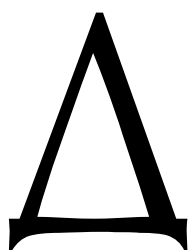


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67
4 • 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

АПРЕЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 02.04.2022.
Подписано в печать 15.04.2022. Формат
60 × 88½.
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.akc.ru,
www.pressa-rl.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 4. 193–256.

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:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ диагностика

Volume 67
4 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

APRIL

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:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV
(*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK
(*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*),
T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*),
A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KOR-
SHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHET-
TOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Коваленко Н.В., Вереникина Е.В., Максимов А.Ю., Гладких О.Н.,
Демидова А.А., Домашенко Е.В.

Прогноз ранних рецидивов рака тела матки на основе мониторинга сывороточных
биологических маркеров 197

Орлов Д.С., Назаренко Л.П., Диденко Л.И., Сеитова Г.Н.

Сравнение флуоресцентного и масс-спектрометрического методов для скрининга
новорожденных на болезнь Фабри 204

Базарный В.В., Сиденкова А.П., Соснин Д.Ю.

Лактоферрин ротовой жидкости в норме и при болезни Альцгеймера:
лабораторно-диагностические аспекты (обзор литературы) 207

ГЕМАТОЛОГИЯ

Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н.,
Снеговой А.В., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Рябчиков Д.А.

Оценка нарушений метаболизма железа и адекватности лечения анемического
синдрома у больных раком молочной железы на фоне химиотерапии 213

ЦИТОЛОГИЯ

Пурсанова А.Е., Казарина Л.Н., Круглова И.А., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Филатова Е.Н.

Флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика предраковых заболеваний
и рака слизистой оболочки рта 219

ИММУНОЛОГИЯ

Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А., Ермолаев И.И.

Особенности гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Гам-КОВИД-Вак»
и у переболевших COVID-19 227

Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А.

Иммуногематологическое обеспечение трансфузий эритроцитов аллоиммунизированным
реципиентам (клинический случай) 234

МИКРОБИОЛОГИЯ

Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С.

Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток
бактерий и микробной популяции 237

Анисимова А.С., Полеева М.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В.

Особенности идентификации грибов рода *Candida* с помощью
масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS) 244

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Фонова Е.А. Васильева О.Ю., Зарубин А.А.,
Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Скрябин Н.А.

Анализ спектра мутаций в гене АТР7В с использованием массового параллельного
секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова 250

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Kovalenko N.V., Verenikina E.V., Maksimov A.Yu., Gladkikh O.N., Demidova A.A., Domashenko E.V.
Prediction of early recurrences of uterine body cancer based on monitoring of serum biological markers 197

Orlov D.S., Nazarenko L.P., Didenko L.I., Seitova G.N.
Comparison of fluorimetric and mass spectrometric methods for Fabry disease newborn screening 204

Bazarnyi V.V., Sidenkova A.P., Sosnin D.Yu.
Lactoferrin of oral fluid is normal and in Alzheimer's disease:
laboratory and diagnostic aspects (review of literature) 207

HEMATOLOGY

*Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N.,
Snegovoy A.V., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Ryabchikov D.A.*
Assessment of iron metabolism disorders and adequate treatment of anemic syndrome in patients
with breast cancer on the background of adjuvant chemotherapy 213

CYTOLOGY

Pursanova A.E., Kazarina L.N., Kruglova I.A., Zinoviev S.V., Utkin O.V., Filatova E.N.
Fluorescent immunocytochemical diagnostics of precancerous diseases and cancer of the oral mucosa 219

IMMUNOLOGY

Akinshina Yu. A., Mardanly S. G., Rotanov S. V., Pomazanov V. V., Kiseleva V. A., Ermolaev I.I.
Features of the humoral response to immunization "Gam-COVID-Vac" and in patients with COVID-19 227

Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A.
Immunohematological provision of red blood cells transfusions to alloimmunized recipients (clinical case) 234

MICROBIOLOGY

Gerasimov V.N., Marinina N.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S.
The possibilities of transmission electron microscopy in assessing the quality of bacterial
cells and microbial population. 237

Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V.
Peculiarities of Candida yeast identification by mass spectrometric analysis (MALDI-ToF MS). 244

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

*Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Fonova E.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A.,
Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Skryabin N.A.*
Analysis of mutations spectrum in the ATP7B gene in patients with Wilson disease using
massively parallel sequencing 250

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Коваленко Н.В.¹, Вереникина Е.В.², Максимов А.Ю.², Гладких О.Н.³, Демидова А.А.², Домашенко Е.В.³

ПРОГНОЗ РАННИХ РЕЦИДИВОВ РАКА ТЕЛА МАТКИ НА ОСНОВЕ МОНИТОРИНГА СЫВОРОТОЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

¹ГБУЗ «Волгоградский областной клинический онкологический диспансер», 400138, Волгоград, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава РФ, 344019, Ростов-на-Дону, Россия;

³ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», 344002, г. Ростов-на-Дону, Россия

Целью работы явилась оптимизация прогноза ранних рецидивов рака тела матки путем поиска информативных лабораторных биомаркеров. В исследование включены 343 пациентки с эндометриальной аденокарциномой I-IV стадий по FIGO в возрасте от 53 до 76 лет. У пациенток до хирургического вмешательства, а также через 3 и 6 месяцев после окончания первичного лечения в сыворотке крови методом иммуноферментного и электрохемилюминесцентного иммуноанализа определяли концентрацию онкологических маркеров CA-125, HE4, DJ-1, DKK-1. Анализировали прогностическую информативность мониторинга маркеров для оценки риска развития ранних рецидивов онкологического заболевания в течение двух лет после операции. У больных раком тела матки со стадией заболевания и степенью дифференцировки опухоли в сыворотке крови сопряжено изменение концентрации DJ-1. При инвазии миометрия более 50% повышались сыровоточные уровни трех маркеров – CA-125, HE4 и DJ-1. В зависимости от риска рецидива болезни, оценка которого определена по интраоперационным и гистологическим характеристикам, выявлено различие содержания в крови маркеров HE4 и DJ-1. Установлено, что риск раннего рецидивирования рака тела матки повышался ($p < 0,05$) при превышении концентрации CA-125 уровня 29,3 МЕ/мл, HE4 выше 79,3 пмоль/л, DJ-1 выше 90,0 нг/мл и DKK-1 выше 47,3 пг/мл через 6 месяцев после окончания первичного лечения. Наибольшая прогностическая информативность выявлена для мониторинга DJ-1 и HE4 в сыворотке крови, что указывает на перспективность их использования при непрерывном контроле за течением онкологического заболевания.

Ключевые слова: рак тела матки; сыворотка крови; онкологические маркеры; мониторинг; рецидив.

Для цитирования: Коваленко Н.В., Вереникина Е.В., Максимов А.Ю., Гладких О.Н., Демидова А.А., Домашенко Е.В. Прогноз ранних рецидивов рака тела матки на основе мониторинга сыровоточных биологических маркеров. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 197-203. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-197-203>

Для корреспонденции: Демидова Александра Александровна, канд. мед. наук, доц., докторант; e-mail: alald@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2021

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 17.04.2022

Kovalenko N.V.¹, Verenikina E.V.², Maksimov A.Yu.², Gladkikh O.N.³, Demidova A.A.², Domashenko E.V.³

PREDICTION OF EARLY RECURRENCES OF UTERINE BODY CANCER BASED ON MONITORING OF SERUM BIOLOGICAL MARKERS

¹Volgograd Regional Clinical Oncological Dispensary, 400138, Volgograd, Russia;

²«National Medical Research Center of Oncology» of Ministry of Health of the Russian Federation, 344019, Rostov-on-Don, Russia;

³Regional Consultative and Diagnostic Center, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The aim of this work was to optimize the prognosis of early recurrences of uterine cancer by searching for informative laboratory biomarkers. The study included 343 patients with I-IV stages FIGO endometrial adenocarcinoma the ages of 53 and 76 years. In patients before surgery, as well as 3 and 6 months after the end of primary treatment, the concentration of oncological markers CA-125, HE4, DJ-1, DKK-1 was determined in blood serum by ELISA and electrochemiluminescence immunoassay. We analyzed the predictive informativeness of monitoring markers to assess the risk of early recurrences of cancer within two years after surgery. In patients with uterine cancer with the stage of the disease and the degree of tumor differentiation in the blood serum, the concentration of DJ-1 is changed. With myometrial invasion of more than 50%, increased serum levels of three markers — CA-125, HE4, and DJ-1. Depending on the risk of disease recurrence, the assessment of which was determined by intraoperative and histological characteristics, a difference was revealed in the content of HE4 and DJ-1 markers in the blood. It was found that the risk of early recurrence of uterine cancer increased ($p < 0,05$) when the concentration of CA-125 exceeded the level of 29,3 U/ml, HE4 was above 79,3 pmol/l, DJ-1 was above 90,0 ng/ml and DKK-1 above 47,3 pg/ml 6 months after the end of primary treatment. The highest predictive information value was found for monitoring DJ-1 and HE4 in blood serum, which indicates that they are promising for use in continuous monitoring of the course of cancer.

Key words: cancer of the body of the uterus; blood serum; oncological markers; monitoring; relapse.

For citation: Kovalenko N.V., Verenikina E.V., Maksimov A.Yu., Gladkikh O.N., Demidova A.A., Domashenko E.V. Prediction of early recurrences of uterine body cancer based on monitoring of serum biological markers. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 197-203 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-197-203

For correspondence: Demidova A.A., candidate of Medical Sciences, doctoral student; e-mail: alald@inbox.ru

Information about authors:

Kovalenko N.V., <https://orcid.org/0000-0001-6375-9039>;
Verenikina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7609-0626>;
Maksimov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>;
Gladkikh O.N., <https://orcid.org/0000-0002-3613-222X>;
Demidova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-3545-9359>;
Domashenko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-3847-6875>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 20.12.2021

Accepted 25.01.2022

Published 17.04.2022

Введение. Прогноз онкологического заболевания любой локализации строится с учетом стадии, степени дифференцировки опухоли, типа гистологического строения, глубины инвазии и поражения регионарных лимфатических узлов [1]. При стандартизации всех значимых факторов для контроля прогрессирования онкологического заболевания клиницисты нуждаются в экспресс-методах неинвазивного мониторинга биологических маркеров. Оценка сывороточных биомаркеров в динамике помогает определить индивидуальный риск неблагоприятного исхода заболевания и эффективность лечения. При этом, определение биомаркеров в крови можно реализовать многократно ввиду доступности и безопасности для пациента, легкости и быстроты исполнения [2].

Индикатором успешности лечения рака тела матки является отсутствие ранних рецидивов заболевания. Между тем, частота развития рецидивов после лечения при раке тела матки высокая и достигает при I стадии 15,9%, II стадии – 30,1%, III-IV стадиях – 40% [3]. На большом количестве пациенток ($n=1322$) с диагнозом рака тела матки выявлено, что в первые пять лет после операции регионарные и отдаленные метастазы встречались в 59,5%, локорегионарные рецидивы в 21,5%, продолженный рост в 10,7% [4]. При наличии локорегионарных рецидивов 5-летняя выживаемость резко снижалась и составляла 34% [4].

После окончания первичного лечения рака тела матки каждые три месяца в первые два года в алгоритм наблюдения входят гинекологический осмотр, ультразвуковое исследование, цитология соскобов со слизистой влагалища, определение концентрации опухолевого антигена СА-125 в крови [5]. Особое внимание уделяется больным, у которых исходно уровень СА-125 повышен [6]. В последнее время для ранней диагностики рака тела матки рекомендовано определение содержания в крови маркера HE4 (Human epididymis protein 4) [7]. В качестве перспективных, но не изученных по эффективности маркеров, можно назвать протеин DKK-1 (Dickkopf-1) как растворимый ингибитор сигнального пути Wnt, белок DJ-1 семейства пептидазы C56 (белковая дегликаза) [8,9]. Прогностическая значимость динамического определения в крови биомаркеров HE4, DKK-1, DJ-1 у больных раком тела матки окончательно не изучена. Между тем, их определение может расширить информативность мониторинга СА-125 у пациенток с раком тела матки для своевременного выявления

высокого риска и развития рецидивов злокачественного заболевания, своевременного индивидуального изменения активности и спектра лечения, достижения благоприятных исходов болезни.

Целью исследования явилась оптимизация прогноза ранних рецидивов рака тела матки путем поиска информативных лабораторных биомаркеров.

Материал и методы. Обследованы 343 пациентки с эндометриальной аденокарциномой в возрасте от 53 до 76 лет (средний возраст $63,7 \pm 2,1$ лет). Стадии рака тела матки определяли по итогам ревизии органов во время операции и результатам гистологического исследования операционных образцов тканей по классификации FIGO [10]. I стадия выявлена у 94 (27,4%), II – у 134 (39,1%), III – у 75 (21,8%), IV – у 40 (11,7%) пациенток. Критериями включения в исследование явились: подтвержденный гистологически диагноз эндометриальной аденокарциномы (C54 по МКБ10); отсутствие до операции специализированного противоопухолевого лечения, двухлетнее наблюдение за пациентками после окончания первичного лечения. Критерии исключения: декомпенсация сопутствующих соматических заболеваний – сердечная недостаточность, почечная недостаточность, онкологические заболевания иной локализации, генетическая предрасположенность к онкологическим заболеваниям (носители гена *BRCA1-2*, *APC*), гормональное лечение перед гистерэктомией, нейродегенеративные заболевания, несоответствие степени и/или гистологического типа между биопсией эндометрия и исследованием операционных образцов. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие для участия в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России.

Всем пациенткам выполняли экстирпацию матки с придатками. Тазовая и поясничная лимфодиссекция, оментэктомия выполнялись по показаниям.

Образцы крови собирали за сутки перед операцией, а затем двукратно каждые 3 мес после окончания первичного лечения. Венепункцию осуществляли из локтевой вены через 12 ч после приема пищи, кровь помещали в пробирки с сывороткой S-Monovette® Serum Gel (Sarstedt). Свертывание крови происходило при комнатной температуре, образцы центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут. Далее из сыворотки от каждого больного на всех этапах сбора материала отбирали

три аликвоты по 300 мкл и хранили при -80°C до лабораторного этапа. Каждый образец крови размораживали однократно.

Определение концентрации DJ-1 и DKK1 осуществляли с помощью иммуноферментного анализа с помощью специфических тест-систем CircuLex Human DJ-1 / PARK7 ELISA Kit (CycLex Co., Ltd. Япония) и Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kit (Biotechne, R & D Systems, США) на аппарате iMARK (Bio-Rad Laboratories, США). Уровни CA-125 и HE4 в сыворотке измеряли с применением электрохемилуминесцентного иммуноанализа на аппаратах UniCel DxI 800 (Beckman Coulter, США) и Roche Cobas e411 (Roche Group Ltd, Швейцария), соответственно. Для измерения CA-125 использовали диагностический набор ARCHITECT Ca125 II (CN 2K45-24, Abbott), а при определении HE4 – тест-систему ARCHITECT HE4 (CN 2P51-25, Abbott).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft, США). Уровни маркеров между группами сравнивали с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса и критерия Манна-Уитни. В динамике средние величины показателей сравнивали с помощью критерия Уилкоксона. Для выявления статистических различий между группами $p \leq 0,05$ считали статистически значимым. Для определения дифференциально разделительного уровня концентрации маркеров использовали метод ROC-анализа. Площадь под ROC кривой (AUC) детализировали для определения диагностической специфичности (ДС) и чувствительности (ДЧ), предсказательной ценности отрицательного результата (ПЦОР) теста.

Результаты. Общая характеристика больных клинической группы представлена в табл. 1.

На момент постановки диагноза рака тела матки больные преимущественно находились в постменопаузе (87,8%). У 245 (71,4%) пациенток было диагностировано ожирение I–III степени (индекс массы тела $31,4 \pm 1,8$ кг/м²). Стадию заболевания определяли после гистологического исследования операционных образцов ткани. Чаще других встречалась II стадия рака тела матки (39,1%). По результатам гистологического исследования у всех больных верифицирован диагноз эндометриальной аденокарциномы. В большинстве наблюдений (70,3%) отмечена умеренная степень дифференцировки опухолевых клеток. Хирургическое лечение получали все пациентки в объеме, соответствующем стадии заболевания. Лучевую (79,3%) и химиотерапию (51,9%) проходили адьювантно после операции. В течение двух лет после окончания первичного лечения локорегионарные рецидивы имели место у 64 (18,7%), а отдаленные рецидивы у 11 (3,2%) больных.

До операции в клинической группе в сыворотке крови средняя величина концентрации CA-125 составила $38,7 \pm 2,4$ МЕ/мл, HE4 – $81,3 \pm 4,1$ пмоль/л, DJ-1 – $51,4 \pm 3,9$ нг/мл, DKK-1 – $40,5 \pm 2,6$ пг/мл. Исходная величина биомаркеров в крови зависела от стадии, степени дифференцировки опухоли, инвазии миометрия и риска рецидивов (табл. 2).

Из изучаемых биомаркеров статистически значимое повышение концентрации при поздних III–IV стадиях относительно ранних I–II стадий заболевания установлено только для фермента DJ-1 ($77,6 \pm 2,8$ нг/мл против $33,2 \pm 1,7$ нг/мл, $p < 0,001$). Уровень DJ-1 в сыворотке крови повышался также при низкой дифференцировке опухолевых клеток (G3) по сравнению с более благоприятными гистологическими типами (G1–G2) ($83,4 \pm 3,7$ нг/мл против $39,1 \pm 2,9$ нг/мл, $p < 0,001$). Содер-

Таблица 1

Общая характеристика больных эндометриальной аденокарциномой

Показатели	Больные эндометриальной аденокарциномой (n=343)
Возраст, годы (M±m)	63,7±2,1
Менопаузальный статус абс.(%):	
пре-/перименопауза	42 (12,2%)
постменопауза	301 (87,8%)
Индекс массы тела, кг/м ² (M±m)	31,4±1,8
Стадия FIGO:	
I	94 (27,4%)
II	134 (39,1%)
III	75 (21,8%)
IV	40 (11,7%)
Степень дифференцировки:	
G1	55 (16,0%)
G2	241 (70,3%)
G3	47 (13,7%)
Инвазия миометрия:	
<50%	67 (19,5%)
≥50%	276 (80,5%)
Лечение:	
Экстирпация матки с придатками	343 (100%)
Тазовая +/- поясничная ЛД	263 (76,7%)
Лучевая терапия	272 (79,3%)
Химиотерапия	178 (51,9%)
Ранние рецидивы:	
Локорегионарные	64 (18,7%)
Дистантные	11 (3,2%)

жение СА-125, HE4 и DKK-1 в крови не коррелировало со стадией рака тела матки и степенью дифференцировки опухоли. Сывороточные уровни СА-125, HE4 и DJ-1 повышались у пациенток при инвазии миометрия более 50% ($p<0,05$). Риск рецидивов рака тела матки считали высоким, если интраоперационно при ревизии и гистологическом исследовании опухолевых препаратов отмечали инвазию миометрия $\geq 50\%$, низкую градацию дифференцировки опухоли G3, опухолевые эмболы в лимфатических щелях, сосудистую инвазию опухоли. С исходным высоким риском рецидивов ассоциировано повышение в крови дооперационного уровня концентрации HE4 ($80,7\pm 4,9$ пмоль/л против $61,2\pm 3,8$ пмоль/л, $p=0,005$) и DJ-1 ($86,4\pm 4,4$ нг/мл против $38,1\pm 3,3$ нг/мл, $p<0,001$). Таким образом, от стадии, степени дифференцировки опухоли, инвазии миометрия и риска рецидивов в большей мере изменялась концентрация дегликазы DJ-1.

На рисунке отражено изменение концентрации биомаркеров в крови в течение 6 мес после окончания первичного лечения.

Динамику содержания изучаемых маркеров в крови оценивали в двух группах в зависимости от наличия или отсутствия рецидивов заболевания в течение двух лет от окончания первичного лечения. Изменение концентрации белков в двух подгруппах анализировали ретроспективно. Через 3 месяца наблюдения по сравнению с дооперационным уровнем концентрация всех изучаемых биомаркеров снижалась. На этом этапе содержание СА-125, HE4 и DKK-1 в крови не отличалось в подгруппах. Через 3 месяца после окончания лечения установлено только повышение концентрации DJ-1 у больных с последующим развитием раннего рецидива заболевания ($34,5\pm 2,1$ нг/мл против $23,2\pm 1,7$ нг/мл, $p=0,045$). Через 6 месяцев наблюдения концентрация всех четырех маркеров в подгруппе больных с рецидивом заболевания была выше, по сравнению с пациентками, у которых отмечали ремиссию (табл. 3). Таким образом, отличие между содержанием изучаемых маркеров в подгруппах в зависимости от развития рецидивов опухолевого про-

цесса формировалось в ранние сроки наблюдения только для DJ-1, а через 6 мес для всех показателей.

Методом ROC-анализа была найдена критическая разделительная точка концентрации маркеров через 6 мес после окончания первичного лечения для формирования заключения о высоком риске развития рецидива рака тела матки в течение двух лет (табл. 3).

Риск развития раннего рецидива рака тела матки повышался ($p<0,05$) при превышении концентрации СА-125 уровня 29,3 МЕ/мл (ДЧ 76,2%, ДС 77,2%, ПЦОР 93,2%), HE4 выше 79,3 пмоль/л (ДЧ 83,2%, ДС 69,1%, ПЦОР 89,4%), DJ-1 выше 90,0 нг/мл (ДЧ 91,5%, ДС 99,1%, ПЦОР 94,7%) и DKK-1 выше 47,3 пг/мл (ДЧ 60,3%, ДС 79,7%, ПЦОР 80,1%) через 6 мес после окончания первичного лечения.

Таким образом, для оценки риска развития ранних рецидивов эндометриальной карциномы наибольшая прогностическая информативность выявлена для мониторинга DJ-1 и HE4 в сыворотке крови, что указывает на перспективность их использования при непрерывном контроле за течением онкологического заболевания.

Обсуждение. Понятие рецидива при раке тела матки объединяет различные формы распространения болезни: продолженный либо возобновленный рост, инвазия в соседние органы, локорегиональные рецидивы (поражение подвздошных лимфатических узлов, влагалища, параметрия), а также отдаленные метастазы в лимфатические узлы и органы [11]. Выделяют ранние (до 2-х лет после окончания первичного лечения) и поздние (два и более лет) сроки развития рецидивов эндометриального рака. У 77% больных рецидивы рака тела матки развиваются в течение первых двух лет наблюдения, а у 88% в первые три года после окончания первичного лечения [11]. Если поздние рецидивы сложно прогнозировать и сроки их возникновения зависят от биологических особенностей опухоли, то предикторы ранних рецидивов многочисленны и представлены различными биохимическими, генетическими, молекулярно-генетическими факторами [9]. Среди предикторов наиболее значимую информацию для прогноза предоставляют показатели,

Таблица 2

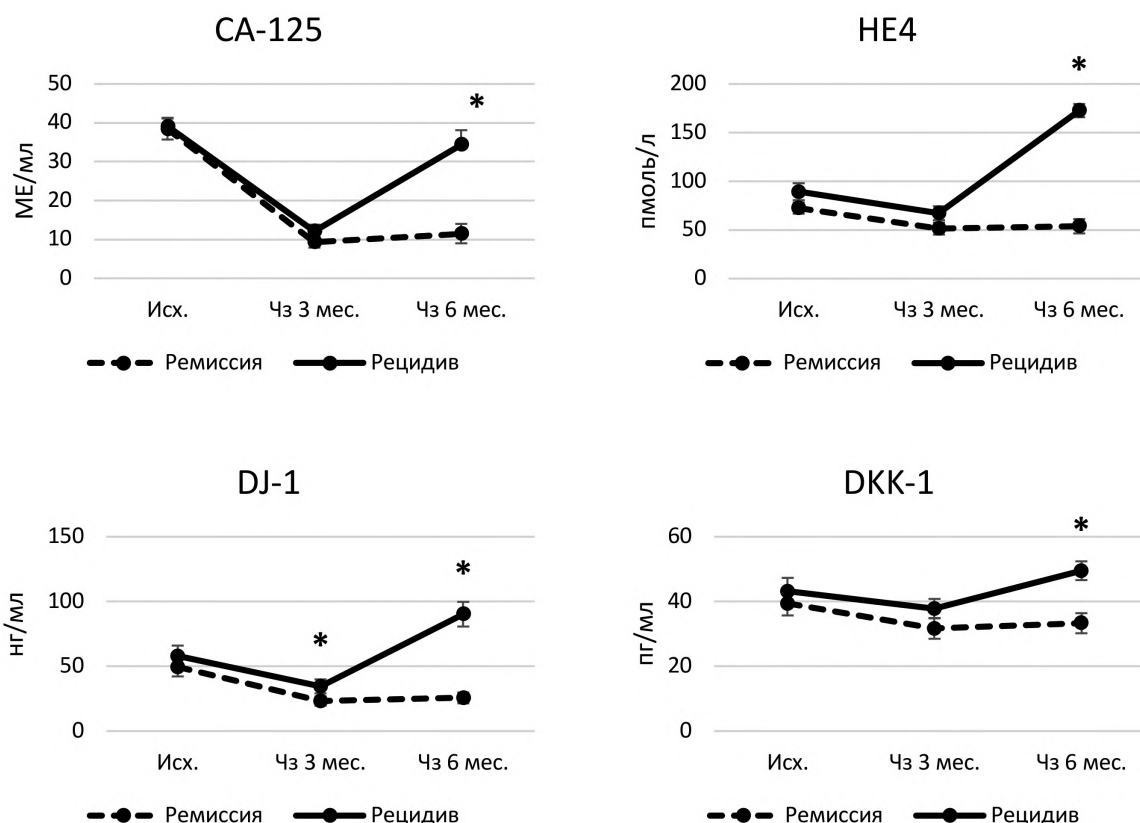
Исходное содержание биомаркеров в крови до операции в зависимости от стадии, степени дифференцировки опухоли, инвазии миометрия и риска рецидивов

Признак	Уровни признака	СА-125, МЕ/мл	HE4, пмоль/л	DJ-1, нг/мл	DKK-1, пг/мл
Стадия FIGO	I-II	36,8 $\pm$ 2,9	69,3 $\pm$ 3,5	33,2 $\pm$ 1,7	37,4 $\pm$ 3,1
	III-IV	39,9 $\pm$ 2,4	77,8 $\pm$ 3,7	77,6 $\pm$ 2,8	41,3 $\pm$ 3,3
	p	0,86	0,13	<0,001	0,45
Степень дифференцировки	G1-2	35,5 $\pm$ 2,2	67,8 $\pm$ 3,5	39,1 $\pm$ 2,9	38,6 $\pm$ 2,5
	G3	41,7 $\pm$ 3,4	78,1 $\pm$ 4,6	83,4 $\pm$ 3,7	43,0 $\pm$ 3,1
	p	0,24	0,09	<0,001	0,26
Инвазия миометрия	<50%	31,2 $\pm$ 2,1	60,1 $\pm$ 3,8	61,2 $\pm$ 4,6	35,4 $\pm$ 1,9
	$\geq 50\%$	41,7 $\pm$ 2,7	136,5 $\pm$ 5,9	91,6 $\pm$ 6,3	40,3 $\pm$ 2,5
	p	0,042	<0,001	<0,001	0,18
Риск рецидивов	Низкий	36,3 $\pm$ 2,0	61,2 $\pm$ 3,8	38,1 $\pm$ 3,3	36,7 $\pm$ 3,0
	Высокий	40,4 $\pm$ 3,1	80,7 $\pm$ 4,9	86,4 $\pm$ 4,4	47,5 $\pm$ 3,8
	p	0,13	0,005	<0,001	0,09

которые оценивают в динамике. В связи с этим обстоятельством, в работе была определена концентрация онкологических маркеров как до операции, так и в первые 6 мес после окончания первичного лечения.

Согласно клиническим рекомендациям по ведению больных раком тела матки при контроле за течением болезни из лабораторных показателей определяют концентрацию СА-125 в крови. Однако, с развитием рецидива болезни связывают повышенный уровень

СА-125 в крови, установленный на предоперационном этапе [12]. С целью стратификации риска прогрессирующего течения болезни динамика содержания СА-125 в крови в первые 6 мес после операции и адъювантного лечения не оценивалась. На ранних стадиях рака тела матки диагностическая информативность маркера HE4 (Human epididymis protein 4) выше, чем у СА-125 [13]. HE4 представляет собой человеческий эпидидимальный секреторный белок 4 и принадлежит



Исходные показатели концентрации биомаркеров в крови у больных эндометриальной карциномой до операции и их динамика в первые 6 мес после окончания первичного лечения в подгруппах пациенток с ремиссией и рецидивом заболевания. * – статистически значимое отличие показателей между подгруппами при $p < 0,05$.

Таблица 3

Содержание биомаркеров в крови через 6 месяцев после окончания первичного лечения в зависимости от наличия или отсутствия ранних рецидивов заболевания

Этап	СА-125, МЕ/мл	HE4, пмоль/л	DJ-1, нг/мл	DKK-1, пг/мл
Ремиссия	11,5±0,5	53,8±3,5	25,6±1,4	33,3±2,0
Рецидив	34,4±2,0	172,6±5,7	90,2±4,5	49,5±2,4
<i>p</i>	0,0002	<0,001	<0,001	<0,001
Cut-off	29,3	79,3	90,0	47,3
ДЧ	76,2	83,2	91,5	60,3
ДС	77,2	69,1	99,1	79,7
ПЦОР	93,2	89,4	94,7	80,1
AUC, <i>p</i>	0,738, <i>p</i> =0,027	0,802 <i>p</i> =0,011	0,911 <i>p</i> =0,0001	0,710 <i>p</i> =0,047

Примечание. Cut-off – разделительная точка концентрации биомаркера в крови для оценки риска развития рецидива, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ПЦОР – предсказательная ценность отрицательного результата, AUC – площадь под ROC кривой.

к семейству ингибиторов протеаз. Его прогностическое значение для определения риска рецидивов рака тела матки установлено только для низкой степени дифференцировки опухоли [7]. В последнее время в качестве маркеров при диагностике рака тела матки рассматривают DKK-1 и DJ-1 (белковая дегликаза) [9]. DJ-1 способствует пролиферации опухолевых клеток и играет важную роль в патогенезе и прогрессировании рака тела матки путем модуляции супрессора опухолей PTEN [14]. Перспективность определения DJ-1 в крови в комплексе с HE4 установлена при проведении дифференциальной диагностики эндометриальных и неэндометриальных аденокарцином, низко- и высокодифференцированного рака тела матки [15]. Белок DKK-1 отвечает за регуляцию костного метаболизма, в связи с чем научные публикации посвящены в большей мере анализу его уровней в крови при костных метастазах опухолей или остеопорозе [16]. Появились работы, где изучено влияние DKK-1 на пролиферацию и миграцию опухолевых клеток при раке толстой кишки и желудка, множественной миеломе [17,18]. При раке эндометрия на небольших по числу группах больных в крови обнаружены более высокие уровни DKK-1 по сравнению со здоровыми женщинами [19].

Оценка прогноза рецидивов у больных раком тела матки остается непростым вопросом для клиницистов. В этой связи в исследовании было изучено прогностическое значение дискретных последовательных определений концентрации СА-125, HE4, DKK-1 и DJ-1 в крови до и после окончания первичного противоопухолевого лечения. Риск развития рецидивов оценивали исходно по результатам интраоперационной ревизии и гистологическом исследовании опухолевых препаратов. С высоким риском рецидивов на начальном этапе исследования коррелировало повышение в крови концентрации HE4 и DJ-1. На следующем этапе за два года наблюдения были выявлены пациентки с рецидивами рака тела матки: 64 (18,7%) локорегионарных рецидивов и 11 (3,2%) отдаленных рецидивов. У больных с рецидивами эндометриального рака и ремиссией ретроспективно оценивали динамику изменений биомаркеров в крови. В подгруппе больных с рецидивом заболевания имело место повышение всех изучаемых маркеров к 6 месяцу наблюдения. Наибольшая прогностическая информативность выявлена для мониторинга DJ-1 и HE4. Таким образом, серийное тестирование маркеров DJ-1 и HE4 каждые 3 мес на начальном этапе наблюдения за больными раком тела матки позволит своевременно выделять группы больных с высоким риском рецидивирования для осуществления их углубленного обследования с целью проведения адекватных лечебных мероприятий.

Заключение. В работе показано, что у больных раком тела матки со стадией заболевания и степенью дифференцировки опухоли в сыворотке крови сопряжено изменение концентрации DJ-1. При инвазии миометрия более 50% повышались сывороточные уровни трех маркеров – СА-125, HE4 и DJ-1. В зависимости от риска рецидива болезни, оценка которого определена по интраоперационным и гистологическим характеристикам, выявлено различие содержания в крови маркеров HE4 и DJ-1. Установлено повышение концентрации СА-125, HE4, DJ-1 и DKK-1 в сыворотке крови через 6 мес после окончания первичного лечения в подгруппе больных с ранними рецидивами заболевания, что позволя-

ет диагностировать бессимптомные ранние рецидивы, формировать прогноз относительно прогрессирования рака тела матки. Следовательно, последовательное дискретное определение концентрации СА-125, HE4, DJ-1 и DKK-1 в крови каждые три месяца эффективно для мониторинга успешности лечения рака тела матки. В работе определены критические уровни маркеров, превышение которых через 6 мес наблюдения сопровождалось повышением риска развития ранних рецидивов эндометриального рака.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4, 6-19 см. REFERENCES)

3. Нечушкина В.М., Деньгина Н.В., Коломиец Л.А., Кравец О.А., Морхов К.Ю., Новикова Е.Г. и др. Практические рекомендации по лечению рака тела матки и сарком матки. *Злокачественные опухоли*. 2018; 8(S2): 190-203. DOI:10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-190-203.
5. Санджиева Л., Идрисова Л., Солопова А., Табакман Ю., Ермакова И. Рак эндометрия: актуальность вопроса и возможности реабилитации. *Врач*. 2020; 31(2): 7-12. DOI:10.29296/25877305-2020-02-02.

REFERENCES

1. Toboni M., Powell M. New Treatments for Recurrent Uterine Cancer. *Current Oncology Reports*. 2021; 23(12): 139. DOI:10.1007/s11912-021-01129-4.
2. Coll-de la Rubia E., Martinez-Garcia E., Dittmar G., Nazarov P.V., Bebia V., Cabrera S. et al. In silico Approach for Validating and Unveiling New Applications for Prognostic Biomarkers of Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 9; 13(20): 5052. DOI:10.3390/cancers13205052.
3. Nechushkina V.M., Den'gina N.V., Kolomiec L.A., Kravets O.A., Morkhov K.Yu., Novikova E.G. et al. Practical recommendations for the treatment of cancer of the body of the uterus and uterine sarcomas. *Zlokachestvennye opukholi*. 2018; 8(S2): 190-203. DOI:10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-190-203. (in Russian)
4. Kim T.H., Kim H.S., Kim T.J., Chang S.J., Kim D.Y., Ryu S.Y. et al. Survival impact based on the thoroughness of pelvic lymphadenectomy in intermediate- or high-risk groups of endometrioid-type endometrial cancer: A multi-center retrospective cohort analysis. *Gynecol. Oncol.* 2016 Jun; 141(3): 440-6. DOI:10.1016/j.ygyno.2016.03.031.
5. Sandzhieva L., Idrisova L., Solopova A., Tabakman Yu., Ermakova I. Endometrial cancer: the relevance of the issue and the possibility of rehabilitation. *Vrach*. 2020; 31(2): 7-12. DOI:10.29296/25877305-2020-02-02. (in Russian)
6. Quan Q., Liao Q., Yin W., Zhou S., Gong S., Mu X. Serum HE4 and CA125 combined to predict and monitor recurrence of type II endometrial carcinoma. *Sci. Rep.* 2021 Nov 4; 11(1): 21694. DOI:10.1038/s41598-021-01263-w.
7. Espiau Romera A., Cuesta Guardiola T., Benito Vielba M., De Bonrosto Torralba C., Coronado Martin P.J., Baquedano Mainar L. HE4 tumor marker as a predictive factor for lymphatic metastasis in endometrial cancer. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2020 Jun; 149(3): 265-268. doi:10.1002/ijgo.13140.
8. Bednarikova M., Vinklerova P., Gottwaldova J., Ovesna P., Hausnerova J., Minar L. et al. The Clinical Significance of DJ1 and L1CAM Serum Level Monitoring in Patients with Endometrial Cancer. *J. Clin. Med.* 2021; 10: 2640. DOI:10.3390/jcm10122640.
9. Hutt S., Taylor A., Ellis P., Michael A., Butler-Manuel S., Chatterjee J. (2019) The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncologica*. 2019; 58(3): 342-52. DOI:10.1080/0284186X.2018.1540886.
10. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2009; 105(2): 103-4. DOI:10.1016/j.ijgo.2009.02.012.

