицелий. Суммарное увеличение микроскопа $\times 1750$. Одно деление на шкале соответствует 1 мкм.

Взаимосвязь между возрастом добровольцев, степенью неблагополучия кожи стоп и обсемененностью различными морфотипами микроорганизмов

Возрастная группа, годы	Средний возраст в группе, $M \pm m$, лет	Число обследованных	Степень неблагополучия локуса, баллы, $M \pm m$	Обилие микроорганизмов, баллы, $M \pm m$					
				Бактерии (формы)		Дрожжевые грибы		Дерматофитные грибы	
				кокки	палочки	мицелий	споры	мицелий	споры
14-19	18,3 $\pm$ 0,9	19	1,2 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 1,1
20-29	22,9 $\pm$ 2,7	24	1,2 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 1,2
30-39	33,2 $\pm$ 1,8	14	1,4 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,7
40-49	44,0 $\pm$ 2,4	18	1,9 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 1,1	0,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,9
50-59	54,1 $\pm$ 2,2	14	1,9 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 1,1
> 60	62,9 $\pm$ 2,5	10	2,4 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,8
Корреляция показателя с возрастом	-	-	0,954	-0,620	0,821	0,519	0,309	0,635	0,891
Корреляция показателя со степенью неблагополучия локуса	0,954	-	-	-0,560	0,768	0,519	0,415	0,476	0,843
Достоверность различий между младшей и старшей возрастными группами по критерию Манна-Уитни			$p \leq 0,01$	$p \geq 0,05$	$0,01 \leq p \leq 0,05$	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$

(см. таблицу). Судя по наличию положительной корреляции высокой силы и наличием достоверных различий между младшей и старшей возрастными группами по критерию Манна-Уитни, эти показатели действительно взаимосвязаны, т. е., чем старше человек, тем более вероятны такие изменения кожи стопы, как налёт, шелушение, трещины.

Палочковидные бактерии, по размерам и форме близкие к пропионовым, встречались в 100% случаев во всех возрастных группах, тогда как встречаемость кокков варьировала в пределах от 50% до 84,2%, при-

чём в обратной корреляции по отношению к возрасту ($r = -0,793$). Встречаемость дрожжевого мицелия находилась в пределах от 0% до 14,3%, корреляции с возрастом не отмечено ($r = 0,510$). Встречаемость спор дрожжей варьировала от 37,5% до 50% при невысокой положительной корреляции с возрастом ($r = 0,662$) и незначимой разнице между первой и последней возрастными группами по обсеменённости ($p \geq 0,05$).

Сравнение возраста добровольцев с обсеменённостью пяток разными морфотипами микроорганизмов показало следующее (см. таблицу): положительная

корреляция высокой силы имела место между возрастом и обилием палочковидных бактерий, спор и мицелия дерматофитов. Значимых достоверных различий между младшей и старшей возрастными группами по критерию Манна-Уитни между указанными показателями не отмечено ($p \geq 0,05$). Сопоставление частоты встречаемости дерматофитных спор/мицелия с возрастом добровольцев показало наличие положительной корреляции высокой силы (рис. 2): r составили 0,819 и 0,749 соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что частота встречаемости дерматофитного мицелия в самой младшей возрастной группе составила 10,5%, спор дерматофитов – 73,7%. Различия между частотой встречаемости спор и частотой встречаемости мицелия достоверны как среди мужчин, так и среди женщин – $p < 0,01$.

Сравнение между собой обилия кокков, палочек и грибов показало, что более или менее значимые корреляционные взаимосвязи имеют место лишь между обилием палочек и спор дерматофитов ($r=0,950$), между обилием кокков и спор дерматофитов ($r=-0,538$).

Распределение добровольцев по 4-м группам в соответствии со степенью неблагополучия локуса (рис. 3) показало следующее: частоты встречаемости спор и мицелия дерматофитов коррелируют со степенью неблагополучия локуса – r составили 0,924 и 0,938 соответственно, между собой ($r=0,771$). Достоверность различий в обилии спор дерматофитов между группами с 0 и 3 степенью неблагополучия находится в зоне неопределённости ($0,01 \leq p \leq 0,05$), мицелия – в зоне незначимости ($p \geq 0,05$). Группа с 0 степенью включала людей в возрасте от 14 до 56 лет, причём обращает на себя внимание высокая частота встречаемости спор и мицелия дерматофитных грибов (см. рис. 3).

Гендерные различия в степени неблагополучия локуса, частоте встречаемости спор/мицелия дерматофитов в разных возрастных группах, оцененные по критерию Манна-Уитни, достоверно не значимы – во всех указанных группах сравнения $p \geq 0,05$.

Обсуждение. Многие виды микроорганизмов, в норме колонизирующие различные локусы организма человека, по мере снижения местного иммунитета могут действовать как условные патогены.

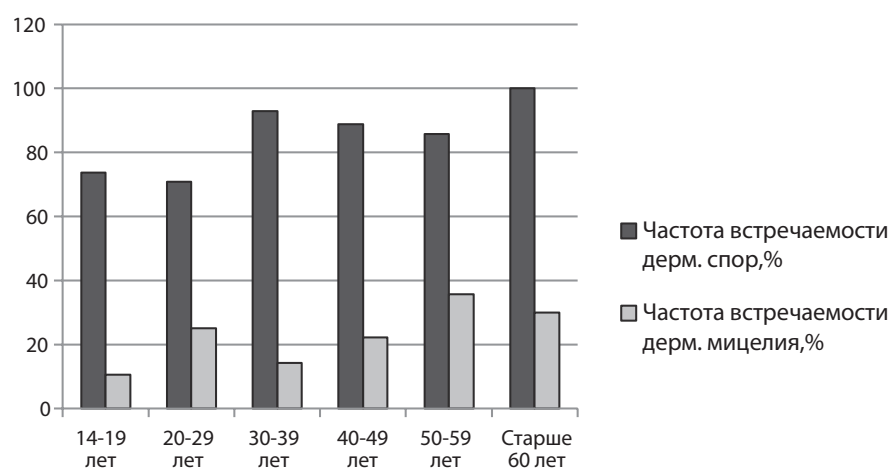


Рис. 2. Сравнение частоты встречаемости дерматофитных спор и мицелия в разных возрастных группах.

