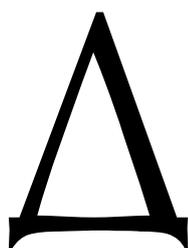


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

2 • 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

ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией *Л.А. Шанкина*

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 02.02.2022.
Подписано в печать 15.02.2022.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,87.

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

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

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

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 2. 65–128.

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 (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 67

2 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY,
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. KOCHETOV
(*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*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*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Сидоренко Д.В., Назаров В.Д., Волникова Е.Г., Кондрашева Е.А., Пешкова Н.Г., Ковалева И.С., Кокорина О.С., Сватковская И.Б., Лапин С.В.
Зависимость биохимических показателей крови от различных генотипов гена UGT1A1, ассоциированного с синдромом Жильбера 69

Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Воротников И.К., Соколов Н.Ю., Ермилова В.Д., Мочалова А.С., Кушинский Н.Е.
Растворимые формы рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L в сыворотке крови больных раком молочной железы: взаимосвязь с клинико-морфологическими особенностями и молекулярным типом опухоли 76

Лебеденко А.А., Афонин А.А., Семерник О.Е., Логинова И.Г., Гунько В.О., Ларичкин А.В., Аллилуев И.А., Галкина Г.А., Панова И.В.
Протеомный анализ сыворотки крови – новый подход к поиску диагностических маркеров бронхиальной астмы у детей 81

Ройтман А.П., Седова Н.А., Иванова Е.А., Годков М.А.
Значение лабораторных показателей липидтранспортной системы и гормонов жировой ткани в оценке течения хронической сердечной недостаточности у больных с метаболическим синдромом 85

ИММУНОЛОГИЯ

Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А.
О количественном определении содержания D-димера в крови иммунохроматографическим методом 91

Борзова Н.Ю., Раджабова Н.Р., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Малышкина А.И.
Новый прогностический критерий исхода беременности у пациенток с угрожающими преждевременными родами 97

МИКРОБИОЛОГИЯ

Куцевалова О.Ю., Козель Ю.Ю., Алавердян А.И., Гусак Д.А.
Анализ этиологии структуры инфекций кровотока с использованием автоматического бактериологического анализатора Юнона® Labsta 101

Немченко У.М., Григорова Е.В., Погодина А.В., Белькова Н.Л., Воропаева Н.М., Романица А.И., Григорьева Е.А., Савелькаева М.В., Рычкова Л.В.
Взаимосвязь состава микробиоты и функциональных расстройств кишечника у подростков с ожирением ... 106

Омарова С. М., Исаева Р. И., Багандова Д. Ш., Саидова П. С., Горелова В.Г.
Разработка и изучение питательных сред для определения биологических свойств листерий 110

Хамитова И. В., Лаврентьева И. Н., Семёнов А. В.
Алгоритм лабораторной диагностики парвовирусной инфекции в группах риска 115

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гвалдин Д.Ю., Тимошкина Н.Н., Ващенко Л.Н., Новикова И.А., Владимирова Л.Ю., Сторожакова А.Э., Сагакянц А.Б.
Полиморфизм rs4673 и уровень параоксоназы 1 в плазме крови – новые перспективы в прогнозировании и ранней диагностике антрациклин-опосредованной кардиотоксичности 123

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Sidorenko D.V., Nazarov V.D., Volnikova E.G., Kondrasheva E.A., Peshkova N.G., Kovaleva I.S., Kokorina O.S., Svatkovskaya I.B., Lapin S.V.*
Dependence of blood biochemical parameters on various genotypes of the UGT1A1 gene associated with gilbert's syndrome 69
- Gershtein E.S., Korotkova E.A., Vorotnikov I.K., Sokolov N.Yu., Ermilova V.D., Mochalova A.S., Kushlinskii N.E.*
Soluble forms of PD-1/PD-L immune checkpoint receptor and ligand in blood serum of breast cancer patients: association with clinical pathologic factors and molecular type of the tumor 76
- Lebedenko A.A., Afonin A.A., Semernik O.E., Loginova I.G., Gunko V.O., Larichkin A.V., Alliluyev I.A., Galkina G.A., Panova I.V.*
Proteomic analysis of blood serum – a new approach to the search for diagnostic markers of bronchial asthma in children 81
- Roytman A.P., Sedova N.A., Ivanova E.A., Godkov M.A.*
The importance of laboratory parameters of the lipid transport system and adipose tissue hormones in assessing the course of chronic 85

IMMUNOLOGY

- Akinshina Yu. A., Mardanly S. G., Rotanov S. V., Pomazanov V. V., Kiseleva V. A.*
About quantitative determination of the D-dimer in the blood by immunochromatographic method 91
- Borzova N.Yu., Radjabova N.R., Sotnikova N.Yu., Kudryashova A.V., Malyshkina A.I.*
New prognostic criterion for the outcome of pregnancy in patients with threatening preterm birth 97