11. Makker V., MacKay H., Ray-Coquard I., Levine D.A., Westin S.N., Aoki D. et al. Endometrial cancer. *Nat. Rev. Primers*. 2021; 7: 88. DOI:10.1038/s41572-021-00324-8.
12. Reijnen C., Visser N.C., Kasius J.C., Boll D., Geomini P.M., Ngo H. et al. Improved preoperative risk stratification with CA-125 in low-grade endometrial cancer: A multicenter prospective cohort study. *J. Gynecol. Oncol.* 2019; 30: e70. DOI:10.3802/jgo.2019.30.e70.
13. Behrouzi R., Barr C.E., Crosbie E.J. HE4 as a Biomarker for Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 23; 13(19): 4764. DOI:10.3390/cancers13194764.
14. Benati M., Montagnana M., Danese E., Paviati E., Giudici S., Ruzzenente O. et al. The clinical significance of DJ-1 and HE4 in patients with endometrial cancer. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32: e22223. DOI:10.1002/jcla.22223.
15. Di Cello A., Di Sanzo M., Perrone F.M., Santamaria G., Rania E., Angotti E. et al. DJ-1 is a reliable serum biomarker for discriminating high-risk endometrial cancer. *Tumor Biol.* 2017; 39: 6. DOI:10.1177/1010428317705746.
16. Kasoha M., Bohle R.M., Seibold A., Gerlinger C., Juhasz-Böss I., Solomayer E.-F. Dickkopf-1 (Dkk1) Protein Expression in Breast Cancer with Special Reference to Bone Metastases. *Clin. Exp. Metastasis*. 2018; 35(8): 763–75. DOI:10.1007/s10585-018-9937-3.
17. Gao S., Jin Y., Zhang H. Pan-Cancer Analyses Reveal Oncogenic and Immunological Role of Dickkopf-1 (DKK1). *Front. Genet.* 2021. 12:757897. DOI:10.3389/fgene.2021.757897.
18. Bian J., Dannappel M., Wan C., Firestein R. Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway in Colorectal Cancer. *Cells*. 2020; 9(9): 2125. doi:10.3390/cells9092125.
19. Eskander R.N., Ali S., Dellinger T., Lankes H.A., Randall L.M., Ramirez N.C. et al. Expression Patterns of the Wnt Pathway Inhibitors Dickkopf3 and Secreted Frizzled-Related Proteins 1 and 4 in Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma: An NRG Oncology/ Gynecologic Oncology Group Study. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2016 Jan; 26(1): 125-32. DOI:10.1097/IGC.0000000000000563.

Орлов Д.С., Назаренко Л.П., Диденко Л.И., Сеитова Г.Н.

СРАВНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ НА БОЛЕЗНЬ ФАБРИ

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Научно-исследовательский институт
медицинской генетики, 634009, Томск, Россия

Болезнь Фабри – вызванное мутациями в гене GLA X-сцепленное наследственное заболевание, которое входит в группу лизосомных болезней накопления. Неонатальный скрининг новорожденных мальчиков технически возможен благодаря измерению активности фермента альфа-галактозидазы А в сухих пятнах крови с применением методов масс-спектрометрического и флуоресцентного анализа. Цель исследования: оценить перспективу внедрения сравниваемых методов энзимодиагностики в практику неонатального скрининга. Для обоих подходов показана достоверность различий в измеряемой активности фермента в образцах биологического материала между группами новорожденных и пациентов с болезнью Фабри. Небольшая модификация флуориметрического метода за счет центрифугирования 96-луночного микропланшета перед измерением может улучшить отношение сигнал / шум.

Ключевые слова: неонатальный скрининг; болезнь Фабри.

Для цитирования: Орлов Д.С., Назаренко Л.П., Диденко Л.И., Сеитова Г.Н. Сравнение флуоресцентного и масс-спектрометрического методов для скрининга новорожденных на болезнь Фабри. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 204-206. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-204-206>

Для корреспонденции: Орлов Дмитрий Сергеевич, мл. науч. сотр. лаб. наследственной патологии;
e-mail: doc_esperanzo@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Томского НИИМЦ на выполнение поисковых научных исследований (Номер государственного учета НИОКТР АААА-А20-120041490003-6).

Поступила 11.11.2021

Принята к печати 17.02.2022

Опубликовано 17.04.2022

Orlov D.S., Nazarenko L.P., Didenko L.I., Seitova G.N.

COMPARISON OF FLUORIMETRIC AND MASS SPECTROMETRIC METHODS FOR FABRY DISEASE NEWBORN SCREENING

Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 634009, Tomsk, Russia

Fabry disease is an X-linked hereditary lysosomal storage disorder caused by mutations in the GLA gene. Neonatal screening for Fabry disease in males is feasible by measurement of α -galactosidase A activity in DBS using either the mass spectrometric or fluorogenic substrate. The aim of the study: to assess the possibility of introducing the compared methods into the practice of neonatal screening. In the both assays performed a statistically significant difference of the enzyme activity between affected individuals and controls is reported. The slight modification of the fluorimetric method by centrifugation of a 96-well microplate before measurement could improve signal to noise ratio.

Key words: neonatal screening; Fabry disease.

For citation: Orlov D.S., Nazarenko L.P., Didenko L.I., Seitova G.N. Comparison of fluorimetric and mass spectrometric methods for Fabry disease newborn screening. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 204-206 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-204-206>

For correspondence: Orlov D.S., researcher of laboratory of hereditary pathology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, e-mail: doc_esperanzo@mail.ru

Information about authors:

Orlov D.S., <https://orcid.org/0000-0001-7525-0176>;

Nazarenko L.P., <https://orcid.org/0000-0002-1861-433X>;

Didenko L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2965-3665>;

Seitova G.N., <https://orcid.org/0000-0002-8421-1416>.

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

Acknowledgment. The work was carried out within the State assignment (State registration number АААА-А20-120041490003-6).

Received 11.11.2021

Accepted 17.02.2022

Published 17.04.2022

Болезнь Фабри входит в группу лизосомных болезней накопления и обусловлена снижением активности фермента альфа-галактозидаза А. Ген *GLA* картирован

на длинном плече X хромосомы. Частота встречаемости классической формы болезни Фабри оценивается как 1:50 000 новорожденных мальчиков [1].

Программы массового неонатального скрининга гемизигот возможны благодаря наличию двух подходов к энзимодиагностике: флуоресцентного и масс-спектрометрического. Наличие патогенетически обоснованной ферментзаместительной терапии дает основание для включения болезни Фабри в программу скрининга новорожденных на наследственные заболевания [2].

Цель данного исследования – оценка перспективы внедрения сравнимых методов энзимодиагностики в практику неонатального скрининга на территории Томской области.

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы сухих пятен крови на стандартных тест-бланках фильтровальной бумаги. Все манипуляции с образцами осуществлялись в соответствии с Хельсинской декларацией ВОЗ. Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» и биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Кровь наносили на тест-бланк и высушивали при комнатной температуре не менее 3 ч вдали от источников тепла и прямого солнечного света. Пробы хранились в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ и защищались от влаги. Приготовление и хранение образцов осуществлялось в соответствии с практическими рекомендациями [3].

Флуоресцентный метод (4-MU). Диск фильтровальной бумаги диаметром 3,2 мм выбивали из каждого образца сухих пятен крови, помещали в 96-луночный микропланшет и инкубировали с 50 мкл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,5), содержащего 2,5 мМ 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозид, и 0,1 М N-ацетилгалактозамин в течение 18 ч при 37°C . Для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,2 М глицин-карбонатного буфера (pH 10,5). Флуоресценцию свободного 4-метилумбеллиферона ($\lambda_{\text{ex}}=365\text{ нм}$; $\lambda_{\text{em}}=450\text{ нм}$) измеряли на счетчике Wallac 1420 Multilabel Counter (Victor-2), PerkinElmer (США). Результаты были скорректированы по значениям холостых проб и сопоставлены с калибровочной кривой 4-метилумбеллиферона. Активность фермента представляли в мкмоль/л/ч [4].

Масс-спектрометрический метод (MSMS). Активность шести лизосомальных ферментов, присутствующих в диске 3,2 мм из высушенного пятна крови, одновременно измеряли с помощью набора NeoLSD, PerkinElmer (США). Образцы инкубировали в течение 18 ч при 37°C со смесью реагентов для анализа, которая содержала 6 субстратов, 6 внутренних стандартов и реакционный буфер. Количество образуемого продукта прямо пропорционально активности соответствующего фермента в образце. Внутренние стандарты представляют собой меченые дейтерием версии соответствующих продуктов ферментативных реакций. После инкубации образцы смешивали с раствором для экстракции и водой, и разделяли на водный и органический слои. Продукты реакции неполярны и преимущественно растворяются в органическом слое, аликвота которого и используется для измерения. Нерасщепленные субстраты реакции остаются в водном слое и не вводятся в масс-спектрометр. Этот процесс значительно снижает фоновые сигналы при анализе данных. Внутренние стандарты и продукты ферментативных реакций измеряли с помощью тандемной масс-спектрометрии (FIA-MSMS) с использованием мониторинга множественных реакций

(MRM). Активности ферментов рассчитывали на основе соотношения пиков каждого измеренного продукта и связанного с ним внутреннего стандарта и известных концентраций внутренних стандартов с использованием программного обеспечения для анализатора QSight 225MD UHPLC, PerkinElmer (США) и выражали в мкмоль/л/ч [5].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы SPSS 17.0. Проверка нормальности распределения количественных показателей осуществлялась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде медианы верхнего и нижнего квартилей $Me (Q_1-Q_3)$. Для сравнения групп использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми различия считали при $p<0,05$.

Для валидации разработанного в лаборатории количественного флуориметрического теста использовали линейную регрессию. Новый тест считался прошедшим валидацию, если и коэффициент регрессии (B) и константа (B_0) не отличаются достоверно от 1 и 0, соответственно. Надежность нового теста, определяющую воспроизводимость результатов, определяли с помощью коэффициента корреляции между результатами первого и повторного тестирования. Новый тест считался надежным, если коэффициент альфа-Кронбаха был больше 0,8.

Результаты. На первом этапе исследования показатель cut-off устанавливался как 30% от среднего значения активности фермента в образцах сухих пятен крови [6]. Образцы с активностью фермента ниже указанного порогового значения исследовались повторно в дублях. При условии нормальной активности фермента дополнительная процедура забора биологического материала не требовалась.

Флуориметрическим методом в течение двух лет проанализирована активность α -галактозидазы А в 881 образце сухих пятен крови, взятых у новорожденных г. Томска в рамках программы неонатального скрининга, без учета повторов, контрольных образцов, а также образцов пациентов, направляемых врачом генетиком на селективный скрининг болезни Фабри. Количество образцов, требующих повторного исследования, составляло менее 5% от общего количества. Ни в одном случае не потребовалось проведение ретеста, что сопоставимо с литературными данными [7]. Такой результат является хорошим показателем, поскольку не приводил к тревожности родителей обследуемых и одновременно не увеличивал нагрузку на лабораторию. Методом тандемной масс-спектрометрии обследованы 340 новорожденных. Ни в одном случае не потребовалось проведения повторного исследования.

Вне зависимости от метода активность α -галактозидазы А в группе новорожденных была значительно выше, и не перекрывалась со значениями, полученными у пациента с болезнью Фабри ($p<0,05$). Данные обобщены в таблице.

Разработанный в лаборатории флуориметрический тест для определения активности фермента α -галактозидазы А в сухих пятнах крови валидировался с применением масс-спектрометрического теста в качестве референсного.

Коэффициент регрессии B равен $0,922 \pm 0,180$ (стандартная ошибка), а константа B_0 составила $0,967 \pm 1,221$ (стандартная ошибка). Таким образом, 95% доверитель-

Активность фермента α -галактозидазы А в исследуемых группах

Показатели	Активность α -галактозидазы А, мкМ/ч			
	4-MU, Me (Q_1-Q_3)		MSMS, Me (Q_1-Q_3)	
Новорожденные	$n=881$	7,0 (4,0 – 11,0)	$n=340$	9,0 (8,0 – 12,0)
Пациент	$n=1$	0,3	$n=1$	0,4

Примечание. 4-MU – флуориметрия, MSMS – масс-спектрометрия; n – число обследованных.

ный интервал для коэффициента регрессии В включал 1 и рассчитывался по формуле: $0,922 \pm 1,96 \times 0,180$, т.е., между 0.5692 и 1.2748. А 95% доверительный интервал для константы B_0 включал 0 и рассчитывался по формуле: $0,967 \pm 1,96 \times 1,221$, т.е. между -1,42616 и 3,36016.

Коэффициент альфа Кронбаха, отражающий надежность разработанного флуориметрического теста, составил 0,978 (97,8%), $p=0,001$, что указывает на очень хорошую воспроизводимость метода.

Обсуждение. Преимуществами метода тандемной масс-спектрометрии являются высокая аналитическая чувствительность и возможность измерять активность нескольких ферментов одновременно. Достоинствами флуориметрического метода являются простота выполнения и доступность для лабораторий, проводящих неонатальный скрининг [8].

Следует отметить, что соотношение сигнал/шум флуориметрического метода можно улучшить центрифугированием 96-луночного планшета перед измерением флуоресценции. Это позволяет значительно уменьшить количество ложноположительных результатов и, кроме того, проводить измерение без дополнительного этапа переноса образцов в другой планшет. Действительно, измерение флуоресценции необходимо проводить в прозрачных растворах образцов [9].

Заключение. Обе описанные технологии позволяют оптимизировать диагностику болезни Фабри у новорожденных мальчиков до появления развернутой клинической картины и расширить программу массового неонатального скрининга.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–9 см. REFERENCES)

- Кузенкова Л.М., Намазова-Баранова Л.С., Подклетнова Т.В., Геворкян А.К., Вашакмадзе Н.Д., Савостьянов К.В. и др. Болезнь Фабри: особенности заболевания у детей и подростков. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14 (3): 341–8. DOI: 10.15690/vsp.v14i3.1369.

REFERENCES

- Mehta A., Hughes D.A. Fabry disease. 2002 Aug 5 [Updated 2017 Jan 5]. In book Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A. et al., eds. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.
- Kuzenkova L. M., Namazova-Baranova L. S., Podkletnova T. V., Gevorkyan A. K., Vashakmadze N. D., Savostyanov K. V. et al. Fabry Disease: symptoms in children and teenagers. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2015; 14 (3): 341–8. DOI: 10.15690/vsp.v14i3.1369. (in Russian)
- CLSI. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- Linthorst G.E., Vedder A.C., Aerts J.M., Hollak C.E. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin. Chim. Acta*. 2005; 353 (1-2): 201-3. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.10.019.
- Gal A., Hughes D.A., Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011; 34 (2): 509-14. DOI:10.1007/s10545-010-9261-9.
- Gelb M.H. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: methodologies, screen positive rates, normalization of datasets, second-tier tests, and post-analysis tools. *Int. J. Neonatal. Screen*. 2018; 4 (3): 23. DOI: 10.3390/ijns4030023.
- Lukacs Z., Nieves Cobos P., Mengel E., Hartung R., Beck M., Deschauer M. et al. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2010; 33 (1): 43-50. DOI: 10.1007/s10545-009-9003-z.
- Schielen P.C.J.I., Kemper E.A., Gelb M.H. Newborn Screening for lysosomal storage diseases: a concise review of the literature on screening methods, therapeutic possibilities and regional programs. *Int. J. Neonatal. Screen*. 2017; 3 (2): 6. DOI: 10.3390/ijns3020006.
- Schmidt W. Optical spectroscopy in chemistry and life sciences: an introduction. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Базарный В.В.¹, Сиденкова А.П.¹, Соснин Д.Ю.²

ЛАКТОФЕРРИН РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ В НОРМЕ И ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ЛАБОРАТОРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620014, Екатеринбург, Россия;

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия

В статье рассматриваются вопросы клинической ценности определения белка лактоферрина в ротовой жидкости – одного из представителей протеома слюны. Обзор основан на анализе современной литературы, включающей систематические обзоры, результаты многоцентровых проспективных исследований, обзорные и оригинальные статьи ведущих специалистов в этой области, представленных в базах данных PubMed, Scopus, CyberLeninka. Освещены проблемы преаналитического этапа, методы определения лактоферрина и приведены сведения о его содержании в смешанной слюне по данным различных авторов. Особое внимание уделено клинко-диагностическому значению уровня слюварного лактоферрина при болезни Альцгеймера. По мнению большинства авторов, диагностическая чувствительность данного параметра составляет от 87 до 100%. Показаны некоторые механизмы взаимосвязи данного белка и центральной нервной системы (ЦНС). В заключении делается вывод о том, что слюварный лактоферрин может являться «индикатором» формирования амилоидных бляшек и может рассматриваться в качестве одного из надежных биомаркеров болезни Альцгеймера. Это мнение базируется как на фундаментальных представлениях о глобальной взаимосвязи врожденного иммунитета и ЦНС, так и на клинических данных. Особое достоинство данного лабораторного теста заключается в его неинвазивности, что делает его более предпочтительным в сравнении с определением амилоида и тау-белков в ликворе и крови.

Ключевые слова: ротовая жидкость; слюна; лактоферрин; болезнь Альцгеймера.

Для цитирования: Базарный В.В., Сиденкова А.П., Соснин Д.Ю. Лактоферрин ротовой жидкости в норме и при болезни Альцгеймера: лабораторно-диагностические аспекты (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 207-212. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-207-212>

Для корреспонденции: Соснин Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, проф. каф. факультетской терапии № 2, проф. патологии и клин. лаб. диагностики; e-mail: sosnin_dm@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Финансирование осуществлено за счет средств государственного задания на научно-исследовательскую работу «Предикторы старения в полости рта и возможность их использования для персонализации стоматологического лечения» (№ госрегистрации АААА-А18-118042890061-4).

Поступила 26.11.2021

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 17.04.2022

Bazarnyi V.V.¹, Sidenkova A.P.¹, Sosnin D.Yu.²

LACTOFERRIN OF ORAL FLUID IS HEALTHY AND IN ALZHEIMER'S DISEASE: LABORATORY AND DIAGNOSTIC ASPECTS (REVIEW OF LITERATURE)

¹ Ural State Medical University, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation;

² E.A. Vagner Perm State Medical University, 614990, Perm, Russian Federation

The article discusses the clinical value of determining the lactoferrin protein in oral fluid – one of the representatives of the saliva proteome. The review is based on the analysis of modern literature, including systematic reviews, the results of multicenter prospective studies, review and original articles by leading experts in this field, presented in the databases PubMed, Scopus, CyberLeninka. The problems of the preanalytical stage, methods for determining lactoferrin are highlighted and information about its content in mixed saliva according to various authors is provided. Special attention is paid to the clinical and diagnostic value of the level of salivary lactoferrin in Alzheimer's disease. According to most authors, the diagnostic sensitivity of this parameter ranges from 87 to 100%. Some mechanisms of the relationship between this protein and the central nervous system (CNS) are shown. In conclusion, it is concluded that salivary lactoferrin can be an "indicator" of the formation of amyloid plaques and can be considered as one of the reliable biomarkers of Alzheimer's disease. This opinion is based both on fundamental ideas about the global relationship between innate immunity and the central nervous system, and on clinical data. The special advantage of this laboratory test is its non-invasiveness, which makes it more preferable in comparison with the determination of amyloid and tau proteins in the cerebrospinal fluid and blood.

Key words: oral fluid; saliva; lactoferrin; Alzheimer's disease.

For citation: Bazarnyi V.V., Sidenkova A.P., Sosnin D.Yu. Lactoferrin of oral fluid is normal and in Alzheimer's disease: laboratory and diagnostic aspects (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 207-212 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-207-212>

For correspondence: Sosnin D. Yu., Dr. Sci. Med., Professor of the Department of Faculty therapy No. 2, occupational pathology and clinical laboratory diagnostics; e-mail: sosnin_dm@mail.ru

Information about authors:

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>;
Sidenkova A.P., <https://orcid.org/0000-0001-5142-3992>;
Sosnin D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1232-8826>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 26.11.2021

Accepted 25.01.2022

Published 17.04.2022

Ротовая жидкость (РЖ, смешанная слюна) представляет собой смесь секретов слюнных желез, десневой жидкости, а также продуктов слизистой оболочки полости рта (СОПР) и компонентов сыворотки крови, иногда она содержит перимплантную щелевую жидкость, примесь бронхиальных и назальных секретов. В составе РЖ заметную долю составляют пептиды. Существует мнение, что они формируют уникальный профиль биомаркеров патологических процессов как в полости рта, так и системных заболеваний. К последним относятся онкопатология, сердечно-сосудистые заболевания, аутоиммунные болезни, нейродегенеративные заболевания, респираторные инфекции и многие другие [1–4].

За последние годы опубликовано несколько отличных обзоров, посвященных использованию смешанной слюны как диагностической жидкости, получившему название «саливадиагностика». В них убедительно показано, что РЖ является ценным диагностическим биоматериалом. Особую актуальность такой подход имеет благодаря его неинвазивности. Поэтому в настоящее время закономерно высок интерес к изучению саливарного протеома, учитывая значение саливарных белков для распознавания многих заболеваний [5, 6, 7, 8]. Поскольку протеомной стратегии, способной охарактеризовать весь протеом РЖ, не существует, то многие исследования одного и того же заболевания проводились с использованием разных инструментов и экспериментальных дизайнов, поэтому неудивительно, что для одной и той же патологии были предложены и исследованы разные биомаркеры. Диагностическая ценность не всех их убедительно доказана. Поэтому определение индивидуальных белков в РЖ в норме и патологии с последующим расчетом клинической ценности, сохраняет свою актуальность. Одним из таких белков является лактоферрин (ЛФ), содержащийся как в крови, так и в других биожидкостях, в частности – в ротовой. Оценке клинической ценности данного белка как лабораторного параметра, посвящен данный обзор.

Лактоферрин (ЛФ) – железосвязывающий катионный гликопротеин 80 кДа из семейства трансферринов, открытый в 1939 году. Существуют также изоформы (ЛФ-β), которые обладают рибонуклеазной активностью, но не связывают железо. Основными источниками ЛФ в РЖ являются слюнные железы, нейтрофильные гранулоциты, поступающие в полость рта, и эпителиальные клетки СОПР. На сегодняшний день детально расшифрованы структура, механизмы синтеза и биологическое значение ЛФ, чему посвящено достаточное количество научных обзоров. Данному пептиду принадлежит важная роль во всасывании, транспортировке и связывании железа. Его важнейшей особенностью является антимикробная активность. Он обладает положительным суммарным зарядом, то есть при электрофорезе в электрическом поле ведет как катион, и это свой-

ство, по-видимому, является важным фактором, который может привести к связыванию и разрушению мембран микроорганизмов. Важно и то, что ЛФ связывает железо, необходимое для роста многих бактерий. Также возможно его прямое взаимодействие с липополисахаридами бактериальной стенки. ЛФ вызывает активацию фагоцитоза и белков системы комплемента, связывание эндотоксинов. Он активен не только в отношении бактерий, грибов, паразитов и вирусов, но также способен ингибировать накопление прионов [9, 10]. Выраженный противовоспалительный эффект делает его важнейшим белком острой фазы воспаления. На клеточном уровне ЛФ модулирует миграцию, созревание и функции иммунных клеток. Он также обладает антиоксидантными свойствами. В целом, ЛФ является важной составляющей системы неспецифической антимикробной защиты, ему принадлежит важнейшая роль в формировании врожденного и адаптивного секреторного (мукозального, местного) иммунитета слизистых оболочек [11–13]. Вместе с тем известны и неиммунологические свойства этого белка – он опосредованно участвует в регуляции костеобразования, заживления ран, дифференцировки адипоцитов, в регуляции обмена глюкозы [14–17].

ЛФ принимает участие в развитии головного мозга, нейрогенезе, обладает нейтропротективными свойствами, оказывает позитивное влияние на развитие когнитивных функций [18, 19].

Методы определения ЛФ в РЖ. Одним из первых для этой цели использовался метод радиальной иммунодиффузии в агаре или геле агарозы [20]. Хотя метод достаточно прост в выполнении, на его результаты оказывают влияние различные факторы. В частности, ошибки могут быть связаны с тем, что обеспечить абсолютную однородность глубины и плотность агаровой пластины достаточно сложно и это приводит к некоторой гетерогенности диффузии исследуемого вещества. Также не исключены незначительные погрешности при измерении площади кольца преципитации. Кроме того, этот метод не автоматизирован, что делает его трудоемким, плохо стандартизованным и длительным в исполнении, и что важно – он имеет не очень высокую аналитическую чувствительность. Более чувствительным, точным и удобным в лабораторной практике является метод твердофазного гетерогенного ИФА (ELISA). Он имеет предел чувствительности в среднем около 3 нг/мл, а линейная зависимость прослеживается в диапазоне концентраций от 5 до 600 нг/мл [21]. Данный метод является наиболее распространенным среди тех, которые используются в большинстве исследований. Кроме того, в литературе описаны такие методы определения ЛФ в биожидкостях как спектроскопия в ультрафиолетовом спектре (220 – 280 нм), двойной электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография, ка-

пиллярный электрофорез, «микрофлюидный анализ» на бумаге, применение иммунохимических биосенсоров, поверхностный плазмонный резонанс [22, 23].

Поскольку исследование ЛФ в РЖ еще не стало рутинным тестом, но имеет определенные перспективы для внедрения в практику, следует обратить внимание на некоторые методические вопросы, прежде всего это относится к соблюдению всех требований преаналитического этапа [24,25]. Так, содержание ЛФ в образцах РЖ, хранившихся при 4°C, оставалось стабильным в течение 10 дней, а затем значительно снижалось. Однократное замораживание/оттаивание не влияло на концентрацию данного белка, но его концентрация резко падала после двух циклов замораживания/оттаивания. Учтывая, что значения ЛФ в пробах могут зависеть от фактора разведения, с целью получения адекватных результатов исследования, можно определять содержание общего белка в пробе с последующим пересчетом концентрации ЛФ на мг белка.

Специальных исследований, посвященных установлению референсных интервалов для саливарного ЛФ, нами не выявлено. В табл. 1 мы приводим некоторые примеры «нормальных значений» содержания ЛФ в РЖ, полученные при обследовании «контрольных» групп в различных исследованиях.

Данные, представленные в табл. 1, получены методом твердофазного гетерогенного ИФА. Они свидетельствуют о большом разбросе значений уровня саливарного ЛФ у практически здоровых добровольцев; результаты варьировали в диапазоне от 3,4 до 16,4 мкг/мл. Это диктует необходимость определения в будущем четких референсных величин.

Следует отметить, что на концентрацию саливарного ЛФ в физиологических условиях оказывают влияние различные факторы. Например, установлено зависимое от возраста снижение уровня ЛФ после 40 лет. В то же время существенных суточных колебаний и гендерных различий не отмечено [25], однако, при этом в единичной публикации приведены данные о корреляции концентрации ЛФ с продолжительностью сна [33]. Уровень саливарного ЛФ значительно повышен у курильщиков по сравнению с некурящими [34]. Показано заметное влияние физической активности на уровень ЛФ – он повышался даже после умеренной физической активности в сравнении с теми, кто ведет сидячий образ жизни, а также у спортсменов-любителей после пробежек, у спортсменов-марафонцев, в условиях гипоксических нагрузок [35–37].

Таким образом, в литературе продемонстрирована зависимость содержания ЛФ от возраста, физической активности и некоторых вредных привычек (курения).

Не меньший интерес представляют данные о значении уровня саливарного ЛФ в диагностике различных заболеваний. В частности, и нашими исследованиями, и другими авторами показано изменение уровня ЛФ (преимущественно – повышение) при хроническом пародоните, кариесе, болезнях желудочно-кишечного тракта, ревматических болезнях, ассоциированным с сахарным диабетом инфарктом миокарда, после трансплантации костного мозга и т.д. [20, 29, 31, 32, 38–41].

Особый интерес представляют данные о возможной роли саливарного ЛФ как потенциального биомаркера болезни Альцгеймера (БА). Интерес к данной патологии все возрастает в связи с высокими темпами демографического старения, характерными для нашего времени. Это, в свою очередь, взаимосвязано с увеличением распространенности возраст-ассоциированных заболеваний. Среди них одной из актуальных проблем являются нейродегенеративные заболевания, к которым относится болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (БА) — это хроническое нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной деменции у лиц старшего возраста. Оно характеризуется, прежде всего, неуклонным прогрессирующим расстройством памяти и высших корковых функций вплоть до тотального распада интеллекта и психической деятельности в целом, а также характерным комплексом нейропатологических признаков, нарушениями поведения и функциональной активности больного в повседневной жизни. Считается, что в развитии заболевания играют роль несколько факторов риска – возраст, генетические факторы, травмы головы, сосудистые заболевания, инфекции и факторы окружающей среды [42–44].

В настоящее время рассматриваются две модели развития заболевания – холинергическая и амилоидная. Большинство исследователей следуют идее амилоидной концепции БА, так как она охватывает всю структуру болезни – на нейрохимическом, субстратном и клиническом уровнях, что позволяет соотносить нарушенную функцию мозга с объемом его морфологического поражения. В соответствии с данной моделью, патогенез БА связывают с проявлением агрегированных амилоидных бляшек, содержащих внеклеточные гидрофобные отложения амилоидных β -пептидов (А β 42) в теле нейрона, а также с фрагментами более крупного белка-предшественника амилоида (APP), который экспрессируется практически во всех тканях млекопитающих. Другим важным патогенетическим механизмом патогенеза БА являются нейрофибриллярные клубочки (NFT), образующие внутринейрональные пучки парных спиральных филаментов (PHF), состоящих из агрегатов гиперфосфорилированного и патологически свернутого тау-белка в аномально фосфорилированной форме. В результате отложения в гиппокампальных нейронах β -амилоида и формирования нейрофибриллярных клубков происходит поражение структур гиппокампа, что и определяет основные клинические проявления БА, начиная с ранних ее этапов. Степень потери нейронов в гиппокампе вследствие перераспределения внутриклеточного тау-белка, его взаимодействиями на терминалах нейронов и дендритах с β -амилоидным белком или обоими, коррелирует с выраженностью когнитивного дефицита при БА [27, 44 – 46].

Таблица 1

Содержание лактоферрина в смешанной слюне практически здоровых лиц

Контингент обследуемых и временной период (страна, годы)	Нормальное значение лактоферрина в группе здоровых	Авторы, ссылка
Испания, 2020	7,7 $\pm$ 2,3 мкг/мл 6,2 $\pm$ 2,9 мкг/мл	[26, 27]
Узбекистан, 2015	10,9 $\pm$ 0,87 мкг/мл	[28]
Россия, 2015	7,3 $\pm$ 1,1 мкг/мл	[29]
США, 2021	16,4 $\pm$ 6,6 мкг/мл	[30]
Польша, 2020	3,4 $\pm$ 0,8 мкг/мл	[31]
Швейцария, 2021	9,3 $\pm$ 1,9 мкг/мл	[32]

Диагноз БА формируется на основе анализа клинических данных, нейропсихологического тестирования и других. Однако, в научной литературе отчетливо виден интерес к выявлению биомаркеров БА. ЛФ рассматривается как один из возможных кандидатов на эту роль.

Впервые связь ЛФ и БА была отмечена, вероятно, в публикации А.Р. Osmund и соавт. [47], где отмечалось, что ЛФ был выявлен в амилоидных бляшках, а также нейронах пациентов, чего не было у здоровых людей. Позднее это было подтверждено и другими авторами [19, 48]. На выявленную взаимосвязь описанного белка с патологией ЦНС указывают описанные выше факты, а также наличие рецепторов к ЛФ в ткани мозга, изменения его концентрации в биологических жидкостях и тканях организма при заболеваниях нервной системы [30, 49].

Для оценки клинической ценности определения ЛФ в ротовой жидкости при БА нами был проведен анализ 12 статей за 2017-2021 гг., размещенных на сайте PubMed, [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/], а также Scopus, CyberLeninka. Из них 2 статьи были систематическими обзорами, 1 статья содержала результаты проспективного многоцентрового исследования, остальные были обзорными литературы и оригинальными полнотекстовыми статьями.

Одним из убедительных следует признать исследование E. Sagot и соавт. [50], включающее 274 человек, наблюдавшихся в неврологической клинике (Испания). Пациенты были распределены на 4 группы в соответствии с их когнитивным статусом: умеренные когнитивные нарушения (УКГ, MCI), когнитивные нарушения на фоне болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП) и контрольная группа без нарушений когнитивных функций. На первом этапе обнаружили, что ЛФ был существенно снижен в первых двух группах (MCI и БА). Его уровень, также как и Аβ, сильно коррелировал с диагнозом БА. На втором этапе подтвердили эффективность саливарного ЛФ в качестве биомаркера БА в двух слепых и независимых группах. В анализе данных был использован ROC-анализ, который позволил отличить группу пациентов с БА и умеренными когнитивными нарушениями от контрольной группы с ДЧ и ДЧС 100% при cut-off 7,43 мкг/мл ЛФ. Была также выявлена выраженная достоверная корреляция уровня саливарного ЛФ с содержанием амилоида и тау белка в ликворе. У пациентов с БП уровень ЛФ в РЖ был выше, чем в контрольной группе и при БА.

В одном из систематических обзоров H.S. Gleerup и соавт. [51] проанализированы результаты 15-ти исследований. В десяти из них была показана высокая клиническая значимость белка Аβ42 и тау-белка для диагностики БА. Наряду с этим был оценен ряд других биомаркеров. В частности, в одном исследовании был обнаружен сниженный уровень ЛФ в слюне у пациентов с БА и MCI по сравнению со здоровыми. На этом основании авторы предположили, что наряду с известными биомаркерами БА – Аβ42 и тау-белка, уровень саливарного ЛФ облада-

ет определенным диагностическим потенциалом и может быть экономичным и эффективным лабораторным маркером данного заболевания, что безусловно требовало новых исследований. Однако двумя годами позже, эти же авторы опубликовали данные о том, что не показано существенной диагностической ценности саливарного ЛФ при БА [30]. Но это не перечеркнуло все полученные ранее убедительные данные и не остановило дальнейших исследований.

Особого внимания заслуживают результаты двух проспективных, перекрестных, многоцентровых исследований, проведенных в Испании, в которые были включены 250 пациентов с БА с 2014 по 2018 гг. [26]. В них было установлено, что более высокие уровни саливарного ЛФ были связаны с более высокими показателями шкалы MMSE ($r=0,69$; $p<0,01$) и более низкими показателями шкалы CDR ($r=-0,59$; $p<0,01$) у пациентов. Обе шкалы позволяют оценить когнитивное здоровье. При этом не было обнаружено корреляций между ЛФ и длительностью заболевания. Особый интерес представляют данные, полученные в указанном исследовании, о клинической ценности уровня ЛФ в слюне у пациентов с БА и умеренными когнитивными нарушениями (MCI). Пациенты были подразделены на 2 группы – с выявленным при позитронно-эмиссионной томографии амилоидом (ПЭТ+) и с его отсутствием (ПЭТ-). Уровень ЛФ был существенно ниже при БА и при умеренных когнитивных нарушениях в группах пациентов ПЭТ+, в сравнении с контролем и лобно-височной деменцией. Построение характеристической кривой (ROC) позволило определить диагностическую чувствительность (ДЧ) теста определения саливарного ЛФ, его специфичность (ДС), а также площадь под ROC-кривой (AUC – характеристика диагностической ценности) (табл. 2). С помощью индекса Юдена была определена величина cut-off – 5,63 мкг/мл ЛФ, которая отличалась от указанной в другой, приведенной выше работе [50].

Более низкая ДС может быть объяснена тем, что пациенты с умеренными когнитивными нарушениями и отрицательным амилоидным ПЭТ, представляют собой слишком гетерогенную группу. Тем не менее, полученные результаты показали, что саливарный ЛФ при установленной величине cut-off способен с высокой точностью верифицировать пациентов с умеренными когнитивными нарушениями/БА, а также позитивных в ПЭТ тесте на амилоид. Показанное авторами снижение уровня ЛФ в РЖ скорее всего специфично для БА, поскольку оно не встречалось у здоровых пожилых людей или при лобно-височной деменции.

Еще в одном исследовании L. Reseto и соавт. [27] показали, что саливарный ЛФ при старении имеет отрицательную корреляцию с «нагрузкой» амилоидным белком Аβ42, особенно в парietoльно-височных областях левого полушария и с ухудшением памяти. Эти результаты также подтверждают значение ЛФ как биомаркера повреждения головного мозга при нормальном старении, и спо-

Таблица 2

Диагностические характеристики уровня саливарного лактоферрина

Группы пациентов	БА/MCI-ПЭТ+ в сравнении с контролем	MCI-ПЭТ+ в сравнении с контролем	БА/MCI-ПЭТ+ в сравнении с ПЭТ-
AUC	0,95	0,93	0,88
ДЧ	87	87	82
ДС	92	93	83

способствуют расширению нашего понимания его роли при БА. Представленные авторами данные соответствуют ранее предложенной гипотезе о том, снижение ЛФ в РЖ, наблюдаемое на продромальной и клинической стадиях БА, может указывать на ранние иммунологические нарушения, которые, в конечном итоге, повышают риск БА.