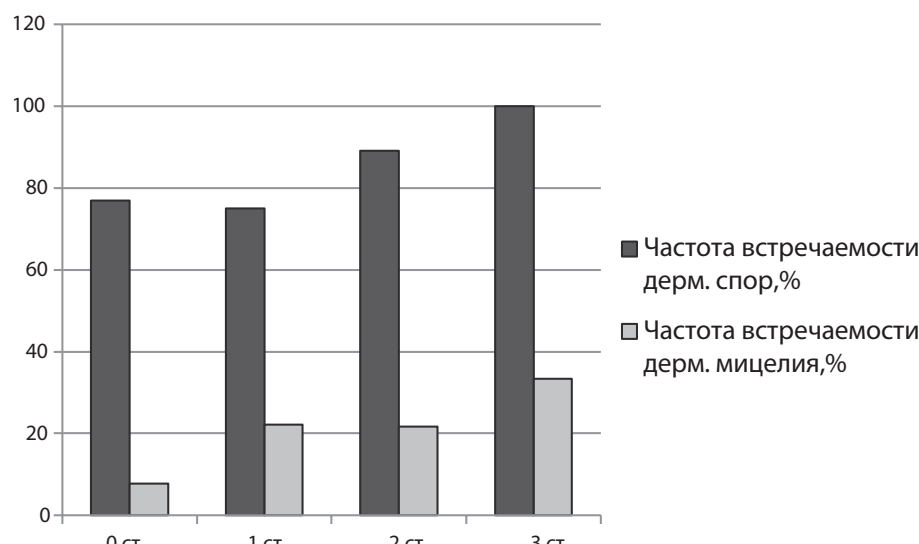


Рис. 3. Частота встречаемости дерматофитных спор и мицелия при разной степени неблагополучия локуса.

Примером могут служить дрожжи *Malassezia* spp. и бактерии *Propionibacterium* spp., которые являются нормальным компонентом микробиоты кожи и выделяют антагонистические противомикробные субстанции [11, 12], однако, при снижении защитных функций кожи они участвуют в таких патологических процессах, как акне, фолликулит и др. [2, 13]. Помимо антагонистических веществ микробной природы к факторам защиты неповреждённой кожи относятся собственно эпидермис, антимикробные пептиды, секретируемые кератиноцитами и потовыми железами [14]. Внешнее неблагополучие кожи стопы выражается в виде налёта, шелушения, трещин. Есть мнение, что эксфолиация – один из способов защиты организма от нежелательных микробов путём отмирания и удаления поражённых кожных чешуй. Из полученных данных следует, что с возрастом выраженность симптомов неблагополучия стоп нарастает (см. таблицу), наряду с увеличением обсеменённости палочковидными бактериями и дерматофитами. Обилие и частота детекции кокков по мере взросления снижается, при этом имеет место обратная взаимосвязь между кокками и дерматофитами. Если принять за норму исходные уровни этих показателей (т. е. первую возрастную группу), то вполне вероятно, что причиной повышения обсеменённости палочками и дерматофитами является именно снижение обилия кокков. Причин таких изменений может быть несколько. Во-первых, изменение баланса веществ, которые являлись питательными субстратами для микроорганизмов, например, снижение легкодоступных субстратов типа аминокислот пота, являющихся предпочтительными для кокков. На этом фоне остаются менее доступные соединения, типа липидов, которые предпочитают пропионовые бактерии, или кератина, на котором хорошо растут дерматофитные грибы. Во-вторых, нельзя исключать микробный антагонизм посредством выработки микроорганизмами разных видов антимикробных субстанций. Ранее показан антимикотический эффект пропионовых бактерий в отношении клеток дрожжей *Candida albicans* [12], разных видов дрожжей друг против друга [15]. В-третьих, с возрастом может меняться скорость секреции, концентрация и набор антимикробных пептидов, по-разному ингибирующих рост микроорганизмов разных видов. Установлено, что фракция сывороточных антимикробных пептидов имеет высокую антимикробную активность по отношению к клеткам *Candida albicans*, но относительно низкую против клеток *Trichosporon cutaneum* и *Geotrichum candidum* [16].

Основным критерием дерматофитии считается наличие мицелия, обнаруживаемого при микроскопии образцов биоматериала. По-видимому, это связано с более простым распознаванием мицелиальных форм по сравнению со споровыми [17]. У диморфных грибов споры и мицелий являются лишь различными стадиями размножения [18,19]. Мы определяли обе эти формы, и оказалось, что их встречаемость коррелирует, причём споры обнаруживаются в 3-10 раз чаще, чем мицелий. Частота обнаружения дермато-

фитных форм у молодых людей и лиц с отсутствием симптомов неблагополучия стопы подтверждает возможность отнесения этих микроорганизмов к нормобиоте с оговоркой о состоянии иммунитета носителя [1], но идёт вразрез с определением их как облигатных патогенов [7].

Заключение. Внешнее неблагополучие кожи стопы достоверно увеличивается по мере взросления. Палочковидные бактерии встречаются у всех обследованных независимо от возраста, их обилие с возрастом нарастает. Кокки встречаются чаще и в большей концентрации у относительно молодых людей. Встречаемость и обилие дерматофитных грибов нарастает с возрастом, однако, величины этих показателей у молодых людей и в подгруппе без симптомов неблагополучия позволяют отнести эти микроорганизмы к нормобиоте человека. Гендерные различия в степени неблагополучия локуса, частоте встречаемости спор/мицелия дерматофитов в разных возрастных группах отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-9, 11, 12, 14, 16, 18 см. REFERENCES)

- Нобл У.К. Микробиология кожи человека. М: Медицина; 1986.
- Математические методы обработки данных (он-лайн расчёт) (источник: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>).
- Котрехова Л.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И., Пиотровская И.В., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е. Клинико-лабораторные предикторы и терапия микозов кожи, обусловленных *Malassezia* spp. *Клиническая дерматология и венерология*. 2011; 9(4): 79-83.
- Ожован И.М. Киллерная активность клинически значимых дрожжей *Malassezia* и *Candida albicans*. Дисс. ...канд. биол. наук. М.; 2010.
- Арзуманян В.Г., Ильина И.В., Васильева Г.В., Магаршак О.О., Миронов А.Ю. Новое в клинической лабораторной диагностике дерматофитных грибов у детей с atopическим дерматитом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(6): 351-3.
- Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд., исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.

REFERENCES

- Tachibana D.K. Microbiology of the foot. *Ann. Rev. Microbiol.* 1976; 30:351-75.
- Noble W.C. Microbiology of human skin. Lloyd-Luke (Medical books). Moscow: Meditsina; 1986. (in Russian)
- Maraïs A., Osuch E. Common cutaneous dermatophyte infections of the skin and nails. *South African Family Practice* 2017; 59(3):33-40.
- Sakka N., Shemer A., Barzilai A., Farhi R., Daniel R. Occult tinea pedis in an Israeli population and predisposing factors for the acquisition of the disease. *Int. J. Dermatol.* 2015;54(2):146-9.
- Grice E.A., Segre J.A. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(4):244-53.
- Adamczyk K., Garnarczyk A., Antonczak P., Wcislo-Dziadecka D. The foot microbiome. *J. Cosmetic Dermatol.* 2020; 19(5): 1039-1043.
- White T.C., Findley K., Dawson T.L.Jr., Scheynius A., Boekhout T., Cuomo C.A., et al. Fungi on the Skin: Dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014; 4(8): a019802.