MICROBIOLOGY

- Kutsevalova O.Yu., Kozel Yu.Yu., Alaverdyan A.I., Gusak D.A.*
Analysis of the etiology of the structure of bloodstream infections using the automatic bacteriological analyzer Yunon® Labstar 101
- Nemchenko U.M., Grigorova E.V., Pogodina A.V., Belkova N.L., Voropaeva N.M., Romanitsa A.I., Grigoryeva E.A., Savelkaeva M.V., Rychkova L.V.*
The relationship between the composition of the microbiota and functional intestinal disorders in obese adolescents 106
- Omarova S.M., Isaeva R.I., Bagandova D. Sh., Saidova P.S., Gorelova V.G.*
Development and study of nutrient media for determining the biological properties of Listeria 110
- Khamitova I. V., Lavrentieva I. N., Semenov A. V.*
Algorithm for laboratory diagnostics of parvoviral infection in risk groups 115

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Gvaldin D.Yu., Timoshkina N.N., Vashchenko L.N., Novikova I.A., Vladimirova L.Yu., Storozhakova A.E., Sagakyants A.B.*
RS4673 and pon1 level in blood plasma – new prospects in prediction and early diagnostics of anthracyclinemediated cardiotoxicity 123

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сидоренко Д.В.¹, Назаров В.Д.¹, Волникова Е.Г.¹, Кондрашева Е.А.², Пешкова Н.Г.², Ковалева И.С.², Кокорина О.С.², Сватковская И.Б.², Лапин С.В.¹

ЗАВИСИМОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ГЕНА *UGT1A1*, АССОЦИИРОВАННОГО С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА

¹ Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

² ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», 125047, Москва, Россия

Диагностика синдрома Жильбера основывается на выявлении гомозиготного носительства дополнительного *TA*-повтора в промоторе гена *UGT1A1*, приводящего к снижению активности фермента уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы (УДФ-ГТ). В Российской Федерации не было проведено крупных исследований, посвященных распространённости носительства синдрома Жильбера, а также биохимическому и молекулярному профилю таких пациентов. Целью исследования является оценка биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов с синдромом Жильбера. В исследование включены 124 здоровых добровольца (1-я группа) и 5650 пациентов с анамнестическими, клиническими и биохимическими признаками синдрома Жильбера (2-я группа). Для всех участников было определено число *TA*-повторов в промоторной области гена *UGT1A1* с помощью фрагментного анализа. Для 299 пациентов из 2-й группы были проанализированы следующие биохимические показатели: уровень билирубина и его фракций, АСТ, АЛТ, холестерин и ЛПНП. В 1-й группе частота встречаемости генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%, редких форм не обнаружено. Во 2-й группе частота встречаемости генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 6,04%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 73,7%, редких аллелей – 0,2%, среди которых $(TA)_5/(TA)_6$, $(TA)_5/(TA)_7$, $(TA)_6/(TA)_8$ и $(TA)_7/(TA)_8$, а также новый, не описанный в литературе генотип – $(TA)_7/(TA)_8$. Было выявлено значимое повышение уровня общего билирубина и его фракций при сравнении генотипа синдрома Жильбера $(TA)_7/(TA)_7$ с референсным генотипом $(TA)_6/(TA)_6$ и генотипом $(TA)_6/(TA)_7$. Было продемонстрировано значимое повышение уровня общего билирубина у носителей большего количества *TA*-повторов. Статистически значимой разницы концентрации АЛТ, АСТ, холестерина, ЛПНП между подгруппами выявлено не было. Увеличение *TA*-повторов гена *UGT1A1* сопряжено с повышением общего билирубина и его непрямофракции, в том числе при носительстве редких аллельных вариантов ($TA \leq 5$, $TA \geq 8$). Влияния генотипа *UGT1A1* на активность АЛС и АСТ, а также на липидный профиль продемонстрировано не было.

Ключевые слова: синдром Жильбера; ген *UGT1A1*; гипербилирубинемия.

Для цитирования: Сидоренко Д.В., Назаров В.Д., Волникова Е.Г., Кондрашева Е.А., Пешкова Н.Г., Ковалева И.С., Кокорина О.С., Сватковская И.Б., Лапин С.В. Зависимость биохимических показателей крови от различных генотипов гена *UGT1A1*, ассоциированного с синдромом Жильбера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 69-75 DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-69-75>

Для корреспонденции: Сидоренко Дарья Владимировна, врач клин. лаб. диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний; e-mail: si-do-renko@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.11.2021

Принята к печати 24.11.2021

Опубликовано 23.02.2022

Sidorenko D.V.¹, Nazarov V.D.¹, Volnikova E.G.¹, Kondrasheva E.A.², Peshkova N.G.², Kovaleva I.S.², Kokorina O.S.², Svatkovskaya I.B.², Lapin S.V.¹

DEPENDENCE OF BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS ON VARIOUS GENOTYPES OF THE *UGT1A1* GENE ASSOCIATED WITH GILBERT'S SYNDROME

¹ Laboratory for diagnostics of autoimmune diseases» of Department of Molecular Medicine of First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, 197022, Saint-Petersburg, Russia;

² Limited Liability Company «Independent laboratory INVITRO», 125047, Moscow, Russia