Обсуждая полученные данные, можно полагать, что низкий уровень ЛФ в ротовой полости способствует дисбиозу, который, в свою очередь, вызывает длительные инфекции и провоспалительную реакцию, которая ослабляет гематоэнцефалический барьер, способствуя колонизации ткани мозга бактериями пародонта, приводящую к иммунной дисфункции и ускоряя нейровоспаление, развитие БА. Другими словами, снижение уровня ЛФ в РЖ может быть триггером орального дисбиоза, вызывающего хронический воспалительный процесс, способствующий, в свою очередь, развитию БА. На этом основании можно полагать, что ЛФ выполняет функцию индикатора амилоидных бляшек [18, 52 – 54].

Проведенные исследования дают основание считать, что определение биомаркеров в слюне остается актуальной и практически важной задачей, а определение ЛФ ротовой жидкости выходит на первую линию среди информативных и неинвазивных показателей лабораторной диагностики БА. Используемые в настоящее время доклинические биомаркеры, такие, как бета-амилоид (A β 42) и уровни тау белка в спинномозговой жидкости и нейровизуализация, не обладают высокой достоверностью прогнозирования в клинике, являются дорогостоящими и инвазивными. Поэтому многие авторы считают, что ЛФ ротовой жидкости может стать многообещающим маркером нейродегенеративных заболеваний, определение которого в РЖ является неинвазивным, экономичным и достаточно точным тестом в диагностике БА. Это мнение базируется как на фундаментальных представлениях о глобальной взаимосвязи врожденного иммунитета (и, в частности, саливарного ЛФ) и ЦНС, так и на клинических данных, обработанных с помощью статистических методов (ROC-анализ и другие), делающих эти выводы обоснованными [19, 55]. Особое преимущество определения любых белков РЖ состоит в неинвазивности, что, по оригинальному выражению К.Е. Касзор-Урбанович и соавт. [56], «представляет собой Святой Грааль для раннего выявления заболеваний», делая этим саливадиагностику клинической реальностью.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 23, 25 – 27, 30 – 37, 39 – 56 см. REFERENCES)

1. Базарный В.В., Сиденкова А.П., Резайкин А.В., Мякотных В.С., Боровкова Т.А., Селькина Е.О. и др. Возможность использования результатов исследования ротовой жидкости и буккального эпителия в диагностике болезни Альцгеймера. *Успехи геронтологии*. 2021; 34(4): 550-7.
24. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю. Лабораторное исследование буккального эпителия и ротовой жидкости. Екатеринбург: УГМУ; 2020.
28. Шодиева Ш.Ш., Алимов А.С., Хаджиметов А.А. Характер изменений белка острой фазы – лактоферрина в слюне при пародонтите различной степени тяжести. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 8: 694-6.
29. Базарный В.В., Журавлев В.П., Мандра Ю.В., Николаева А.А., Ваневская Е.А., Полушина Л.Г. Лактоферрин в ротовой жидкости пациентов с герпесвирусной инфекцией. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2014; 1(47): 48-9.

38. Базарный В.В., Береснева Н.С., Ломова О.Л., Санникова Н.Е. Клинико-диагностическое значение определения лактоферрина в ротовой жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 10: 36.

REFERENCES

1. Bazarnyi V.V., Sidenkova A.P., Rezaikin A.V., Myakotnykh V.S., Borovkova T.A., Sel'kina E.O. et al. The possibility of using the results of the study of oral fluid and buccal epithelium in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Uspekhi gerontologii*. 2021; 34(4): 550-7. (in Russian)
2. Melguizo-Rodríguez L., Costela-Ruiz V.J., Manzano-Moreno F.J., Ruiz C., Illescas-Montes R. Salivary Biomarkers and Their Application in the Diagnosis and Monitoring of the Most Common Oral Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(14): 5173.
3. Castagnola M., Scarano E., Passali G.C., Messina I., Cabras T., Iavarone F. et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2017; 37(2): 94-101.
4. Chojnowska S., Baran T., Wilińska I., Sienicka P., Cabaj-Wiater I., Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv. Med. Sci.* 2018; 63(1): 185-91.
5. Khurshid Z., Warsi I., Moin S.F., Slowey P.D., Latif M., Zohaib S. et al. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Adv. Clin. Chem.* 2021; 100: 205-53.
6. Zhang C.Z., Cheng X.Q., Li J.Y., Zhang P., Yi P., Xu X. et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int. J. Oral. Sci.* 2016; 8(3): 133-7.
7. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., Wong D.T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 781-91.
8. Ligtenberg A.J.M. Saliva diagnostics: a summary of the expanded possibilities. *Ned. Tijdschr Tandheelkd.* 2020; 127(10): 561-6.
9. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1820(3): 226-36.
10. Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem. Cell Biol.* 2012; 90(3): 252-68.
11. Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59(4): 580-96.
12. Fábán T.K., Hermann P., Beck A., Fejérdy P., Fábán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(4): 4295-4320.
13. Kell D.B., Heyden E.L., Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol.* 2020; 11: 1221.
14. Hao L., Shan Q., Wei J., Ma F., Sun P. Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2019; 20(2): 139-44.
15. Icriverzi M., Dinca V., Moisei M., Evans R.W., Trif M., Roseanu A. Lactoferrin in Bone Tissue Regeneration. *Curr. Med. Chem.* 2020; 27(6): 838-53.
16. Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., Levy E. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016; 24(14): 813-36.
17. Takayama Y., Aoki R. Roles of lactoferrin on skin wound healing. *Biochem. Cell Biol.* 2012; 90(3): 497-503.
18. Bermejo-Pareja F., Del Ser T., Valenti M., de la Fuente M., Bartolome F., Carro E. Salivary lactoferrin as biomarker for Alzheimer's disease: Brain-immunity interactions. *Alzheimers Dement.* 2020; 16(8): 1196-1204.
19. Li Y.Q., Guo C. A Review on Lactoferrin and Central Nervous System Diseases. *Cells.* 2021; 10(7): 1810.
20. Janssen P.T., van Bijsterveld O.P. A simple test for lacrimal gland function: A tear lactoferrin assay by radial immunodiffusion. *Graef's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1983; 220: 171-4.
21. Liu L., Kong D., Xing C., Zhang X., Kuang H., Xu C. Sandwich immunoassay for lactoferrin detection in milk powder. *Anal. Methods.* 2014; 6: 4742-5.
22. Mikula E. Recent Advancements in Electrochemical Biosensors for Alzheimer's Disease Biomarkers Detection. *Curr. Med. Chem.* 2021; 28(20): 4049-73.

BIOCHEMISTRY

23. Zhang Y., Lu C., Zhang J. Lactoferrin and Its Detection Methods: A Review. *Nutrients*. 2021; 13(8): 2492.
24. Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu. Laboratory examination of buccal epithelium and oral fluid. Ekaterinburg:Ural'skiy gosmeduniversitet; 2020. (in Russian)
25. Bartolome F., Orive G., Carro E. Standardizing salivary lactoferrin measurement to obtain a robust diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2021; 13(1): e12173.
26. González-Sánchez M., Bartolome F., Antequera D., Puertas-Martin V., González P., Gómez-Grande A. et al. Decreased salivary lactoferrin levels are specific to Alzheimer's disease. *EBioMedicine*. 2020; 57: 102834.
27. Reseco L., Atienza M., Fernandez-Alvarez M., Carro E., Cantero J.L. Salivary lactoferrin is associated with cortical amyloid-beta load, cortical integrity, and memory in aging. *Alzheimers Res. Ther.* 2021; 13(1): 150.
28. Shodieva Sh.Sh., Alimov A.S., Khadzhimetov A.A. The nature of changes in the acute phase protein – lactoferrin in saliva with periodontitis of varying severity. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 8: 694-6. (in Russian)
29. Bazarnyi V.V., Zhuravlev V.P., Mandra Yu.V., Nikolaeva A.A., Vanevskaya E.A., Polushina L.G. Lactoferrin in the oral fluid of patients with herpesvirus infection. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; 1(47): 48-9. (in Russian)
30. Gleerup H.S., Jensen C.S., Høgh P., Hasselbalch S.G., Simonsen A.H. Lactoferrin in cerebrospinal fluid and saliva is not a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease in a mixed memory clinic population. *EBioMedicine*. 2021; 67: 103361.
31. Hildebrandt T., Zawilska A., Trzcionka A., Tanasiewicz M., Mazurek H., Świętochowska E. Estimation of Proinflammatory Factors in the Saliva of Adult Patients with Cystic Fibrosis and Dental Caries. *Medicina (Kaunas)*. 2020; 56(11): 612.
32. Ramenzoni L.L., Lehner M.P., Kaufmann M.E., Wiedemeier D., Attin T., Schmidlin P.R. Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(3): 571.
33. Ide M., Saruta J., To M., Yamamoto Y., Sugimoto M., Fuchida S. et al. Relationship between salivary immunoglobulin A, lactoferrin and lysozyme flow rates and lifestyle factors in Japanese children: a cross-sectional study. *Acta Odontol. Scand*. 2016; 74(7): 576-83.
34. Nishida N., Yamamoto Y., Tanaka M., Kataoka K., Kuboniwa M., Nakayama K. et al. Association between involuntary smoking and salivary markers related to periodontitis: a 2-year longitudinal study. *J. Periodontol*. 2008; 79(12): 2233-40.
35. Gillum T., Kuennen M., McKenna Z., Castillo M., Jordan-Patterson A., Bohnert C. Exercise increases lactoferrin, but decreases lysozyme in salivary granulocytes. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2017; 117(5): 1047-51.
36. Svendsen I.E., Hem E., Gleeson M. Effect of acute exercise and hypoxia on markers of systemic and mucosal immunity. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2016; 116: 1219-29.
37. Santos J.M.B.D., Foster R., Jonckheere A.C., Rossi M., Luna J.L.A., Katekaru C.M. et al. Outdoor Endurance Training with Air Pollutant Exposure Versus Sedentary Lifestyle: A Comparison of Airway Immune Responses. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(22): 4418.
38. Bazarnyi V.V., Beresneva N.S., Lomova O.L., Sannikova N.E. Clinical and diagnostic significance of the determination of lactoferrin in oral fluid. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2011; 10: 36. (in Russian)
39. Janšáková K., Escudier M., Tóthová E., Proctor G. Salivary changes in oxidative stress related to inflammation in oral and gastrointestinal diseases. *Oral. Dis*. 2021; 27(2): 280-9.
40. Li C., Liu Z. Bioinformatic Analysis for Potential Biomarkers and Therapeutic Targets of T2DM-related MI. *Int. J. Gen. Med*. 2021; 14: 4337-47.
41. van Leeuwen S., Potting C., Huysmans M.-C., Blijlevens N. Salivary Changes before and after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review Biol Blood Marrow. *Transplant*. 2019; 25(6): 1055-61.
42. Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020; 25(24): 5789.
43. Calabrò M., Rinaldi C., Santoro G., Crisafulli C. The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neurosci*. 2020; 8(1): 86-132.
44. Kumar A., Sidhu J., Goyal A., Tsao J.W. Alzheimer Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
45. Ashrafian H., Zadeh E.H., Khan R.H. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *Int. J. Biol. Macromol*. 2021; 167: 382-94.
46. Ittner L.M., Gotz J. Amyloid-Beta and tau – A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2011; 12: 65–72.
47. Osmand A.P., Switzer R.C. Differential distribution of lactoferrin and Alz-50 immunoreactivities in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1990; 11: 284.
48. Kawamata T., Tooyama I., Yamada T., Walker D.G., McGeer P.L. Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. *Am. J. Pathol*. 1993; 142(5): 1574-85.
49. Huang R.Q., Ke W.L., Qu Y.H., Zhu J.H., Pei Y.Y., Jiang C. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain. *J. Biomed. Sci*. 2007; 14(1): 121-8.
50. Carro E., Bartolomé F., Bermejo-Pareja F., Villarejo-Galende A., Molina J.A., Ortiz P. et al. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017; 8: 131-8.
51. Gleerup H.S., Hasselbalch S.G., Simonsen A.H. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: A Systematic Review. *Dis. Markers*. 2019; 2019: 4761054.
52. Kamer A.R., Dasanayake A.P., Craig R.G., Glodzik-Sobanska L., Bry M., de Leon M J. Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. *J. Alzheimers Dis*. 2008; 13(4): 437–49.
53. Olsen I., Singhrao S.K. Low levels of salivary lactoferrin may affect oral dysbiosis and contribute to Alzheimer's disease: A hypothesis. *Med. Hypotheses*. 2021; 146: 110393.
54. Sweeney M.D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A.R., Zlokovic B.V. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. *Physiol. Rev*. 2019; 99(1): 21–78.
55. Farah R., Haraty H., Salame Z., Fares Y., Ojcus D.M., Said Sadier N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Biomed. J*. 2018; 41(2): 63-87.
56. Kaczor-Urbancowicz K.E., Martin Carreras-Presas C., Aro K., Tu M., Garcia-Godoy F., Wong D.T. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2017; 242(5): 459-72.

ГЕМАТОЛОГИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Блиндарь В.Н.¹, Зубрихина Г.Н.¹, Давыдова Т.В.¹, Добровольская М.М.¹, Хагажеева М.Н.¹, Снеговой А.В.², Любимова Н.В.¹, Кушлинский Н.Е.¹, Рябчиков Д.А.¹

ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА И АДЕКВАТНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ АДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115552, Москва, Россия;

²ФГБОУ «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.Е. Евдокимова» Минздрава РФ, 127206, Москва, Россия

Ранняя и адекватная коррекция анемического синдрома (АС) у онкологических больных может предупредить ухудшение качества жизни и рассматриваться как резерв для повышения эффективности лечения рака молочной железы (РМЖ). Цель исследования – оценка статуса железа с помощью современных методов феррокинетики у пациенток РМЖ на фоне адъювантной химиотерапии для ранней диагностики и адекватного лечения АС.

В исследование включили 21 пациентку РМЖ, с относительно благоприятным прогнозом, с люминальным типом А и В (Her 2/neu положительный или отрицательный), трижды негативным типом. Обследование проведено в послеоперационном периоде, на фоне адъювантной химиотерапии. Изучали основные метаболиты феррокинетики: гепсидин 25 (ГП25); ферритин (ФР); растворимые рецепторы трансферрина (рРТФ); трансферин (ТРФ); железо (Fe); эритропоэтин (ЭПО); показатели СРБ и ИЛ-6. Проводилась коррекция АС (феринжескт, эпотин-альфа, В₁₂). У 10 (47,6%) пациенток с РМЖ выявлен АС. У большинства из них диагностирована ЖДА с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов, низкой концентрацией ФР, Fe, ГП25, ИЛ-6, СРБ и высоким уровнем ТРФ и рРТФ. У отдельных пациенток установлен функциональный дефицит железа (ФДЖ). В отличие от пациенток с ЖДА, у них отмечались высокая концентрация ФР, СРБ и значительная продукция ГП25, ИЛ-6. Уровень ЭПО не был оптимальным для большинства пациенток с АС. В единичных случаях, на фоне лечения рекомбинантными эритропоэтинами, выявили дефицит витамина В₁₂ (цианокобаламина).

Рациональное использование препаратов железа, витаминов, рекомбинантных форм ЭПО позволило восстановить метаболизм Fe, стабилизировать уровень гемоглобина, а также улучшить состояние большинства больных РМЖ на фоне адъювантной химиотерапии. Полученные данные по ИЛ-6, ГП25, СРБ свидетельствуют о некоторой взаимосвязи их в развитии анемии с ФДЖ у больных РМЖ и, необходимости дальнейшего изучения особенностей метаболизма железа онкологических больных.

Ключевые слова: метаболизм железа; рак молочной железы; гепсидин 25; интерлейкин-6; С-реактивный белок; ферритин; эритропоэтин; ретикулоциты.

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н., Снеговой А.В., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Рябчиков Д.А. Оценка нарушений метаболизма железа и адекватности лечения анемического синдрома у больных раком молочной железы на фоне химиотерапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 213-218. DOI:<https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-213-218>

Для корреспонденции: Блиндарь Валентина Николаевна, д-р биол. наук; e-mail: bld51@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Поступила 12.01.2022

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 17.04.2022

Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Dobrovol'skaya M.M., Khagazheeva M.N., Snegovoy A.V., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Ryabchikov D.A.

ASSESSMENT OF IRON METABOLISM DISORDERS AND ADEQUATE TREATMENT OF ANEMIC SYNDROME IN PATIENTS WITH BREAST CANCER ON THE BACKGROUND OF ADJUVANT CHEMOTHERAPY

¹FGBU National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhin "Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation;

²FGBOU "Moscow State University of Medicine and Dentistry A.E. Evdokimov" Ministry of Health of the Russian Federation, 127206, Moscow, Russian Federation

Early and adequate correction of the anemic syndrome (AS) of cancer patients can prevent deterioration in the quality of life and be considered as a reserve for increasing the effectiveness of treatment for breast cancer (BC). The aim of the study was to assess the status of iron using modern methods of ferrokinetics in breast cancer patients on the background of adjuvant chemotherapy for early diagnosis and adequate treatment of AS.

The object of the study included 21 breast cancer patients with a relatively favorable prognosis, with luminal types A and B (Her 2 / neu positive or negative), three times negative type. The examination was carried out in the postoperative period, against the background of adjuvant chemotherapy. The main metabolites of ferrokinetics were studied: hepcidin 25 (GP25); ferritin (FR); soluble transferrin receptors (rTRP); transferrin (TRF); iron (Fe); erythropoietin (EPO); CRP and IL-6 indicators. AC correction was performed (ferinject, epotin-alpha, B₁₂). 10 (47.6%) patients with breast cancer had AS. Most of them were diagnosed with IDA with microcytic, hypochromic characteristics of erythrocytes, low concentration of FR, Fe, GP25, IL-6, CRP, and high levels of TRP and rTRP. Functional iron deficiency (FDF) was established in some patients. In contrast to patients with IDA, they had a high concentration of FR, CRP and significant production of GP25, IL-6. The EPO level was not optimal for the majority of patients with AS. In isolated cases, during treatment with recombinant erythropoietins, a deficiency of vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) was revealed. The rational use of iron preparations, vitamins, and recombinant forms of EPO made it possible to restore Fe metabolism, stabilize the hemoglobin level, and also improve the condition of most breast cancer patients. The obtained data on IL-6, GP25, CRP indicate a certain relationship between them in the development of anemia with VDF in breast cancer patients and the need for further study of the characteristics of iron metabolism in cancer patients.

Key words: iron metabolism; breast cancer; hepcidin 25; interleukin-6; C-reactive protein; ferritin; erythropoietin; reticulocytes.

For citation: Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N., Snegovoy A.V., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Ryabchikov D.A. Assessment of iron metabolism disorders and adequate treatment of anemic syndrome in patients with breast cancer on the background of adjuvant chemotherapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 213-218 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-213-218>

For correspondence: Blindar Valentina Nikolaevna, Dr. biol. sciences, scientific consultant; e-mail: bld51@list.ru

Information about authors:

Blindar V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>;
Zubrikhina G.N., <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>;
Davydova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-5769-3114>;
Dobrovolskaya M.M., <https://orcid.org/0000-0002-8889-5384>;
Khagazheeva M.N., <https://orcid.org/0000-0002-3744-6802>;
Snegovoy A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>;
Lyubimova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;
Ryabchikov D.A., <https://orcid.org/0000-0003-2670-236>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

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

Received 12.01.2022

Accepted 25.01.2022

Published 17.04.2022

Известно, что анемический синдром (АС) является частым осложнением противоопухолевого лечения у онкологических больных. Цитостатики нарушают деление не только опухолевых клеток, но и вызывают миелосупрессию, в том числе эритропоэза. В то же время АС наряду с размером опухоли, негативным рецепторным статусом является значимым прогностическим фактором прогноза общей выживаемости [1, 2]. Ранняя и адекватная коррекция АС может предупредить ухудшение качества жизни больных, в том числе может рассматриваться как резерв для повышения эффективности лечения РМЖ. В исследованиях качества жизни при анемии доказано прямое влияние снижения уровня гемоглобина на утомляемость и остальные параметры качества жизни; нормализация уровня гемоглобина сопровождается достоверным улучшением субъективного состояния больных [1,2].

Цель работы – оценить статус метаболизма железа с помощью современных методов феррокинетики у пациенток РМЖ на фоне адъювантной химиотерапии для ранней диагностики и оценки адекватного лечения АС.

Материал и методы. В группу исследования включили 21 пациентку с РМЖ от 31 до 72 лет, с относительно благоприятным прогнозом. Средний возраст составил (53±2,8) лет, медиана (Me) – 55 лет. I стадия выявлена у 2 больных., II – у 14, III – у 4, IV – у 1 больной. Контрольная группа представлена 30 практически здоровыми женщинами соответствующего возраста. Всего проведено 156 исследований.

Пациенты получали лечение (адъювантная химиотерапия) по программе 4-х курсов АС: доксорубицин 60 мг/м² и циклофосфан 600 мг/м² +/- 12 еженедельных введений паклитаксела 80 мг/м² +/- карбоплатин AUC1,5, либо 4 курса доцетаксел 75 мг/м². Включены в исследование пациенты с люминальным типом А и В (Her 2/neu положительный или отрицательный), трижды негативным типом. Исследование периферической крови проводилось после хирургического лечения и каждого курса химиотерапии (КХТ). Коррекция АС выполнялась в зависимости от этиологии возникновения анемии, лабораторных показателей метаболизма железа и продукции ЭПО: железа (III) гидроксид сахарозный комплекс – внутривенно струйно 200 мг 3 раза в неделю, либо внутривенно капельно 7 мг/кг, однократная доза – не более 500 мг железа, минимальное время введения – 3,5 ч; эритропоэтин-стимулирующие препараты – эпотин альфа 150 МЕ/кг 3 раза в неделю, подкожно 12 000 МЕ; витамин В₁₂ (цианокобаламин) 0,5 мг/мл – 1,0 мл подкожно через день;

Расширенный клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе фирмы «Sysmex» (Япония), в том числе исследовали среднее содержание гемоглобина в ретикулоците (RET-HE). Рассчитывали ретикулоцитарный индекс (RPI reticulocyte production index) по формуле:

$RPI = \text{число ретикулоцитов (\%)} \times \text{HCT} / 0,45$,

где: HCT – гематокрит, 0,45 – нормальное значение гематокрита.

В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание эндогенного ЭПО с использованием наборов фирмы «Biomerica» (США), ГП25 с наборами «Peninsula Laboratories International, Inc.» (США). Для исключения аутоиммунной гемолитической анемии выполняли прямую пробу Кумбса, на основе гелевых технологий (прямой антиглобулиновый тест). Определение свободного гемоглобина в плазме крови было проведено гемиглобинцианидным методом. Результаты оценивали на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer (Финляндия). Подсчитывали лейкоцитарную формулу и детальный анализ морфологии эритроцитов с помощью микроскопа фирмы LEICA (США). Исследование биохимических показателей обмена железа проводилось в сыворотке крови больных на автоматическом анализаторе Cobas c501 фирмы «Roche» (Швейцария). Определение Fe проводилось колориметрическим методом при помощи набора реактивов «Iron Gen.2». Уровни ФР, ТРФ и рРТФ были получены иммунотурбидиметрическими методами с латексным усилением на основе специфических антисывороток при использовании тест-систем «Tina-quant Ferritin Gen 4», «Tina-quant Transferrin ver.2» и «Tina-quant Soluble Transferrin Receptor», соответственно. Определение ИЛ-6 проводили в сыворотке крови при использовании тест-системы «Elecys IL-6» на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария). С-реактивный белок (СРБ) исследовали иммунотурбидиметрическим методом с латексным усилением на основе специфических антисывороток с использованием тест-системы «C-Reactive Protein Gen».

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов MS Excel Biostat, 2016. Для оценки достоверности результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Исследования выполняли в соответствии с принципами Хельсинской Декларации, разработанной Всемирной Медицинской Ассоциацией [3].

Результаты и обсуждение. При анализе параметров клинического анализа крови больные на фоне 6-ти курсов химиотерапии были разделены на 2 группы: 1-я группа с нормальными показателями гемограммы ($n = 11$; 52,4%), 2-я группа с АС ($n = 10$; 47,6 %). *Me* концентрации гемоглобина (HGB) в 1-й группе составила 13,5 г/дл при диапазоне 12,2 – 14,9 г/дл. В литературных данных показано, что абсолютный дефицит Fe устанавливается при снижении концентрации ФР менее 30 нг/мл, несмотря на отсутствие лабораторных признаков показателей железодефицитного эритропоэза [2]. Так, у пациенток без АС перед 1-м курсом ХТ было выявлено снижение показателей ФР менее 30 нг/мл у 4 человек (19%), которое сопровождалось значительной экспрессией белка ГП25 (более 25 нг/мл), что не исключало развитие начальной или латентной стадии АС (ЛДЖ). Остальные параметры, характеризующие метаболизм Fe, существенно не отличались от референсных значений нормы. Известно, что метаболизм Fe у онкологических больных часто нарушается из-за высвобождения провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6 и активации белка ГП25, основного регулятора метаболизма Fe. Повышенный уровень ГП25 приводит к недостаточному поступлению железа и функциональному дефициту Fe из-за интернализации ферропортина, наиболее

важного трансмембранного канала для экспорта железа из эритроцитов и макрофагов в кровотоки [4]. Следует подчеркнуть, что у пациенток с ЛДЖ высокие уровни ГП25 не сопровождались значительной продукцией ИЛ-6, а это значит, что причиной гиперэкспрессии этого белка, в данном случае, могут быть другие источники. Важно отметить, что пациентки с ЛДЖ перешли в статус 2-й группы с АС уже со II-го курса ХТ – 1 пациентка, с III-го – 2 пациентки и с VI-го курса ХТ – 1 пациентка.

Анемия встречалась, как у пациенток с III-IV-й, II-й, так и с I-й стадией заболевания в равной степени. Больные с анемическим синдромом имели одинаковые морфологические признаки эритроцитов крови, а именно микроцитоз ($MCV = 76,3 \pm 8,2$ фл) и гипохромию ($MCH = 25,4 \pm 0,6$ пг). Количество гипохромных эритроцитов ($HYP0 = 17,6 \pm 1,5$ %) статистически значимо превышало норму ($1,5 \pm 0,3$ %) более чем в 10 раз и свидетельствовало о железодефицитном эритропоэзе ($p < 0,012$). Среднее содержание HGB в ретикулоците (RET-HE) также было снижено, в среднем эта величина составила ($26,8 \pm 0,7$ пг), что значительно ниже нормы. Уровень HGB колебался от 8,9 до 11,3 г/дл и в среднем по группе составил ($10,4 \pm 0,9$ г/дл), преобладали больные АС I и II степени тяжести. Из группы с АС у 6 человек выявлена ЖДА, которая характеризовалась классически: низкими показателями Fe; ФР; ГП25; ИЛ-6; СРБ; высокой концентрацией ТРФ; рРТФ, что свидетельствовало об абсолютном дефиците Fe. У 4-х пациенток с III-IV стадией заболевания РМЖ установили АС с функциональным дефицитом железа (ФДЖ). ФДЖ – это ситуация, когда, несмотря на достаточные запасы Fe, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом. По основным характеристикам эритропоэза ЖДА и ФДЖ существенно не отличались (рис. 1).

Однако, наряду с высокой концентрацией ФР, по всем острофазным белкам и ИЛ-6 выявлено различие.

Так ФР, ГП25, ИЛ-6, СРБ были статистически значимы ($p < 0,05$) выше у пациенток с ФДЖ по сравнению с ЖДА (рис. 2).

У большинства больных АС сопровождался недостаточной продукцией ЭПО. Регуляция эритропоэза – сложный процесс, в котором участвуют различные ростовые цитокины. Для окончательной дифференцировки эритроидных клеток необходим ЭПО. Уровень продукции новых эритроцитов в костном мозге соответствует уровню эндогенного ЭПО в плазме крови. У здоровых людей уровень ЭПО в плазме варьирует в пределах 4,3–32,9 МЕ/мл. При диагностике АС был выявлен адекватный его уровень (более 100 МЕ / мл) только у 2-х пациенток РМЖ с ЖДА. У остальных (8 человек) уровень ЭПО находился в пределах от 3,5 до 45,1 МЕ / мл ($17,9 \pm 6,9$ МЕ / мл), *Me* – 6,7 МЕ / мл, т. е. был неадекватным степени тяжести АС у всех пациенток. Более низкую продукцию ЭПО отмечали у пациенток с ФДЖ (менее 4,3 МЕ/мл).

Прямая проба Кумбса была отрицательной у всех пациенток, как с АС, так и без него. Анализ показателей свободного HGB не выявил значительных отклонений от референсных значений нормы (0,09–0,4 г/л).

Пациентки с ЖДА были прослежены в динамике, в процессе лечения АС. Анализ полученных результатов показал восстановление основных метаболитов феррокинетики (см. таблицу). Отмечали постепенное повышение ФР, от очень низкой концентрации перед I КХТ до нормы или несколько выше, начиная со II КХТ и к VI КХТ достигла максимума. При этом высокий уровень

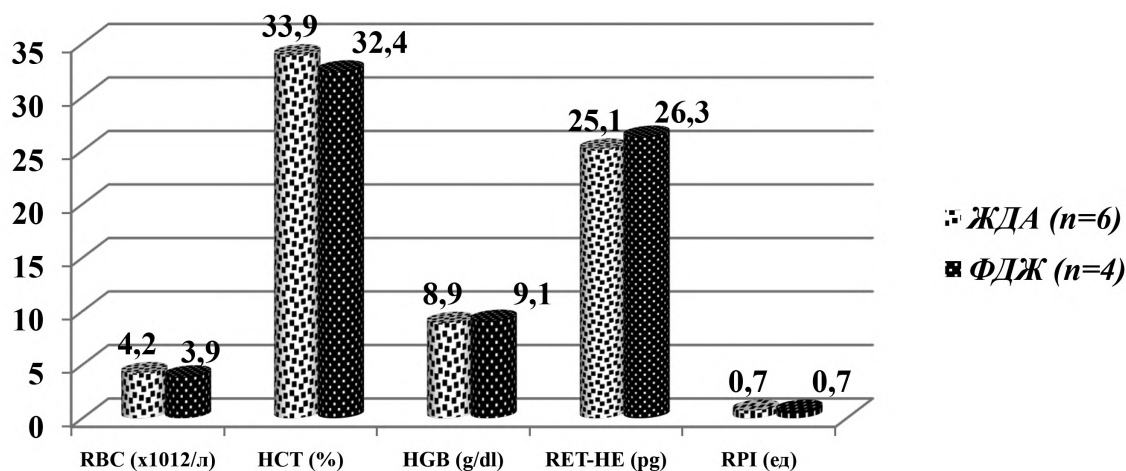


Рис. 1. Основные показатели красной крови у больных РМЖ с разными вариантами анемии.

RBC – эритроциты ($\times 10^{12}/л$); HCT – гематокрит; HGB – гемоглобин; RET-HE – среднее содержание гемоглобина в ретикулоците; RPI – индекс продукции ретикулоцитов.

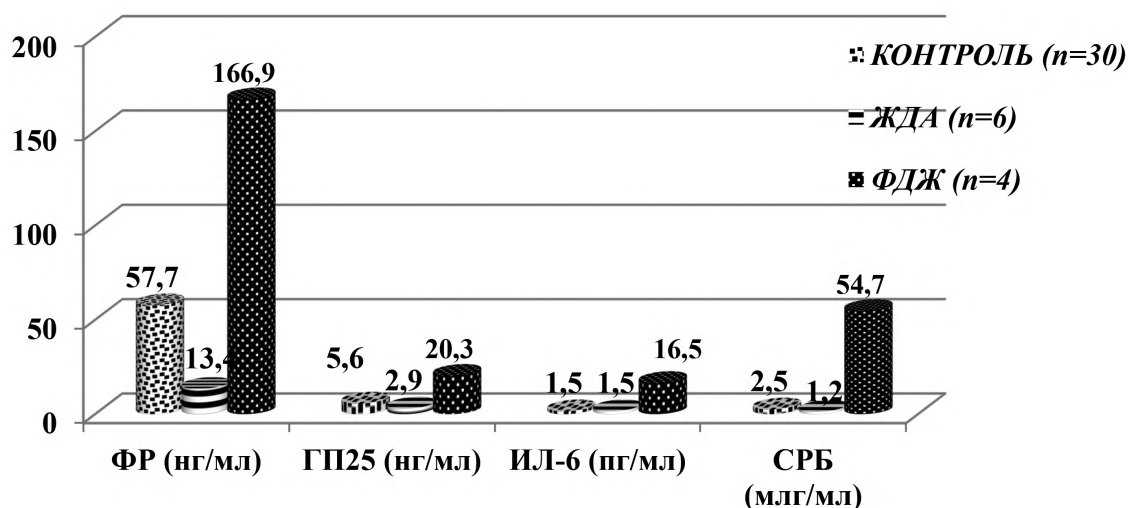


Рис. 2. Показатели концентрации ферритина, гепсидина 25, интерлейкина 6 и С-реактивного белка у больных РМЖ с разными вариантами анемии.

рРТФ перед I-м КХТ снизился до нормальных величин, начиная с IV-го и последующих КХТ.

Такая же закономерность прослеживалась при анализе показателя ТРФ. Он был высоким перед I-II КХТ и восстановился до референсных значений к VI-му курсу ХТ. При этом уровень HGB стабилизировался от очень низких показателей перед I-м КХТ и почти нормальному уровню к VI-му КХТ, что свидетельствовало об эффективности проводимой терапии АС (см. таблицу).

Следует подчеркнуть, что качество жизни пациентов значительно улучшилось в процессе лечения АС. Уменьшилась слабость, исчезли боли в икроножных мышцах, вероятнее всего из-за нормализации миоглобина, восстановился аппетит, нормализовался сон.

Анализ результатов лечения АС у отдельных пациенток с ФДЖ не выявил положительной динамики показателей красной крови на фоне лечения АС в процессе ХТ. Концентрация белка ГП25 у пациенток с ФДЖ оста-

валась высокой на всех КХТ. Можно предположить, что причиной развития ФДЖ может быть гиперпродукция ГП25. Но небольшое число наблюдений не позволяют сделать однозначные выводы.

Известно, что самыми информативными показателями оценки эффективности проводимой терапии АС являются средняя концентрация HGB в ретикулоците (RET-HE) и показатели индекса продукции RET (RPI), отражающие активность эритропоэза. Значительное увеличение числа ретикулоцитов и содержания в них HGB служит достоверным показателем хорошей ответной реакции на лечение препаратами железа, гЕРО, витамином B_{12} и фолиевой кислоты.

Так, при динамическом наблюдении ряда пациенток с ЖДА, которые получали для коррекции АС феринжект, мы отметили постепенное повышение RET-HE, которое достигло нормальных величин к VI КХТ, что свидетельствовало об адекватной терапии ЖДА. Что касается RPI, то этот показатель восстанавливался медлен-

Показатели концентрации ферритина, растворимых рецепторов трансферрина, трансферрина и гемоглобина у пациенток РМЖ (n=6) в процессе лечения ЖДА на фоне химиотерапии (X±m)

Курсы химиотерапии	ФР, нг/мл	pPTФ, мкг/мл	ТРФ, мг/дл	HGB, г/дл
Контроль (n=30)	57,7±3,1	3,2±0,06	246,3±9,4	13,4±0,4
I курс	13,4±0,6*	5,4±0,3*	309±7,2*	8,9±0,6*
II курс	47,3±1,5**	4,2±0,8	267,6±6,9**	9,7±0,3*
III курс	111,8±3,5**	4,3±0,09	252±10,1	10,7±0,2*
IV курс	188,1±6,7**	3,7±0,07	250±4,3	10,7±0,4*
V курс	257,3±5,6**	3,5±0,3	227,2±5,1**	10,9±0,4*
VI курс	156,7±8,9**	2,9±0,5	238,3±7,6	11,5±0,2**

Примечание: * – различия показателей по сравнению с показателями контроля статистически значимые; ** – различия показателей по сравнению с показателями контроля и перед I курсом статистически значимые.