GENERAL CLINICAL METHODS

8. Sergeev A. Current epidemiology of tinea pedis in Russia. *International Journal of Dermatology*. 2017; 56: 1272.
9. Rebell G., Taplin D. Dermatophytes. Their recognition and identification. University of Miami Press; 1971.
10. Mathematical methods of data processing (on-line calculation). Available at: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>. (in Russian)
11. Arzumaniyan V., Sergeev A.Yu., Shelemekh O.V., Ojovan I.M., Serdiuk O.A. Antagonistic activity of *Malassezia* spp. towards other clinically significant yeast genera. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009; 148 (3): 410-5.
12. Arzumaniyan V., Zaborova V., Globa A., Shmeleva O. Communities of Skin Propionic Bacteria: Cultivation and Antifungal Antagonistic Activity. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2016; 7: 266.
13. Kotrekhova L.P., Vasil'eva N.V., Raznatovskii K.I., Piotrovskaya I.V., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E. Clinical and laboratory predictors and therapy of skin mycoses caused by *Malassezia* spp. *Klinicheskaya dermatologia i venerologia*, 2011; 9(4): 79-83. (in Russian)
14. Coates M., Blanchard IS., MacLeod I. A.S. Innate antimicrobial immunity in the skin: A protective barrier against bacteria, viruses, and fungi. *PLOS Pathogens*. 2018; 14(12): e1007353.
15. Ozhovan I.M. Killer activity of clinically important yeasts *Malassezia* and *Candida albicans*. Diss.... Moscow; 2010. (in Russian)
16. Arzumaniyan V., Erofeeva T., Ixanova A., Zhigalkina P., Svitich O. Activity of antimicrobial peptide fractions of human serum and saliva against clinically important yeasts. *Current Topics in Peptide & Protein Research*. 2019; 20: 9-15.
17. Arzumaniyan V.G., Il'ina I.V., Vasileva G.V., Magarshak O.O., Mironov A.Yu. New in clinical laboratory diagnostics of dermatophyte fungi in children with atopic dermatitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(6): 351-3. (in Russian)
18. de Hoog G.S., Guarro J., eds. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
19. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., eds. Medical microbiology, virology and immunology: a textbook for medical students. 3-rd ed., revised. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ольховский И.А.^{1,2}, Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Бахтина В.И.^{3,4}, Михалёв М.А.³, Ольховик Т.И.³,
Судариков А.Б.⁵, Сидорова Ю.С.⁵, Поспелова Т.И.⁶, Колесникова М.А.⁶, Капорская Т.С.⁷, Лыскова В.А.⁷

ИССЛЕДОВАНИЕ МРНК ГЕНОВ *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* И *HMGA2* В ОБРАЗЦАХ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ

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

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

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

⁴ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;

⁶ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, Новосибирск, Россия;

⁷ГБУЗ Иркутская ордена «Знак почета» областная клиническая больница, 664003, Иркутск, Россия

*Известно, что повышенная экспрессия генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* вовлечена в патогенез онкогематологических заболеваний. Высказано предположение, что одновременное количественное определение комплекса мРНК в циркулирующих в крови клетках может отражать специфику патологических пролиферативных процессов, а соотношение экспрессии отдельных мРНК может стать полезным диагностическим маркером. Транскриптомный профиль клеток острого лейкоза как правило оценивается с использованием дорогостоящих технологий NGS и микрочипирования после предварительной процедуры выделения мононуклеаров. Однако до сих пор не публиковались результаты использования мультиплексной реакции ПЦР одновременного определения всех указанных выше мРНК в образцах цельной крови. Цель: определение уровня мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в пробах венозной крови методом мультиплексной ОТ-ПЦР.*

*В работу включено 127 образцов крови пациентов, обследованных при первичном обращении с последующим подтвержденным диагнозом острого лейкоза. В качестве групп сравнения были выбраны 87 проб пациентов не имеющих онкогематологического диагноза, в том числе 31 образец (K1) с нормальной формулой клеток крови и 56 образцов (K2) с нарушением клеточного состава – анемией, лейкоцитозом и тромбоцитопенией. Выделение РНК из проб цельной крови, и обратную транскрипцию выполняли с использованием наборов «Рибо-золь-D» и «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Определение уровня экспрессии мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* методом мультиплексной ПЦР-PB выполняли с использованием разработанного in house метода мультиплексной ПЦР. Уровень мРНК исследуемых генов, характеризовался высокой межиндивидуальной вариацией и не коррелировал с количеством циркулирующих лейкоцитов или бластных клеток крови. Экспрессия мРНК *WT1* определялась в цельной крови только у одного пациента из группы сравнения и в 112 (88%) пробах пациентов с лейкозом и сочеталась со снижением уровня экспрессии мРНК *HMGA2* и высокими значениями мРНК *BAALC*. В отличие от групп сравнения у пациентов с лейкозией наблюдались более высокие уровни мРНК *BAALC* при ОМЛ и ОЛЛ, повышенные значения мРНК *PRAME* при ОМЛ и ОЛЛ, но более низкие уровни *HMGA2* при ОЛЛ. Впервые в мультиплексном формате ПЦР одновременно определены уровни пяти мРНК *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови у пациентов с острыми лейкозами. С учетом наиболее выраженного преобладания вклада одной из мРНК в их суммарном уровне экспрессии, предложено выделять отдельные типы преимущественной экспрессии (ВЕРН-критерий), отличающиеся в разных нозологических вариантах лейкоемии. Полученные данные поддерживают гипотезу патогенетической роли дисбаланса РНК и формировании различных транскриптомных субпопуляций лейкоэмических клеток.*

Ключевые слова: острые лейкозы; мРНК; *WT1*; *BAALC*; *EVII*; *PRAME*; *HMGA2*; мультиплексная ОТ-ПЦР.

Для цитирования: Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Судариков А.Б., Сидорова Ю.С., Поспелова Т.И., Колесникова М.А., Капорская Т.С., Лыскова В.А. Исследование мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 613-620. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-613-620>

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность зав. лаб. Областной детской клинической больницы г. Екатеринбурга, доц. каф. Уральского государственного медицинского университета, д-ру мед. наук Г.А. Цауру за обсуждение и ценные критические замечания.

Поступила 04.05.2022

Принята к печати 12.05.2022

Опубликовано 14.10.2022

Olkhovskiy I.A.^{1,2}, Gorbenko A.S.^{1,2}, Stolyar M.A.^{1,2}, Bakhtina V.I.^{3,4}, Mikhalev M.A.³, Olkhovik T.I.³, Sudarikov A.B.⁵, Sidorova Yu.S.⁵, Pospelova T.I.⁶, Kolesnikova M.A.⁶, Kaporskaya T.S.⁷, Lyskova V.A.⁷

STUDY OF MRNA OF *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* AND *HMGA2* GENES IN WHOLE BLOOD SAMPLES

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

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

³Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵«National Research Center for Hematology» Department of Health, Moscow, Russian Federation;

⁶Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation;

⁷State-financed health care institution, a winner of the "Mark of the Honor" award, Irkutsk regional clinical hospital, Irkutsk, Russian Federation

Simultaneous quantitative measurement of mRNA of the WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes in whole blood samples reflects the specific pathological proliferative activity in acute leukemia and their ratio is promising as a diagnostic marker. The transcriptome profile of acute leukemia cells is usually assessed using NGS or microarray techniques after a preliminary procedure for isolation of mononuclear cells. However, the results of using the multiplex PCR reaction for the simultaneous determination of all above mRNAs in whole blood samples have not been published so far. Determination of mRNA of WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes in venous blood level samples by multiplex RT-PCR.