Diagnosis of Gilbert's syndrome is based on the detection of homozygous carriage of an additional TA-repeat in the promoter of the UGT1A1 gene, leading to a decrease in the activity of the UGT enzyme. No large studies have been done in the Russian Federation on the prevalence of carriage of Gilbert's syndrome, as well as the biochemical and molecular profile of such patients. The aim of the study is to evaluate biochemical and molecular genetic parameters in patients with Gilbert's syndrome in Russia. The study included 124 healthy volunteers (group 1) and 5650 patients with suspected Gilbert's syndrome (group 2). The number of TA-repeats of the promoter region of the UGT1A1 gene was determined by the method of fragment analysis for all participants. The following biochemical parameters were analyzed for 299 patients from group 2: the level of bilirubin and its fractions, AST, ALT, cholesterol and LDL. In group 1 the prevalence of genotype $(TA)_6/(TA)_6$ was 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%, no rare forms were found. In group 2 the prevalence of genotype $(TA)_6/(TA)_6$ was 6,04%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 73,7%, rare alleles – 0,2%, among which $(TA)_5/(TA)_6$, $(TA)_5/(TA)_7$, $(TA)_6/(TA)_8$ and $(TA)_7/(TA)_8$, as well as a new, not described in the literature genotype – $(TA)_7/(TA)_8$. A significant increase in the level of total bilirubin and its fractions was revealed when comparing the Gilbert's syndrome genotype $(TA)_7/(TA)_7$ with the reference genotype $(TA)_6/(TA)_6$ and the genotype $(TA)_6/(TA)_7$. A significant increase in the level of total bilirubin was demonstrated in carriers of a greater number of TA-repeats. A statistically significant difference in the concentration of ALT, AST, cholesterol, and LDL between subgroups was not found. An increase in the number of UGT1A1 gene repeats is associated with an increase in total bilirubin and its indirect fraction, including in carriers of rare allelic variants ($TA \leq 5$, $TA \geq 8$). The influence of the UGT1A1 genotype on the activity of AST and ALT, as well as on the lipid profile, was not demonstrated.

(TA)7 – 73,7%, rare alleles – 0,2%. Rare alleles included (TA)5/(TA)6, (TA)5/(TA)7, (TA)6/(TA)8 and (TA)7/(TA)8, as well as a new genotype not described in the literature previously – (TA)7/(TA)9. When assessing the level of total bilirubin and its fractions, a difference was revealed between the genotype of Gilbert's syndrome (TA)7/(TA)7 and the reference genotype (TA)6/(TA)6, and between genotypes (TA)7/(TA)7 and (TA)6/(TA)7. A significant increase in total bilirubin was demonstrated in carriers of a larger number of TA-repeats. There was no significant difference in the concentration of ALT, AST, cholesterol or LDL between different genotypes. The number of TA-repeats of the UGT1A1 gene affects the increase of total bilirubin and its indirect fraction, including the cases of rare allelic variants (TA \leq 5, TA \geq 8), but not the activity of ALT and AST and the lipid profile.

Key words: Gilbert's syndrome; UGT1A1 gene; hyperbilirubinemia.

For citation: Sidorenko D.V., Nazarov V.D., Volnikova E.G., Kondrasheva E.A., Peshkova N.G., Kovaleva I.S., Kokorina O.S., Svatkovskaya I.B., Lapin S.V. Dependence of blood biochemical parameters on various genotypes of the UGT1A1 gene associated with Gilbert's syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 69-75 (in Russ.) DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-69-75

For correspondence: Sidorenko Dar'ja Vladimirovna, clinical laboratory diagnostics specialist of Laboratory for diagnostics of autoimmune diseases; e-mail: si-do-renko@mail.ru

Information about authors:

Sidorenko D.V., <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>;
Nazarov V.D., <https://orcid.org/0000-0002-9354-879>;
Volnikova E.G., <https://orcid.org/0000-0001-7703-0396>;
Kondrasheva E.A., <https://orcid.org/0000-0002-8240-5452>;
Peshkova N.G., <https://orcid.org/0000-0001-7703-7221>;
Kovaleva I.S., <https://orcid.org/0000-0002-1675-3328>;
Kokorina O.S., <https://orcid.org/0000-0002-8368-6700>;
Svatkovskaya I.B., <https://orcid.org/0000-0001-8389-9872>;
Lapin S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>.

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

Acknowledgment. The study was performed without external funding.

Received 01.11.2021
Accepted 24.11.2021
Published 23.02.2022

Введение. Синдром Жильбера представляет собой генетическую патологию с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующуюся нарушением конъюгации билирубина и обусловленную мутациями в гене UGT1A1. Ген UGT1A1 кодирует A1 изоформу фермента уридин-5-дифосфат глюкуронозилтрансферазы (УДФ-ГТ). Основной функцией данного фермента является глюкуронирование свободной фракции билирубина гепатоцитами с превращением его в конъюгированный (прямой, растворимый) для последующей секреции в желчь. Кроме того, УДФ-ГТ принимает участие в биотрансформации эндогенных гормонов, нейротрансмиттеров и экзогенных ксенобиотиков, канцерогенов и лекарственных средств, способствуя их выведению из организма [1].

Характерным внешним признаком патологии является иктеричность кожных покровов, склер и слизистых оболочек. Отмечаются разнообразные диспептические явления и астеновегетативный синдром. Симптомы патологии обычно возникают на фоне физического перенапряжения, инфекционных заболеваний, после голодания или низкокалорийной диеты, при приеме некоторых лекарственных препаратов. Диагностика синдрома Жильбера основывается на изменениях лабораторных показателей обмена билирубина – основным проявлением является увеличение общего билирубина за счет его непрямой фракции.