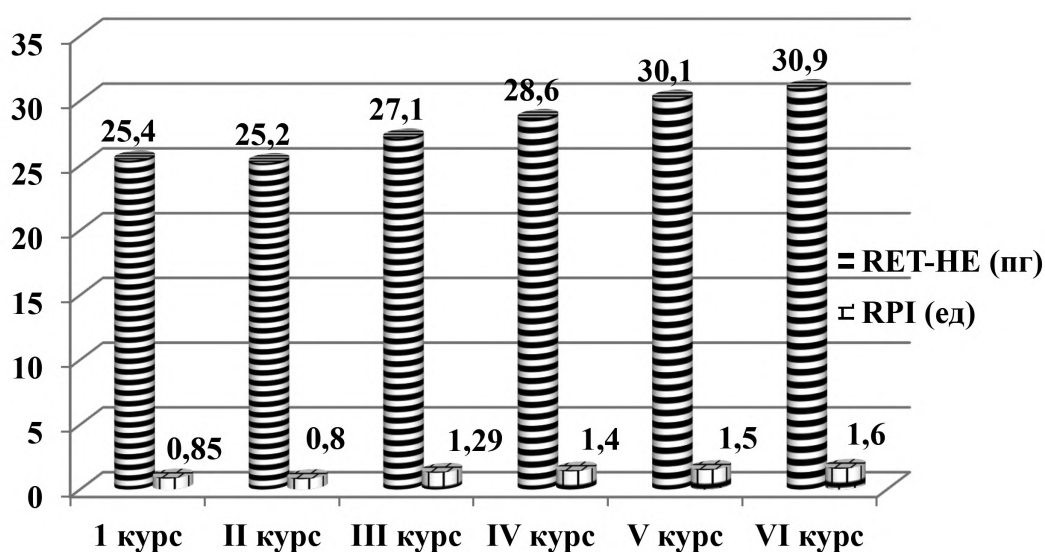


Рис. 3. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE) и индекса продукции ретикулоцитов (RPI) у больной РМЖ в процессе лечения феринжектом (карбоксималтотат). Здесь и на рис. 4,5: по оси абсцисс – курсы химиотерапии.

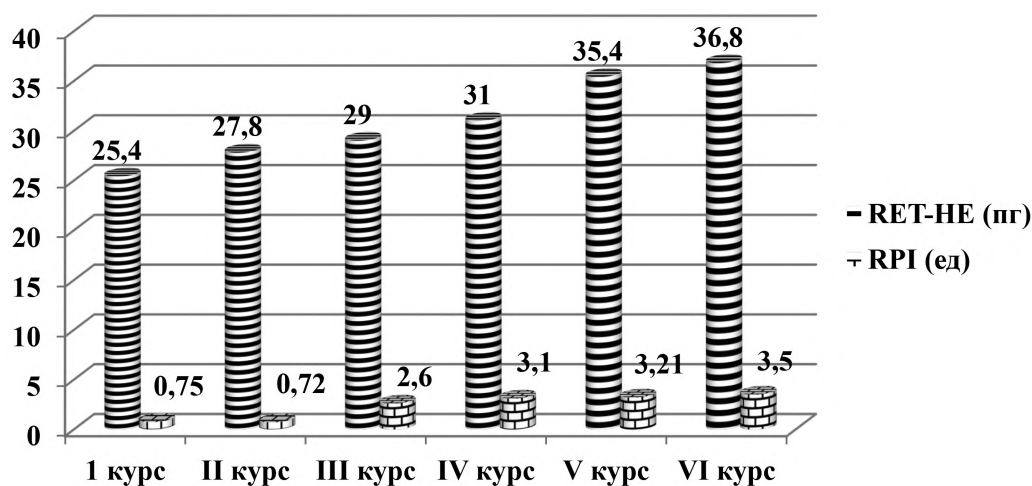


Рис. 4. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците, индекса продукции ретикулоцитов у больной РМЖ в процессе лечения ЖДА феринжектом в комбинации с эпоэтином альфа.

нее к VI КХТ, скорость восстановления ретикулоцитов достигла только нижней границы нормы (рис. 3).

В то же время части пациенток с ЖДА вводили феринжект в комбинации с эпоэтином альфа. И как видно из рис. 4, наряду с ростом показателя RET-HE, показатель RPI, отражающий активность эритропоэза, вырос

значительно, почти в 4 раза, чем до введения эпоэтин альфа, что может являться достоверным признаком усиления скорости образования эритроцитов и подтверждением чувствительности к ГЕРО.

Следует отметить, что анализ результатов лечения АС у отдельных пациенток с ФДЖ не выявил положи-

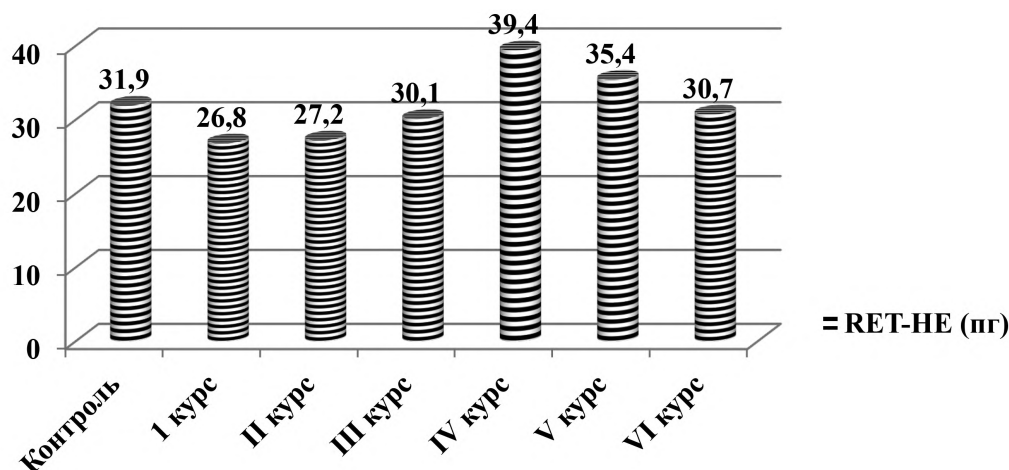


Рис. 5. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE) у больной РМЖ в процессе лечения дефицита витамина В₁₂.

тельной динамики показателей красной крови на фоне лечения АС в процессе ХТ. Концентрация белка ГП25 у пациенток с ФДЖ оставалась высокой на всех КХТ.

Следует подчеркнуть, что у отдельных пациенток, на фоне лечения гЕРО, высокой скорости эритропоэза и повышения потребности витаминов, развивался дефицит В₁₂, начиная с IV КХТ. Это сопровождалось появлением популяции макроцитарных, гиперхромных эритроцитов, ретикулоцитов с высоким содержанием RET-HE и низкой концентрацией этого витамина в сыворотке крови (менее 200 пг/мл). Представленная на рис.5 динамика показателя RET-HE у пациентки в процессе лечения витамином В₁₂ свидетельствует об адекватности проводимой терапии. Показатели RET-HE вернулись к нормальным величинам к VI КХТ.

Важно подчеркнуть, что у пациенток с ФЖД отмечались самые низкие показатели скорости эритропоэза (RPI менее 0,6 ед) на всех КХТ, несмотря на лечение гЕРО.

Заключение. Таким образом, АС выявлен почти у половины (47,6%) пациенток РМЖ на фоне адъювантной химиотерапии. У большинства пациенток АС сопровождался недостаточной продукцией ЭПО. Преобладала ЖДА, у единичных больных РМЖ диагностирован АС с функциональным нарушением железа, который, вероятнее всего, спровоцирован гиперэкспрессией белка ГП25. Следует отметить, что значительная концентрация белка ГП25 была выявлена и у больных РМЖ без лаборатор-

ных признаков АС, что не исключало латентной стадии АС. Рациональное использование препаратов Fe, витамина В₁₂, рекомбинантных форм ЭПО позволило восстановить метаболизм железа, стабилизировать уровень гемоглобина, а также улучшить состояние у большинства больных РМЖ, что может рассматриваться как резерв повышения эффективности противоопухолевого лечения. Полученные данные по ИЛ-6, ГП25, СРБ свидетельствуют о некоторой взаимосвязи их в развитии АС у больных РМЖ и, необходимости дальнейшего изучения особенностей метаболизма железа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rodgers G.M., Becker P.S., Blinder M., Cella D., Chanan-Khan A, Cleeland C. et al. Cancer- and chemotherapy-induced anemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012; 10(5): 628–53.
2. Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C., Dicato M., Gascón P., Glaspy J. et al. Management of anemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*. 2018; 29(4): 96–110. DOI:10.1093/annonc/mdx758.
3. World Medical Association, Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013; 310(20):2191–4. PMID 24141714, DOI:10.1001/jama.2013.281053.
4. Ganz T., Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annual Review of Medicine*. 2011; 62: 347–60.

ЦИТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Пурсанова А.Е.¹, Казарина Л.Н.², Круглова И.А.³, Зиновьев С.В.⁴, Уткин О.В.⁵, Филатова Е.Н.⁵

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

¹ ФБГОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», 430005, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия;

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», 603005, г. Нижний Новгород, Россия;

³ ГБУЗ НО «Городская больница № 35», 603089, г. Нижний Новгород, Россия;

⁴ ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», 603126, г. Нижний Новгород, Россия;

⁵ ФБУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Цель исследования: совершенствование диагностики предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта (СОР) с применением флуоресцентного иммуноцитохимического исследования методом прямой иммунофлуоресценции. Проведено клиничко-лабораторное обследование 111 пациентов: 46 больных с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта, 35 человек с предраковыми заболеваниями: лейкоплакия (n=17), красный плоский лишай (n=18) и 30 здоровых человек. Всем пациентам проведено традиционное цитологическое исследование и дополнительное иммуноцитохимическое исследование методом прямой иммунофлуоресценции, определены уровни экспрессии опухолевых маркеров P53, P16 и Ki67. Данные сопоставлены с результатами гистологического анализа.

В результате исследования выявлено, что у пациентов с раком СОР экспрессия онкомаркера P53 была в 4 раза выше, чем у пациентов с предраковой патологией. В 6,52% случаев обнаружена коэкспрессия маркеров Ki67 и P16.

Таким образом, преимуществами флуоресцентной иммуноцитохимической диагностики является отсутствие инвазивного травматичного забора биоматериала, сокращение сроков получения результата, высокая чувствительность, возможность дистанционной оценки результатов. Это повышает доступность метода и возможность использования данной методики для скринингового исследования населения.

Ключевые слова: предраковые заболевания; плоскоклеточный рак слизистой оболочки рта; диагностика; флуоресцентная иммуноцитохимия; онкомаркеры.

Для цитирования: Пурсанова А.Е., Казарина Л.Н., Круглова И.А., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Филатова Е.Н. Флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (4): 219-226. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-219-226>

Для корреспонденции: Пурсанова Анастасия Евгеньевна, канд. мед. наук, зав. каф.; e-mail: pursanova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование. Авторы выражают благодарность за финансовую помощь в виде гранта от фонда «Сколково» (Россия).

Поступила 10.01.2022

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 17.04.2022

Pursanova A.E.¹, Kazarina L.N.², Kruglova I.A.³, Zinovev S.V.⁴, Utkin O.V.⁵, Filatova E.N.⁵

THE FLUORESCENT IMMUNOCYTOCHEMICAL DIAGNOSTICS OF PRECANCEROUS DISEASES AND CANCER OF THE ORAL MUCOSA

¹ Federal state budgetary educational institution of higher professional education "N. P. Ogarev Mordovian State University", 430005, Saransk, Republic of Mordovia, Russia;

² Federal state budgetary educational institution of higher professional education "Privolzhskiy Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federatsii, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

³ State budgetary institution of health care "City hospital No. 35", 603089, Nizhny Novgorod, Russia;

⁴ State budgetary institution of health care "Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Dispensary", 603126, Nizhny Novgorod, Russia;

⁵ Federal budgetary institution of science "Nizhny Novgorod research Institute of epidemiology and microbiology. academician I. N. Blokhina Rospotrebnadzor", 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Purpose of the study improving the diagnosis of precancerous diseases and cancer of the oral mucosa using fluorescent immunocytochemical studies by direct immunofluorescence. A clinical laboratory examination of 111 patients was carried out: 46 patients with squamous cell carcinoma of the oral mucosa, 35 people with precancerous lesions (17 leukoplakia, 18 – oral lichen planus) and 30 healthy people. All patients underwent a traditional cytological examination and an additional immunocytochemical examination by direct immunofluorescence, the expression levels of tumor markers P53, P16 and Ki67 were determined. The data were compared with the results of histological analysis. As a result of the study, it was revealed that in patients with cancer, the expression of oncomarker P53 was four times higher than in patients with precancerous pathology. In 6.52% of cases, co-expression of markers Ki67 and P16 was found.

Thus, the advantages of fluorescent immunocytochemical diagnostics were the absence of invasive traumatic intake of the biomaterial in the patient, reduction in the timing of obtaining the result, high sensitivity, and the possibility of remote evaluation of the results. Therefore, that increases the accessibility of the method, and the possibility of using this method for a screening study of population.

Key words: *precancerous diseases; oral mucosal squamous cell carcinoma; diagnosis; fluorescent immunocytochemistry; oncomarkers.*

For citation: Pursanova A.E., Kazarina L.N., Kruglova I.A., Zinoviev S.V., Utkin O.V., Filatova E.N. Fluorescent immunocytochemical diagnostics of precancerous diseases and cancer of the oral mucosa. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 219-226 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869/2084-2022-67-4-219-226>

For correspondence: Pursanova Anastasia Evgenievna, Candidate of Sciences, Head of department; e-mail: pursanova@mail.ru

Information about authors:

Pursanova A.E. <http://orcid.org/0000-0002-4137-2834>;
Kazarina L.N. <http://orcid.org/0000-0001-5033-7945>;
Kruglova I.A. <http://orcid.org/0000-0001-7955-349X>;
Zinoviev S.V. <http://orcid.org/0000-0003-1037-2601>;
Utkin O.V. <http://orcid.org/0000-0002-7571-525X>;
Filatova E.N. <http://orcid.org/0000-0002-6683-7191>.

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

Acknowledgment. *The authors express their gratitude for the financial assistance in the form of a grant from the Skolkovo Foundation.*

Received 10.01.2022

Accepted 25.01.2022

Published 17.04.2022

Введение. По данным последних эпидемиологических исследований особую актуальность приобретает проблема своевременной диагностики рака слизистой оболочки рта (СОР), ее дифференциальной диагностики с предраковыми заболеваниями. Эта проблема носит как медицинский, так и социально-экономический характер и требует конкретных путей решения [1-5].

В 2012 г. Россия оказалась по абсолютным цифрам на 5-м месте в мире по абсолютному числу случаев смертности от рака слизистой оболочки рта и красной каймы губ (ККГ) [6]. В 2020 г. в Европе рак органов и тканей полости рта диагностирован у 65 279 человек, умерло от этой патологии 24 575 человек. В Европе наиболее высокий риск заболевания этой патологией у жителей центральной и восточной ее части. В свою очередь, в Западной Европе с начала 90-х годов XX века также отмечается рост случаев рака СОР, что может быть связано с активной миграцией в эту часть мира жителей Южной и Юго-Восточной Азии [7-12].

В России заболеваемость раком СОР составила 6,63 на 100 000 населения, заболеваемость раком ККГ – 1,53 на 100 000. В течение последнего десятилетия наблюдается стабильная тенденция к снижению заболеваемости раком ККГ (на 40%) и, напротив, к росту случаев рака СОР (на 36%). В нашей стране рак СОР и ККГ поражает мужчин в 3 раза чаще, чем женщин, при этом за последние 10 лет отмечается значительный удельный рост показателя смертности от злокачественных опухолей губы, полости рта и глотки среди женщин почти на 20%. Общая смертность от данных злокачественных образований составила в 2018 г. 6,84%, а прирост за 10 лет – 11,5%. При раке ККГ летальность в первый год после установки диагноза составила лишь 4,3%, в то время как при раке СОР – 32,4%. При этом отмечается ежегодный прирост смертности у пациентов, страдающих раком СОР во многих регионах России. Установлено, что «грубый» и стандартизованный показатели смертности от злокачественных новообразований челюстно-лицевой области по Приволжскому Федеральному округу

несколько выше российских, и составляют 9,10 и 5,62 на 100 000 населения. Частота диагностики новообразований визуальных локализаций на поздних стадиях (III-IV) составляет 62,4-69,0% опухолей полости рта [13-18].

В этой связи становится очевидной актуальность внедрения в широкую стоматологическую практику современных неинвазивных и доступных методов диагностики новообразований СОР, что позволит избежать использования инвазивных методов исследования, уменьшить риск развития запущенных стадий рака и снизить смертность [7,16-18].

Цитологический метод исследования в настоящее время широко применяется в диагностике опухолевых и предопухолевых заболеваний различных локализаций. В стоматологии наиболее распространено морфологическое исследование эпителия СОР с целью выявления нарушений в дифференцировке эпителиальных клеток на фоне различных патологических процессов. Однако, при использовании только рутинного цитологического исследования, возникают трудности в диагностике предопухолевой патологии, чаще всего связанные с одновременным возникновением в клетках дегенеративных изменений и атипических признаков. Учитывая тот факт, что диапазон чувствительности данного способа составляет от 64% до 96% и он используется, прежде всего, в первичной диагностике, а его результаты во многом определяют дальнейшую лечебную тактику, возникает необходимость применения новых уточняющих методов [20-26].

В последние годы появились сведения об использовании молекулярных иммуноцитохимических исследований (ИЦХИ) в диагностике предопухолевых заболеваний и опухолей различной локализации, в том числе шейки матки, молочной железы, легкого, мочевого пузыря. Одной из разновидностей ИЦХИ является прямое флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование (ФИЦХИ). Данная технология позволяет локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с флуоресцентно мечеными антителами, а также визуализировать распреде-

ление «мишени» в исследуемом материале. Меченые флуорохромами антитела взаимодействуют с антигеном и визуализируются в виде яркого свечения практически мгновенно, что позволяет использовать методику в качестве инструмента экспресс-диагностики. Кроме того, данный метод позволяет обнаруживать немногочисленные опухолевые клетки и их скопления, не выявляемые с помощью традиционного цитологического исследования, а также снизить частоту гипо- и гипердиагностики опухолевого процесса. Имеющиеся данные об эффективности применения данной технологии в других областях медицины послужили основанием для оценки возможности ее использования в стоматологии [19-22].

Цель исследования – совершенствование диагностики предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта с применением флуоресцентного иммуноцитохимического исследования методом прямой иммунофлуоресценции.

Материал и методы. На базе кафедры пропедевтической стоматологии Института стоматологии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава и ГБУЗ НО «Нижегородский областной онкологический диспансер» обследованы 111 человек в возрасте от 29 до 69 лет. Согласно нозологическим формам все исследуемые были разделены на три группы: в 1-ю группу вошли 46 больных с плоскоклеточным раком СОР, во 2-ю – 35 пациентов с предраковой патологией (17 человек с диагнозом «лейкоплакия СОР», 18 – с диагнозом «красный плоский лишай СОР»), 3-ю контрольную группу составили 30 человек без патологии СОР. Группы были стандартизированы по возрасту и полу участников. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией (Хельсинки, Финляндия, 1964 г.), пересмотренной в Эдинбурге (Шотландия) в 2000 г., одобрено Этическим комитетом ПИМУ. От каждого пациента получено информированное согласие.

Забор материала для цитологического исследования осуществляли путем соскоба на предметное стекло. Для дополнительной ФИЦХ-диагностики пациенты самостоятельно проводили смыв с ротовой полости. Окраску цитологических препаратов выполняли методом Романовского, визуализацию осуществляли с применением микроскопа «Zeiss Primo Star» (Carl Zeiss, Германия), используемые увеличения $\times 100$ - 1000 . При традиционном цитологическом исследовании оценивали клеточный состав препарата с оформлением морфологического заключения, а также рассчитывали индекс кератинизации (ИК) согласно формуле:

$$\text{ИК} = (\text{число ороговевших клеток} / \text{общее число клеток}) \times 100\%.$$

Для оценки уровней экспрессии белков P53, P16 и Ki67 выполнено ИЦХИ методом прямой иммунофлуоресценции с использованием первично меченых флуоресцентных антител к P53-Су5 (мышинные, моноклональные, клон Pab240), P16-AlexaFluor488 (кроличьи, моноклональные, клон EP1551Y), Ki67-Су3 (мышинные, моноклональные, клон EPR3610) («Abcam», Великобритания). Для подтверждения отсутствия неспецифического связывания применяемых антител с целевыми белками использованы изотипические контроли к P53 (мышинные, моноклональные, меченые Су5, IgG2a, клон MG2a-53), к P16 (кроличьи, моноклональные, меченые AlexaFluor488, IgG, клон EPR25A), к Ki67 (мышинные, моноклональные, меченые Су3, IgG1, клон CT6) («Abcam», Великобритания).

В исследовании использовали нефиксированный материал, полученный путем смыва с ротовой полости.

Время инкубации с антителами составляло 15-30 мин в темноте. Визуализация флуоресценции проводилась с помощью микроскопа «Leica DM1000» (Leica, Германия), используемое увеличение $\times 200$. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы AxioVision Rel.4.8 (Carl Zeiss, Германия), в ходе которого было определено количество клеток с положительной экспрессией исследуемых антигенов, т.е. наличием в клетке интенсивного свечения ядра в диапазоне эмиссии выбранных флуорофоров. Замеры интенсивности свечения выполнены в программе AxioVision Rel.4.8 (Carl Zeiss, Германия), при этом значимым считалось свечение ядра, превышающее таковое у цитоплазмы исследуемой клетки в 3 и более раза. В каждом препарате просматривали не менее 10 полей зрения. Полученный результат представлен в процентах в расчете на 100 клеток.

Также в исследовании использовали результаты гистологического анализа, выполненного в процессе планового лечения пациентов с онкологическими и предраковыми заболеваниями СОР. Материал от пациентов контрольной группы, характеризующейся отсутствием признаков стоматологической патологии, был получен путем самостоятельного смыва с ротовой полости и использовался для проведения традиционного цитологического анализа на стекле с последующей оценкой экспрессии белков P16, P53, Ki67. В контрольной группе гистологическое исследование не проводили в связи с отсутствием показаний для взятия биопсии.

Статистическую обработку результатов проводили в свободно распространяемой программной среде «R» версии 4.0.0 (The R Foundation, Австрия). Поскольку изучаемые параметры характеризовались распределением, отличным от нормального, сравнение экспрессии белков P16, P53 и Ki67 в исследуемых группах проводили с применением Н-критерия Краскела-Уоллиса и апостериорного анализа методом рангового критерия Манна-Уитни с поправкой Бенджамини-Хохберга. Различия между исследуемыми группами считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Для оценки возможности применения ФИЦХИ в целях улучшения дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковых состояний применяли метод анализа ROC-кривых. Строили ROC-кривые вероятности выявления злокачественного новообразования СОР методами гистологического исследования, классического цитологического исследования и цитологического исследования, комбинированного с ФИЦХИ. Данные контрольной группы в анализе не использовали. В качестве истинного результата считали диагноз пациентов. Для гистологического и классического цитологического исследования ROC-кривые строили на основании заключения гистолога/цитолога по всей совокупности данных. Для построения ROC-кривой в отношении метода цитологического исследования с ФИЦХИ строили модель логистической регрессии, используя в качестве независимых переменных значения экспрессии белков P16, P53 и Ki67 и результат классического цитологического исследования. При этом проводили процедуру кросс-валидации (50 раз), случайным образом разделяя массив данных на обучающую и тестовую выборки в соотношении 2:1. Для оценки качества моделей использовали коэффициент детерминации МакФаддена. Далее, для каждой из 50 полученных логит-моделей строили ROC-кривую и рассчитывали значение площади под ней (AUC). Усредненную ROC-

кривую и среднее значение AUC использовали для оценки диагностической значимости метода.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования, представляющего собой гистологический и классический цитологический анализы, были получены следующие результаты. У пациентов со злокачественными новообразованиями СОР гистологическое исследование позволило установить наличие онкологического заболевания в 93,5% (43 пациента из 46) случаев. Три образца были ошибочно отнесены к предраковой патологии, вероятно, вследствие неадекватного забора

биоматериала. Применение классической цитологии позволило в 54,3% (у 25 пациентов из 46) установить признаки злокачественного новообразования СОР, в то время как в 45,7% (у 21 пациента из 46) ошибочно установлена предраковая патология. При этом, в микроскопической картине препаратов, классифицированных как онкопатология, преобладали отдельно лежащие клетки многослойного плоского эпителия с клеточной и ядерной атипией, а также наличием в цитоплазме признаков патологического ороговения (рис.1, а). Рассчитанный ИК составил $68,17 \pm 18,96\%$.

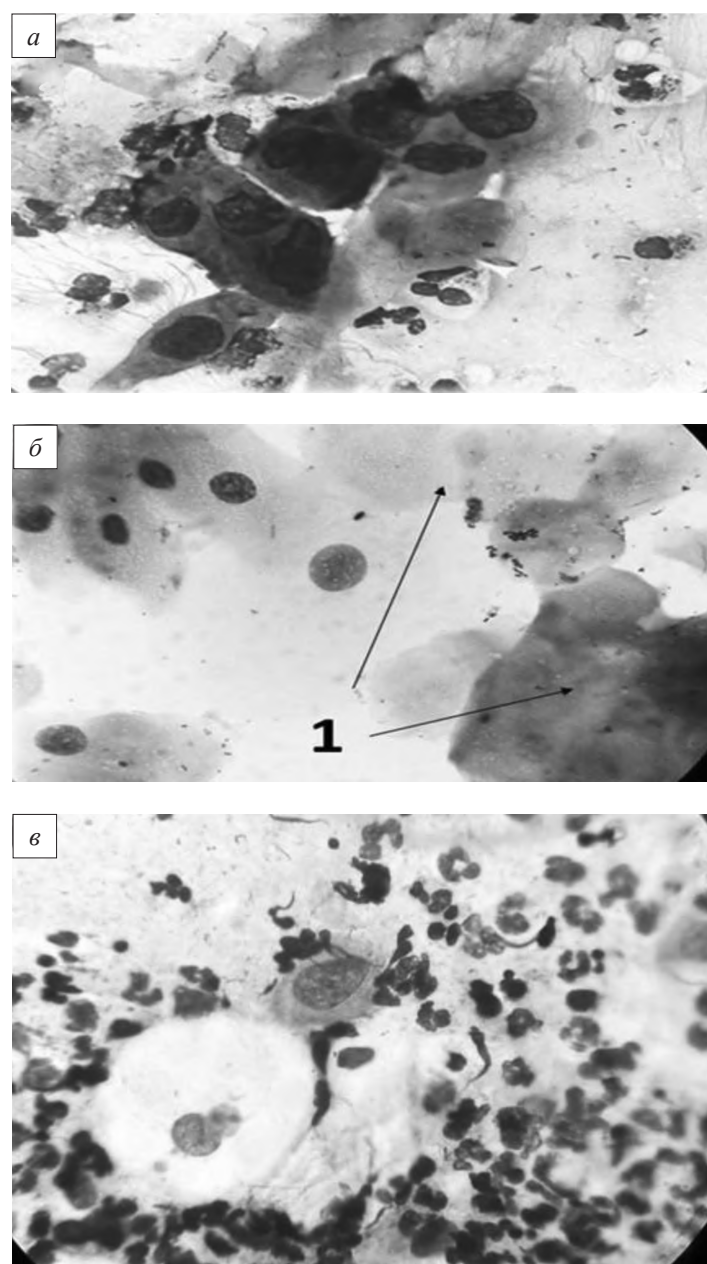


Рис.1. Мазок-отпечаток со слизистой оболочки рта.

а – в цитологическом препарате наблюдалось умеренное количество нейтрофильных лейкоцитов, на фоне которых представлены клетки плоского эпителия с признаками атипии различной степени выраженности и патологическим ороговением. Цитологическая картина плоскоклеточной карциномы с ороговением; б – в большей части цитологического препарата наблюдались признаки гиперкератоза (1). Цитологическая картина гиперкератоза без атипии; в – в цитологическом препарате обнаружено умеренное количество нейтрофильных лейкоцитов, на фоне которых представлены клетки плоского эпителия с признаками дегенеративных изменений и паракератозом. Цитологическая картина воспалительных изменений. Окраска по Романовскому, ув. $\times 1000$.

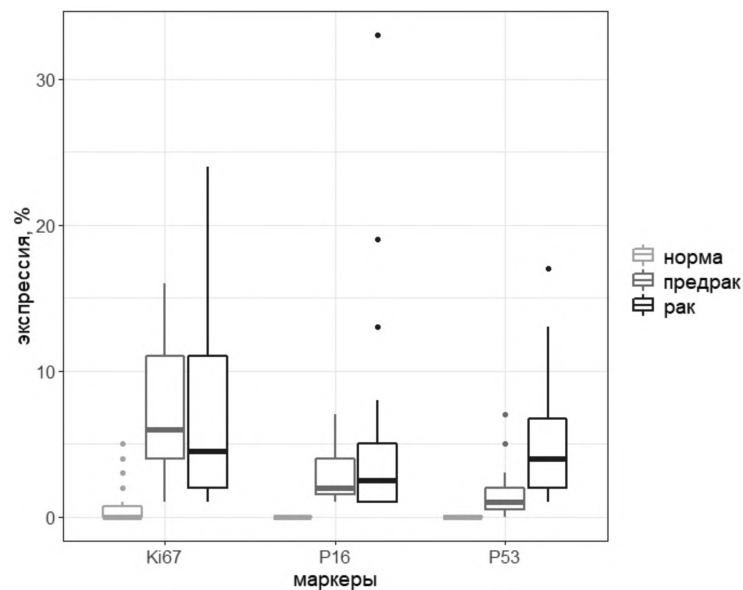


Рис. 2. Экспрессия белков Ki67, P16, P53 в исследуемых группах. * – статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой; ** – статистически значимые отличия по сравнению с группой пациентов с предраковыми заболеваниями СОР.

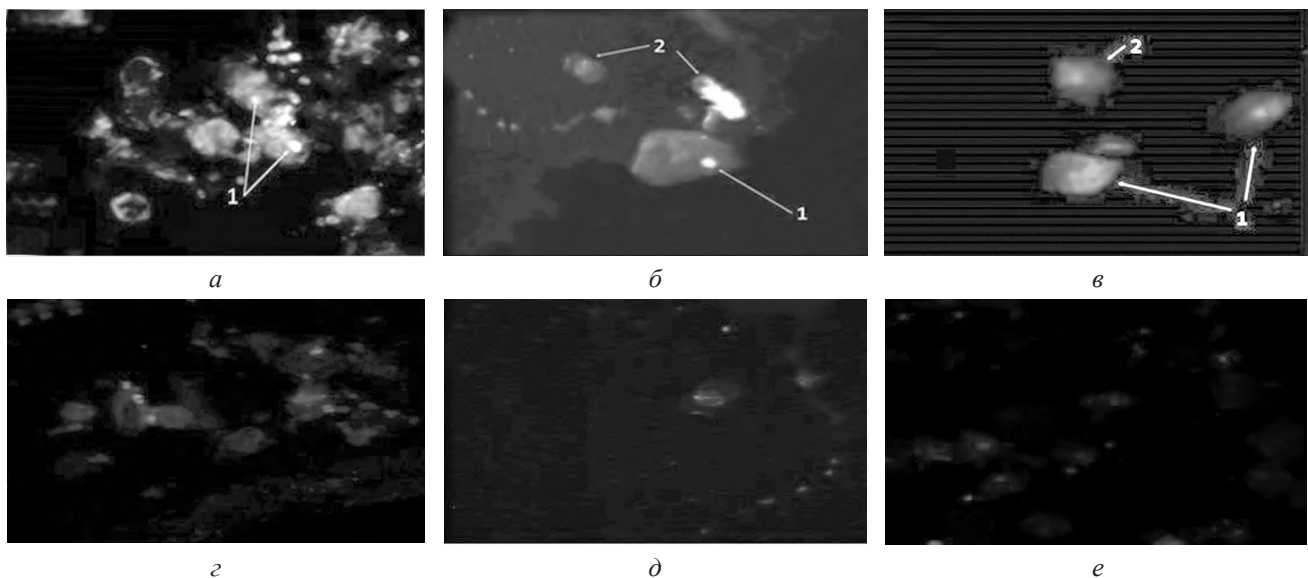


Рис. 3. Соскоб с новообразования слизистой оболочки щек.

a – положительная экспрессия Ki67 (1); *б* – положительная экспрессия P16 (1), отрицательная экспрессия P16 (2); *в* – положительная экспрессия P53 (1), отрицательная экспрессия P53 (2). Ув. $\times 200$; *г*, *д*, *е* – изотипический контроль на антитела к Ki67, P16 и P53, соответственно. Ув. $\times 200$.

У пациентов с клиническими диагнозами «лейкоплакия» и «красный плоский лишай» гистологическое исследование позволило идентифицировать предраковую патологию в 100% случаев (у 35 пациентов из 35). Только цитологическое исследование позволило установить диагноз «лейкоплакия» в 82,4% случаев (у 14 пациентов из 17). При этом в морфологической картине исследуемых цитологических препаратов отмечались обширные поля клеток плоского эпителия с признаками гиперкератоза, единичные эпителиальные клетки с явлениями паракератоза; фон препаратов был чистым (рис.1, б). У пациентов с красным плоским лишаем цитологически подтвердить диагноз удалось в 50,0% случаев (у 9 па-

циентов из 18). В препаратах таких пациентов, в основном, отмечались воспалительные элементы в различном процентном соотношении, а также единичные клетки или мелкие группы клеток многослойного плоского эпителия с признаками гиперкератоза и/или акантолиза (рис.1, в). Рассчитанный ИК для всей группы пациентов с предраковой патологией составил $51,66 \pm 16,24\%$.

Классическое цитологическое исследование материала пациентов контрольной группы не выявило отличительных особенностей от нормальной морфологической картины СОР. Рассчитанный ИК составил $41,95 \pm 7,72\%$.

При оценке соотношения ИК в группе больных к группе контроля наблюдалось повышение данного по-

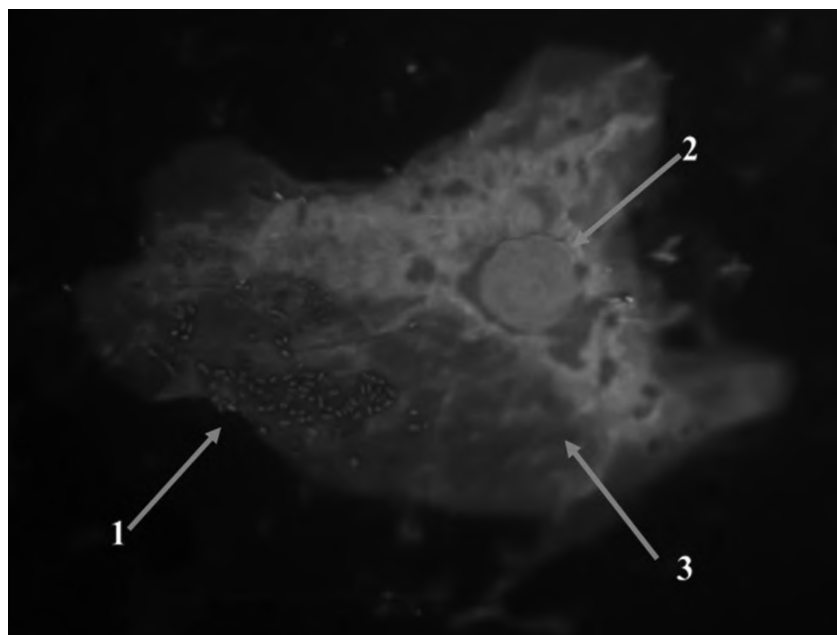


Рис. 4. Коэкспрессия P16 (2) и Ki67 (3) в одной клетке эпителия ротовой полости. Сопутствующая микрофлора ротовой полости (1). Ув. x200.

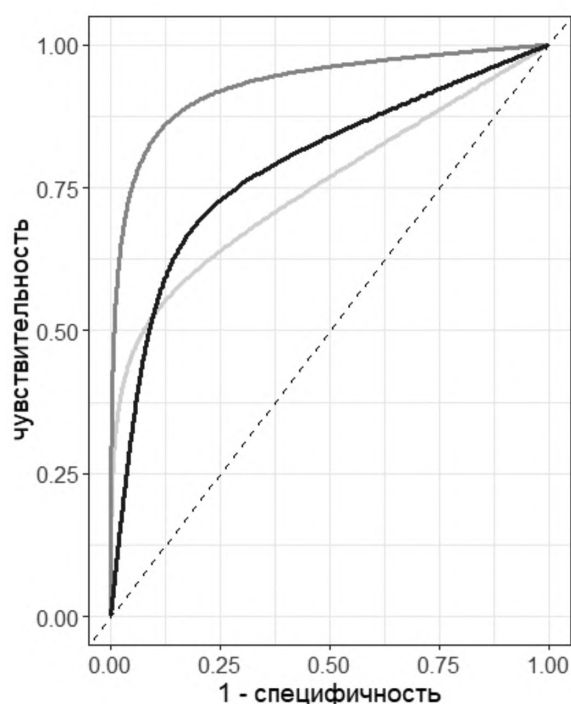


Рис. 5. ROC-анализ предиктивной силы методов дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковой патологии.