The study included 127 blood samples from patients who diagnosis of acute leukemia was subsequently confirmed. In the comparison group, 87 samples of patients without oncohematological diagnosis were selected, including 31 samples (K1) with a normal blood formula and 56 samples (K2) with a violation of the cellular composition - anemia, leukocytosis and thrombocytopenia. RNA isolation and reverse transcription were performed using the RiboZol-D and Reverta-L kits (TsNIE, Russia). Determination of the mRNA expression level of the WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes by multiplex real-time PCR using a homemade multiplex PCR kit.

The mRNA level was characterized by high interindividual variation and did not correlate with the rate of circulating leukocytes or blood blasts. Expression of WT1 mRNA was observed in whole blood only in one patient from the control group and in 112 (88%) patients with leukemia and was combined with a decrease in the level of HMGA2 mRNA expression and BAALC mRNA values. In contrast to the control groups, patients with leukemia had higher levels of BAALC mRNA in AML and ALL, increased PRAME mRNA in AML and APL, but lower levels of HMGA2 in APL.

Key words: acute leukemia; mRNA; *WT1*; *BAALC*; *EVII*; *PRAME*; *HMGA2*; multiplex RT-PCR.

For citation: Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Mikhalev M.A., Olkhovik T.I., Sudarikov A.B., Sidorova Yu.S., Pospelova T.I., Kolesnikova M.A., Kaporskaya T.S., Lyskova V.A. Study of mRNA of *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* and *HMGA2* genes in whole blood samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 613-620 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-613-620>

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

Information about authors:

Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>;

Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>;

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>;

Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>;

Mikhalev M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>;

Olkhovik T.I., <https://orcid.org/0000-0002-4526-1920>;

Sudarikov A.B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>;

Sidorova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-1936-0084>;

Pospelova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>;

Kolesnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-3647-692X>;

Kaporskaya T.S., <https://orcid.org/0000-0002-4059-8209>;

Lyskova V.A., <https://orcid.org/0000-0003-2217-2180>.

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

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

Acknowledgment. *The authors are grateful to the Head Laboratory of the Yekaterinburg Regional Children's Clinical Hospital, associate Professor of the Department of the Ural State Medical University, G.A. Tsaur for discussions and valuable critical remarks.*

Received 04.05.2022

Accepted 12.05.2022

Published 14.10.2022

Введение. Результаты последних 30 лет исследований молекулярного патогенеза острого лейкоза выявили высокогетерогенную генетическую природу заболевания, включающую в себя различные хромо-

сомные aberrации, ряд соматических точечных мутаций, выраженные сдвиги экспрессии как матричных, так и некодирующих РНК [1, 2]. Выявление цитогенетических поломок и анализ химерных транскриптов в

лейкозных клетках включены в клинические рекомендации в качестве важных диагностических маркеров [3, 4]. Поскольку цитогенетические нарушения при острых лейкозах выявляются примерно в половине случаев, перспективы дальнейшего поиска новых диагностических маркеров во многом связаны с результатами исследования специфического профиля РНК (транскриптома). Использование транскриптомного анализа позволяет оценить активность различных генов в онкотрансформированных клетках. Вместе с тем, его широкое применение в клинической практике сдерживается низкой доступностью, дороговизной и трудоемкостью использования аналитических платформ на основе микропипирования и секвенирования РНК. Очевидно, что решение этой проблемы может быть реализовано выбором ограниченного числа наиболее информативных РНК-маркеров и внедрением методик для рутинного ПЦР-тестирования.

Уже достаточно давно [1–12] при онкологических, в том числе и онкогематологических заболеваниях исследуется экспрессия таких генов как *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME*, *HMGA2*. Эти гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, активно экспрессируются в CD34+ кроветворных клетках, но уровни их мРНК быстро снижаются в процессе созревания форменных элементов крови. Исследования роли указанных генов в развитии острых лейкозов доказывают, что их избыточная экспрессия способствует прогрессии заболевания, а определение уровня соответствующих мРНК было предложено в качестве прогностических маркеров. Недавно опубликован результат метаанализа [15] данных прогностического значения оценки мРНК трех генов *WT1*, *BAALC* и *EVII*, а также результаты исследования, в котором с помощью ПЦР-РВ в пробах костного мозга оценивалось прогностическое значение экспрессии параллельно двух генов *WT1*, *BAALC* у 14 пациентов с гиперэкспрессией *EVII* в ответе на химиотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток при ОМЛ [9]. Авторы пришли к выводу, что такой «подход представляется перспективным для исследования патогенетических механизмов и может быть весьма важным для клинической практики».

Учитывая наличие дополнительной диагностической значимости экспрессии генов *PRAME* и *HMGA2*, представляется актуальным возможность одновременного выполнения тестирования всех пяти выбранных мРНК-маркеров в образцах цельной крови методом мультиплексной ПЦР.

Цель работы: определение уровня мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в пробах венозной крови методом мультиплексной ПЦР-РВ.

Материал и методы. В исследование включены аликвоты крови из оставшегося объема проб после выполнения рутинного гематологического анализа. В данной работе использовалась лишь ограниченная информация о возрасте, половой принадлежности пациентов и результатах гематологического анализа без учета иных персональных данных, особенностей клинической картины заболевания или результатов других исследований.

Из поступивших в лабораторию 147 образцов крови мультиплексный тест ПЦР-РВ был полностью выполнен для 127 образцов крови пациентов, обследованных при первичном обращении, в том числе, пациентов с последующим подтверждением диагноза: ОМЛ ($n=95$), с ОПЛ ($n=7$), с ОЛЛ ($n=19$), с ОЛ смешанного фенотипа ($n=1$) и 5 пациентов с неуточненным диагнозом острого лейкоза на момент выполнения исследования. В качестве групп сравнения были выбраны пробы пациентов, не имеющих онкогематологического диагноза, в том числе 31 образец (K1) с нормальной формулой клеток крови и 56 образцов (K2) с нарушением клеточного состава – анемией, лейкоцитозом и тромбоцитопенией. Выделение РНК из проб цельной крови, и обратную транскрипцию выполняли с использованием наборов «Рибо-золь-D» и «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Определение уровня экспрессии мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* выполняли с использованием разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ. Использовали следующую программу амплификации: предварительный прогрев при 95°C – 5 мин, далее 50 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 60 с, детекция флуоресцентного сигнала проводилась по каналам FAM, ROX и HEX в ходе ПЦР-РВ. Для нормализации получаемых данных в качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген *ABL1*. Уровень экспрессии исследуемых мРНК выражали в количестве молекул на 10 000 молекул *ABL1*. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программ пакета R. Проверка нормальности распределения количественных признаков с использованием критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерия Шапиро-Уилка показала, что полученные данные не подчиняются закону нормального распределения, поэтому для дальнейшего анализа использовали непараметрические методы статистики. Значимость отличий в несвязанных выборках оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и с помощью критерия Краскелла-Уолисса при сравнении более двух групп, различия оценивали как статистически значимые при $p<0,05$. Корреляционный анализ проводили с использованием метода Спирмена.