Основные клинические проявления синдрома Жильбера носят транзиторный характер и не ведут напрямую к тяжелым поражениям печени. Несмотря на легкость проявлений и симптомов синдрома Жильбера, важно дифференцировать доброкачественную гипербилирубинемия, связанную с мутациями в гене UGT1A1, и повышение уровня билирубина в связи с более тяжелой патологией печени. Молекулярно-генетический анализ

аббераций в гене UGT1A1 позволяет установить этиологию гипербилирубинемии пациента и рационально подойти к диагностике и профилактике заболеваний гепатобилиарной системы. В настоящее время известно более 130 изменений в гене UGT1A1, способных влиять на активность глюкуронозилтрансферазы, частота которых варьирует среди представителей различных этнических групп [2]. Они могут затрагивать как кодирующие последовательности гена, так и локализоваться в некодирующих регионах. Наиболее распространённой в европейской популяции мутацией, связанной с формированием синдрома Жильбера, является увеличение числа TA-повторов в промоторном регионе гена UGT1A1 [3].

У большинства людей в здоровой популяции TATA-бокс (TATA-box) промоторного региона гена UGT1A1 включает 6 тандемных повторов, что соответствует последовательности A(TA)₆TAA и обозначается как UGT1A1*1. Для данной аллели «дикого типа» (wild-type) характерен высокий уровень функциональной активности УДФ-ГТ и нормальные значения билирубина и его фракций. Показано, что увеличение количества TA-повторов промоторного региона гена UGT1A1 снижает аффинность TATA-связывающего белка к TATA-боксу, вызывая снижение экспрессии гена и, как следствие, приводящее к непрямой гипербилирубинемии. Наиболее часто встречается инсерция дополнительного седьмого TA-повтора (A(TA)₇TAA), что обозначается как UGT1A1*28 [4]. Гомозиготное носительство данной аллели является основной причиной формирования синдрома Жильбера и приводит к снижению активности УДФ-ГТ более чем на 50% относительно нормы [5].

Носительство A(TA)₇TAA довольно широко распространено – от 3% до 13% популяции являются гомозиготами по данной абберации [6], а аллельная частота A(TA)₇TAA в западной популяции достигает 40% [7].

Однако носительство аллели этнически неоднородно, так, среди населения Африки можно обнаружить до 23% гомозиготных носителей $A(TA)_7TAA$, а Европы – только 8%. В то же время мутация довольно редко отмечается у представителей азиатского происхождения (3% гомозигот), где синдром Жильбера чаще связан с другими абберациями в гене *UGT1A1* [8]. Менее распространёнными аллельными вариантами гена *UGT1A1* являются изменение числа tandemных повторов до 5 ($A(TA)_5TAA$, *UGT1A1**36) и 8 ($A(TA)_8TAA$, *UGT1A1**37). Распространённость $A(TA)_7TAA$ в Российской Федерации до сих пор точно не ясна.

Кроме того, представляет интерес влияние количества ТА-повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* на метаболизм липидов. Так, ряд исследований показывает, что люди с синдромом Жильбера имеют в три раза более низкие риски возникновения сердечно-сосудистой патологии по сравнению с носителями генотипа *UGT1A1**28/*1 и *UGT1A1**1/*1 [9], а также у них отмечается значимое уменьшение содержания ХС, ТГ и ЛПНП [10].

Целью данного исследования является оценка биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов с синдромом Жильбера в России.

Материал и методы. Для изучения распространённости аллели $A(TA)_7TAA$ на территории Северо-Запада России была отобрана группа контроля из 124 добровольцев (1-я группа). Также были проанализированы образцы венозной крови 5650 пациентов (2-я группа), направленных на молекулярное исследование гена *UGT1A1* из различных регионов Российской Федерации в связи с подозрением на наличие синдрома Жильбера на основании анамнестических, клинических и лабораторных данных (иктеричность кожных покровов и слизистых, диспепсические расстройства, гипербилирубинемия в анамнезе, наличие близких родственников с диагностированным синдромом Жильбера). Для всех участников было проведено молекулярно-генетическое исследование промотора гена *UGT1A1* с использованием высокоточного фрагментного анализа с помощью метода, разработанного в лаборатории диагностики ау-

тоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Миздрава РФ, позволяющего выявлять количество ТА-повторов. Паттерны электроферограммы представлены на рис. 1, а–г. Условия ПЦР реакции и последовательность праймеров могут быть сообщены по запросу. Для проведения исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя из венозной крови.

Для 299 пациентов из 2-й группы была собрана информация по следующим лабораторным показателям: уровень билирубина (общий, прямой, непрямой), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Измерение биохимических показателей производилось кинетическим и колориметрическим фотометрическим методами.

Все пациенты были разделены на 3 подгруппы в зависимости от результата анализа генетического исследования промоторной области гена *UGT1A1*: $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$.

Статистическая обработка полученных данных была произведена с использованием программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В общей группе из 5774 пациентов после проведения молекулярно-генетического тестирования была определена распространённость различных генотипов и аллельная частота гена *UGT1A1*. Статистическая обработка производилась непараметрическими методами Пирсона (χ^2), Фишера. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

В 1-й группе распространённость генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 39,52% (49 добровольцев), гетерозиготного носительства $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23% (66 добровольцев), гомозиготной мутации $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26% (9 добровольцев).