казателя при переходе от контрольной группы к предраковым процессам и раку (ИК 1:1,23:1,62, соответственно). Рост значений ИК обусловлен увеличением числа клеток с признаками ороговения в цитоплазме.

В ходе проведения ФИЦХИ получены результаты, представленные на рис. 2 и 3. Показано, что экспрессия

всех трех маркеров повышалась в группах пациентов с раковой и предраковой патологией по сравнению с контролем (рис. 2). При этом в цитологических препаратах контрольной группы не выявлено клеток, экспрессирующих белки P16 и P53. Экспрессию белка Ki67 (рис. 3, а) в этой группе детектировали в 26,7% случаев (8 образцов из 30), при этом исследуемые образцы характеризовались наличием признаков воспаления. Обнаружено, что у пациентов со злокачественными новообразованиями СОР экспрессия P53 (рис. 3, в) в 4 раза превышала таковую у пациентов с предраковой патологией. Экспрессия белков Ki67 и P16 (рис. 3, б) в группах с онкологической и предраковой патологиями статистически значимо не отличалась (см. рис. 2).

Постановка изотипических контролей продемонстрировала наличие низкого уровня фоновой флуоресценции, что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания используемых нами моноклональных антител с целевыми белками (см. рис. 3, г-е).

Следует отметить, что в группе пациентов с раком СОР в 6,52% (3 образца из 46) детектировалась коэкспрессия белков Ki67 и P16 (рис. 4). Исходя из существующих данных по новообразованиям других локализаций [10], отмеченный факт коэкспрессии требует дальнейшего изучения для определения возможной клинической значимости в стоматологической практике.

В соответствии с задачами данного этапа работы проведен анализ эффективности дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковых патологий СОР методом цитологического исследования в комбинации с ФИЦХИ. В этой связи построены 50 логит-моделей зависимости вероятности выявления онкологического заболевания СОР от результатов цитологического исследования и показателей экспрессии белков Ki67, P16 и P53. Значение коэффициента детерминации для построенных моделей составило $0,54 \pm 0,07$, а показатель AUC – $0,82 \pm 0,07$.

Таким образом, в отношении дифференциальной диагностики рака и предраковых состояний СОР, метод цитологии в комбинации с ФИЦХИ по соотношению чувствительности и специфичности занимает промежуточное положение между методами гистологии (AUC=0,97) и классической цитологии (AUC=0,77) (рис. 5).

По сравнению с использованием только классической цитологии, проведение дополнительного ФИЦХИ привело к повышению чувствительности и значительному снижению количества ложноотрицательных результатов (в среднем, на 14 случаев из 21). Одновременно с этим, комбинированный подход характеризовался снижением специфичности и появлением ложноположительных результатов (в среднем, 6 случаев), а при использовании метода классической цитологии ложноположительные результаты отсутствовали. Несмотря на это мы полагаем, что комбинация методов цитологии и ФИЦХИ является более выигрышной в контексте поиска оптимального баланса чувствительности и специфичности в сравнении с классической цитологией. Кроме того, применение ФИЦХИ позволяет повысить чувствительность традиционного цитологического исследования и увеличить количество выявляемых случаев злокачественных новообразований СОР на этапе донозологической диагностики.

Заключение. В настоящей работе проанализирована возможность применения ФИЦХИ в стоматологии для дифференциальной микроскопической диагностики пред- и онкологической патологии СОР. Выявленные особенности экспрессии маркеров пролиферативной активности P16, P53, Ki67 в клетках эпителия ротовой полости методом ФИЦХИ в комбинации с классической цитологией позволили повысить эффективность диагностики злокачественных новообразований органов и тканей полости рта, что в перспективе может способствовать более раннему началу лечения и снижению числа случаев онкологических заболеваний на поздней стадии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-12, 22-26 см. REFERENCES)

1. Сулимов А.Ф., Кузнецова А.Б. Клиническая значимость морфологических методов диагностики слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ с целью выявления ранних признаков малигнизации. *Российский стоматологический журнал*. 2013; 2: 30-2.
2. Вильданов М. Н., Оптимизация диагностики и консервативного лечения кератозов слизистой оболочки рта и красной каймы губ. Дисс. канд. мед. наук. Уфа; 2017.
3. Максимовская Л.Н., Абрамова М.Я., Лукина Г.И. Государственная программа онкоскрининга заболеваний слизистой оболочки рта в России. *Кафедра*. 2018; 65: 56-8.
4. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Частота выявления онкологической патологии в структуре заболеваний слизистой оболочки рта. *Клиническая стоматология*. 2020; 3 95: 32-5. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_3_32.
5. Гельфанд И.М., Романов И.С., Минкин А.У. Тактика лечения плоскоклеточного рака полости рта стадий Cт1–2сn0m0. *Опухоли головы и шеи*. 2014;(2):33-6. DOI:10.17650/2222-1468-2014-0-2-33-36.
6. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.
7. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.

16. Кряжинова И.А., Олесов Е.Е., Садовский В.В., Степанов А.Ф., Попов А.А. Онкологическая настороженность врачей-стоматологов по данным анкетирования в Московской области. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019; 21(2): 244-50.
17. Шухорова Ю.А., Ткач Т.М., Буракшаев С.А., Постников М.А. Онконастороженность в практике врача стоматолога на амбулаторном приеме. *Институт стоматологии*. 2020; 3 (88): 20-2.
18. Постников М.А., Трунин Д.А., Габриелян А.Г., Потапов В.Г., Кириллова В.П. Диагностические возможности врача-стоматолога при выявлении новообразований слизистой оболочки полости рта. *Клиническая стоматология*. 2021, 4: 32-6. DOI:10.37988/1811-153X_2020_4_32.
19. Зиновьева О.С., Мотовилова О.М., Качалина Т.С., Зиновьев С.В., Кузнецов С.С., Круглова И.А., Уткин О.В. Исследование пролиферативного потенциала гипопластического эндометрия у пациенток с репродуктивными нарушениями в анамнезе методом флуоресцентной иммуноцитохимии. *Медицинский альманах*. 2017; 6 (51): 84-7.
20. Савостикова М.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Кудайбергенова А.Г. Флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование выпотов и смывов с серозных полостей при интраоперационной цитологической диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(12): 742-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-12-742-5.
21. Савостикова М.В., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю. Современная цитоморфологическая диагностика опухолей легких. *Новости клинической цитологии России*. 2018; 22 (3-4): 3-7.

REFERENCES

1. Sulimov A. F., Kuznetsova A. B. The clinical significance of morphological methods for diagnosing the oral mucosa and the red border of the lips in order to identify early signs of malignanc. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2013; 2: 30-2. (in Russian)
2. Vildanov M. N. Optimization of diagnostics and conservative treatment of keratoses of the oral mucosa and the red border of the lips. Diss.... Ufa; 2017. (in Russian)
3. Maksimovskaya L. N., Abramova M. Ya., Lukina G. I. State program of oncoscreening of diseases of the oral mucosa in Russia. *Kafedra*. 2018; 65: 56-8. (in Russian)
4. Rabinovich O. F., Rabinovich I. M. The frequency of detection of oncological pathology in the structure of diseases of the oral mucosa. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2020; 3 95: 32-5. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_3_32. (in Russian)
5. Aguirre-Urizar J.M., Lafuente-Ibáñez de Mendoza I., Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis*. 2021 Feb 19. DOI: 10.1111/odi.13810. Epub ahead of print. PMID: 33606345.
6. Salehiniya H., Raei M. Oral cavity and lip cancer in the world: An epidemiological review. *Biomedical Research and Therapy*. 2020 7(8), 3898-3905. DOI: 10.15419/bmrat.v7i8.619.
7. Montero P.H., Patel S.G. Cancer of the oral cavity. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2015; 24(3):491-508. DOI:10.1016/j.soc. 2015.03.006.
8. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8(9):11884-94. PMID: 26617944; PMCID: PMC4637760.
9. Baom N., Hamid B. Epidemiology of oral and pharyngeal cancer. *European journal of pharmaceutical and medical research*. 2017; 4(9):155-64.
10. Kujan O., Camile S. Farah, Newell W. Oral and oropharyngeal cancer in the Middle East and North Africa: Incidence, mortality, trends, and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Johnson First Published*. 2017. Research Article DOI:10.1177/2057178X17698480.
11. Capote-Moreno A., Brabyn P., Muñoz-Guerra M.F., Sastre-Pérez J., Escorial-Hernandez V., Rodríguez-Campo F.J., García T., Naval-Gías L. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2020; 49(12):1525-34. DOI:10.1016/j.ijom.2020.03.009. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32360101.
12. Inchingolo F., Santacroce L., Ballini A., Topi S., Dipalma G., Haxhiresha K. et al. Oral Cancer: A Historical Review. *Int. J. Environ.*

- Res. Public Health.* 2020; 17(9): 3168. Published 2020 May 2. DOI:10.3390/ijerph17093168.
13. Gelfand I.M., Romanov I.S., Minkin A.U. Tactics of treatment of squamous cell cancer of the oral cavity stages Ct1-2sp0m0. *Opukholi golovy i shei.* 2014; (2):33-6. DOI:10.17650/2222-1468-2014-0-2-33-36. (in Russian)
14. Kaprin A. D., Starinskiy V. V., Petrova G. V. State of cancer care in Russia in 2017. [Sostoyaniye onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2017 godu]. Moscow: MMIOI. P. A. Gertsena – filial of the FBGOU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii; 2018. (in Russian)
15. Kaprin A. D., Starinskiy V. V., Petrova G. V. Malignant neoplasms in Russia in 2018. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu]. Moscow: MMIOI. P. A. Gertsena – filial of the FBGOU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii; 2019. (in Russian)
16. Kryazhinova I.A., Olesov E.E., Sadovsky V.V., Stepanov A.F., Popov A.A. Oncological alertness of dentists according to the survey data in the Moscow region. *Meditcina ekstremal'nykh situatsiy.* 2019; 21(2): 244-50. (in Russian)
17. Shukhorova Yu.A., Tkach T.M., Burakshaev S.A., Postnikov M.A. Oncological alertness in the practice of a physician at an outpatient appointment. *Institut stomatologii.* 2020; 3 (88): 20-2. (in Russian)
18. Postnikov M.A., Trunin D.A., Gabrielyan A.G., Potapov V.G., Kirillova V.P. Diagnostic capabilities of a dentist in the detection of neoplasms of the oral mucosa. *Klinicheskaya stomatologiya.* 2021; 4: 32-6. DOI:10.37988/1811-153X_2020_4_32. (in Russian)
19. Zinov'eva O.S., Motovilova O.M., Kachalina T.S., Zinoviev S.V., Kuznetsov S.S., Kruglova I.A., Utkin O.V. Study of the proliferative potential of hypoplastic endometrium in patients with a history of reproductive disorders by fluorescent immunocytochemistry. *Meditinskiy al'manakh.* 2017; 6 (51): 84-7. (in Russian)
20. Savostikova M.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Kudai-bergenova A.G. Fluorescent immunocytochemical study of effusions and flushes from serous cavities during intraoperative cytological diagnosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2017; 62(12): 742-5. DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-12-742-5. (in Russian)
21. Savostikova M.V., Fedoseeva E. S., Furminskaya E.Yu. Modern cytomorphological diagnostics of lung tumors. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2018; 22 (3–4): 3-7. (in Russian)
22. Dash K.C., Mahapatra N., Bhuyan L., Panda A., Behura S.S., Mishra P. An Immunohistochemical Study Showing Ki-67 as an Analytical Marker in Oral Malignant and Premalignant Lesions. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2020; 12 (Suppl. 1): S274-S278. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_83_20.
23. Roelens J., Reuschenbach M., von Knebel Doeberitz M., Wentzensen N., Bergeron C., Arbyn M. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathology.* 2012; 120(5): 294-7.
24. Monteiro L., Mello F., Warnakulasuriya S. Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: A systematic review, *Oral Diseases*, 2021; 27 (8): 1977-92. DOI:10.1111/odi.13747.
25. Ramos-García P., González-Moles M., Warnakulasuriya S. Oral cancer development in lichen planus and related conditions—3.0 evidence level: A systematic review of systematic reviews, *Oral Diseases*. 2021; 27 (8): 1919-35. DOI:10.1111/odi.13812.
26. McParland H., Warnakulasuriya S. Lichenoid morphology could be an early feature of oral proliferative verrucous leukoplakia, *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2021; 50 (2): 229-35.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Акиншина Ю.А.¹, Марданлы С.Г.^{1,2,3}, Ротанов С.В.^{1,4}, Помазанов В.В.^{1,3}, Киселева В.А.³, Ермолаев И.И.¹

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНАЦИЮ «ГАМ-КОВИД-ВАК» И У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

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

³ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия;

⁴ГБУЗ МО «Люберецкий кожно-венерологический диспансер» (ГБУЗ МО «ЛКВД»), 140013, г. Люберцы, Россия

Представлены результаты обследования лиц, прошедших иммунизацию комбинированной векторной вакциной для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 «Спутник V – «Гам-КОВИД-Вак», реconvalescentов COVID-19. С помощью количественного иммуноферментного анализа определены уровни специфических IgG у лиц, переболевших до вакцинации в разной степени тяжести, у иммунонегативных до иммунизации лиц, у реконвалесценто, перенесших коронавирусную инфекцию разной степени тяжести. Рассмотрена иммунная направленность антител против разных белков SARS-CoV-2.

Ключевые слова: иммунохроматография; иммуноферментный анализ; SARS-CoV-2; COVID-19; коронавирус.

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А., Ермолаев И.И. Особенности гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Гам-КОВИД-Вак» и у переболевших COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 227-233. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-227-233>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела ИХТС ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.03.2022

Принята к печати 21.03.2022

Опубликовано 17.04.2022

Akinshina Yu.A.¹, Mardanly S.G.^{1,2,3}, Rotanov S.V.^{1,4}, Pomazanov V.V.^{1,3}, Kiseleva V.A.³, Ermolaev I.I.¹.

FEATURES OF THE HUMORAL RESPONSE TO IMMUNIZATION «GAM-COVID-VAC» AND IN PATIENTS WITH COVID-19

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

²«First Moscow State Medical University after I. M. Sechenov» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (1st MSMU after I. M. Sechenov), 119991, Moscow, Russia;

³State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

⁴State budgetary healthcare institution of Moscow region «Liubertskiy kozhno-venerologicheskii dispanser», 140013, Liubertsy, Russia

The paper present the results of a survey of people who have undergone immunization with a combined vector vaccine for the prevention of coronavirus infection COVID-19 «Sputnik V – Gam-COVID-Vac», as well as COVID-19 reconvalescent. Using a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay, the levels of specific IgG were determined in persons who had had different degrees of severity before vaccination, in persons who were immuno-negative before immunization, as well as in convalescents who had undergone coronavirus infection of varying severity. The immunological targeting of antibodies against various SARS-CoV-2 proteins is considered.

Key words: immunochromatographic assay; enzyme-linked immunosorbent assay; SARS-CoV-2; COVID-19; coronavirus.

For citation: Akinshina Yu. A., Mardanly S. G., Rotanov S. V., Pomazanov V. V., Kiseleva V. A., Ermolaev I. I. Features of the humoral response to immunization «Gam-COVID-Vac» and in patients with COVID-19. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 227-233 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-227-233>

For correspondence: Akinshina Yuliya Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOLab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Akinshina Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;
Rotanov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;
Pomazanov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>;
Kiseleva V.A., <https://orcid.org/0000-0003-3565-1981>;
Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.03.2022

Accepted 21.03.2022

Published 17.04.2022

Введение. Тестирование населения на антитела к SARS-CoV-2 продолжает играть важную роль в управлении пандемией COVID-19. Обнаружение специфических антител к антигенам SARS-CoV-2 необходимо как на индивидуальном, так и на популяционном уровне для выявления лиц, подверженных риску заражения [1]. Во время всеобщей вакцинации, к серологическому обследованию населения добавляется ещё одна важная задача: количественное определение уровня специфических антител после активной иммунизации [2,3]. Это необходимо для оценки клинической и эпидемиологической эффективности применяемых вакцин, разработки новых их вариантов, для последующего персонализированного наблюдения за вакцинированными лицами. Ввиду своей доступности и относительно хорошей стандартизуемости, серологические тесты по выявлению антител к антигенам SARS-CoV-2 сохраняют свое значение как ценные диагностические инструменты [5].

Первые иммуноферментные тест-системы (ИФТС) по выявлению антител к SARS-CoV-2 разработаны для дифференцирования лиц, уже перенесших COVID-19, и имеющих иммунную защиту, от тех, кто может быть подвержен заражению [6]. Данные иммунологические тесты разработаны преимущественно как качественные, а не количественные. Разработчики ИФТС ставили перед собою задачи достижения максимально возможной специфичности и высокой чувствительности. Высокая специфичность незаменима, особенно в начале пандемии, поскольку чрезвычайно низкие уровни распространённости серотипа привели к множеству ложноположительных результатов обследования в тест-системах с невысокой специфичностью [7]. Высокоспецифичные ИФТС не обладали достаточной чувствительностью, что вело к усложнению диагностики бессимптомных и лёгких случаев заболевания, состояния естественной элиминации антител [8-14].

Для изготовления диагностических ИФТС использованы различные антигены на основе нуклеокапсидных и спайковых белков [15]. Антитела против нуклеокапсидных антигенов SARS-CoV-2 у большинства инфицированных этим вирусом лиц индуцируются рано и интенсивно благодаря их выраженной иммуногенности [16]. Путём направленной модификации антигена нуклеокапсида в составе ИФТС, может быть достигнута очень высокая специфичность результатов, даже при исследовании образцов, содержащих антитела к близкородственным вирусам. Следовательно, дискриминационные свойства определения антител на основе антигенов нуклеокапсида могут иметь высокую клиническую диагностическую и прогностическую ценность [17, 18].

С другой стороны, физиологическое значение этих антител не до конца ясно.

Антитела, реагирующие со спайковым белком (S), действуют иначе. Часть S-связывающих антител способна выполнять функцию вируснейтрализующих антител [19]. Это подтверждают многочисленные исследования корреляции между результатами выявления S-специфичных антител и результатами реакции нейтрализации [20-25].

В контексте применения вакцин против SARS-CoV-2 эти вируснейтрализующие антитела имеют первостепенное значение. Основная цель активной иммунизации – индуцировать выработку вируснейтрализующих антител, специфичных для SARS-CoV-2, которые на самых начальных этапах предотвращают проникновение вируса в чувствительные клетки организма, останавливают системное распространение инфекции, предотвращают манифестацию заболевания [26].

Функциональные исследования в реакции нейтрализации не могут широко применяться для определения уровня *spike*-специфичных антител в крови, поскольку основаны на использовании культур живых вирусов в лабораториях 2 уровня биологической безопасности [27, 28]. Для массового скрининга незаменимым инструментом диагностики должны стать классические лабораторные исследования, позволяющие выявлять и измерять количество антител в сыворотке/плазме к определённым антигенам возбудителя; эти тесты должны выполняться достаточно быстро и с высокой пропускной способностью.

Использование *spike*-белков в качестве иммуносорбентов для диагностических лабораторных исследований на основе иммуноферментного анализа (ИФА) играет важную роль в оценке напряжённости гуморального иммунитета пациентов, в изучении и длительном мониторинге клинической эффективности вакцин.

Материал и методы. Исследовано 145 образцов сывороток крови людей. Из них 17 образцов получены от лиц, иммунизированных против новой коронавирусной инфекции вакциной «Спутник V – «Гам-КОВИД-Вак» (разработанной Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи), и 128 сывороток, предоставленных от переболевших COVID-19 в бессимптомной или манифестной форме (Диагностический центр «El Clinic», г. Электрогорск).

Использована тест-система иммуноферментная выявления антител класса IgG к SARS-CoV-2 «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G. Количественный» (ЗАО «ЭКОлаб»; РУ № РЗН 2021/15302 от 14.09.2021), серия № 01, серия № 02 предназначенная для количественного выявления

антител класса G (IgG) к коронавирусу 2 типа, вызывающему COVID-19, в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твёрдофазном носителе при «ручной» постановке и с использованием ИФА-анализаторов. Указанный набор реагентов предназначен для оценки гуморального иммунитета при текущей или перенесённой инфекции COVID-19 и в различные сроки после вакцинации.

При наличии в исследуемом образце антител класса IgG к SARS-CoV-2 происходит связывание их с антигеном, сорбированным в лунках планшета-иммуносorbента, образовавшийся комплекс «антиген-антитело» реагирует с внесённым в реакционную среду раствором конъюгата – антителами к IgG человека, меченными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляется в реакции с раствором индикаторным, содержащим хромоген – тетраметилбензидин (ТМБ), в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству антител в образце.

Концентрацию антител класса G к SARS-CoV-2 в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови человека определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания антител класса IgG к SARS-CoV-2 в калибровочных пробах.

Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgM к SARS-CoV-2 «ИФА-SARS-CoV-2-AT-M» (ЗАО «ЭКОлаб»; № РЗН 2020/13045 от 25.12.2020). Набор реагентов предназначен для качественного выявления видоспецифических антител класса M (IgM) к коронавирусу 2 типа (SARS-CoV-2) в сыворотке (плазме) крови человека методом ИФА на твёрдофазном носителе при «ручной» постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Определение IgM, специфичных к SARS-CoV-2, базируется на принципе «IgM-захвата» (формат «capture») с двухэтапной инкубацией. В лунках иммунологического планшета сорбированы моноклональные антитела мыши к IgM человека. Во время первого этапа инкубации, присутствующие в исследуемых образцах IgM связываются с моноклональными антителами на твёрдой фазе в лунках ИФА-планшета. После отмывания компонентов, не вступивших в реакцию, в лунки добавляют смесь конъюгатов рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена, которые взаимодействуют со специфическими IgM в составе иммунных комплексов на иммуносorbенте твёрдой фазы. Несвязанные компоненты вновь удаляются во время отмывания. Сложные иммунные комплексы выявляют добавлением в лунки раствора индикаторного, содержащего ТМБ, в результате чего меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству IgM к SARS-CoV-2 в образце. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты определения регистрируются путём измерения оптической плотности на спектрофотометре.

Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов «Лайн-Блот SARS-CoV-2-IgG» разработана ЗАО «ЭКОлаб» и используется для исследовательских целей.

Набор реагентов предназначен для дифференцированного выявления специфических антител класса IgG к белкам SARS-CoV-2: нуклеопротеину N, белку шипа S, мембранному и оболочечному с целью определения гуморального иммунного статуса пациента. Тест-полоски представляют собой стрипы из нитроцеллюлозной мембраны, на каждую из которых в виде поперечных линий нанесены рекомбинантные аналоги антигенов вышеуказанных белков, и три контрольные линии: с минимальной и (на «0,5+» условных единиц по системе четырёх плюсов), средней интенсивностью окрашивания («2,0+») и линия контроля внесения исследуемого образца (Кво). Линия «0,5+» соответствует критическому уровню для учёта интенсивности окрашивания. Нанесённые на стрипы антигены визуально не определяются.

При наличии в исследуемом образце специфических к какому-либо белку антител к SARS-CoV-2 они связываются с антигенами иммуносorbента. Образовавшиеся комплексы антиген-антитело связываются с конъюгатом – антителами козы к IgG человека, мечеными щелочной фосфатазой, и выявляются по цветной реакции с хромогеном, которая приводит к появлению в соответствующих зонах стрипа окрашенных линий (формазонов). Интенсивность окрашивания формазонов пропорциональна содержанию соответствующих IgG в исследуемой пробе.

Работа выполнена на основе опыта исследований, накопленного в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве иммуноферментных тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [30-33]. Работа является очередной в цикле исследований, посвящённых серодиагностике COVID-19 и начатым разработкой ИФТС для выявления специфических IgG к возбудителю этой инфекции [34].

Результаты. При исследовании сывороток крови 17 лиц, впоследствии прошедших иммунизацию комбинированной векторной вакциной для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 «Спутник V – «Гам-КОВИД-Вак», установлено, что 8 человек не имели анамнестических указаний на контакт с возбудителем новой коронавирусной инфекции или перенесённую инфекцию в скрытой форме, и в образцах их крови на начальном этапе антитела класса G к антигенам этого патогена не обнаружены, 9 человек имели контакт с вирусом SARS-CoV-2 до начала вакцинации, так как сыворотка их крови содержала специфические антитела (IgG) (реконвалесценты).

В соответствии с регламентирующими документами к препарату «Спутник V – «Гам-КОВИД-Вак», вакцинацию проводили в 2 этапа (в 0 и 21-й день). При этом все пациенты оба компонента вакцины перенесли удовлетворительно без выраженных осложнений или нежелательных реакций.

У всех 8 человек, в крови которых в начале исследования антитела не обнаруживались, при обследовании на 29-79 дни после вакцинации установлено появление специфических антител (IgG) к SARS-CoV-2. Максимальные уровни IgG составили 77-2160 BAU/мл; средние показатели $M \pm m = 548,5 \pm 491,1$ BAU/мл (табл. 1).

Трое пациентов этой группы дополнительно обследованы на 49-85-й дни после начала вакцинации, у всех отмечено повышение концентрации специфических антител в крови в 1,6-3,7 раза, что свидетельствует о

Таблица 1

Уровень антител (IgG) у лиц с исходно серонегативными показателями после их иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак»

Пациенты	Дни обследования после начала иммунизации	Уровень антител (BAU/мл)	Кратность повышения уровня антител
1	29	116	-
	49	420	3,7
2	36	137	-
	85	400	2,9
3	49	320	-
4	43	156	-
5	55	49	-
	74	77	1,6
6	55	580	-
7	79	870	-
8	55	2160	-

продолжающемся гуморальном иммунном ответе в эти сроки. Другие пациенты за дополнительным обследованием не обращались.

При изучении данных анамнеза и исследования крови 9 пациентов, имевших антитела (IgG) к SARS-CoV-2 уже до вакцинации, установлено, что 5 человек болели COVID-19 практически бессимптомно (трое – за 5 мес до вакцинации и уровень IgG на начальном этапе перед вакцинацией у них составил 51, 54, 127 BAU/мл; один – за 4 мес и уровень IgG – 67 BAU/мл; один – за 2,5 мес и уровень антител – 880 BAU/мл); 4 человека перенесли заболевание с характерными симптомами лёгкой и средней тяжести в виде ОРВИ-подобного клинического проявления с аносмией и/или утратой ощущения вкуса еды (у двух пациентов с давностью заболевания 9 и 12 мес антитела класса IgG в крови не выявлены, у 2-х других – через 8 и 12 мес определены 23 и 67 BAU/мл, соответственно) (табл. 2).

Во всех случаях после введения 1-й и 2-й доз вакцины наблюдалось нарастание уровня антител в крови. У лиц с бессимптомным течением первоначаль-

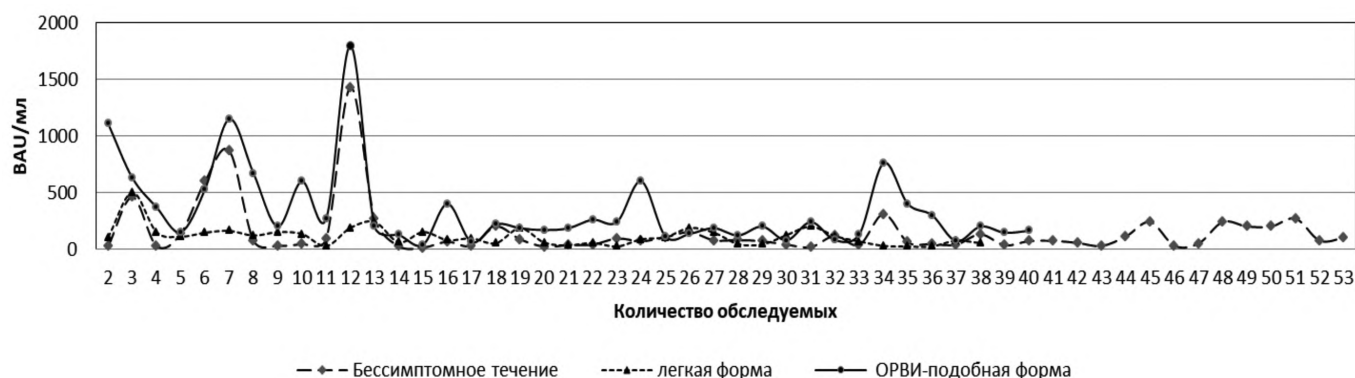
ного инфицирования коронавирусом после первого компонента вакцины (через 20-21 день) концентрация специфических IgG в крови возрастала в 3,0-6,3 раза, после второго компонента (в сроки 49-55 дней от начала иммунизации) – в 1,5-24,6 раза (итого в среднем в 11,7±9,7 раза). Максимальные показатели содержания антител у вакцинированных реконвалесцентов со скрытым течением предшествовавшего заболевания варьировали в интервале 163-3120 BAU/мл (средние показатели $M \pm m$ составили 1238,6±785,1 BAU/мл). У одного пациента, чья кровь исследована через 20 и 120 дней, наблюдался спад напряжённости гуморального иммунитета с уровня 163 до 120 BAU/мл, что могло быть обусловлено индивидуально низким иммунным ответом с последующей естественной элиминацией антител.

Содержание специфических IgG у вакцинированных реконвалесцентов с клиническими проявлениями лёгкой и средней тяжести после вакцинации через 53-62 дня повышалось в 7,1-91,5 раз (в среднем в 53,7±24,4 раза) до максимальных значений 420-

Таблица 2

Уровень специфических антител (IgG) в сыворотке крови реконвалесцентов COVID-19 до и после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак»

Пациенты	Форма перенесенной COVID-19	Срок после болезни до вакцинации, мес	Уровень антител до вакцинации, BAU/мл	Дни исследования после начала вакцинации	Уровень антител, BAU/мл	Кратность повышения уровня антител
9	Бессимптомная	4	67	21	420	6,3
10		5	51	49	1170	22,9
11		2,5	880	55	1320	1,5
12		5	54	20	163	3,0
				120	130	2,4
13	Манифестная	5	127	55	3120	24,6
14		12	0	53	4840	91,5
15		9	0	59	420	7,1
16		12	67	55	3560	64,7
17		8	23	62	3200	51,6



Концентрация IgG у реконвалесцентов COVID-19.

4840 BAU/мл (средние показатели $M \pm m$ составили $3005,0 \pm 1292,5$ BAU/мл).

Отмечено, что у лиц, перенесших COVID-19 с выраженными симптомами средней и лёгкой степени тяжести, иммунный ответ на вакцину статистически достоверно ($t > 0,05$) значительно более выражен по сравнению с лицами, переболевшими бессимптомно, и обе эти группы показывали более выраженный гуморальный иммунный ответ на введение вакцины по отношению к лицам с исходно интактным к SARS-CoV-2.

Данные исследования могут помочь в решении проблемы первичной или бустерной вакцинации лиц, переболевших COVID-19, или ранее успешно вакцинированных в отношении возбудителя этой инфекции, в крови которых ещё поддерживается определяемый уровень антител. Сомнения в целесообразности проведения вакцинации в подобных случаях основывались на возможности снижения иммуногенности материала вакцины за счёт нейтрализующего воздействия циркулирующих в крови специфических антител. Нами показана достаточно высокая эффективность вакцинации у этих лиц и статистически достоверный более высокий уровень гуморального иммунного ответа.

Для изучения специфической направленности антител у переболевших COVID-19 людей (в разных формах проявления), образцы их крови изучены методом линейного иммунного блоттинга с использованием 4 рекомбинантных антигенов в составе иммуносорбента набора реагентов «Лайн-Блот SARS-CoV-2-IgG». У переболевших лиц в крови до иммунизации в 100% случаев выявлялись антитела к нуклеопротеину и RBD домену S-белка (в 100%). Антитела к мембранному и оболочечному антигенам выявлялись с незначительной разницей у лиц, перенесших бессимптомную инфекцию: 33,3% и 37,5%, соответственно, и с ОРВИ-подобной клиникой: в 34,4% и 28,1%, соответственно.

У привитых с исходным отсутствием иммунитета к SARS-CoV-2 в реакции линейного иммунного блоттинга выявлены специфические IgG только к RBD домену S-белка. В основе вакцины «Гам-КОВИД-Вак» использован аденовирусный вектор со встроенным в него фрагментом генетического материала SARS-CoV-2, кодирующим информацию о структуре S-белка шипа вируса, и целью иммунизации является выработка антител к S белку.

Исследование содержания специфических IgM в сыворотке крови иммунизированных лиц, показали, что у

6 человек (3,5%) обнаружены эти антитела, у 5 больных присутствие антител обусловлено длительной постинфекционной персистенцией их в крови, причём после иммунизации их уровень продолжал снижаться. У одного пациента (№ 5), не имеющего в анамнезе COVID-19, обнаружены антитела после вакцинации при исследовании сыворотки крови на 55-й день после начала иммунизации, но на уровне порогового значения. Можно предположить, что при иммунизации IgM вырабатываются короткий период.

Исследованы сыворотки переболевших COVID-19 в бессимптомной форме ($n=52$), в лёгкой форме (преимущественно анносимия, температура 1-2 дня ($t=37^0$ C), с респираторными проявлениями, стойкой температурой выше 38^0 C в течение нескольких дней ($t=39^0$ C). При оценке уровня антител у этих больных стало очевидно, что тяжесть заболевания нередко коррелирует с уровнем антител. Согласно данным литературы, уровень антител 150 BAU/ml и выше обеспечивает защиту от инфицирования SARS-CoV-2. В группе бессимптомно перенесших заболевание 12 человек (23,1%) имели уровень антител выше этого значения, в группе переболевших в лёгкой форме – 10 человек (27%), в группе больных с ОРВИ-подобным течением – 28 человек до (71,8%) (см. рисунок). У всех переболевших наблюдался иммунный ответ на N и RBD домена S белка. К оболочечному и мембранному белку наблюдался иммунный ответ у бессимптомно переболевших – 17,3% и 19,2%, соответственно. У переболевших в лёгкой форме – 5,4% и 13,5%, у переболевших из третьей группы – 17,9% и 15,4%, соответственно.

Обсуждение. Тесты для детекции антител к SARS-CoV-2 становятся важным инструментом при оценке иммунного статуса лиц, затронутых COVID-19, и выявления тех, кто всё ещё находится в группе риска заражения. С началом всеобщей вакцинации важное значение отводится серологическим тестам с количественной оценкой результата. Показано, что наибольшие уровни антител вырабатываются у реконвалесцентов COVID-19 с ОРВИ-подобным течением, иммунизированных позднее «Гам-КОВИД-Вак», однако, и у серонегативных пациентов в ответ на вакцинацию вырабатывается стойкий иммунитет.

При иммунизации выработанные антитела специфичны к белку шипа S, при инфекции – к белку нуклеокапсида SARS-CoV-2, к остальным белкам вируса, по нашим данным, антитела не продуцируются, либо появ-

ляются в незначительных количествах, таким образом, эти белки не имеют диагностического значения.

Исследования, включающие лиц переболевших COVID-19 разной степени тяжести, показали, что тяжесть, характер течения заболевания часто коррелирует с уровнем постинфекционных IgG.

Заключение. Показана возможность более обширного исследования с использованием количественного ИФА для решения вопроса безопасности вакцинации лиц с протективным уровнем постинфекционных IgG. Контроль уровня IgG позволит своевременно произвести вакцинацию или ревакцинацию, что значительно сократит число случаев реинфекций COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-29 см. REFERENCES)

30. Марданлы С.Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 2: 35-7.
31. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдоница А.С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
32. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. Инфекции ToRCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль. Москва: Транзит-ИКС; 2018.
33. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология и профилактика. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2020.
34. Марданлы С.Г., Авдоница А.С., Мамедова С.Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 683-7. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-683-687.