Результаты. Уровень мРНК исследуемых генов характеризовался высокой межиндивидуальной вариацией (рис.1, а–д) и их значения не коррелировали с количеством циркулирующих лейкоцитов или бластных клеток крови. В отличие от групп сравнения у пациентов с лейкемией наблюдались более высокие уровни мРНК *BAALC* при ОМЛ и ОЛЛ, повышенные значения мРНК *PRAME* при ОМЛ и ОПЛ, но более низкие уровни *HMGA2* при ОПЛ.

Медиана значений экспрессии мРНК *EVII* была более высокой в выборке пациентов с нарушенной формулой крови в сравнении с выборкой здоровых доноров. Экспрессия мРНК *WT1* определялась в цельной крови только у одного пациента из группы сравнения и в 112 (88%) пробах первичных пациентов. Пробы крови с повышенной экспрессией *WT1* преимущественно принадлежали пациентам с ОМЛ

и сочетались со статистически значимым снижением уровня экспрессии мРНК *HMG2* и более высокими значениями мРНК *BAALC* (см. таблицу).

В ряде проб крови у пациентов с лейкозами обнаружено выраженное преобладание уровня одной из исследуемых нами мРНК. Учитывая высокую степень вариации абсолютных значений экспрессии мРНК для дальнейшего анализа мы разделили всю выборку образцов в зависимости от вклада каждой из

мРНК в их суммарный уровень, обозначая эти группы по первой букве названия соответствующего гена типа Н-тип экспрессии (мРНК *HMG2* вклад >30%), Е- (мРНК *EVII* >30%), Р- (мРНК *PRAME* >30%) и В- тип (мРНК *BAALC* >90%). Особенность выбора такого уровня вклада *BAALC* была обусловлена значительно более частой встречаемостью высоких значений вклада мРНК этого гена по сравнению с другими и поэтому была принята величина больше,

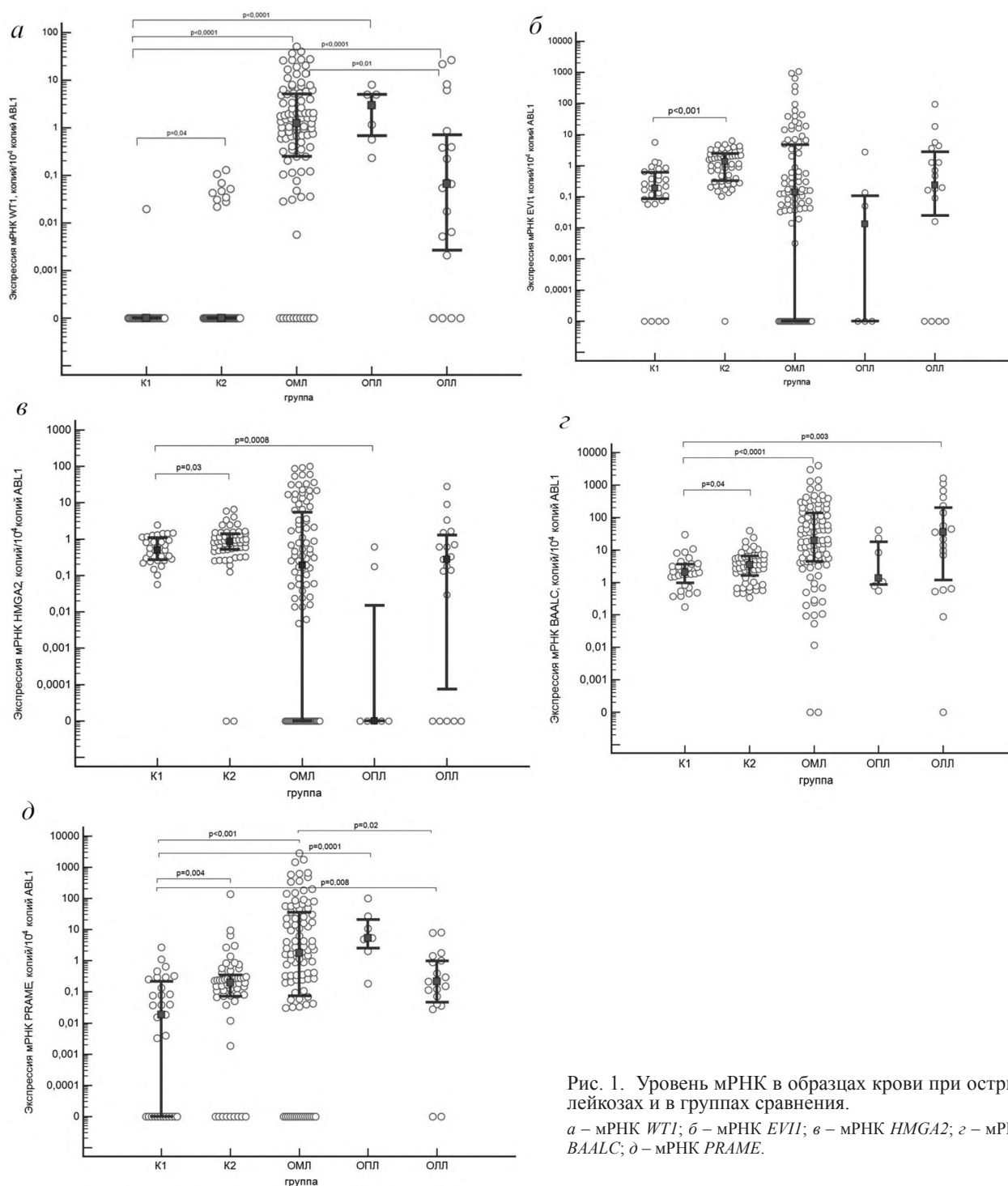


Рис. 1. Уровень мРНК в образцах крови при острых лейкозах и в группах сравнения.

а – мРНК *WT1*; б – мРНК *EVII*; в – мРНК *HMG2*; з – мРНК *BAALC*; д – мРНК *PRAME*.

Сравнение уровня мРНК и бластных клеток в зависимости от сопутствующей экспрессии мРНК WT1, Me (C₂₅-C₇₅)

Показатели	WT1<0,01	WT1>0,01	P-уровень
Всего	16	111	
Из них с ОЛЛ	4	14	-
WT1	0	1,51 (0,39-5,36)	
HMGA2	0,45 (0-2,95)	0,17 (0-3,39)	0,04
PRAME	0,37 (0,06-5,22)	1,63 (0,07-26,3)	н.д.
EVII	0,16 (0-4,75)	0,15 (0,003-3,6)	н.д.
BAALC	6,53 (0,34-16,77)	31,17 (4,36-186,7)	0,01
Бласты в крови	39,0 (14,0-88,7)	56,0 (18,0-85,0)	н.д.
Бласты в костном мозге	79,0 (30,0-84,5)	77,3 (54,0-87,0)	н.д.