Во 2-й группе распространённость генотипа $(TA)_6/(TA)_6$ составила 6,04% (341 пациент), гетерозиготно-

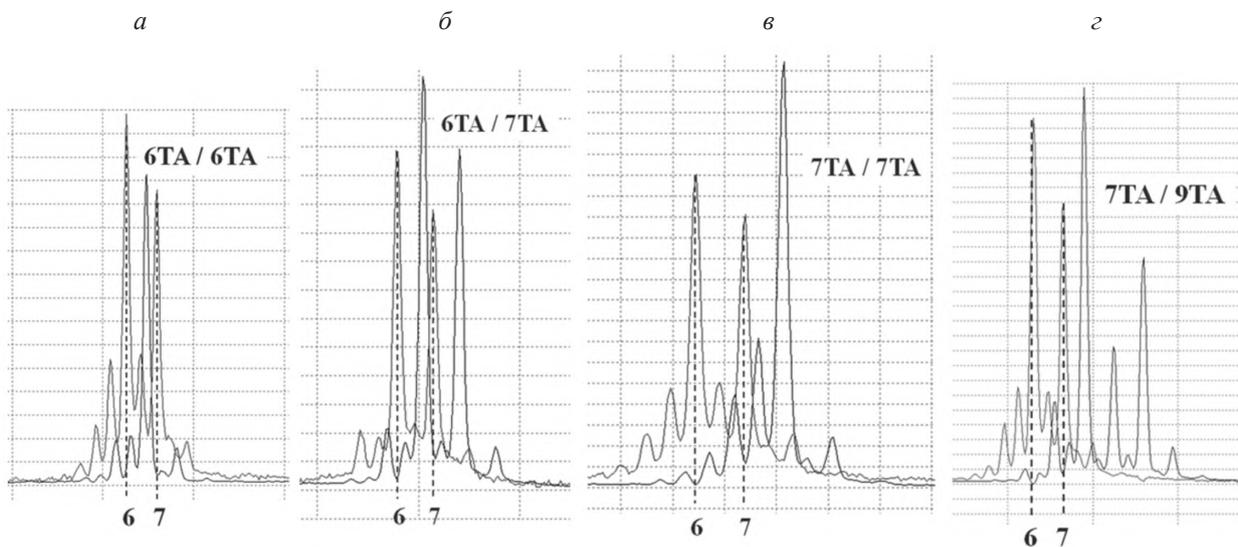


Рис. 1. Паттерн электроферограммы различных генотипов *UGT1A1*. а – генотип $(TA)_6/(TA)_6$; б – генотип $(TA)_6/(TA)_7$; в – генотип $(TA)_7/(TA)_7$; г – генотип $(TA)_7/(TA)_9$.

BIOCHEMISTRY

го носительства $(TA)_6/(TA)_7$ – 20,05% (1133 пациента), гомозиготной мутации $(TA)_7/(TA)_7$ – 73,7% (4165 пациентов), а на долю редких аллелей пришлось 0,2% (11 пациентов). Среди редких аллелей были обнаружены: $(TA)_5/(TA)_6$ – 0,02% (1 пациент), $(TA)_5/(TA)_7$ – 0,11% (6 пациентов), $(TA)_6/(TA)_8$ – 0,02% (1 пациент), $(TA)_7/(TA)_8$ – 0,04% (2 пациента) и новый, ранее не описанный в литературе генотип, $(TA)_7/(TA)_9$ – 0,02% (1 пациент). Паттерн электроферограммы пациента с генотипом $(TA)_7/(TA)_9$ представлен на рис. 1, з.

Распространённость генотипов *UGT1A1* для 1-й и 2-й групп отображена на рис. 2, а. Аллельная частота различных аллелей гена *UGT1A1* для 1-й и 2-й групп отображена на рис. 2, б.

Для 299 пациентов из 2-й группы было произведено исследование биохимических показателей крови. Между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ было проведено сравнение уровня следующих лабораторных показателей: общий билирубин, прямой билирубин, непрямой билирубин, АЛТ, АСТ, общий холестерин и ЛПНП.

Средние значения общего билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $15,2 \pm 9,9$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $22,8 \pm 13$ мкмоль/л,

$(TA)_7/(TA)_7$ – $35,9 \pm 17,1$ мкмоль/л. Была показана статистически значимая разница концентрации общего билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ ($p=0,019$), $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$). Данные приведены на рис. 3, а.

Средние значения показателей общего билирубина для всех генотипов *UGT1A1*, включая редкие аллели, продемонстрированы на рис. 3, б.

Средние концентрации прямого билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $5,8 \pm 2,2$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $7,1 \pm 2,7$ мкмоль/л, $(TA)_7/(TA)_7$ – $9,5 \pm 2,4$ мкмоль/л. Также была обнаружена статистически значимая разница концентрации прямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), но не для $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ ($p=0,12$). Данные приведены на рис. 4, а.