REFERENCES

1. Krammer F., Simon V. Serology assays to manage COVID-19. *Science*. 2020; 368: 1060-1. DOI:10.1126/science.abc1227.
2. Alter G., Seder R. The power of antibody-based surveillance. *The New England Journal of Medicine*. 2020; 383: 1782-4. DOI: 10.1056/NEJMe2028079.
3. Abu Jabal K., Ben-Amram H., Beiruti K., Batheesh Y., Sussan C., Zarka S. et al. Impact of age, ethnicity, sex and prior infection status on immunogenicity following a single dose of the bnt162b2 mRNA COVID-19 vaccine: Real-world evidence from healthcare workers, Israel, december 2020 to january 2021. *Eurosurveillance*. 2021; 26(6): 2100096. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.6.2100096.
4. Prendecki M., Clarke C., Brown J., Cox A., Gleeson S., Guckian M. et al. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and t-cell responses to single-dose bnt162b2 vaccine. *Lancet*. 2021; 397(10280): 1178-81. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00502-X.
5. Jin P., Li J., Pan H., Wu Y., Zhu F. Immunological surrogate endpoints of covid-2019 vaccines: The evidence we have versus the evidence we need. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021; 6: 48. DOI: 10.1038/s41392-021-00481-y.
6. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A. et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2021; 590(7847): 630-4. DOI: 10.1038/s41586-020-03041-6.
7. Perkmann T., Perkmann-Nagele N., Breyer M. K., Breyer-Kohansal R., Burghuber O. C., Hartl S. et al. Side-by-side comparison of three fully automated SARS-CoV-2 antibody assays with a focus on specificity. *Clinical Chemistry*. 2020; 66: 1405-13. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa198.

8. Pollan M., Perez-Gomez B., Pastor-Barriuso R., Oteo J., Hernan M.A., Perez-Olmeda M. et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ene-COVID): A nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020; 396: 535-44. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31483-5.
9. Oved K., Olmer L., Shemer-Avni Y., Wolf T., Supino-Rosin L., Prajgro G. et al. Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 non-responding seronegative subpopulation. *E Clinical Medicine*. 2020; 29: 100651. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100651.
10. Long Q.X., Tang X.J., Shi Q.L., Li Q., Deng H.J., Yuan J. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine*. 2020; 26: 1200-4. DOI: 10.1038/s41591-020-0965-6.
11. Lumley S. F., Wei J., O'Donnell D., Stoesser N. E., Matthews P. C., Howarth A. et al. The duration, dynamics and determinants of SARS-CoV-2 antibody responses in individual healthcare workers. *Clinical Infectious Diseases*. 2021; 73(3): e699-e709. DOI: 10.1093/cid/ciab004.
12. Muecksch F., Wise H., Batchelor B., Squires M., Semple E., Richardson C. et al. Longitudinal analysis of serology and neutralizing antibody levels in COVID-19 convalescents. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020; 223 (3). DOI: 10.1101/2020.08.05.20169128.
13. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J. C. C., Wang Z., Cho A. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020; 584: 437-42. DOI: 10.1038/s41586-020-2456-9.
14. Buss L.F., Prete C.A.Jr., Abraham C.M.M., Mendrone A.Jr., Salomon T., de Almeida-Neto C. et al. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science*. 2021; 371: 288-92. DOI: 10.1126/science.abe9728.
15. Bolotin S., Tran V., Osman S., Brown K. A., Buchan S. A., Joh E. et al. SARS-CoV-2 seroprevalence survey estimates are affected by anti-nucleocapsid antibody decline. *Journal of the Infectious Diseases*. 2021; 223(8): 1334-8. DOI: 10.1093/infdis/jiaa796.
16. Favresse J., Brauner J., Bodart N., Vigneron A., Roisin S., Melchionda S. et al. An original multiplex method to assess five different SARS-CoV-2 antibodies. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2020; 59(5): 971-8. DOI: 10.1515/ccclm-2020-1652.
17. Le Bert N., Tan A. T., Kunasegaran K., Tham C. Y. L., Hafezi M., Chia A. et al. SARS-CoV-2-specific t cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020; 584: 457-62. DOI: 10.1038/s41586-020-2550-z.
18. Musico A., Frigerio R., Mussida A., Barzon L., Sinigaglia A., Riccetti S. et al. SARS-CoV-2 epitope mapping on microarrays highlights strong immune-response to n protein region. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(1): 35. DOI: 10.3390/vaccines9010035.
19. Klausberger M., Dürkop M., Haslacher H., Wozniak-Knopf G., Cserjan-Puschmann M., Perkmann T. et al. A comprehensive antigen production and characterization study for easy-to-implement, highly specific and quantitative SARS-CoV-2 antibody assays. *EBioMedicine*. 2021; 67: 103348. DOI:10.1101/2021.01.19.21249921.
20. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020; 370: 1227-30. DOI: 10.1126/science.abd7728.
21. Bal A., Pozzetto B., Trabaud M.A., Escuret V., Rabilloud M., Langlois-Jacques C. et al. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: Clinical sensitivity, specificity and association with virus neutralization test. *Clinical Chemistry*. 2021; 67(5): 742-52. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa336.
22. Bonelli F., Sarasini A., Zierold C., Calleri M., Bonetti A., Vismara C. et al. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies s1/s2-neutralizing igg in COVID-19 patients semiquantitatively. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020; 58(9): e01224-20. DOI: 10.1128/JCM.01224-20.

23. Padoan A., Bonfante F., Pagliari M., Bortolami A., Negrini D., Zuin S. et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine*. 2020; 62: 103101.
24. Patel E.U., Bloch E.M., Clarke W., Hsieh Y.H., Boon D., Eby Y. et al. Comparative performance of five commercially available serologic assays to detect antibodies to SARS-CoV-2 and identify individuals with high neutralizing titers. *Journal Clinical Microbiology*. 2021; 59(2): e02257-20. DOI: 10.1128/JCM.02257-20.
25. Suhandynata R.T., Hoffman M.A., Huang D., Tran J.T., Kelner M.J., Reed S.L. et al. Commercial serology assays predict neutralization activity against SARS-CoV-2. *Clinical Chemistry*. 2021; 67(2): 404-14. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa262.
26. Tang M.S., Case J.B., Franks C.E., Chen R.E., Anderson N.W., Henderson J.P. et al. Association between SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and commercial serological assays. *Clinical Chemistry*. 2020; 66(12):1538-47. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa211.
27. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020; 586(7830): 516-27. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3.
28. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging Microbes Infections*. 2020; 9: 680-6. DOI: 10.1080/22221751.2020.1743767.
29. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Hung C.T., Ikegame S., Acklin J.A., Kowdle S.S. et al. Quantifying absolute neutralization titers against SARS-CoV-2 by a standardized virus neutralization assay allows for cross-cohort comparisons of covid-19 sera. *mBio*; 2021; 12(1): e02492-20. DOI: 10.1128/mBio.02492-20.
30. Mardanly S.G., Development and testing of new ELISA test systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 2: 35-7. (in Russian)
31. Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
32. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. ToRCH- infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. Moscow: Tranzit-IKS; 2018. (in Russian)
33. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Herpesvirus infections: etiology and pathogenesis, clinic and laboratory diagnostics, epidemiology and prevention. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2020. (in Russian)
34. Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mamedova S.G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against COVID-19 pathogen in human serum (plasma). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 65 (11): 683-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-683-687. (in Russian)

Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А.

ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ТРАНСФУЗИЙ ЭРИТРОЦИТОВ АЛЛОИММУНИЗИРОВАННЫМ РЕЦИПИЕНТАМ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства», 610027, Киров, Россия

Своевременная диагностика антиэритроцитарных антител и подбор иммунологически совместимых доноров позволяют профилактировать возникновение посттрансфузионных реакций и осложнений у реципиентов эритроцитсодержащих компонентов крови (ЭСК). Представлен разбор клинического случая с вариативностью результатов скрининга антител. Продemonстрирована сложность индивидуального подбора доноров ЭСК пациентке с миелодиспластическим синдромом, иммунизированной к антигенам эритроцитов. Сформулированы основные иммуногематологические принципы, соблюдение которых обеспечивает безопасность трансфузий у пациентов с антиэритроцитарными антителами.

Ключевые слова: эритроциты; антигены; аллоантитела; индивидуальный подбор доноров, трансфузионная терапия.

Для цитирования: Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А. Иммуногематологическое обеспечение трансфузий эритроцитов аллоиммунизированным реципиентам (клинический случай). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 234-236. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-234-236>

Для корреспонденции: Йовдий Анна Васильевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. иммуногематологии; e-mail: annaovdii@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Поступила 04.10.2021

Принята к печати 04.12.2021

Опубликовано 17.04.2022

Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A.

IMMUNOHEMATOLOGICAL PROVISION OF RED BLOOD CELLS TRANSFUSIONS TO ALLOIMMUNIZED RECIPIENTS (CLINICAL CASE)

Federal State Budget Institution of Science "Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency", 610027 Kirov, Russia

Timely diagnostics of red blood cells (RBC) antibodies and selection of immunologically compatible donors can prevent the occurrence of hemolytic transfusion reactions in recipients of RBC. The article presents an analysis of a clinical case describing the variability of the antibody screening results and the difficulties of individual selection of donors for a alloimmunized patient with myelodysplastic syndrome. The basic immunohematological principles have been formulated to ensure the safety of transfusions in patients with RBC antibodies.

Key words: red blood cells; antigens; alloantibodies; individual selection of donors, transfusion therapy.

For citation: Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A. Immunohematological provision of red blood cells transfusions to alloimmunized recipients (clinical case). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 234-236 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-234-236>

For correspondence: Yovdiy A.V., researcher of the Laboratory of Immunohematology; e-mail: annaovdii@bk.ru

Information about authors:

Yovdiy A.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>;

Butina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7474-7559>;

Poponina E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4941-1735>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 04.10.2021

Accepted 04.12.2021

Published 17.04.2022

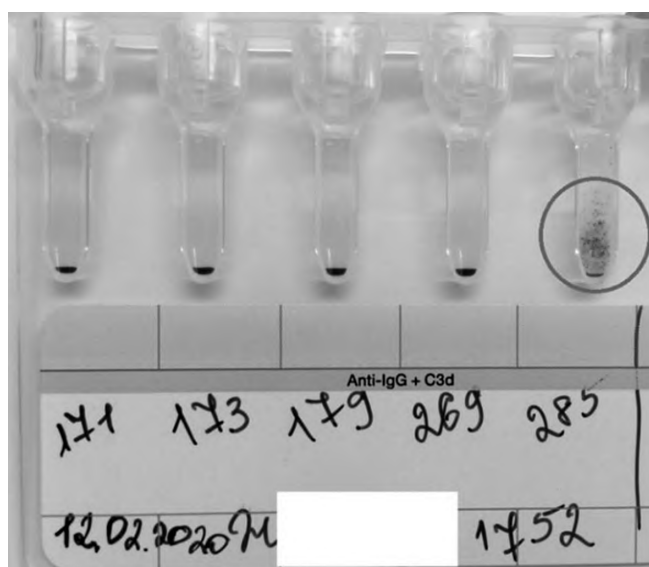
Введение. В гематологической клинике Кировского НИИ гематологии и переливания крови 1,8 % пациентов иммунизированы к антигенам эритроцитов, что в два раз превышает уровень аллоиммунизации доноров компонентов крови, составляющий 0,98% [1, 2, 6]. Аллоантитела увеличивают риск развития посттрансфузионных реакций и осложнений, и препятствуют своевременному обеспечению реципиентов совместимыми эритроцитсодержащими компонентами (ЭСК), жизнен-

но важными для больных с тяжелой анемией [3–9]. Реципиенты с антиэритроцитарными антителами требуют индивидуального подбора доноров перед каждой трансфузией эритроцитов, даже когда титр антител опускается ниже порога чувствительности тест – системы.

Описание клинического случая. Пациентка Ж., 59 лет, с марта 2014 г. наблюдалась по месту жительства с диагнозом рефрактерная анемия, в связи с чем получила заместительную терапию ЭСК 1-2 раза в месяц.

Зависимость результатов индивидуального подбора доноров от специфичности антител

Период, годы	Специфичность антител	Взаимодействие антител с собственными эритроцитами	Общее количество подбирившихся доноров	% совместимых доноров в НПАГТ
06.11.14-06.03.15	Анти-Е	Нет	9	100%
14.09.15-14.11.16	Нет	Нет	28	100%
26.12.16	Неустановленной специфичности	Нет	6	83%
13.02.17-15.01.18	Нет	Нет	27	100%
19.02.18-11.05.18	Полиспецифические аутоантитела	Да	29	52%
13.06.18-17.04.19	Нет	Нет	41	98%
21.05.19	Неустановленной специфичности	Нет	6	83%
19.06.19-15.06.20	Нет	Нет	65	91%
09.07.20-10.09.20	Анти-Е	Нет	12	92%
28.10.20-11.12.20	Неустановленной специфичности	Нет	14	86%
18.01.21-10.06.21	Нет	Нет	20	95%



Результаты индивидуального подбора эритроцитов от 12.02.2020 г.

Информированное согласие пациента на обследование и лечение получено. В анамнезе больной 3 беременности, 1 роды. В ноябре 2014 г. пациентка госпитализирована в клинику ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Установлен диагноз: миелодиспластический синдром. Рефрактерная анемия с избытком бластов. При поступлении выполнены иммуногематологические тесты с применением оборудования и реактивов фирмы Bio-Rad (США). Определен фенотип эритроцитов больной: В Rh-положительный С⁺с⁺Е-е⁺С^w- К-к⁺. Результаты скрининга антител с тест-эритроцитами: I-, II+, III. С использованием идентификационной панели эритроцитов установлена специфичность антител: анти-Е.

Индивидуальный подбор доноров, идентичных с пациенткой по резус-фенотипу, проводился с использованием непрямого антиглобулинового теста (НПАГТ). Анти-Е антитела выявлялись на протяжении 5 мес после первичного поступления в стационар (см. таблицу). Трансфузии совместимых по фенотипу ЭСК привели к уменьшению титра аллоантител ниже уровня выявляемости. В течение следующих 15 мес антитела не выявлялись.

В декабре 2016 г. у больной обнаружены аллоантитела неустановленной специфичности. Только 83% доноров были совместимы с больной в НПАГТ. В 2017 г. аллоантитела в крови отсутствовали, в НПАГТ совместимы 100% доноров.

С февраля по май 2018 г. у пациентки выявлены полиспецифические аутоантитела (прямой антиглобулиновый тест положительный за счет иммуноглобулинов IgG2/4), существенно затруднявшие подбор ЭСК – только 52% доноров были совместимы с больной в НПАГТ.

Проведено типирование фенотипа больной по антигенам систем Kell, Duffy, MNS, Kidd. Интенсивная трансфузионная терапия не позволила получить однозначный результат тестирования. Поиск в регистре доноров, типированных по 8 антигенным системам эритроцитов, оказался невозможным. Был продолжен подбор ЭСК «слепым» методом только на основании результатов НПАГТ.

Следующие 11 месяцев антиэритроцитарные антитела не выявлялись (98% доноров совместимы в НПАГТ). В мае 2019 г. вновь обнаружены антитела неустановленной специфичности, циркулировавшие в крови в течение 2-х месяцев. С июля 2019 г. антитела не выявлялись, однако только 91% доноров совместимы в НПАГТ.

Несмотря на подбор доноров, совместимых по фенотипу и в НПАГТ, в июле 2020 г. вновь обнаружены анти-Е антитела, с декабря – антитела неустановленной специфичности. С января 2021 г. антитела отсутствовали, при индивидуальном подборе совместимо 95% доноров.

На рисунке представлен результат НПАГТ с сывороткой крови больной и эритроцитами 5 доноров. Все доноры идентичны с пациенткой по антигенам систем АВ0 и резус. В НПАГТ с панелью тест-эритроцитов антиэритроцитарные антитела не выявлены, в том числе с тест-эритроцитами, обработанными папаином. Результат прямого антиглобулинового теста эритроцитов доноров – отрицательный. При этом донор № 285 не совместим с пациентом в НПАГТ (сила реакции «+»).

Таким образом, в клиническом примере рассмотренная ситуация, описывающая вариабельность результатов скрининга антител и сложности подбора совместимых доноров ЭСК у пациента – респондера.

Обсуждение. Клинический пример иллюстрирует основные иммуногематологические правила, соблюдение которых обеспечивает безопасность трансфузий у аллоиммунизированных пациентов.

Реципиенту с идентифицированными аллоантителами всегда переливаются эритроциты, не имеющие в фенотипе специфического антигена.

Аллоиммунизированные больные являются «респондерами», способными активно вырабатывать антитела как к донорским, так и к собственным эритроцитам. Полиспецифические антитела могут экранировать антитела к трансфузионно опасным антигенам.

Фенотипический подбор доноров для аллоиммунизированных реципиентов должен проводиться по максимально доступному спектру антигенов.

Отрицательный результат скрининга антител с панелью тест-эритроцитов у ранее аллоиммунизированных больных не является основанием для отказа от НПАГТ перед каждой трансфузией ЭСК. НПАГТ с эритроцитами доноров является обязательным тестом на совместимость у пациентов-респондеров.

Пациентов с миелодиспластическим синдромом, хроническим миелолейкозом, апластической анемией, талассемией, относящихся к группе высокого риска аллоиммунизации, необходимо типировать по клинически значимым антигенам систем Rh, Kidd, Duffy, MNS до начала трансфузионной терапии.

ЛИТЕРАТУРА (п. 9 см. REFERENCES)

1. Бутина Е.В., Минеева Н.В., Зайцева Г.А., Попонина Е.А., Йовдий А.В. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Трансфузиология*. 2019; 20 (2): 107-14.
2. Минеева Н.В., Пашкова И.И., Кробинет И.И., Сысоева Е.А. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы). *Онкогематология*. 2015; 10 (4): 60–5.
3. Бутина Е.В., Коряковцева Т.А., Максимов О.Д., Шерстнев Ф.С., Караваева А.В., Зайцева Г.А. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники. *Трансфузиология*. 2018; 19 (1): 57-66.
4. Минеева Н.В. Иммунологические посттрансфузионные осложнения. *Трансфузиология*. 2001; 2 (2): 40-4.
5. Минеева Н.В., Пашкова И.А., Кробинет И.И., Гавровская С.В., Сысоева Е.А., Бодрова Н.Н. Оптимизация подбора совместимых пар «донор — реципиент»: роль скрининга антител и фенотипирования антигенов эритроцитов реципиентов при гемотрансфузиях. *Трансфузиология*. 2015; 16 (2): 52–9.
6. Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Стремоухова А.Г., Журавлев В.В. Иммунологическое обеспечение трансфузий эритроцитосодержащих сред в клиниках гематологического научного центра. *Трансфузиология*. 2014; 15 (2): 55–6.
7. Минеева Н.В., Гавровская С.В., Кробинет И.И., Пашкова И.А., Бодрова Н.Н., Сысоева Е.А. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями. *Онкогематология*. 2013; 8 (4): 13–7.
8. Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Минаева Н.В. Шерстнев Ф.С. Особенности анти-Jka -аллоантител при подборе доноров эритроцитов (клинический случай). *Трансфузиология*. 2020; 21 (3): 290-4.
1. Butina E.V., Mineeva N.V., Zaytseva G.A., Poponina E.A., Yovdiy A.V. Red blood cell alloimmunization in patients with hematology/oncology disorders. *Transfuziologiya*. 2019; 20(2): 107-14. (in Russian)
2. Mineeva N.V., Pashkova I.A., Krobinets I.I., Sysoeva E.A. Allosensibilisation to erythrocyte antigens (literature review). *Onkogematologiya*. 2015; 10 (4): 60–5. (in Russian)
3. Butina E. V., Koryakovtseva T. A., Maximov O. D., Sherstnev F. S., Karavaeva A. V., Zaitseva G. A. Results of screening and identification of red blood cells antibodies in patients of the hematological clinic. *Transfuziologiya*. 2018; 19 (1): 57-66. (in Russian)
4. Mineeva N.V. Immunological transfusion reactions. *Transfuziologiya*. 2001; 2 (2): 40-4. (in Russian)
5. Mineeva N.V., Pashkova I.A., Krobinets I.I., Gavrovskaya S.V., Sysoeva E.A., Bodrova N.N. Optimizing selection of compatible «donor–recipient» pairs: the role of antibody screening and erythrocyte antigens phenotyping in the blood transfusion recipients. *Transfuziologiya*. 2015; 16 (2): 52–9. (in Russian)
6. Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Stremoukhova A.G., Zhuravlev V.V. Immunological support transfusion of red blood cells in clinics Hematological Scientific center. *Transfuziologiya*. 2014; 15(2): 55–6. (in Russian)
7. Mineeva N.V., Gavrovskaya S.V., Krobinets I.I., Pashkova I.A., Bodrova N.N., Sysoeva E.A. Frequency of red cell, leukocytic and platelet alloantibodies in patients with hematological diseases. *Onkogematologiya*. 2013; 8 (4): 13–7. (in Russian)
8. Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A., Minaeva N.V. Sherstnev F.S. Features of anti-Jka alloantibodies in the selection of red blood cell donors (clinical case). *Transfuziologiya*. 2020; 21 (3): 290-4. (in Russian)
9. Von Zabern I., Wagner F.F., Flegel W.A. Ten years Rhesus Immunization Registry. *Vox Sanguinis*. 2010; 99: 1–55.

REFERENCES

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Герасимов В.Н.¹, Маринина Н.Н.¹, Харсеева Г.Г.², Щербатая О.С.²

ВОЗМОЖНОСТИ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, Россия;

²ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

Определение изменений морфоструктуры микроорганизмов под влиянием антибиотиков, дезинфектантов, биоцидов, физических и химических агентов проводят с помощью метода визуализации ультратонких срезов в трансмиссионном электронном микроскопе. Цель – разработка методических приёмов экспрессной подготовки и визуализации ультратонкой структуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции. Разработана методика ускоренной подготовки образцов для визуализации ультратонкой структуры бактерий и диагностики структурных повреждений клеток в трансмиссионном электронном микроскопе. Использование этого метода позволит более эффективно исследовать механизмы инактивации микроорганизмов на разных этапах контакта с антибиотиками, дезинфектантами, биоцидами, включая различные стрессовые, повреждающие и летальные физические и химические воздействия.

Ключевые слова: трансмиссионная электронная микроскопия; ультратонкие срезы бактерий; фиксация; качество бактериальной популяции.

Для цитирования: Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С. Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток бактерий и микробной популяции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 237-243. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-237-243>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Поступила 02.02.2022

Принята к печати 25.02.2022

Опубликовано 17.04.2022

Gerasimov V.N.¹, Marinina N.N.¹, Kharseeva G.G.², Sherbataya O.S.²

POSSIBILITIES OF TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY IN ASSESSING THE QUALITY OF BACTERIAL CELLS AND MICROBIAL POPULATION

¹Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Russia;

²Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia

Determination of changes in the morphostructure of microorganisms under the influence of antibiotics, disinfectants, biocins, physical and chemical agents is carried out using the method of visualization of ultrathin sections in a transmission electron microscope. The aim is to develop methodological techniques for express preparation and visualization of the ultrastructure of bacteria in a transmission electron microscope to detect structural damage to cells and assess the quality of the microbial population. A technique of accelerated sample preparation for visualization of the fine structure of bacteria and diagnosis of structural damage to cells in a transmission electron microscope has been developed. The use of this method will make it possible to more effectively investigate the mechanisms of inactivation of microorganisms at different stages of contact with antibiotics, disinfectants, biocins, including various stressful, damaging and lethal physical and chemical effects.

Key words: transmission electron microscopy; ultrathin sections of bacteria; fixation; quality of bacterial population.

For citation: Gerasimov V.N., Marinina N.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S. The possibilities of transmission electron microscopy in assessing the quality of bacterial cells and microbial population. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 237-243 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-237-243>

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

Information about authors:

Gerasimov V.N., <http://orcid.org/0000-0002-0473-7785>;
Marinina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-9001-6668>;
Kharseeva G.G., <http://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Shcherbataya O.A., <http://orcid.org/0000-0002-0507-3853>.

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

Acknowledgment. The study was conducted at the expense of the Federal budget within the framework of the state task «Markers of pathogenicity and antibiotic resistance of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract».

Received 02.02.2022

Accepted 25.02.2022

Published 17.04.2022

Введение. Способность микроорганизмов к выживанию в условиях широкого использования антимикробных и дезинфицирующих препаратов является серьёзной проблемой здравоохранения во всем мире. Обладая высокой степенью изменчивости, микробные патогены приобретают устойчивость и, зачастую множественную, к лекарственным препаратам и дезинфектантам [1]. Для определения механизмов формирования этого явления используют фенотипические и молекулярно-биологические методы. Однако под воздействием антимикробных препаратов (АМП) происходят изменения не только указанных свойств, но и строения бактерий [2]. Определение изменений морфоструктуры микроорганизмов под влиянием АМП, дезинфектантов, биоцинов, физических и химических агентов проводят с помощью визуализации ультратонких срезов в трансмиссионном электронном микроскопе [3]. Электронно-микроскопическое исследование позволяет выявить изменения структуры микроорганизмов, свидетельствующие о характере протекающих в них деструктивных процессов [4]. Такие изменения возможно определять как у отдельных микробных клеток, так и при исследовании репрезентативной выборки микроорганизмов. Метод ультратонких срезов является одним из основных способов пробоподготовки биологических объектов при проведении трансмиссионной электронной микроскопии. С его помощью раскрыты особенности ультратонкой структуры клеток и надмолекулярных комплексов, выявлены структурные основы многих биохимических и физиологических процессов, механизмы патологических изменений клеток [5]. Этот метод позволяет находить самые тонкие нарушения ультраструктуры микроорганизмов (при больших увеличениях) и даёт возможность работать с достаточно большой выборкой популяции микробов (при малых увеличениях). Особую важность для оценки качества микроорганизмов на различных стадиях биотехнологических процессов (разработка и испытание вакцин, биопрепаратов, дезинфицирующих средств) имеет использование экспрессных методов визуализации их ультраструктуры. Большое значение имеет и разработка количественных способов оценки структуры как отдельных микроорганизмов, так и микробной биомассы в целом на любых стадиях изучения [6].

Цель исследования – разработка методических приёмов экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции.

Материал и методы. Использованы штаммы микроорганизмов: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученный из ГИСК им. Л.А. Тарасевича,

Escherichia coli K12, *Staphylococcus aureus* 906, *Bacillus thuringiensis* 52B, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Штамм *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 культивировали на кровяно-теллуритовом и 20% сыворо-точном агаре; *E. coli K-12*, *S. aureus* 906 – на мясо-пептонном агаре. Споры бактерий *B. thuringiensis* 52 получали по методике споруляции вегетативных клеток [7].

Для исследования ультраструктуры бактерий и спор в электронном микроскопе микробы препарировали и фиксировали образцы биомассы по общепринятой методике [6, 8, 9]. Фиксацию проводили с помощью 4% раствора глутарового альдегида в 0,2 MNa-какодилатном буфере (pH 7,2) в течение ночи при температуре +4° С. Дополнительную фиксацию осуществляли в растворе четырёхокси осмия на буфере Райтер-Келленберга в течение ночи при температуре +4° С. После фиксации и отмывки в буфере клетки бактерий дегидратировали по 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и 20 мин в абсолютном спирте при его трёхкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношение 3:1; 1:1; 1:3) при +37° С в течение трёх суток и выдерживали в чистом аралдите 1,5-2 ч при температуре +37° С. Затем образцы заливали аралдитом и полимеризовали при температуре +40°С в течение ночи; при температуре +60° С – одни сутки; при температуре +90° С – двое суток [6]. Срезы фиксированной биомассы бактерий готовили с использованием стеклянного ножа на ультрамикротоме Ultracut (Reichert Jung, Австрия). Полученные срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 SpiritBioTWIN (FEI, Голландия, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении x10 000-100 000. Съёмку электронно-микроскопических изображений производили с помощью высококонтрастной широкоугольной CCD камеры высокого разрешения GatanOriusSC200W 120 kV, CCD камеры высокого разрешения Gatan Orius SC 1000B 200kV. Обработку фотоснимков производили с помощью программ TecnaImaging and Analysis, Gantandigitalmicrograph.

Результаты. При визуализации в трансмиссионном электронном микроскопе ультратонких срезов бактерий штамма *E. coli K-12*, фиксированных и препарированных по общепринятой методике [6], выявлены особенности ультраструктуры этих микроорганизмов (рис. 1, а). Клеточная оболочка включает в свой состав извилистую трёхслойную наружную мембрану (толщина 10 нм). Слой пептидогликана (толщина 3-7 нм) имеет гомогенную структуру. В трёхслойной цитоплазматической мембране

(толщина 7,5 нм) имеются неглубокие инвагинации. Цитоплазма бактерий представлена гомогенной структурой со средней электронно-оптической плотностью и гранулярными образованиями размером 20-30 нм. Внутритоплазматический мембранный аппарат слабо развит и содержит кольца, петли и каналы мембранного происхождения. Нуклеоид занимает центральную часть цитоплазмы и представлен клубком тонких фибрилл хроматина, распределённых в электронно-светлой нуклеоплазме.

Учитывая, что общепринятая методика пробоподготовки для трансмиссионной электронной микроскопии достаточно трудоёмка и длительна (от 5 до 10 сут), для выявления структурных повреждений клеток бактерий и оценки качества микробной популяции предложен ускоренный метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе. Согласно этому методу, в состав префиксирующей смеси входят 25% глутаровый альдегид (2,0-2,5%), уранилацетат (0,5-0,6%), CaCl_2 (0,11-0,12%), ацетат-вероналовый буфер pH 6,0 (96,78-97,34%) (см. таблицу). Бактерии первоначально префиксируют в течение 5-10 мин в указанной смеси. Затем к ней добавляют 3-4% раствор четырёхокисного осмия в соотношении 1:1 (объём/объём) и проводят дофиксацию в течение 55 мин при +22°C. Суспензию микробов центрифугируют, осадок обезвреживают в градиенте концентрации этанола: 50% – 10 мин, 70% – 10 мин, 80% – 10 мин, 90% – 10 мин, 95% – 10 мин и 100% (абсолютный этанол) 3 смены по 20 минут. Образцы пропитывают в трёх сменах абсолютного этанола и аралдита, либо пропиленоксида и эпона в соотношениях 3:1, 1:1, 1:3 при +37°C по 1,5 ч в каждой, затем переносят в чистый аралдит (эпон) и выдерживают в вакууме (10^{-2} – 10^{-3} торр) 1,5 ч при +37°C. Образцы помещают в свежую смолу и полимеризуют при +90°C в течение 14-24 часов. Разработанная ускоренная методика позволяет в течение 24-48 ч подготовить клетки к ультраструктурному анализу. Дальнейшие операции (изготовление срезов, дополнительное контрастирование и просмотр в электронном микроскопе) проводят как обычно.

Изучение «ускоренно приготовленных» срезов в трансмиссионном электронном микроскопе показало, что тонкая структура исследуемых клеток качественно сохранена. Для проверки универсальности методики исследованы грамположительные (*S. aureus* 906), грамотрицательные (*E. coli* K12) бактерии и споры бактерий *B. thuringiensis* 52. Электронограммы ультратонких срезов бактерий, подготовленных общепринятым способом, и по методике ускоренной фиксации и препарирования клеток представлены на рис. 1. Подобранные условия позволяют выявить все основные элементы ультраструктуры, как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов (см. рис. 1, б, в, г).

При визуализации ультратонкой структуры, бактериальные клетки подразделяли на три основные группы: интактные или неповреждённые; имеющие обратимые повреждения; имеющие необратимые повреждения или разрушенные (рис. 2, а, б, в, г).

Интактные грамотрицательные бактерии визуализировались с чётким, непрерывным, трёхслойным контуром наружной и цитоплазматической мембран. Повреждённые грамположительные бактерии имели одно- или многослойную гомогенную клеточную стенку, плотно прилегающую к трёхслойной непрерывной цитоплазматической мембране. Для грамотрицательных и

грамположительных бактерий в интактном состоянии характерно отсутствие выраженного периплазматического пространства. Цитоплазма интактных клеток бактерий имеет гомогенное мелкогранулярное строение средней электронной плотности с размером гранул в 15-30 нм, в соответствии с размерами рибосомальных структур. Нуклеоид характеризуется тонко-фибриллярным строением в виде компактной зоны меньшей электронной плотности относительно окружающей цитоплазмы и диффузным распределением по клетке небольшими электронно-светлыми зонами, либо центрально (рис. 2, а).

Обнаружены клетки бактерий, имеющие обратимые повреждения ультратонкой структуры (рис. 2, б), которые подразделились на три основные подгруппы:

а) с изменёнными размерами и формой, например, из-за сжатия при временном обезвреживании или набухания при временном нарушении барьеров проницаемости;

б) плазмоллизированные, у которых основным нарушением является отхождение цитоплазмы от клеточной стенки вследствие повышения осмотичности среды, сопровождающееся частичным уплотнением цитоплазмы и изменением формы, но при полностью сохранённой целостности мембранного аппарата;

в) имеющие различные нарушения клеточной стенки в виде разрывов наружной мембраны и/или клеточной стенки для грамположительных бактерий, но сохранившие целостность цитоплазматической мембраны с ненарушенным строением цитоплазмы и нуклеоида.

Необратимые нарушения жизнедеятельности клеток неизбежно наступали при нарушении целостности цитоплазматической мембраны и деструктивных процессах в зоне нуклеоида или цитоплазмы. Соответственно, к группе бактерий с необратимыми повреждениями относятся клетки, имеющие:

а) разрыв всех слоёв клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (рис. 2, в);

б) разрыв всех слоёв клеточной стенки, что обычно сопровождается вытеканием внутриклеточного содержимого (рис. 2, г);

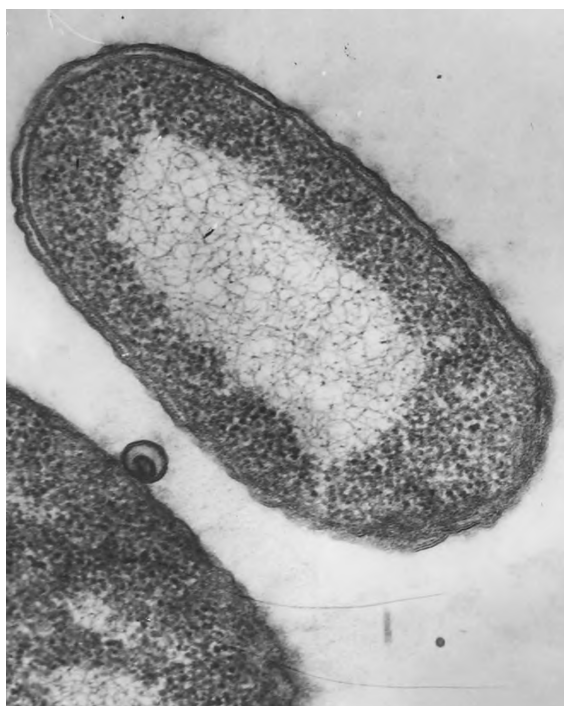
в) частичную деструкцию цитоплазмы и нуклеоида (рис. 2, в, г);

г) полную деструкцию внутриклеточного содержимого, автолизированные клетки (рис. 2, д, е).

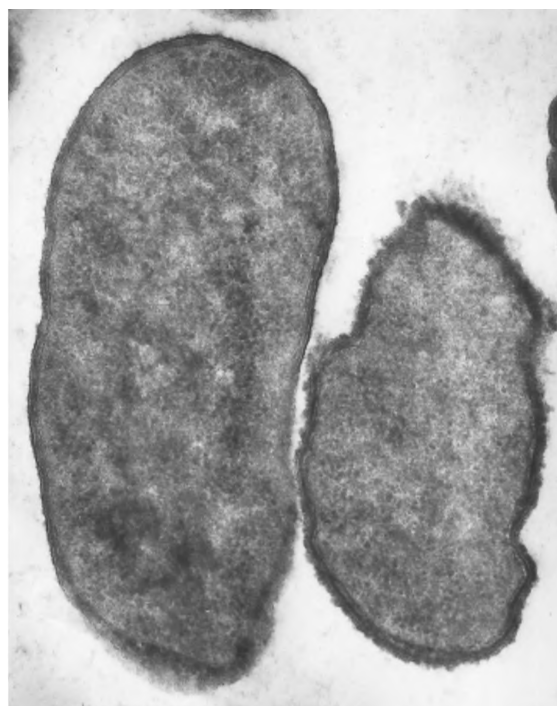
Обсуждение. Для изучения ультраструктуры микроорганизмов при трансмиссионной электронной микроскопии используется общепринятая методика приготовления препаратов ультратонких срезов бактерий, их фиксации и препарирования [6]. Несмотря на широкое использование этой методики, следует указать на ряд её недостатков. Методика включает многочисленные и длительные этапы фиксации и препарирования клеток, длительность её составляет от 5 до 10 суток (см. табл. 1). Из-за вымывания отдельных компонентов бактериальной клетки, цитоплазма и нуклеоид приобретают более разрыхленную и рыхлую структуру (см. рис. 1, а). Всё это отрицательно сказывается на сохранности внутренней структуры бактерий.