Примечание. н.д. – нет статистически значимых отличий.

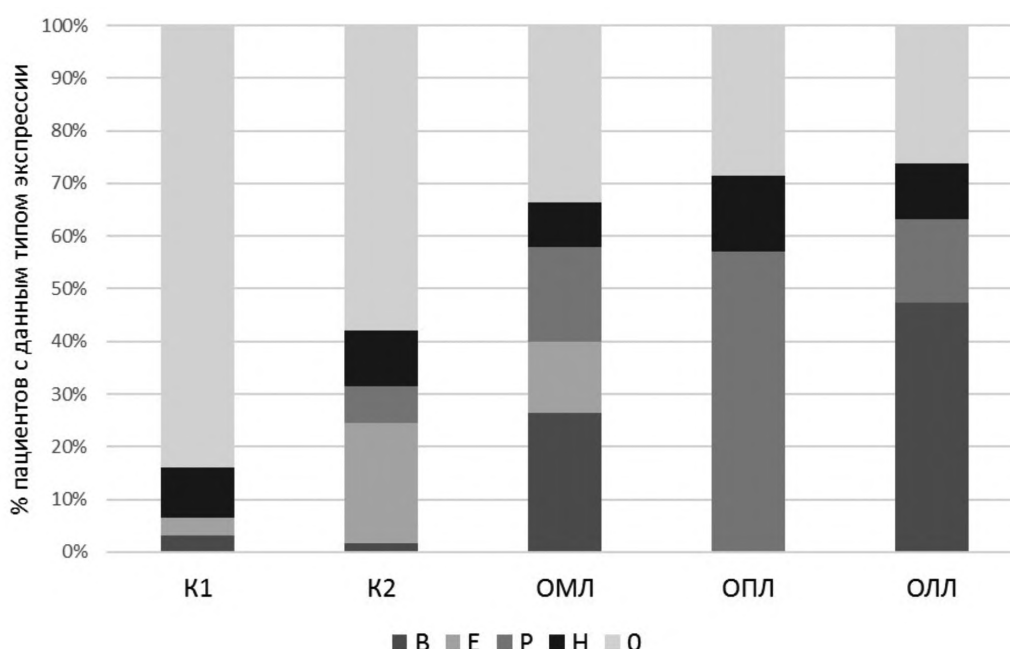


Рис. 2. «ВЕРН-типы» экспрессии в контроле и при острых лейкозах: В-В-тип экспрессии, Е-Е-тип экспрессии, Р-Р-тип экспрессии, Н-Н-тип экспрессии, О-без преимущественного типа экспрессии.

чем Me+C₇₅. Результаты распределения обозначенных выше типов экспрессии среди пациентов с разными вариантами острого лейкоза представлены на рис. 2.

Преимущественный В-тип определяется у единичных пациентов из контрольных групп группы, но при этом был выражен у 24% пациентов с ОМЛ и у 47% при ОЛЛ.

Е-тип экспрессии обнаруживался у 7 пациентов группы сравнения K2 (12%), и только у одного из группы K1 (3%), а также выявлялся в сочетании с WT1 у 15% у пациентов с ОМЛ, но не при ОПЛ или ОЛЛ. Пробы с Е-пиком характеризовались максимально высокими значениями мРНК WT1 и HMGA2.

Р-тип экспрессии наблюдался всего в 3 (5%) образцах крови пациентов из группы сравнения K2, но у 25% пациентов с ОМЛ и у 15% пациентов с ОЛЛ, а

также у большинства (58%) пациентов с ОПЛ. В пробах с Р-типом экспрессии наблюдались близкие к нулю значения экспрессии мРНК HMGA2 и сниженные уровни мРНК BAALC.

Преобладающий Н-тип определялся примерно одинаково (7–12%) среди пациентов контрольных групп и пациентов с первичным ОЛ. Примеры индивидуальных особенностей соотношения уровней исследуемых мРНК представлены на рис. 3, а–г.

Обсуждение. Трудоемкость и длительность выполнения цитогенетического анализа, дороговизна и низкая доступность метода FISH являются побуждающим стимулом поиска маркеров, определяемых распространенными в клинко-диагностических лабораториях методами ПЦР. С этой целью проводят анализ выявления и количественной оценки уровня

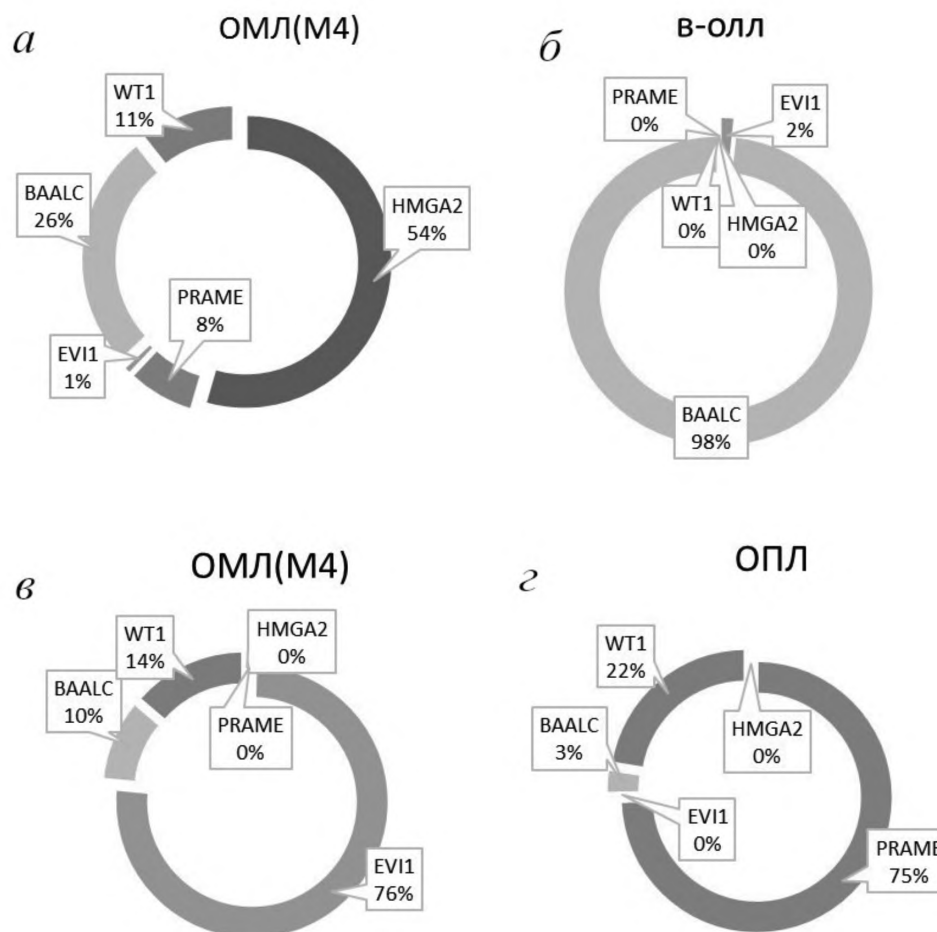


Рис. 3. Примеры индивидуальных соотношений уровня мРНК: а – Н-тип у пациента с ОМЛ (М4); б – В-тип у пациента с В-ОЛЛ; в – Е-тип у пациента с ОМЛ (М4); г – Р-тип у пациента с ОПЛ.