Средние значения непрямого билирубина для $(TA)_6/(TA)_6$ – $11,2 \pm 6,7$ мкмоль/л, $(TA)_6/(TA)_7$ – $15,6 \pm 10,8$ мкмоль/л, $(TA)_7/(TA)_7$ – $25,7 \pm 15,2$ мкмоль/л. Была показана статистически значимая разница концентрации непрямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$ ($p<0,0001$), $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_7/(TA)_7$

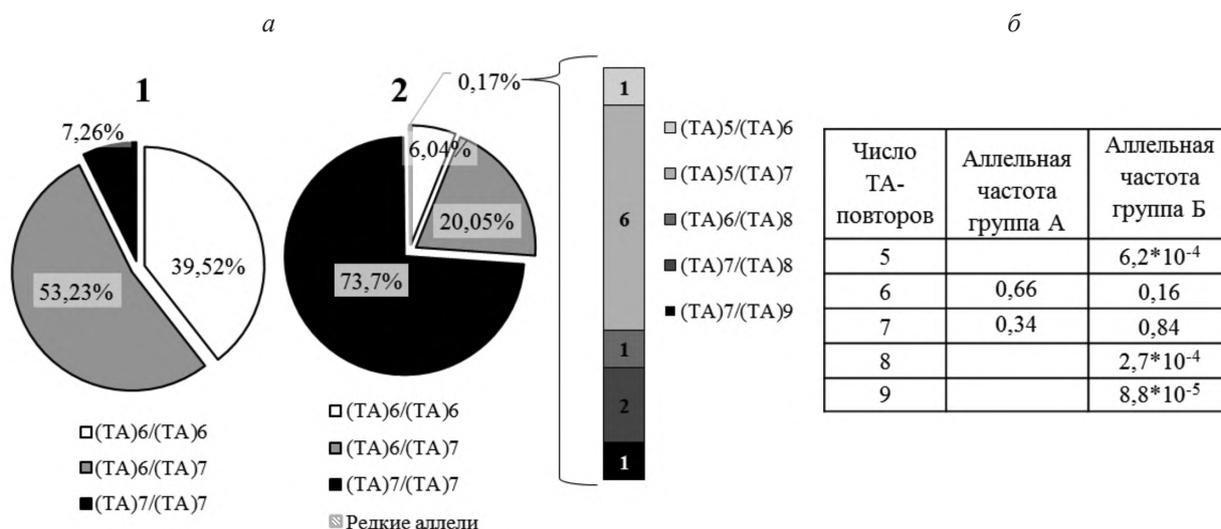


Рис. 2. Распространённость генотипов *UGT1A1*. а – частота генотипов; б – аллельная частота. 1 – 1-я группа; 2 – 2-я группа.

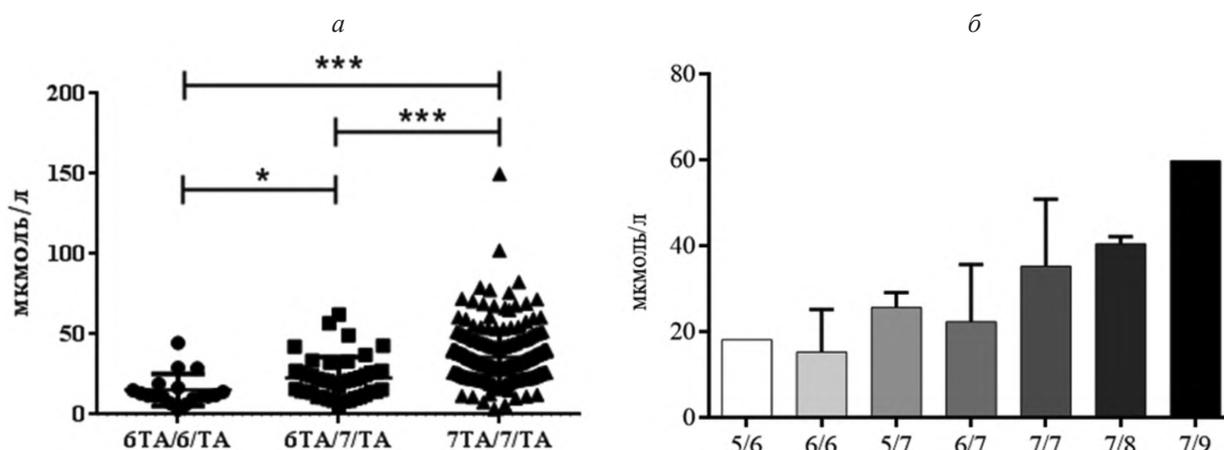


Рис. 3. Концентрация общего билирубина в зависимости от генотипа *UGT1A1*. а – значения концентраций; б – средние значения.