Для получения качественных препаратов ультратонких срезов бактериальных клеток выполнение основных этапов этой методики является обязательным. Попытки просто сократить сроки отдельных стадий процесса приготовления препаратов чаще всего заканчиваются ухудшением качества изображений. Неудачная подготовка биоматериала не позволяет проводить качественный ультраструктурный анализ, поэтому любые изменения

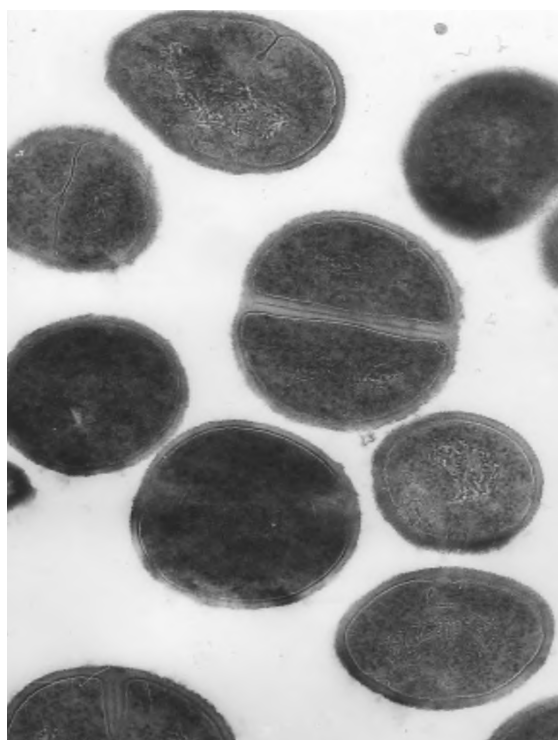
a



б



в



г



Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий и спор, полученных с помощью стандартной и ускоренной методики пробоподготовки.

a – *E.coli* K12 (стандартная методика, увеличение $\times 60000$), *б* – *E. coli* K12 (ускоренная методика, увеличение $\times 60000$), *в* – *S. aureus* 906 (ускоренная методика, увеличение $\times 30000$), *г* – *B.thuringiensis* 52 (ускоренная методика, увеличение $\times 65000$).

методики препарирования должны быть обоснованы и отлажены. Общепринятый способ приготовления ультратонких срезов, основанный на точных химических представлениях, складывался эмпирически и отработан во многих лабораториях. Разработка более простого и

быстрого способа получения препаратов ультратонких срезов бактерий остается актуальной.

Взяв за основу общепринятую «работающую» методику, мы получили более быстрый способ подготовки биологического материала. В основе разработанной ме-

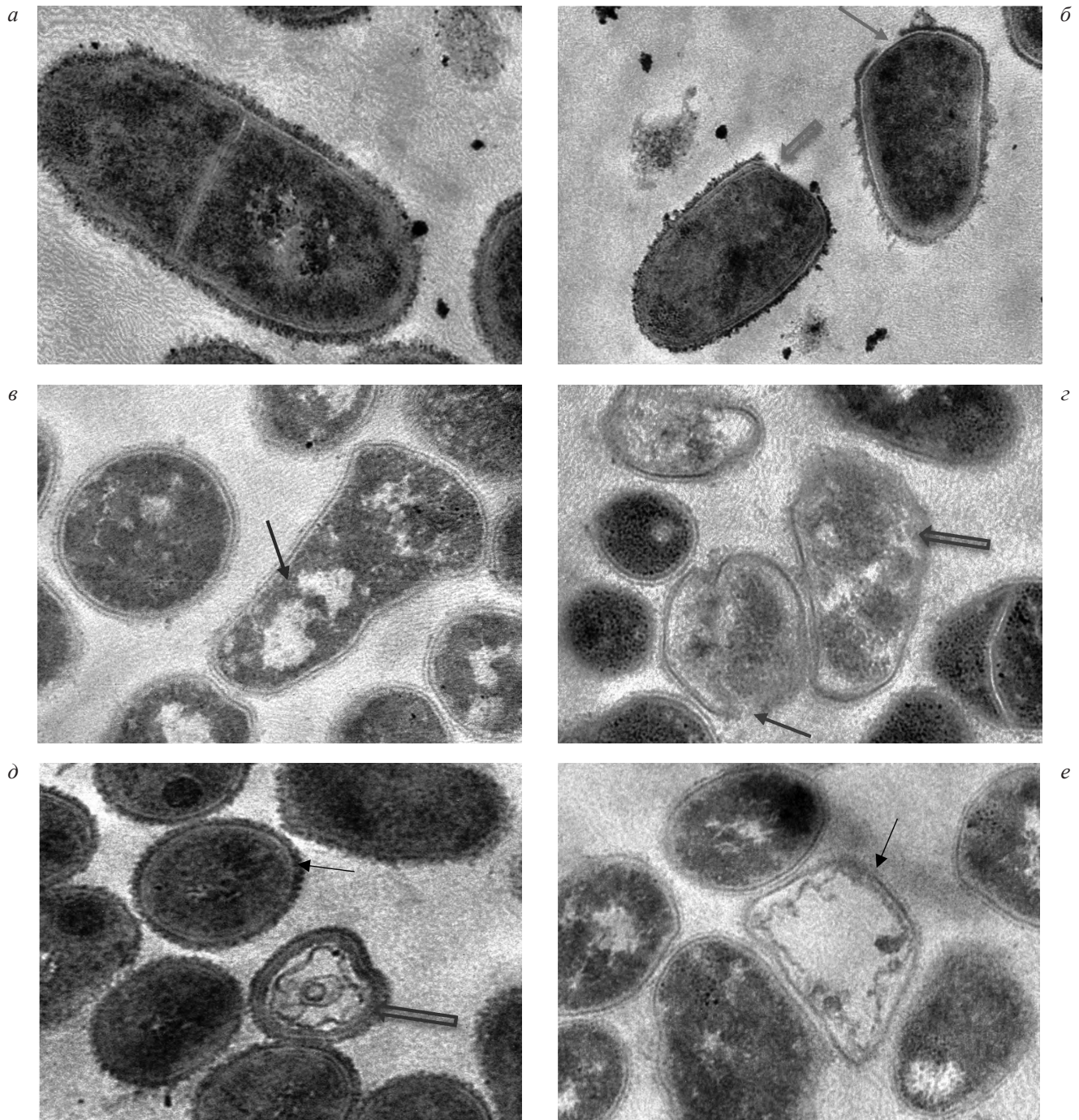


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение ультраструктуры *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665* с обратимыми и необратимыми ультраструктурными нарушениями, полученные с помощью ускоренной методики пробоподготовки.

а – intactные бактериальные клетки (увеличение $\times 50000$), *б* – бактериальная клетка с разорванной клеточной стенкой (стрелка), клетка с разрывом клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (двойная стрелка) (увеличение $\times 40000$), *в* – бактерии на начальных стадиях деградации нуклеоида и цитоплазмы (стрелка) (увеличение $\times 32000$), *г* – бактерии с необратимыми структурными повреждениями: клетка с разрывом клеточной стенки и выходом клеточного содержимого (стрелка), клетка с деградацией внутриклеточного содержимого (двойная стрелка) (увеличение $\times 40000$), *д* – бактерии с intactной ультраструктурой (стрелка) и лизированным внутриклеточным содержимым (двойная стрелка), *е* – полностью лизированная клетка (стрелка) (увеличение $\times 35000$).

тодики ускоренной фиксации и препарирования клеток лежат те же базовые принципы подготовки материала: двойная химическая фиксация клеток, их дегидратация, пропитка и заливка в пластические среды. Если обычный процесс фиксации и подготовки занимает примерно

неделю, то с помощью предлагаемой методики он завершается за 1-2 дня с последующим получением достаточно качественных изображений. Суть излагаемой методики состоит в том, что с целью сокращения времени на подготовку бактерий к анализу, фиксацию и контра-

стирование клеток проводят одновременно, исключая этапы отмывки и заключения в агар, уменьшают время пропитки и полимеризации материала.

Наиболее важным этапом предлагаемой методики, потребовавшим максимальной отработки, является фиксация материала. Именно оптимальная фиксация позволяет как сохранить клетки в состоянии, близком к прижизненному, так и защищает их от повреждений, неизбежных при обезвоживании, заливке, резке на ультрамикротоме. Для фиксации использована смесь, состоящая из глутарового альдегида, уранилацетата и четырёхокиси осмия. Уранилацетат используется, в основном, как краситель для повышения контраста изображения. Показано, что быстрая префиксация смесью глутаровый альдегид – уранилацетат позволяет получать достаточно качественные срезы [11]. Возможно, это связано с тем, что 0,5%-ный уранилацетат за несколько минут гелифицирует раствор ДНК, сохраняя ДНК-структуры, что всегда являлось проблемой препарирования. В собственных исследованиях мы неоднократно находили положительный результат краткой префиксации биоматериалов в глутаровом альдегиде и использовали это и при разработке предлагаемого метода. Существенно то, что при отсутствии отмывки на стадии постфиксации происходит смешивание фиксаторов. При смешивании эти вещества могут реагировать между собой с образо-

ванием компонентов и комплексов, обладающих дополнительным консервирующим и фиксирующим эффектом. Установлено, что фиксация бактерий в предлагаемой смеси позволяет лучше визуализировать структуру мембран и снизить до минимума экстракцию компонентов цитоплазмы, нуклеоида и нуклеоплазмы. На стадии импрегнации образцов смолами лучшие результаты получались при использовании пропиленоксида.

Предлагаемый метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе может быть использован для оценки не только качественных структурных повреждений клеток, но и количественных изменений микробной популяции.

Заключение. Разработанный метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе может успешно применяться для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции. Использование этого метода позволяет более эффективно исследовать механизмы инактивации микроорганизмов на разных этапах контакта с АМП, дезинфектантами, биоцидами, включая различные стрессовые, повреждающие и летальные физические и химические воздействия. Методика ускоренной подготовки образцов бактерий для визуализации их тонкой структуры в элек-

Этапы препарирования бактерий по стандартной и ускоренной методике для визуализации ультраструктуры

Этап	Стандартный метод	Время	Ускоренный метод	Время
Фиксация и инактивация бактерий	Фиксация 2-4% раствором глутарового альдегида на На-какодилатном буфере (pH 7,2) или другом буфере	2-24 ч	Префиксация бактерий в смеси глутарового альдегида и уранилацетата	0,1 ч
Отмывка образцов от фиксатора	3-х кратная отмывка бактерий На-какодилатным буфером (pH 7,2) центрифугированием	0,5 ч	–	–
Контрастирование образцов	Контрастирование бактерий 0,5% раствором уранилацетата на На-какодилатном буфере (pH 7,2)	2-18 ч	–	–
Иммобилизация бактерий в инертную гелеобразную среду для исключения потерь клеток в процессе препарирования	Заключение бактерий в 1%-ный водный расплавленный раствор агара ($\geq 60^{\circ}\text{C}$)	0,25 ч	–	–
Дополнительная фиксация бактерий	Дофиксация бактерий в 1-2% растворе четырёх- окиси осмия на ацетат-вероналовом буфере (pH 6,0)	18-24 ч	Дофиксация образцов в фиксирующей смеси, полученной путём добавления к смеси глутарового альдегида и уранилацетата четырёхокиси осмия	1,0 ч
Отмывка образцов от фиксатора	3-х кратная отмывка бактерий от осмия ацетат-вероналовым буфером (pH 6,0)	0,5 ч	–	–
Дегидратация образцов	Дегидратация образцов в растворах этилового спирта возрастающей концентрации	2,0 ч	Дегидратация образцов в растворах этилового спирта возрастающей концентрации	2,0 ч
Импрегнация образцов в смеси этилового спирта и эпоксидной смолы	Пропитывание образцов в смесях абсолютного этилового спирта и аралдита (эпона) в соотношениях (объём/объём) 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3 по 2-18 ч в каждой	48-60 ч	Пропитывание образцов в смесях абсолютного этилового спирта и аралдита (эпона) в соотношениях (объём/объём) 3:1; 1:1; 1:3 при $+37^{\circ}\text{C}$ по 1,5 час. в каждой	4,5-5,0 ч
	Пропитка образцов чистой эпоксидной смолой при $+37^{\circ}\text{C}$	1,5-24 ч	Пропитка образцов чистой эпоксидной смолой при $+37^{\circ}\text{C}$ в вакууме (10^{-2-3}торр)	1,5-2,0 ч
Полимеризация образцов в эпоксидной смоле	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+60^{\circ}\text{C}$	48 ч	–	–
	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+90^{\circ}\text{C}$	24-48 ч	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+90^{\circ}\text{C}$	14-27 ч
ИТОГО		150-228 ч		24-37 ч

тронном микроскопе может быть полезной при отладке различных биотехнологических процессов на стадиях культивирования микробов (концентрирования и обезвоживания биомассы, приготовление вакцин и др.).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 11 см. REFERENCES)

1. Гренкова Т. А., Селькова Е. П., Гусарова М. П., Ершова О. Н., Александрова И. А., Сазыкина С. Ю. и др. Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 1 (74): 29-33.
2. Дятлов И.А., Детушева Е.В., Мицевич И.П., Детушев К.В., Подкопаев Я.В., Фурсова Н.К. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. *Бактериология*. 2017; 2 (2): 48-58.
6. Герасимов В.Н., Дятлов И.А., Гайтрафимова А.Р., Киселева Н.В., Голов Е.А. Экспериментальный отбор перекисных композиционных дезинфектантов, обладающих спороцидным эффектом. *Дезинфекционное дело*. 2014; 2: 9-16.
7. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Шишкова Н.А., Тимофеев В.С., Миронова Р.И. и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: Издательство «Династия»; 2021.
8. Шахов А. Г., Сашнина Л.Ю., Владимиров Ю.Ю., Тараканов К.В., Карманова Н.В. Ультраструктурные изменения бактерий *Pasteurella multocida* под влиянием бактерицидных концентраций нитрофуранового препарата. *Ветеринарный фармакологический вестник*. 2018; 3: 6-10.
9. Керимли Э.Г., Гасимов Э.К., Серкерев С.В., Керимов Ю.Б., Рзаев Ф.Г., Мурадова С.А. и др. Изучение состава эфирного масла *Achillea nobilis* L. и его антибактериальное влияние на изменения ультраструктуры клеток *Staphylococcus aureus*. *Химия растительного сырья*. 2021; 1: 93-104.
11. 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.
2. Dyatlov I.A., Detusheva E.V., Mitsevich I.P., Detushev K.V., Podkopayev Ya.V., Fursova N.K. Sensitivity and formation of resistance to antiseptics and disinfectants in causative agents of nosocomial infections. *Bakteriologiya*. 2017; 2 (2): 48-58. (in Russian)
3. Yamaguchi M., Chibana H. A Method for Obtaining Serial Ultrathin Sections of Microorganisms in Transmission Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* 2018; 131: 56235.
4. Hovnanyan K., Marutyan S., Pepoyan A., Navasardyan L., Trchounian A. Transmission and Scanning Electron Microscopy of Contacts between Bacterial and Yeast Cells in Biofilms on Different Surfaces. *Open Access Library Journal*. 2015; 2: e1492. Available at: <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1101492>. Open Element.
5. Nguyen H.T., O'Donovan L.A., Venter H., Russell C.C., McCluskey A., Page S.W. et al. Comparison of Two Transmission Electron Microscopy Methods to Visualize Drug-Induced Alterations of Gram-Negative Bacterial Morphology. *Antibiotics*. 2021; 10 (3): 307. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030307>. Open Element.
6. Gerasimov V.N., Dyatlov I.A., Gaitrafimova A.R., Kiseleva N.V., Golov E.A. Experimental selection of peroxide composite disinfectants with a sporicidal effect. *Dezinfektsionnoe delo*. 2014; 2: 9-16. (in Russian)
7. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Shishkova N.A., Timofeev V.S., Mironova R.I. and other Methods of studying the biological and molecular-genetic properties of the causative agent of anthrax. Moscow: Dinastiya; 2021. (in Russian)
8. Shakhov A. G., Sashnina L.Yu., Vladimirova Yu.Yu., Tarakanov K.V., Karmanova N.V. Ultrastructural changes in *Pasteurella multocida* bacteria under the influence of bactericidal concentrations of the nitrofurantoin preparation. *Veterinarnyy farmakologicheskyy vestnik*. 2018; 3: 6-10. (in Russian)
9. Kerimli E.G., Gasimov E.K., Serkerov S.V., Kerimov Yu.B., Rzaev F.G., Muradova S.A. et al. Study of the composition of *Achillea nobilis* L. essential oil and its antibacterial effect on changes in the ultrastructure of *Staphylococcus aureus* cells. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2021; 1: 93-104. (in Russian)
10. Chesnokova M. G., Shalai V. V., Kraus Yu. A., Cherkashina N. V., Mironov A.Yu. Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification. *Procedia engineering*. 2016; 152: 247-50.
11. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Application of scanning electron microscopy to study *Candida albicans* biofilms on the surface of base plastics of removable orthopedic structures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (5): 308-13. (in Russian)

REFERENCES

Анисимова А.С., Полеева М.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В.

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (MALDI-TOF MS)

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы – сравнительный анализ методов пробоподготовки образцов для эффективной идентификации грибов рода Candida с помощью масс-спектрометрического анализа. Исследовано 265 штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов, выделенных из мокроты больных с пневмонией. Идентификацию отобранных штаммов проводили общепринятыми методами (по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным свойствам) и MALDI-ToF MS с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения Flex Control. Для оценки эффективности определения видовой принадлежности грибов выполнен сравнительный анализ подготовки образцов с помощью 4-х методов: прямого нанесения на мишень, расширенного метода прямого нанесения, экстракции белков с использованием этанола/муравьиной кислоты или трифторуксусной кислоты. Ускоренная схема идентификации грибов культуральным методом не обеспечивает получения четких и однозначных результатов. При использовании масс-спектрометрического анализа достоверность результатов зависит от пробоподготовки образцов. Проведено сравнительное изучение эффективности определения видовой принадлежности грибов при различных методах подготовки материала на коллекции 50 клинических изолятов. Выявлено, что экстракция клеток с помощью ТФУ кислоты не приводит к появлению регистрируемых спектров белков. Применение методов прямого и расширенного прямого нанесения позволило установить вид только у 32-44% штаммов. Наиболее эффективным способом пробоподготовки оказался метод с использованием муравьиной кислоты и этанола, который позволил определить видовую принадлежность у 100% изучаемых грибов (Score 2.0). В зависимости от вида дрожжей, высокий статистический показатель (Score ≥ 2.3) зарегистрирован для 42-100% образцов. Использование MALDI-ToF MS является наиболее достоверным и информативным методом идентификации грибов рода Candida.

Ключевые слова: грибы рода *Candida*; MALDI-ToF MS; методы пробоподготовки.

Для цитирования: Анисимова А.С., Полеева М.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 244-249. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

Для корреспонденции: Анисимова Анастасия Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. природно-очаговых и зоонозных инфекций; e-mail: info@tularemia.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.12.2021

Принята к печати 18.03.2022

Опубликовано 17.04.2022

Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V.

PECULIARITIES OF *CANDIDA* YEAST IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS (MALDI-TOF MS)

Federal State Health Institution «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 344002 Rostov-on-Don, Russia

To carry the comparative analysis of sample preparation methods for the most effective identification of Candida yeast by mass spectrometric analysis. 265 strains of yeast and yeast-like fungi isolated from the sputum of patients with pneumonia were investigated. The selected strains were identified by conventional methods (cultural, morphological, tinctorial, enzymatic properties) and MALDI-ToF MS using the Autoflex speed III Bruker Daltonics mass spectrometer (Germany) and Flex Control software. To evaluate the effectiveness of fungi species determination, the comparative analysis of sample preparation was performed using 4 methods: direct application to the target, an extended direct application method, protein extraction using ethanol/formic acid or trifluoroacetic acid. The accelerated scheme of identification of fungi by the culture method does not provide clear and unambiguous results. When using mass spectrometric analysis, the reliability of the results depended on the sample preparation. A comparative study of the effectiveness of fungi species determination by various methods of the sample preparation of 50 clinical isolates was carried out. It was revealed that the extraction of cells using TFC acid does not lead to the appearance of the recordable protein spectra. The use of direct and extended direct application methods made it possible to establish the species only in 32-44% of the strains. The most effective method of sample preparation was the method using formic acid and ethanol, which allowed us to determine the species affiliation in 100% of the studied fungi (Score 2.0). Depending on the yeast species, a high statistical indicator (Score ≥ 2.3) was registered for 42-100% of samples. The results of present study show that the use of MALDI-ToF MS is the most reliable and informative method of Candida spp. identification.

Key words: *Candida* fungi; MALDI-ToF MS; sample preparation methods.

For citation: Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Peculiarities of *Candida* yeast identification by mass spectrometric analysis (MALDI-ToF MS). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 244-249 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

For correspondence: Anisimova A.S., Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections; e-mail: info@tularemia.ru

Information about authors:

Anisimova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4010-2138>;
Poleeva M.V., <https://orcid.org/0000-0001-8086-376X>;
Aronova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>;
Tsimbalistova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>;
Pavlovich N. V., <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 09.12.2021

Accepted 18.03.2022

Published 17.04.2022

Введение. Интенсификация промышленного и сельскохозяйственного производства, сокращение зелёных массивов, использование различных химикатов, другие факторы деятельности человека ведут к постоянному ухудшению экологической обстановки на планете. Следствием подобных процессов является изменение естественного биоценоза, которое при снижении иммунного статуса организма человека, обуславливает преодоление межвидового барьера (от диких животных к человеку) и появление новых инфекционных заболеваний. При этом всё большее значение приобретают заболевания, вызванные ассоциацией микроорганизмов, в частности, вирусы-бактерии-грибы. Грибы в редких случаях являются возбудителями болезней, однако, присоединяясь к бактериальным возбудителям, они осложняют течение инфекционного процесса. Роль грибов в инфекционной патологии человека в последние годы существенно возрастает. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) отмечает, что около 20% населения мира страдает микозами. Несмотря на все усилия по профилактике, диагностике и лечению, количество выявляемых кандидозов имеет тенденцию к увеличению [1].

Эта проблема резко усугубилась из-за развития пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной вирусом SARS-CoV-2. Данное заболевание характеризуется полисимптомокомплексом, однако наиболее тяжёлое течение определяет вирусное поражение лёгких при резком снижении иммунного статуса организма (цитокиновый хаос, лейкопения и др.). Широкое применение антибактериальных и кортикостероидных препаратов, рекомендованных для лечения пациентов с COVID-19, значительно повышает риск появления микотических осложнений [2]. Иллюстрацией может служить тот факт, что при исследовании микробного спектра мокроты у больных с ковидной пневмонией чётко показано присутствие различных видов дрожжей в диагностических количествах (около 40% пациентов) [3, 4].

Кандидозное поражение органов при бактериальных или вирусных болезнях существенно осложняет течение инфекционного процесса и снижает эффективность этиотропной терапии, что может повышать процент неблагоприятных исходов заболевания. Это обосновывает необходимость определения всех ассоциантов (вирусы, бактерии, грибы), вызывающих поражение лёгких.

При микологическом исследовании важным этапом является идентификация грибов до вида с оценкой их чувствительности к антимикотикам, так как в литературе имеются данные о постепенной смене наиболее распространённых видов кандид на более экзотические [1]. Осуществляется постепенный переход от наиболее часто выделяемой при различных заболеваниях *C. albicans* к видам *C. non-albicans* (*C. tropicalis*, *C. gla-*

brata, *C. parapsilosis*). *C. glabrata* является наиболее распространённым видом в Северной Европе и США, тогда как в Испании и Бразилии более часто выявляется *C. parapsilosis*. В Азиатском регионе преобладает *C. tropicalis* [5, 6]. Увеличивается уровень резистентности к антимикотикам у изолятов, отличных от *C. albicans* (особенно *C. tropicalis* и *C. glabrata*) [7]. Следует учитывать, что *C. tropicalis* относится к опасным видам, так как способна проникать в кровь и периферические органы [8, 9]. Не очень распространены, но считаются опасными грибы вида *C. krusei*, характеризующиеся устойчивостью к различным антимикотикам. Важным этапом культурального исследования является правильная идентификация гриба и мониторинг возможной смены вида грибов в процессе лечения.

Диагностика микозов хорошо разработана и включает культуральный, иммунологический, молекулярно-генетический методы. Поскольку кандиды относятся к условно-патогенным возбудителям и являются частыми сапрофитами слизистых оболочек человека, иммунологические и молекулярно-генетические методы не являются информативными. Одним из современных методов для быстрой идентификации микроорганизмов является использование времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) [10]. Эта технология внесла существенные изменения в работу микробиологических лабораторий, так как позволяет сократить время идентификации чистых культур до нескольких минут и повысить достоверность получаемых результатов. Идентификация микроорганизмов происходит по масс-спектру рибосомальных белков и проводится в режиме реального времени путём автоматического сравнения полученных масс-пиков образца с базой данных [11]. Важной характеристикой полученного результата является условный показатель, отражающий точность (достоверность) проведенной оценки. Согласно требованиям программного обеспечения MALDI Biotyper для приборов фирмы Bruker Daltonics (Германия) значение этого показателя (Score) должно быть не менее 2,3 для высокой степени вероятности определения вида. По данным ряда авторов, при проведении идентификации кандид с помощью масс-спектрометрического анализа получаемые результаты не всегда отвечают необходимому уровню достоверности, в частности, в отдельных случаях кандиды либо не определяются, либо характеризуются показателем Score 1,7 – <2,0, что свидетельствует о достоверной идентификации рода, но не вида [12]. Данный факт относится преимущественно к виду *C. albicans*. Нельзя исключить, что кандиды в связи с особенностями своей клеточной стенки требуют особой пробоподготовки. В рекомендациях нет единого мнения

по выбору оптимальных методов проведения белкового профилирования кандид (Методические рекомендации МР 4.2.0089-14, Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics «Прямое белковое профилирование»; 2010 г.).

Целью исследования явился сравнительный анализ методов пробоподготовки образцов для получения наиболее эффективных результатов идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа.

Материал и методы. В работе использованы 265 штаммов грибов рода *Candida*, полученных при исследовании клинических образцов мокроты от больных с пневмонией. Грибы культивировали на агаре Сабуро и хромогенной среде HiCrome Candida Agar (HiMedia, Индия) при температуре 37° С. Видовую идентификацию проводили по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным свойствам (ферментация глюкозы, лактозы, сахарозы, галактозы, мальтозы, трегалозы). Учёт результатов проводили в соответствии с Методическими рекомендациями НИ-ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН «Грибы рода *Candida*. Методы выделения, идентификации на видовом уровне и определение чувствительности к противогрибковым препаратам» [14].

Для дальнейшей работы создана коллекция, включающая 47 изолятов грибов рода *Candida*, отличающихся по морфологии роста и 3 культуры *Geotrichum capitatum*. Видовую идентификацию отобранных штаммов проводили методом времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения MALDI Biotyper. Полученные масс-спектры сравнивали с базой белковых спектров микроорганизмов компании Bruker версия 3.1.66 (Bruker Daltonics, Германия). Вероятность соответствия исследуемого спектра известному таксону определяли по показателю Score: высокая достоверность видовой идентификации характеризуется $Score \geq 2,3$; высокая достоверность родовой идентификации и вероятная идентификация вида – $Score 2,0 - < 2,3$; возможная родо-видовая идентификация – $Score 1,7 - < 2,0$; $Score < 1,7$ – отсутствие надёжной идентификации.

Подготовку образцов для масс-спектрометрии осуществляли с помощью 4-х методов: прямым нанесением образцов на мишень, расширенным методом прямого нанесения, путём экстракции белков с использованием этанола и муравьиной кислоты, экстракции трифторуксусной кислотой (МР 4.2.0089-14, МУ для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics «Прямое белковое профилирование»; 2010 г.) [13]. При прямых методах материал на мишень наносили последовательно на две лунки с истощением образца. В качестве матрицы использована α -циано-4-гидроксикоричная кислота.

Для устранения возможных случайных отклонений учитывали результаты, полученные в 2-3-х экспериментах.

Результаты. В декабре 2020 г. на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проведено исследование видового состава возбудителей пневмоний у коронапозитивных (COVID-19⁺) и коронанегативных (COVID-19⁻) пациентов ($n=429$). Микрофлора мокроты представлена грамотрицательными и грамположительными бактериями [4]. В 46% случаев от больных, которые имели грибы

в диагностических количествах ($\geq 10^4$ кл./мл), изолированы 199 штаммов. От пациентов с кандидоносительством ($\leq 5 \cdot 10^3$ кл./мл) выделено ещё 66 культур грибов. При сравнительном анализе инфицирования кандидами у COVID-19⁺ и COVID-19⁻ больных достоверная разница не установлена. Высокая частота обнаружения грибов обусловила целесообразность проведения их быстрой и точной видовой дифференциации. Научный и практический интерес представлял видовой спектр грибов.

По культуральным свойствам на среде Сабуро удалось чётко дифференцировать штаммы, относящиеся к видам *C. krusei* и *Geotrichum capitatum*. Другие грибы имели похожую морфологию колоний и для определения их видовой принадлежности необходимы иные методы. Информативным оказался посев на хромогенную среду HiCrome Candida Agar, на которой различные виды грибов приобретали разную окраску. Через 24-48 часов инкубации колонии *C. albicans* приобретали зелёный оттенок, *C. tropicalis* – синий с металлическим блеском, *C. krusei* – пурпурный, *C. glabrata* – белый. Ряд культур из исследуемой коллекции, которые в дальнейшем идентифицированы как *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, давали окраску, подобную другим видам, что затрудняло их дифференциацию. Виды *C. kefyr*, *C. inconspicua* имели белый цвет, как и *C. glabrata*, а *C. dubliniensis* окрашивалась в сине-зелёный цвет, как и *C. albicans*, *G. capitatum* имел пурпурный, аналогичный *C. krusei*.

Попытки уточнить таксономическое положение выделенных грибов с помощью исследования их ферментативной активности (глюкоза, лактоза, сахароза, галактоза, мальтоза, трегалоза) не увенчались успехом. Идентифицированы только два вида грибов рода *Candida* – биохимически инертная *C. krusei* и ферментирующая лактозу *C. kefyr* [14]. Получить однозначные результаты по этим тестам не удалось.

Общепринятые методы идентификации грибов рода *Candida* трудоёмки, требуют много времени, и не всегда дают чёткие результаты.

При идентификации возбудителей инфекционных заболеваний широкое распространение получил метод масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS), который позволяет получать быстрые и достоверные результаты исследования (МР 4.2.0089-14) [13]. Для дальнейшей работы по идентификации грибов с помощью масс-спектрометрического анализа сформирована коллекция из 50 клинических штаммов, отличающиеся по тем или иным признакам, включая 3 штамма *G. capitatum*. Все образцы выделены от больных в этиологически значимых количествах, что предполагает их участие в патогенезе пневмонии.

При проведении масс-спектрометрического анализа с помощью прямого нанесения образцов на мишень в большом количестве случаев видовой принадлежности различных грибов не установлена. При исследовании материала в первой лунке достоверно определить таксон не удалось у 88% штаммов ($Score \leq 1,7$), тогда как во второй лунке (с меньшим количеством исследуемой культуры) – принадлежность не установлена у 40% штаммов (табл. 1).

Частота достоверных результатов выше во второй лунке, что, по-видимому, связано с лучшей кристаллизацией материала при более тонком нанесении материала на пластину. Однако, и в этом случае процент штаммов,

Сравнительный анализ результатов белкового профилирования образцов при двукратном последовательном нанесении материала с помощью прямого метода

Вид грибов, количество штаммов, <i>n</i>	Уровень достоверности (Score)	Идентификация штаммов методом прямого нанесения, % (абс.)	
		1 лунка нанесения	2 лунка нанесения
Общее количество штаммов, <i>n</i> =50	2,0-<2,3	2 (1)	44 (22)
	1,7-<2,0	10 (5)	16 (8)
	<1,7	88 (44)	40 (20)
<i>C. albicans</i> , <i>n</i> =33	2,0-<2,3	0	42 (14)
	1,7-<2,0	15 (5)	18 (6)
	<1,7	85 (28)	39 (13)
<i>C. non-albicans</i> , <i>n</i> =17	2,0-<2,3	6 (1)	47 (8)
	1,7-<2,0	0	12 (2)
	<1,7	94 (16)	41 (7)

идентифицированных до вида (Score>2,0), составлял менее 50% (см. табл. 1).

Это определило целесообразность изучения влияния пробоподготовки на эффективность идентификации грибов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Для реализации данной цели использован прямой и расширенный прямой методы (с учётом результатов второго последовательного нанесения), методы экстракции образцов муравьиной и трифторуксусной кислотой (ТФУ). Ни у одного из исследуемых штаммов при применении прямого и расширенного прямого методов нанесения не удалось определить видовую принадлежность с высокой степенью достоверности (Score≥2,3). 32-44% штаммов грибов имели точность идентификации с показателем достоверности 2,0-<2,3 (табл. 2). Проведенное исследование показало непригодность использования ТФУ-кислоты при идентификации грибов методом MALDI-ToF, так как получить белковые профили с помощью этого метода не удалось.

Наиболее эффективным оказался метод пробоподготовки с помощью обработки клеток грибов этанолом и муравьиной кислотой. Точность оценки таксономической принадлежности исследованных грибов с показателем достоверности Score≥2,0 составила 100% для всех видов грибов, из них 50% имели высокие показатели Score≥2,3. При использовании данного метода в исследуемой коллекции точно определено таксономическое положение всех видов грибов рода *Candida* и *G. capitatum*. Некоторые особенности экстракции белков с этанолом и муравьиной кислотой наблюдались при исследовании штаммов *G. capitatum*. Для получения более высокой достоверности результата требовалось увеличить в 2 раза количество микробного материала для экстракции по сравнению с грибами рода *Candida*.

При сравнительном изучении методов пробоподготовки грибов для белкового профилирования с помощью MALDI-ToF MS выявлено, что наиболее адекватным и эффективным методом является экстракция микробных белков с использованием муравьиной кислоты и этанола.

Заключение. По мнению некоторых авторов, сегодня человечество переживает эпидемию оппортунистических инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Среди них важное место занимают грибы, из которых наиболее частыми возбудителями микозов являются грибы рода *Candida* [15].

Подтверждение получено при изучении этиологической структуры внебольничных пневмоний на фоне пандемического распространения коронавирусной инфекции. Часто (около 40%) из мокроты больных изолированы различные виды грибов [3, 4]. При идентификации до вида выделенных грибов мы столкнулись с определенными трудностями. Традиционные методы диагностики не всегда давали однозначный результат, позволяющий определить таксономическое положение грибов. Некоторые виды кандид, например, *C. albicans* и *C. dubliniensis* имеют идентичную окраску на хромогенной среде и морфологию колоний.

В настоящее время широкое применение в лабораторной практике получили методы автоматической идентификации микроорганизмов с использованием анализаторов, например, Microscan, Vitek, MALDI-ToF MS и др., которые позволяют быстро получить информацию о виде возбудителя заболевания.

Вместе с тем, проведенное нами исследование с помощью MALDI-ToF MS по идентификации дрожжей, выделенных от больных с пневмониями, показало, что на достоверность получаемых результатов значительно влияет пробоподготовка образцов для белкового профилирования. Как установлено, при прямом и расширенном прямом методах нанесения достоверно определить видовую принадлежность грибов (Score ≥ 2,0) удастся лишь в 32 – 44% случаев. Следует отметить, что несколько лучшие результаты были получены при изучении белковых спектров во второй лунке при более тонком нанесении материала. Использование метода экстракции с помощью ТФУ-кислоты оказалось неинформативным. В то же время доказано, что наиболее оптимальным способом подготовки культур дрожжевых грибов для масс-спектрометрической идентификации является применение этанола и муравьиной кислоты. В этом случае определяется видовая принадлежность 100% грибов с показателем Score ≥ 2,0 и, в зависимости от вида, 42 – 100% со Score ≥ 2,3.

Таким образом, для идентификации грибов MALDI-ToF MS является наиболее предпочтительным, быстрым и информативным методом определения их видовой принадлежности. В условиях чрезвычайной ситуации (например, пандемия коронавирусной инфекции) при большом объеме проводимых исследований данный метод является удобным подспорьем в лабораторной практике изучения возбудителей оппортунистических инфекций.