специфических химерных транскриптов, однако низкая их выявляемость при острых лейкозах ограничивает целесообразность использования данных тестов на первом этапе диагностики лейкоза. Поэтому более часто встречающиеся, но менее специфические маркеры экспрессии отдельных онкогенов, могут заполнить диагностическую нишу ПЦР-тестов, особенно для случаев заболевания с нормальным кариотипом лейкозных клеток. Неоднократно описано прогностическое значение при острых лейкозах мРНК *WT1* [5, 7, 9, 15], *BAALC* [6, 9, 10, 15], *EVI1* [6, 9, 10, 15], *PRAME* [11] и *HMGA2* [12, 14]. При этом показано, что гиперэкспрессия только одного гена *WT1* не подходит для использования в качестве прогностического маркера, поскольку его высокая экспрессия может оказывать и положительное влияние на выживание, когда исключены влияния неблагоприятных мутаций и других маркеров экспрессии генов [15].

При первичном тестировании гиперэкспрессия генов *BAALC* либо *EVI1* выявляет пациентов с низкой частотой полной ремиссии и более короткой выживаемостью [15–17], а уровни экспрессии *BAALC* связаны с мутационным статусом *FLT3-ITD*, *NPM1*, *KMT2A-PTD* и *CEBPA* [18]. Известно, что высокая экспрессия

EVI1 при ОМЛ с цитогенетическими аномалиями хромосомы 3q, моносомией хромосомы 7 и aberrациями хромосомы 11q23 [19, 20], коррелирует с неблагоприятным исходом. При использовании маркера мРНК *HMGA2* недавно продемонстрирована возможность в 18% (~7% всех обследованных пациентов с ОМЛ) переквалификации степени риска ОМЛ, определенного по критериям ELN [16]. Авторы пришли к выводу, что гиперэкспрессия *HMGA2* объединяет отрицательное прогностическое значение, обусловленное комплексным кариотипом и несколькими мутациями с низким риском, что может упростить прогностическую оценку положительных случаев. Таким образом, анализ экспрессии этих генов является дополнительным информативным критерием прогноза.

Вместе с тем, отсутствие доступных коммерческих наборов реактивов, стандартов и контрольных материалов ограничивают внедрение данных тестов в клиническую практику.

В настоящей работе была впервые осуществлена попытка одновременного определения комплекса мРНК из пяти генов методом мультиплексной ПЦР-РВ в цельной крови. Действительно, отдельно каждый из этих маркеров нельзя признать высоко-

специфичным, так как экспрессию указанных мРНК можно наблюдать в клетках крови не только при онкогематологических заболеваниях. Очевидно, источником мРНК в данном случае могут быть незрелые клеточные элементы, сохраняющие РНК ретикулоциты, ранние гранулоциты, а также пролиферирующие лимфоцитарные клетки. Определенный вклад, вероятно, могут вносить также агрегированные с лейкоцитами тромбоциты и микровезикулы. Очевидно, этим и объясняется отсутствие в наших данных корреляции уровней мРНК и бластных клеток.

Полученные результаты подтверждают уже описанные факты обратной зависимости между экспрессией *WT1* и *HMGA*, связанной со способностью *WT1* увеличивать экспрессию микроРНК let-7, которая и уменьшает уровень мРНК *HMGA2* [17]. Вовлечением данной микроРНК также можно объяснить более высокий уровень экспрессии *WT1* и близкие к нулю уровни экспрессии *HMGA2*, поскольку PML-RAR α -позитивные бласты от пациентов с ОПЛ демонстрируют более низкие уровни let-7с, чем в обычных промиелоцитах [18].

Однако выявленная в наших исследованиях ассоциация Е-типа с высоким уровнем мРНК *HMGA2* и выраженный антагонизм экспрессии гена *PRAME* с всеми другими исследуемыми генами пока не находят однозначного объяснения.

Использованный нами подход, основанный на анализе относительного вклада отдельных мРНК в значения их суммарной активности, ранее не применялся, хотя он позволяет с меньшей погрешностью оценить соотношение активности разных генов по сравнению с оценкой соотношений широко варьируемых абсолютных значений. Важно отметить, что выделенные нами типы экспрессии мРНК лишь частично ассоциированы с тем или иным морфологическим вариантом острого лейкоза (см. рис. 2). Предполагается, что особенности соотношений активности выбранных нами генов в клетках могут свидетельствовать о формировании онкогенного характера регуляции их метаболизма, определяющего высокий риск злокачественной трансформации. При этом субпопуляции клональных клеток с отдельными вариантами транскриптомного профиля, очевидно, формируют определенные метаболические особенности лейкоэмических клеток в разной степени способствующие дальнейшей опухолевой эволюции. С данной точки зрения, выявление «ВЕРН-типов» экспрессии может оказаться полезным в качестве дополнительных прогностических маркеров лейкоза, а также потенциальных терапевтических мишеней.

Ограничения данного исследования связаны с его анонимным (слепым) характером и недостаточной информацией для анализа связей экспрессии исследованных мРНК с результатами морфологических, иммунофенотипических и цитогенетических исследований, а также данными об особенностях течения заболевания и эффективности используемой терапии. Также небольшой объем выборки не позволил оценить особенности экспрессии ком-

плекса выбранных мРНК в привязке к более узким нозологическим вариантам заболевания. Вместе с тем, результаты данного пилотного исследования позволили продемонстрировать перспективность дальнейшего изучения транскриптомного профиля и возможность использования разработанных нами диагностических наборов. Возражениям, которые могут относиться к адекватности выбора для анализа образцов цельной крови, а не моноцитарной фракции или изолированных лейкозных клеток как объекта исследования, на наш взгляд, можно противопоставить следующее: во-первых, заведомую неоднозначность вывода, что суммарные значения экспрессии, получаемые от всех РНК-позитивных клеток, имеют меньшую диагностическую эффективность; во-вторых, предложенный способ, безусловно, упрощает выполнение преаналитического этапа и последующее внедрение данного теста в практику клинических лабораторий.