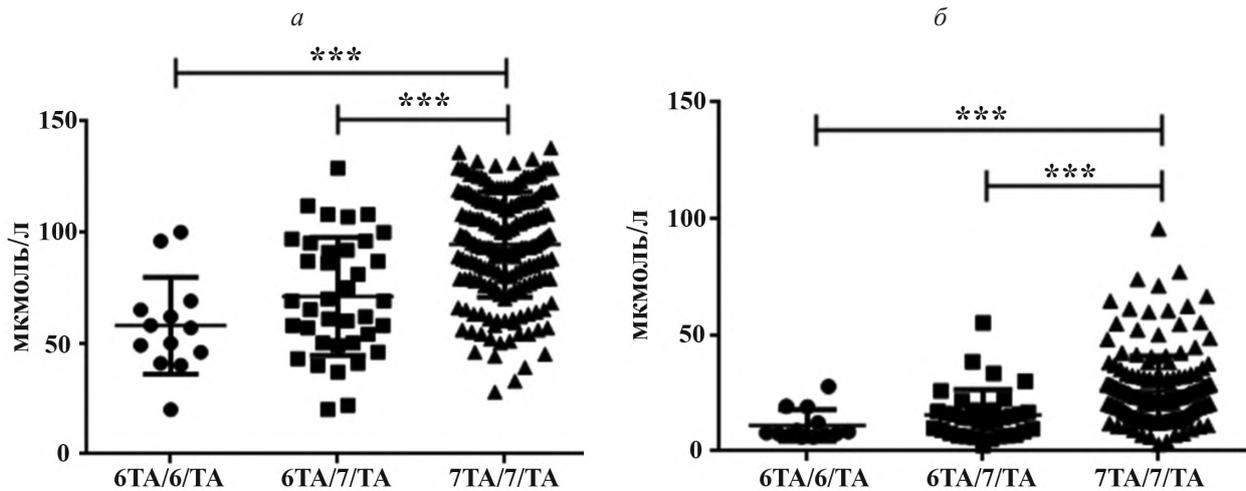


Рис. 4. Значение концентраций фракций билирубина в зависимости от генотипа *UGT1A1*. а – прямая фракция; б – непрямая фракция.

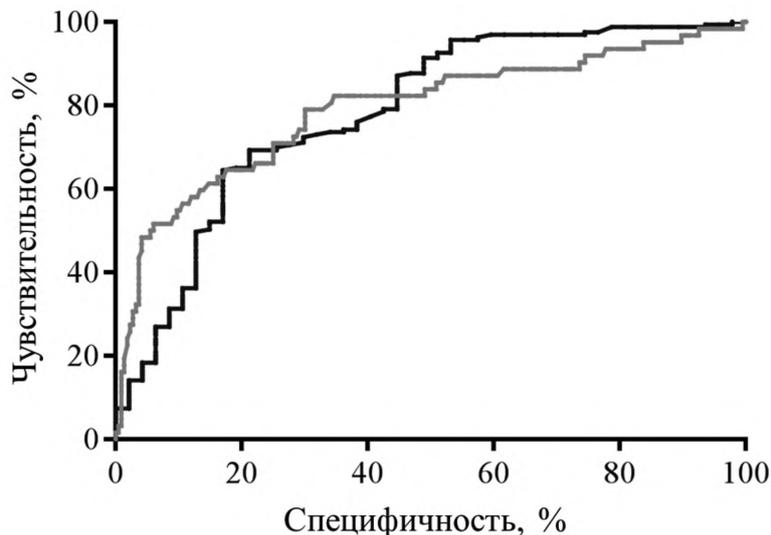


Рис. 5. Кривая ROC-анализа уровня общего (черный цвет) и непрямого билирубина (серый цвет) при сравнении пациентов с генотипом $(TA)_7/(TA)_7$ против $(TA)_7/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_6$.

($p < 0,0001$). Статистически значимой разницы в концентрации непрямого билирубина между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$ и $(TA)_6/(TA)_7$ обнаружено не было ($p = 0,18$). Данные приведены на рис. 4, б.

При проведении ROC-анализа для группы пациентов с синдромом Жильбера (генотип $(TA)_7/(TA)_7$) в сравнении с остальными участниками (рис. 5) значение площади под кривой для уровня непрямого билирубина составило $AUC = 0,79$, для общего билирубина – $AUC = 0,78$. В качестве скрининга на синдром Жильбера по данным нашего исследования оптимальное значение cut-off составило непрямой билирубин $> 12,3$ мкмоль/л с чувствительностью 91,41% и специфичностью 51,06%.

Статистически значимой разницы концентрации АЛТ, АСТ, холестерина, ЛПНП между подгруппами $(TA)_6/(TA)_6$, $(TA)_6/(TA)_7$ и $(TA)_7/(TA)_7$ найдено не было ($p > 0,05$).

Обсуждение. В 1-й группе, состоявшей из 124 здоровых добровольцев, аллельная частота $A(TA)_7TAA$ составила 34%, а $A(TA)_6TAA$ – 66%, что соответствует дан-

ным, полученным в исследовании E. Beutler и соавт. [4], где аллельная частота $A(TA)_7TAA$ и $A(TA)_6TAA$ составила 38,7% и 61,3% соответственно. Результаты генотипирования контрольной группы составили: $(TA)_6/(TA)_6$ – 39,52%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 53,23%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 7,26%. Такое распределение является сопоставимым с результатами исследования из Малазии, в котором приняли участие 248 добровольцев европеоидного происхождения – $(TA)_6/(TA)_6$ – 44,4%, $(TA)_6/(TA)_7$ – 47,1%, $(TA)_7/(TA)_7$ – 8,5% [11]. Таким образом, структура аллельных вариантов промоторной области гена *UGT1A1* в Российской Федерации в целом соответствует общеевропейской.

Во 2-й группе из 5650 пациентов с подозрением на синдром Жильбера частота встречаемости патологической аллели $A(TA)_7TAA$ составила 84%, а нормальной $A(TA)_6TAA$ – 16%, что значительно отличается от здоровой европейской популяции. Это может объясняться особенностью представленной выборки, поскольку в данное исследование включались пациенты с подозрением на синдром Жильбера по результатам клинической

картины и лабораторных показателей, что и объясняет такую высокую распространённость мутации. Генотипы *UGT1A1* в группе распределились следующим образом: (TA)₆/(TA)₇ – 73,7%, (TA)₆/(TA)₇ – 20,05%, (TA)₆/(TA)₆ – 6,04%. Эти данные являются сопоставимыми с результатами генотипирования 51 младенца с диагнозом синдром Жильбера – (TA)₆/(TA)₇ – 76,5%, (TA)₆/(TA)₇ – 15,9%, (TA)₆/(TA)₆ – 3,9% [12]. Таким образом, для более 70% пациентов из 2-й группы с подозрением на синдром Жильбера удалось верифицировать диагноз молекулярно-генетическими методами.