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения трех методов пробоподготовки образцов дрожжей для масс-спектрометрического анализа

Вид грибов, количество штаммов, <i>n</i>	Уровень достоверности (Score)	Идентификация штаммов разными методами пробоподготовки, % (абс.)		
		Прямой метод нанесения	Расширенный метод прямого нанесения	Экстракция этанолом и муравьиной кислотой
Общее количество штаммов, <i>n</i> =50	≥2,3	0	0	50 (25)
	2,0-<2,3	44 (22)	32 (16)	50 (25)
	1,7-<2,0	16 (8)	46 (23)	0
	<1,7	40 (20)	22 (11)	0
<i>C. albicans</i> , <i>n</i> =33	≥2,3	0	0	42 (14)
	2,0-<2,3	42 (14)	27 (9)	58 (19)
	1,7-<2,0	18 (6)	45 (15)	0
	<1,7	39 (13)	27 (9)	0
<i>C. krusei</i> , <i>n</i> =4	≥2,3	0	0	100 (4)
	2,0-<2,3	50 (2)	50 (2)	0
	1,7-<2,0	25 (1)	50 (2)	0
	<1,7	25 (1)	0	0
<i>C. glabrata</i> , <i>n</i> =4	≥2,3	0	0	75 (3)
	2,0-<2,3	50 (2)	25 (1)	25 (1)
	1,7-<2,0	25 (1)	25 (1)	0
	<1,7	25 (1)	50 (2)	0
<i>Geotrichum capitatum</i> , <i>n</i> =3	≥2,3	0	0	66 (2)
	2,0-<2,3	33 (1)	33 (1)	33 (1)
	1,7-<2,0	0	66 (2)	0
	<1,7	66 (2)	0	0
<i>C. dubliniensis</i> , <i>n</i> =2	≥2,3	0	0	50 (1)
	2,0-<2,3	50 (1)	100 (2)	50 (1)
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	50 (1)	0	0
<i>C. kefyr</i> , <i>n</i> =2	≥2,3	0	0	50 (1)
	2,0-<2,3	50 (1)	100 (2)	50 (1)
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	50 (1)	0	0
<i>C. tropicalis</i> , <i>n</i> =1	≥2,3	0	0	1
	2,0-<2,3	1	0	0
	1,7-<2,0	0	1	0
	<1,7	0	0	0
<i>C. inconspicua</i> , <i>n</i> =1	≥2,3	0	0	0
	2,0-<2,3	0	1	1
	1,7-<2,0	0	0	0
	<1,7	1	0	0

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5–10 см. REFERENCES)

- Багирова Н.С. Инвазивные грибковые инфекции: пересмотр определений, новое в диагностике по данным EORTC/MSGERC. *Злокачественные опухоли*. 2020; 3s1: 39-48. DOI: 10.18027 / 2224-5057-2019-10-3s1-39-48.
- Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май-июнь 2020 г.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49.
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалёв Е.В., Чемисова О.С. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105.
- Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Применение метода MALDI-ToF MS в современной микробиологической лаборатории. *Поликлиника*. 2016; 1-3: 53-6.
- Муравьёва В.В., Припутневич Т.В., Завьялова М.Г., Анкирская А.С., Ильина Е.Н. Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-ToF MS и традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16 (1):11-7.
- Чеботарь И.В., Поликарпова С.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III-IV групп патогенности. *Лабораторная служба*. 2018; 7(2):78-86. DOI: 10.17116/labs20187278-86.
- Кубась В.Г. Этиология, патогенез и лабораторная диагностика кандидоза. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/kandidoz3.htm> (дата обращения 15.11.21).

15. Селькова Е.П. Кандидозы: клиника и лабораторная диагностика. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gabrich.com/science/candid-obzor.html> (дата обращения 15.11.21).

REFERENCES

1. Bagirova N.S. Invasive fungal infections: revision of definitions, new in diagnostics according to EORTC/MSGERC. *Zlokachestvennye opukholi*. 2020; 3s1: 39-48. DOI: 10.18027 / 2224-5057-2019-10-3s1-39-48 (in Russian)
2. Song G., Liang G., Liu W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. *Mycopathologia*. 2020; 185(4):599-606. DOI: 10.1007/s11046-020-00462-9.
3. Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Characteristics of bacterial microflora isolated from sputum of patients with pneumonia registered in Khabarovsk city and Khabarovsk territory in the initial period of COVID-19 pandemic in may-june, 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 3:43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49. (in Russian)
4. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Noskov A.K., Kovalev E.V., Chemisova O.S. et al. Features of the etiology of community-acquired pneumonia associated with COVID-19. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 4:99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105. (in Russian)
5. Steinbach W.J., Roilides E., Berman D., Hoffman J.A., Groll A.H., Bin-Hussain I. et al. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. *International pediatric fungal network. pediatr. infect. dis. j.* 2012; 31:1252-7. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182737427.
6. Kathuria S., Singh P.K., Sharma C., Prakash A., Masih A., Kumar A. et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(6):1823-30. DOI: 10.1128/JCM.00367-15.
7. Pana Z.D., Roilides E., Warris A., Groll A. H., Zaoutis T. Epidemiology of invasive fungal disease in children. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2017; 6: S3-11. DOI: 10.1093/jpids/pix046.
8. Togano T., Suzuki Y., Nakamura F., Tse W, Kume H. Epidemiology of visceral mycoses in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome: analyzing the national autopsy database in Japan. *Med. Mycol. J.* 2021; 59(1):50-7. DOI: 10.1093/mmy/myaa029.
9. Kume H., Yamazaki T., Togano T., Abe M., Tanuma H., Kawana S. et al. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. *Med. Mycol. J.* 2011; 52(2):117-27. DOI: 10.3314/jjmm.52.117.
10. Oliver J.C., Laghi L., Parolin C., Foschi C., Marangoni A., Liberatore A. et al. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):16716. DOI: 10.1038/s41598-020-73889-1.
11. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Application of the MALDI-TOF MS method in a modern microbiological laboratory. *Poliklinika*. 2016; 1-3: 53-6. (in Russian)
12. Murav'eva V.V., Priputnevich T.V., Zav'yalova M. G., Ankirskaya A.S., Il'ina E. N. Comparative assessment of species identification of vaginal yeast isolates by MALDI-ToF MS and traditional (biochemical and phenotypic) methods. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16 (1):11-7. (in Russian)
13. Chebotar' I.V., Polikarpova S.V., Bocharova Yu.A., Mayanskii N.A. Use of time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization (MALDI-ToF MS) for identification of bacterial and fungal pathogens of III-IV pathogenicity groups. *Laboratornaya sluzhba*. 2018; 7(2):78-86. DOI: 10.17116/labs20187278-86. (in Russian)
14. Kubas' V.G. Etiology, pathogenesis and laboratory diagnosis of candidiasis. Available at: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/kandidoz3.htm> (accessed 15 November 2021) (in Russian)
15. Sel'kova E.P. Candidiasis: clinic and laboratory diagnostics. Available at: <http://www.gabrich.com/science/candid-obzor.html> (accessed 16 November 2021). (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Фонова Е.А. Васильева О.Ю., Зарубин А.А., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Скрыбин Н.А.

АНАЛИЗ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *ATP7B* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Научно-исследовательский институт медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», 634050, г. Томск, Россия

Целью работы являлся поиск мутаций в гене *ATP7B* с помощью массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области. Молекулярно-генетический анализ проводили у 42 пациентов в возрасте от 1 года до 33 лет с подозрением на болезнь Вильсона-Коновалова. Обогащение интересующих регионов генома проводили с помощью ПЦР длинных фрагментов. Для подготовки ДНК библиотек был использован набор Nextera DNA Flex (Illumina, США). Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США). В результате проведенной работы выявлено 9 патогенных вариантов. Все выявленные варианты были ранее описаны в литературе и встречались у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. Были выявлены 5 миссенс-мутаций, 1 мутация сайта сплайсинга и 3 мутации со сдвигом рамки считывания. Чаще всего у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области встречался вариант с.3207C>A, данный вариант является наиболее распространенным как в Российской Федерации, так и в других европейских популяциях. Кроме того, был обнаружен патогенетически значимый вариант с.3036dupC, который, вероятно является эндемичным для России. Выявленный спектр и частота мутаций в целом совпадают с мутациями, выявленными в европейских популяциях. При этом в результате проведенной работы идентифицирован вариант нуклеотидной последовательности в гене *ATP7B*, эндемичный для России.

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова; массовое параллельное секвенирование; ген *ATP7B*.

Для цитирования: Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Фонова Е.А. Васильева О.Ю., Зарубин А.А., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Скрыбин Н.А. Анализ спектра мутаций в гене *ATP7B* с использованием массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (4): 250-256. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

Для корреспонденции: Сивцев Алексей Алексеевич, мл. науч. сотр. лаб. геномики орфанных болезней; e-mail: sivtsev.alexey@medgenetics.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания № АААА-А19-119090990020-0 и поддержано грантом Федерального Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «УМНИК» на проведение НИИР по договору №55954.

Поступила 05.09.2021

Принята к печати 21.11.2021

Опубликовано 17.04.2022

Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrikan A.E., Fonova E.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Skryabin N.A.

ANALYSIS OF MUTATIONS SPECTRUM IN THE *ATP7B* GENE IN PATIENTS WITH WILSON DISEASE USING MASSIVELY PARALLEL SEQUENCING

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, 634050, Tomsk, Russian Federation

The study aimed to search for mutations in the *ATP7B* gene using massively parallel sequencing in patients with Wilson disease in the Tomsk region. For 42 patients with suspected Wilson's disease (aged from 1 to 33 years) was performed molecular genetic analysis. Enrichment of the interest genome regions was carried out by the long-range PCR. DNA libraries with ligated adapters were constructed with Nextera DNA Flex (Illumina, USA) kit. Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina, USA). As a result of this work, we identified 9 pathogenic genetic variants. All variants were previously described in the literature and were found in patients with Wilson's disease. Five missense mutations, one splice site mutation, and 3 frame-shift mutations were identified. In patients with Wilson's disease in the Tomsk region, the most common variant was с.3207C>A, this variant is the most common both in the Russian Federation and in other European populations. Also, a pathogenic variant с.3036dupC was found, which is probably endemic to the Russian Federation.

Key words: Wilson disease; massively parallel sequencing (MPS); *ATP7B*.

For citation: Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Fonova E.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Skryabin N.A. Analysis of mutations spectrum in the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease using massively parallel sequencing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 244-249. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249

For correspondence: Sivtsev A.A., Junior Researcher, Laboratory of Genomics of Orphan Diseases; e-mail: sivtsev.alexey@medgenetics.ru

Information about authors:

Sivtsev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1670-2942>;
Zhalsanova I.Zh., <https://orcid.org/0000-0001-6848-7749>;
Postrigan A.E., <https://orcid.org/0000-0002-5144-001X>;
Fonova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-1338-5451>;
Vasilyeva O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5797-0014>;
Zarubin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6568-6339>;
Minaicheva L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1752-2521>;
Agafonova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0169-2072>;
Petrova V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4400-994X>;
Ravzhaeva E.G., <https://orcid.org/0000-0002-9516-7262>;
Salyukova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-8922-3635>;
Skryabin N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2491-3141>.

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

Acknowledgment. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of state task No. AAAA 19-119090990020-0 and supported by a grant from the Federal Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere within the framework of the UMNIC program for conducting research under contract No. 55954.

Received 05.09.2021

Accepted 21.11.2021

Published 17.04.2022

Введение. Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК, гепатолентикулярная дегенерация, гепатocereбральная дистрофия, OMIM 277900) – тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу наследования, в основе которого лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер) [1]. Распространенность БВК по данным Orphanet составляет 1-9 случаев на 100 000 населения. Частота выявления новых случаев – от 1 на 30 000 до 1 на 100 000 населения. Органами мишенями чаще всего выступают печень и подкорковые ядра. Можно выделить две стадии течения заболевания: латентную и клинических проявлений. Латентная стадия выявляется только изменением лабораторных показателей при отсутствии клинических проявлений. Так же выявляют стадию отрицательного баланса меди, при которой наблюдается регресс клинических и лабораторных проявлений болезни Вильсона–Коновалова [1].

Причиной возникновения БВК являются мутации гена *ATP7B*, который локализован на 13 хромосоме в локусе 13q14.3 и кодирует медьтранспортирующую АТФ-азу Р-типа – ATP7B. К настоящему времени идентифицировано более 900 различных мутаций в данном гене, и для 380 из них доказана роль в патогенезе заболевания. Чаще всего встречаются миссенс-мутации, также имеют место делеции, инсерции, нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания и мутации сайтов сплайсинга. Наиболее частой мутацией, приводящей к возникновению БВК в европейских популяциях, является точечная мутация с.3207C>A в экзоне 14, приводящая к замене аминокислоты гистидина в положении 1069 на глутаминовую кислоту (His1069Gln). Доля мутации с.3207C>A в российской выборке больных составля-

ет около 50% [2]. Клинические симптомы заболевания наиболее выражены у пациентов-гомозигот, имеющих две идентичные мутации. Однако наибольшее число пациентов являются компаунд-гетерозиготами, т.е. имеют различные мутации в гомологичных хромосомах, каждая из которых унаследована от одного из родителей.

Материал и методы. Молекулярно-генетический анализ проводился 42 пациентам в возрасте от 1 года до 33 лет с подозрением на болезнь Вильсона–Коновалова. Исследование было выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Все пациенты были распределены на две группы согласно балльной количественной шкале [1]. Пациенты были оценены по типичным клиническим симптомам и признакам БВК (кольца Kaysera–Флейшера, неврологические симптомы или характерные проявления при МРТ головного мозга, концентрация церулоплазмينا сыворотки крови и экскреция меди с мочой). Критерием для направления пациентов на подтверждение БВК являлся пороговый балл от 3 единиц и выше (без учета баллов за молекулярно-генетическую диагностику). При показателе от 2 баллов и ниже принято считать, что диагноз БВК маловероятен, но не исключен. Не для всех пациентов были доступны данные о некоторых критериях Лейпцигской шкалы (гемолитическая анемия с отрицательной пробой Кумбса, содержание меди в печени), поэтому было необходимо исследование большего количества показателей, для чего группа пациентов с баллами от 2-х и меньше была направлена на исключение БВК [1].

Всего на молекулярно-генетическую диагностику болезни Вильсона–Коновалова было отправлено 42 па-

циента, из них 35 пробандов и 7 родственников (родители, сибсы). Из них на подтверждение БВК было направлено 8 пробандов (по Лейпцигской шкале от трех и более баллов), на исключение БВК было направлено 27 пробандов и 7 их родственников (по Лейпцигской шкале до двух баллов включительно).

В работе использовали геномную ДНК обследуемых, выделенную из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для анализа мутаций в гене *ATP7B* была разработана панель праймеров для секвенирования полной последовательности гена с помощью таргетного массового параллельного секвенирования (табл. 1). Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (Biolabmix, Россия) с наработкой фрагментов на амплификаторе SureCycler 8800 (Agilent Technologies, США). Амплификация проводилась при следующем режиме: 94 °C, 4 мин; 10 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин; 20 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин (+10 с за цикл). Присутствие амплифицированных продуктов проверялось с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Для пробоподготовки использовалось лигирование адаптеров с помощью тагментазы (Nextera DNA flex, Illumina, США). Для определения концентрации образцов вкДНК использовался флуориметр Qubit 3.0 (Invitrogen, США) с набором реактивов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Проверку качества ДНК библиотек проводили с помощью электрофоретического биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США). Анализ ДНК пациентов проведен на секвенаторе нового поколения

MiSeq (Illumina, США). Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного пакета программ. Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы FastQC. Для удаления адаптеров и тримминга последовательности использовался программный пакет Trimmomatic-0.36. Выравнивание прочтений на целевые последовательности гена *ATP7B* (GRCh37/hg19) осуществлялось с помощью Bowtie2. Для аннотирования выявленных генетических вариантов использовалась программа Annovar.

Оценка клинической релевантности выявленных вариантов производилась в соответствии с протоколом, рекомендованным Российским обществом медицинских генетиков, при этом использовались базы данных OMIM, ExAC, gnomAD, «1000 Genomes», LOVD 3.0 и литературные данные [5].

Все выявленные мутации были подтверждены с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Реакцию секвенирования проводили в соответствии с протоколом производителя с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование осуществлялось на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, США). Результаты анализировали с помощью программы BioEdit 7.2.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование на наличие мутаций гена *ATP7B* у 42 пациентов. Было выявлено 3 семейных и 7 спорадических случаев. У 6 пациентов выявлены причины болезни Вильсона-Коновалова – 5 компаунд-гетерозигот и одна гомозиготная мутация *ATP7B* c.3207C>A, у 9 пациентов найдена одна мутация в гене *ATP7B*, ассоциированная с болезнью Вильсона-Коновалова. Частая мутация *ATP7B*

Таблица 1

Праймеры для амплификации фрагментов гена *ATP7B*

Последовательность праймеров	Длина ПЦР-продукта (п.о.)	Координаты (hg38)
F1 5'-GAAAGTGGAGCGAGTGTGGA-3'	7560	chr13:51,973,844-51,981,403
R1 5'-AGCAGGGCTCACCTATACCA-3'		
F2.4 5'-AATTCTCACGGATTTTCCAAAGCAG-3'	5509	chr13:51,964,406-51,969,914
R2.4 5'-TCTCTTTTCTACCCCAAGTGTG-3'		
F2.5 5'-TCAAACATAGCATGTTCTAGGCATC-3'	6721	chr13:51,967,821-51,974,541
R2.5 5'-TTACAAAGCACTAACCCAAAGAGAC-3'		
F4 5'-TTTTTCGGGAAAGCAGTGCG-3'	8282	chr13:51,939,724-51,948,005
R4 5'-CATACGAGAGGGCACGACTC-3'		
F5 5'-GTCATACGTGCTCCTTGACAG-3'	6561	chr13:51,932,933-51,939,493
R5 5'-CAATTACTGACGGACAGCGG-3'		
F7 5'-TGCTCACCTCAACAATTGC-3'	5602	chr13:52,006,868-52,012,469
R7 5'-CCACCTCCCACTGAAGGAAT-3'		
F13 5'-CTAGTGGAGATGCTTGGCTG-3'	5341	chr13:51,931,715-51,937,055
R13 5'-CAATGGGACATGCACACAAC-3'		
F15 5'-AGAGTCCAAACTCACGAGGA-3'	8348	chr13:51,956,648-51,964,995
R15 5'-CAGTAGTCCAAAGCGAGACC-3'		
F16 5'-TGGTACTTCTACGTTTCAGGC-3'	5190	chr13:51,953,343-51,958,532
R16 5'-ACTAAAGGTCAGACCCCTCT-3'		
F17 5'-TGGTGGATAGCAAGTAACGC-3'	11454	chr13:51,946,315-51,957,768
R17 5'-TTGATGAGGATGCCGTTCTG-3'		

Таблица 2

Варианты нуклеотидной последовательности в гене *ATP7B*, выявленные в данном исследовании

Мутация*	Число хромосом	Частота, %
c.3207C>A:p.His1069Gln	10	50,0
c.3556+1G>T	1	5,0
c.3036dupC:p.Lys1013fs	3	15,0
c.254G>T:p.Gly85Val	1	5,0
c.3128T>C:p.Leu1043Pro	1	5,0
c.*1265A>G: 3'UTR	1	5,0
c.2605G>T:p.Gly869Ter	2	10,0
c.3973delC:p.Leu1325TrpfsTer3	1	5,0

Примечание. * – позиция кДНК указана в варианте транскрипта NM_000053.

c.3207C>A составила 10 из 20 найденных вариантов, что соответствует популяционной частоте в Российской Федерации (табл. 2) [4].

Из группы пациентов, отправленных на подтверждение БВК, гомозиготный и компаунд-гетерозиготные варианты были выявлены у 5 индивидуумов (62,5%), у одного выявлено гетерозиготное носительство, у 2-х пациентов патогенных вариантов не обнаружено. Из 27 пациентов, направленных на исключение БВК, у 22 патогенных вариантов не обнаружено, гетерозиготное носительство было выявлено у 5 пациентов. При уточнении клинико-генеалогического анамнеза было выяснено, что

у троих из них есть родственники первой степени родства с подтвержденной болезнью Вильсона-Коновалова.

В результате проведенной работы обнаружено: три миссенс-мутации, две мутации со сдвигом рамки считывания; одна мутация в каноническом сайте сплайсинга; одна нонсенс мутация и одна мутация с неизвестной значимостью в 3'-нетранслируемой области гена *ATP7B* (табл. 2).

В семье № 1 у пробанда (пациент 1.1, возраст на момент осмотра 9 лет) и сибса (пациент 1.2, возраст на момент осмотра 14 лет) выставлен диагноз болезнь Вильсона-Коновалова (табл. 3). У пациента 1.1 во время

Таблица 3

Мутации в гене *ATP7B*, идентифицированные у больных с болезнью Вильсона-Коновалова

№ семьи	№ пациента	Возраст, годы	Экзон / интрон	Транскрипт	Мутация
1	1.1	9	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	1.2	14	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	2.1	8	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
			Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
2	2.2	31	Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
	2.3	33	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	2.4	1	-	-	-
			Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A: p.His1069Gln
3	3.1	21	Экзон 11	NM_000053	c.2605G>T:p.Gly869Ter
			Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A: p.His1069Gln
	3.2	10	Экзон 11	NM_000053	c.2605G>T:p.Gly869Ter
			Интрон16	NM_000053	c.3556+1G>T
4	4.1	24	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
5	5.1	15	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
6	6.1	29	Экзон 19	NM_000053	c.3973delC: p.Leu1325TrpfsTer3
7	7.1	4	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
8	8.1	25	Экзон 21	NM_000053	c.*1265A>G
9	9.1	11	Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
10	10.1	28	Экзон 2	NM_000053	c.254G>T:p.Gly85Val
			Экзон 14	NM_000053	c.3128T>C:p.Leu1043Pro

планового обследования перед хирургическим лечением был выявлен синдром гепатоцитолита (повышение АЛТ, АСТ). Консультирован гепатологом, при исследовании крови на содержание церулоплазмينا и меди. В результате секвенирования обнаружена частая мутация с.3207C>A в гетерозиготном состоянии. Данный вариант нуклеотидной последовательности приводит к замене гистидина на глутамин в позиции 1069 белка (p.His1069Gln). В основе фенотипического проявления лежит изменение третичной структуры белка, и как следствие изменение пространственного расположения АТФ-связывающего сайта. В результате нарушается процесс фосфорилирования Р-домена и уменьшается способность связывать АТФ [7].

Пациент 1.2. Клинических и биохимических проявлений болезни Вильсона-Коновалова нет. По результатам секвенирования по Сэнгеру подтверждена мутация с.3207C>A:p.His1069Gln в гетерозиготном состоянии.

В семье № 2 у пробанда (пациент 2.1, возраст на момент осмотра – 8 лет) подтверждён диагноз болезни Вильсона-Коновалова. Обратились на прием к врачу-аллергологу с жалобами на сыпь на коже. Был проведен биохимический анализ крови. Отмечалось повышение АЛТ, АСТ и Гамма-ГТ. Проведен молекулярно-генетический анализ крови на частую мутацию с.3207C>A, в результате которой мутация выявлена в гетерозиготном состоянии. Был выставлен диагноз: болезнь Вильсона-Коновалова. В результате секвенирования полной последовательности гена *ATP7B* выявлена вторая мутация – ранее описанный патогенный вариант с.3036dupC, приводящий к сдвигу рамки считывания (p.Lys1013fs). Предполагается, что в новой рамке считывания образуется стоп-кодон в области аминокислотного остатка 1319. Таким образом, это приводит к потере нормальной функции белка либо посредством его укорочения (синтезируется только 1319 из 1465 аминокислотных остатков) или разрушение мРНК из-за нонсенс-опосредованного распада. Эта мутация была описана в работе М.С. Балашовой [8] при исследовании российской популяции. В своей работе авторы предполагают, что указанная мутация входит в число эндемичных для России вариантов, так как была неоднократно описана при исследовании у пациентов с диагнозом БВК как вероятно патогенная. Данный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в базах данных gnomAD, ExAC и 1000 геномов. При дальнейшем разборе семейного случая установлено наличие у отца пробанда (пациент 2.2) мутации с.3036dupC, а у матери (пациент 2.3) выявлена частая мутация с.3207C>A, у сибса (пациент 2.4) установлено отсутствие данных мутаций

Семья № 3. У пациента 3.1 (возраст на момент осмотра – 21 год). Перед оперативным лечением было зафиксировано повышение уровня трансаминаз. Пациент консультировался гепатологом, было проведено инструментальное исследование печени, поставлен диагноз: цирроз печени. В 2017 г. пациент обратился в клинику иммунопатологии НИИФКИ для лечения стволовыми клетками, где был установлен диагноз – болезнь Вильсона-Коновалова с преимущественным поражением печени с исходом в цирроз печени, класс В по Чайлд-Пью (9 баллов). В возрасте 18 лет в ноябре 2017 г. проведена трансплантация печени. При обследовании в клинике НИИ медицинской генетики было

выявлено повышение уровня трансаминаз до 200-400 Ед/л. Данные осмотра: наблюдается тремор рук, скандированная речь. По результатам массового параллельного секвенирования обнаружены 2 мутации: частая мутация с.3207C>A и нонсенс-мутация с.2605G>T в 14 экзоне, приводящая к возникновению стоп-кодона в 869 кодоне, кодирующем глицин (p.G869X), что приводит к потере нормальной функции белка либо посредством его укорочения, либо разрушение мРНК из-за нонсенс-опосредованного распада.

У сестры пробанда (Пациент 3.2) повышение уровня трансаминаз (до 200-400 Ед/л) впервые было выявлено в возрасте восьми лет. В результате секвенирования обнаружена частая мутация с.3207C>A и нонсенс мутация с.2605G>T:p.G869X, подтвержденные прямым секвенированием по Сэнгеру. Вариант с.2605G>T (chr13:51950132C>A, rs191312027) зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD с общей частотой 0,0004007% (1/249580), европейской 0,0008827% (1/113290) и в базе ALFA Allele Frequency с общей частотой 0,1277% и частотой в европейских популяциях 0,1359%.

Пациентка 4.1 (возраст на момент осмотра – 24 года) в сентябре 2014 г. обратилась на прием к генетику с жалобами на слабость, сонливость, нарушения речи и менструального цикла. Был проведен биохимический анализ крови, выявивший снижение уровня меди и церулоплазмينا (церулоплазмин <0,03 г/л, медь – 7,33 мкмоль/л). Осмотр окулиста выявил кольцо Кайзера-Флейшнера. С января 2015 г. назначен пеницилламин 250 мг/сут. Направлена на молекулярно-генетическую диагностику, идентифицированы два патогенных варианта: частая мутация с.3207C>A и с.3556+1G>T. В январе 2018 г. пациентка обратилась из-за резкого ухудшения состояния и самочувствия с жалобами на нарушение походки, речи, письма, поперхивания во время приема жидкой пищи, неловкость мелкой моторики, при волнении – «топтанье на месте» с затруднением выполнения первого шага, плаксивость, обидчивость, чувство зябкости в ногах, нарушение мочеиспускания (упускание и задержка). При осмотре выявлены: эмоциональная лабильность, гипомимия, рот слегка полуоткрыт, при глотании лёгкая дисфагия, дизартрия, походка с элементами атаксии. Ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности с.3556+1G>T является мутацией в каноническом 5'-сайте сплайсинга. Мутация в донорных сайтах сплайсинга приводит к удлинению вышестоящего экзона, в данном случае экзона 16. Вариант нуклеотидной последовательности зарегистрирован в базе данных ALFA Allele Frequency с общей частотой 0,003%, все зарегистрированные приходятся на европейскую популяцию (0,004%).

Пациентка 5.1 (возраст на момент осмотра – 15 лет). В течение нескольких лет была неоднократно госпитализирована в гастроэнтерологическое отделение. В возрасте 14 лет при биохимическом анализе крови выявлено повышение АЛТ и АСТ. Рекомендована консультация врача-генетика для исключения болезни накопления, в частности, болезни Вильсона-Коновалова. При секвенировании выявлена частая мутация с.3207C>A в гомозиготном состоянии.

У пациента 6.1 отягощенная наследственность по болезни Вильсона-Коновалова – у бабушки пациентки по материнской линии и у родного брата бабушки был поставлен диагноз БВК в Московском институте неврологических заболеваний РАМН. Бабушка пациентки скон-

чалась в возрасте 42 лет, ее брат умер в 52 года. Мать пациентки является гетерозиготным носителем. Родная сестра пациентки умерла в возрасте 16 лет, причина смерти: цирроз печени неуточненной этиологии, при морфологическом исследовании печени были обнаружены орсеинположительные гранулы в цитоплазме (скопление частиц меди, связанной с белком), что характерно для болезни Вильсона-Коновалова. У пациентки при массовом параллельном секвенировании выявлен ранее описанный, вероятно, патогенный вариант с.3973delC. В результате данной делеции происходит замена лейцина на триптофан в положении белка 1325 со сдвигом рамки считывания и образование терминирующего кодона через 3 кодона (p.L1325fs). Данный вариант нуклеотидной последовательности был описан в работе Г.М. Баязутдинова [4] в российской популяции, однако отсутствует в базах данных GnomAD, ExAC и 1000 геномов. Других патогенетически значимых вариантов нуклеотидной последовательности не было выявлено.

Пациент 7.1 (возраст на момент осмотра – 4 года) является дочерью пациента с болезнью Вильсона-Коновалова и не имеет активных жалоб и клинических проявлений. В анамнезе перинатальное поражение ЦНС, синдром мышечной дистонии и вегетовисцеральных нарушений. При секвенировании обнаружена частая мутация с.3207C>A в гетерозиготном состоянии.

Пациент 8.1 (возраст на момент осмотра – 25 лет) обратился к врачу-генетику с целью исключения заболеваний нарушения обмена меди. Из анамнеза: в 8 месяцев перенес серозный менингит. В возрасте 25 лет был эпилептический статус, кома 10 суток. Наблюдается у эпилептолога. При проведении МРТ головного мозга: МР-картина соответствует симметричному неспецифичному поражению базальных ядер. Других клинических признаков болезни Вильсона-Коновалова у пациента не выявлено. По данным клинко-генеалогического анализа наследственной отягощенности не выявлено. В результате массового параллельного секвенирования был выявлен ранее описанный вариант с неизвестным клиническим значением в гетерозиготном состоянии – с.*1265A>G. Данный вариант нуклеотидной последовательности выявлен у пациентов с БВК, при этом на настоящий момент не доказана его патогенетическая значимость. Вторая мутация не выявлена.

Пациент 9.1 (возраст на момент осмотра – 11 лет) активных жалоб и клинических проявлений не имеет, отец ребенка страдает болезнью Вильсона-Коновалова. Была конъюгационная желтуха легкой степени. Обследован на наличие частой мутации болезни Вильсона-Коновалова (с.3207C>A), мутаций не обнаружено. При этом гастроэнтерологом было рекомендовано исключить болезнь Вильсона-Коновалова и целиакию. По результатам проведенного контрольного исследования выявлено незначительное понижение содержания церулоплазмينا и снижение содержания меди в крови. При секвенировании обнаружена ранее описанная вероятно патогенная мутация с.3036dupC, приводящая к сдвигу рамки считывания (p.Lys1013fs) в гетерозиготном состоянии. Данная мутация также подтверждена у неродственного пациента 2.1.

Пациент 10.1 (возраст на момент осмотра – 28 лет) наблюдается в генетической клинике с 2012 г., когда впервые был поставлен диагноз. При обследовании в стационаре были описаны диффузные изменения па-

ренхимы печени, усиление сосудистого рисунка и расширение магистральных сосудов, холестаз. После лечения в динамике УЗИ-картина печени: умеренная гепатомегалия, диффузные изменения паренхимы печени в виде зернистости, умеренная спленомегалия. При массовом параллельном секвенировании выявлены варианты гена *ATP7B*, ранее описанные как вероятно патогенные – с.254G>T и с.3128T>C. Вариант нуклеотидной последовательности с.254G>T приводит к замене глицина на валин в позиции протеина 85 (p.Gly85Val). Глицин в позиции 85 является консервативным вариантом в области связывания металлов и замена глицина на валин приводит к нарушению взаимодействия *ATP7B* с *COMMD1-GST* (copper metabolism gene *MURR1 domain 1 glutathione S-transferase*) [9]. Вариант с.3128T>C приводит к замене лейцина на пролин в позиции 1043 (p.Leu1043Pro). Ранее данный вариант был описан у пациентов с диагнозом болезнь Вильсона-Коновалова в Индии, Великобритании, Сардинии и имеет частоту 0.007% в базе данных ALFA Allele Frequency. В работе 2010 г. с помощью функционального анализа было показано, что данный вариант приводит к нарушению функции белка [10]. Вариант с.254G>T отсутствует в базах данных ExAC, gnomAD, 1000 геномов и алгоритмы предсказания патогенности расценивают данный вариант как вероятно патогенный. Вариант нуклеотидной последовательности с.3128T>C был ранее описан у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Турции и у выходцев из Пакистана, проживающих в Великобритании.

Заключение. Патогенетически значимый вариант нуклеотидной последовательности *ATP7B*: с.3207C>A: p.His1069Gln оказался самым часто встречающимся вариантом (50%) у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области, что соответствует данным по частоте в Европе и Российской Федерации. Доля мутации с.3207C>A в Центральной, Восточной и Западной Европе варьирует в пределах 30–72%, а в России она составляет 50% [6]. Также была обнаружена мутация с.3036dupC, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Lys1013fs), вероятно, являющаяся эндемичной для российских больных.

Таким образом, удалось установить причину заболевания и подтвердить клинический диагноз БВК у 6 пациентов. Ещё у 9 обследованных удалось обнаружить одну мутацию в гене *ATP7B*. Очевидно, что в группе с одной выявленной мутацией присутствуют как носители, так и пациенты с возможной локализацией второй мутации в некодирующих регуляторных регионах *ATP7B*. У части обследованных пациентов отмечались только изменения биохимических показателей крови и отсутствовали клинические симптомы заболевания, также были обследованы родственники пробандов без клинических проявлений для исключения наличия мутаций. В группе пациентов с одной выявленной мутацией и с клиническими проявлениями необходимо проведение дополнительных исследований для поиска мутаций в регуляторных и некодирующих регионах гена *ATP7B*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 7-10 см. REFERENCES)

1. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.Я., Горячева Л.Г., Густов А.В., Иванова-Смоленская И.А. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсо-

- на-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). СПб: Литография СПб; 2015.
4. Баязутдинова Г.М., Щагина О.А., Поляков А.В. Мутация с.3207C>А гена АТР7В – наиболее частая причина гепатолентикулярной дегенерации в России: частота и причина распространения. *Медицинская генетика*. 2018; 17(4):25-30.
5. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Маслеников А.В., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*. 2019; 18(2):3-23.
6. Баязутдинова Г.М., Щагина О.А., Карунас А.С., Вялова Н.В., Соколов А.А., Поляков А.В. Спектр мутаций в гене АТР7В у российских больных с болезнью Вильсона-Коновалова. *Генетика*. 2019; 55(12):1433-41.
4. Bayazutdinova G.M., Shchagina O.A., Polyakov A.V. The study of common mutation p.H1069Q in ATP7B gene in Russian WD-patients. *Meditsinskaya genetika*. 2018; 17(4):25-30. (in Russian)
5. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (edition 2018, versiya 2). *Meditsinskaya genetika*. 2019; 18(2):3-23. (in Russian)
6. Bayazutdinova G. M., Shchagina O. A., Karunas A. S., Vyalova N. V., Sokolov A. A., Polyakov A. V. Spectrum of Mutations in the ATP7B Gene in Russian Patients with Wilson's Disease. *Genetika*. 2019; 55(12):1433-41. (in Russian)
7. Rodriguez-Granillo A., Sedlak E., Wittung-Stafshede P. Stability and ATP Binding of the Nucleotide-binding Domain of the Wilson Disease Protein: Effect of the Common H1069Q Mutation. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 383 (5): 1097-1111. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.065.
8. Mariya S. Balashova, Inna G. Tuluzanovskaya, Oleg S. Glotov, Andrey S. Glotov, Yury A. Barbitoff, Mikhail A. Fedyaev et al. The spectrum of pathogenic variants of the ATP7B gene in Wilson disease in the Russian Federation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020; 59: 126420. ISSN 0946-672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.126420.
9. de Bie P., van de Sluis B., Burstein E. et al. Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology*. 2007; 133(4):1316-26. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.07.020.
10. Luoma L.M., Deeb T.M., Macintyre G., Cox D.W. Functional analysis of mutations in the ATP loop of the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum. Mutat*. 2010; 31(5):569-77. DOI: 10.1002/humu.21228. PMID: 20333758.

REFERENCES

1. Asanov A.Yu., Sokolov A.A., Volgina S.Ya., Goryacheva L.G., Gustov A.V., Ivanova-Smolenskaya I.A. et al. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Wilson-Kononov disease (hepatolenticular degeneration). St.Petersburg: Litografiya SPb; 2015. (in Russian)
2. Rodriguez-Castro K.I., Hevia-Urrutia F.J., Sturniolo G.C. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J. Hepatol*. 2015 Dec 18; 7(29):2859-70. DOI: 10.4254/wjh.v7.i29.2859.
3. Cocos R., Sendroiu A., Schipor S., Bohiltea L.C., Sendroiu I., Raicu F. Genotype-Phenotype Correlations in a Mountain Population Community with High Prevalence of Wilson's Disease: Genetic and Clinical Homogeneity. *PLoS ONE*. 2014; 9(6): e98520. DOI: 10.1371/journal.pone.0098520.