Заключение. Впервые в мультиплексном формате ПЦР одновременно определены уровни пяти мРНК *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови у пациентов с острыми лейкозами. Выявленные типы преимущественной экспрессии отдельных мРНК (ВЕРН-критерий) представлены в различных соотношениях при разных нозологических вариантах лейкоэмии. Это поддерживает гипотезу первичной патогенетической роли дисбаланса РНК, формирующего отдельные транскриптомные субпопуляции лейкоэмических клеток.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5–6, 9–10, 12–23 см. REFERENCES)

1. Зуховицкая Е.В., Фиясь А.Т. Молекулярные механизмы лейкозогенеза и проблемы терапии острых лейкозов: монография. Гродно: Гродненский государственный медицинский университет; 2015.
2. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Гаврилина О.А., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых (редакция 2018 г.) [электронный документ]. Доступно по: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83bpdf. Ссылка активна на 30.03.2022.
3. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Грицаев С.В., Семочкин С.В., Бондаренко С.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых (редакция 2018 г.) [электронный документ]. Доступно по: https://npngo.ru/uploads/media_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf. Ссылка активна на 30.03.2022.
4. Мамаев Н.Н., Гудожникова Я.В., Горбунова А.В. Гиперэкспрессия гена *WT1* при злокачественных опухолях системы крови: теоретические и клинические аспекты (обзор литературы). *Клиническая онкогематология*. 2016; 9(3):257–64. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264.
5. Мамаев Н.Н., Шакирова А.И., Морозова Е.В., Гиндина Т.Л. *EVII*-позитивные лейкозы и миелодиспластические синдромы: теоретические и клинические аспекты (обзор литературы). *Клиническая онкогематология*. 2021; 14(1):103–17. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-103-117.
6. Мисюрин В.А. Клиническое значение экспрессии гена *PRAME* при онкогематологических заболеваниях. *Клиническая онкогематология*. 2018; 11(1):26–33. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-26-33.

REFERENCES

1. Zukhovitskaya E.V., Fiyas A.T. Molecular mechanisms of leukemia and problems in the treatment of acute leukemia: monograph. Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2015. (in Russian)
2. Handschuh L. Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies. *J. Oncol.* 2019; 2019:7239206. DOI: 10.1155/2019/7239206.
3. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasyev B.V., Troitskaya V.V., Gavrilina O.A., Sokolov A.N. et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemias in adults. [Internet]. Available from: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf. (accessed 30.03.2022). (in Russian)
4. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasyev B.V., Gritsaev S.V., Semochkin S.V., Bondarenko S.N. et al. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. 2018. [Internet]. Available from: https://npngo.ru/uploads/media_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf. (accessed 30.03.2022). (in Russian)
5. Cilloni D., Renneville A., Hermitte F., Hills R.K., Daly S., Jovanovic J.V. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(31):5195-201. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4865.
6. Thol F., Yun H., Sonntag A.K., Damm F., Weissinger E.M., Krauter J., et al. Prognostic significance of combined MN1, ERG, BAALC, and EVI1 (MEBE) expression in patients with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2012; 91(8):1221-33. DOI: 10.1007/s00277-012-1457-7.
7. Mamaev N.N., Gudozhnikova Ya.V., Gorbunova A.V. WT1 Gene Overexpression in Oncohematological Disorders: Theoretical and Clinical Aspects (Literature review). *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2016; 9(3):257-64. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264. (in Russian)
8. Mamaev N.N., Shakirova A.I., Morozova E.V., Gindina T.L. EVI1-Positive Leukemias and Myelodysplastic Syndromes: Theoretical and Clinical Aspects (Literature review). *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2021; 14(1):103-17. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-103-117. (in Russian)
9. Mamaev N., Shakirova A., Barkhatov I., Kanunnikov M., Gindina T., Rakhmanova Z., et al. Evaluation of BAALC- and WT1-expressing leukemic cell precursors in pediatric and adult patients with EVI1-positive AML by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). *Cellular Therapy and Transplantation. Foundation for the Development of Bone Marrow Transplantation.* 2021; 10(2):54-9. DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-2-54-59.
10. Azizi Z., Rahgozar S., Moafi A., Dabaghi M., Nadimi M. mRNA overexpression of BAALC: A novel prognostic factor for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Biomed. Rep.* 2015; 3(3):371-4. DOI: 10.3892/br.2015.437.
11. Misyurin A.V. Clinical Significance of the PRAME Gene Expression in Oncohematological Diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2018; 11(1):26-33. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-26-33. (in Russian)
12. Zhang S., Mo Q., Wang X. Oncological role of HMGA2 (Review). *Int. J. Oncol.* 2019; 55(4):775-88. DOI: 10.3892/ijo.2019.4856.
13. Rommel B., Rogalla P., Jox A., Kalle C.V., Kazmierczak B., Wolf J. et al. HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk. Lymphoma.* 1997; 26(5-6):603-7. DOI: 10.3109/10428199709050896.
14. Mansoori B., Mohammadi A., Ditzel H.J., Duijf P.H.G., Khaze V., Gjerstorff M.F., et al. HMGA2 as a Critical Regulator in Cancer Development. *Genes (Basel).* 2021; 12(2):269. DOI: 10.3390/genes12020269.
15. Yuen K.Y., Lin X.Y., Zhou Y.Z., Luo H., Liu Y., Xu L.H. Optimal time-points for detecting expression levels of BAALC, EVI1, and WT1 genes in patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Hematology.* 2021; 26(1):995-1006. DOI: 10.1080/16078454.2021.2006409.
16. Wu X., Wang H., Deng J., Zheng X., Ling Y., Gong Y. Prognostic significance of the EVI1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Ann. Hematol.* 2019; 98(11):2485-96. DOI: 10.1007/s00277-019-03774-z.
17. Xiao S.J., Shen J.Z., Huang J.L., Fu H.Y. Prognostic significance of the BAALC gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 2015; 3(4):880-8. DOI: 10.3892/mco.2015.562.
18. Weber S., Alpermann T., Dicker F., Jeromin S., Nadarajah N., Eder C. et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2014; 4(1):e173. DOI: 10.1038/bcj.2013.71.
19. Hinai A.A., Valk P.J. Review: Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2016; 172(6):870-8. DOI: 10.1111/bjh.13898.
20. Gröschel S., Lugthart S., Schlenk R.F., Valk P.J., Eiwen K., Goudswaard C., et al. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(12):2101-7. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.0646.
21. Andrew R.J. Young and Masashi Narita Oncogenic HMGA2: short or small? *Genes & Dev.* 2007; 21:1005-9. DOI: 10.1101/gad.1554707.
22. Bharathavikru R., Slight J., Aitken S., Petrovich G., Charlton J., Stancheva V. et al. Tumour suppressor WT1 regulates the let-7-Igflr axis in kidney mesenchyme. *Cold Spring Harbor Laboratory.* 2019. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/822973>. DOI: <https://dx.doi.org/10.1101/822973>.
23. Pelosi A., Careccia S., Lulli V., Romania P., Marziali G., Testa U. et al. miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 2013; 32(31):3648-54. DOI: 10.1038/onc.2012.398.