На долю редких аллелей во 2-й группе (меньше 6 и больше 7 TA-повторов) пришлось 0,2% всех исследуемых. Аллельная частота A(TA)₅TAA оставила 6,2*10⁻⁴, а для A(TA)₈TAA – 2,7*10⁻⁴. Аллельные частоты редких аллелей в данном исследовании были ниже, чем в исследовании Lamre и коллег (5*10⁻³ и 2*10⁻³ соответственно для смешанной популяции) [13], A(TA)₅TAA и A(TA)₈TAA могут реже встречаться в российской популяции в связи с их преимущественным распространением на территории африканского континента [14]. Кроме того, удалось обнаружить ранее не описанную в литературе аллель – девятый TA-повтор в промоторе гена *UGT1A1* (A(TA)₉TAA). В контрольной группе редких аллелей гена *UGT1A1* обнаружено не было, что вероятно связано с небольшой выборкой участников исследования.

Необходимо отметить, что кроме промоторного региона также интерес представляют нуклеотидные замены в кодирующих областях гена *UGT1A1*. Так, аминокислотная замена p.G71R (*UGT1A1**6) в 1 экзоне, аллельная частота которой в азиатских странах превышает аллельную частоту A(TA)₇TAA (16-21% против 11-15%) [15], в случае гомозиготного носительства или при наличии феномена компаунд гетерозиготности с A(TA)₇TAA также приводит к формированию фенотипа синдрома Жильбера [11]. Распространённость этого полиморфизма на территории России в различных популяциях также требует дальнейшего изучения.

Для 299 пациентов из 2-й группы были собраны данные о различных биохимических показателях, включая уровень билирубина (общий, прямой, непрямой), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

При сравнении средних значений общего билирубина была установлена значимая разница между всеми подгруппами – (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₆/(TA)₇ ($p=0,019$), (TA)₆/(TA)₇ и (TA)₇/(TA)₇ ($p<0,0001$), (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₇/(TA)₇ ($p<0,0001$). Это отражает основной молекулярный механизм развития синдрома Жильбера – нарушение функциональной активности фермента УДФ-ГТ вследствие инсерции дополнительного TA-повтора в промоторную область гена *UGT1A1*, из-за чего нарушается нормальная утилизация билирубина из организма [4]. Аналогичные результаты были получены при исследовании на 1780 добровольцах, где между каждым генотипом *UGT1A1* (6/6, 6/7, 7/7) была найдена значимая разница в среднем уровне общего билирубина [9]. Таким образом, наличие даже 1 копии A(TA)₇TAA оказывает влияние на активность кодируемого фермента и может проявляться как умеренная гипербилирубинемия. Вероятно, это наблюдение стоит учитывать при назначении гетерозиготным носителям препаратов, метаболизирующихся ферментом УДФ-ГТ.

При исследовании средних уровней прямого и непрямого билирубина была получена значимая разница при сравнении гомозиготных носителей аберрации с гетерозиготными и с генотипом (TA)₆/(TA)₆ ($p<0,0001$). При сравнении нормального генотипа *UGT1A1* с гетерозиготными носителями значимой разницы не было получено ни для одной фракции билирубина ($p>0,05$). Это может быть объяснено тем, что при гетерозиготном носительстве A(TA)₇TAA уровень УДФ-ГТ снижается, но остается достаточным для утилизации большей части билирубина, то есть для развития синдрома Жильбера необходимо два патологических аллеля. Так, при исследовании количества продукта гена *UGT1A1* значимое уменьшение выработки УДФ-ГТ микросомами печени (что косвенно отражает активность фермента) наблюдалось между группами (TA)₆/(TA)₇ и (TA)₇/(TA)₇ и (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₇/(TA)₇, но не между (TA)₆/(TA)₆ и (TA)₆/(TA)₇ [16].

По данным ROC-анализа для группы пациентов с синдромом Жильбера (генотип (TA)₇/(TA)₇) в сравнении с остальными участниками, наибольшее значение площади под кривой было выявлено для уровня непрямого билирубина (AUC=0,79). Учитывая преимущественное использование уровня непрямого билирубина в качестве скрининга на синдром Жильбера, по данным нашего исследования оптимальное значение cut-off составило >12,3 мкмоль/л с чувствительностью 91,41% и специфичностью 51,06%. Такие низкие показатели связаны прежде всего с тем, что для определенной части пациентов с синдромом Жильбера характерна транзиторная гипербилирубинемия, провоцируемая различными внешними факторами, таким образом биохимическое исследование вне обострения может быть не показательным.

При исследовании печеночных ферментов у пациентов с подозрением на синдром Жильбера не было обнаружено значимой разницы между носителями различных генотипов *UGT1A1* ($p>0,05$). В целом цитолитический синдром (АЛТ и/или АСТ > 40 Ед/л) был выражен только у 10% обследуемых и вероятно обусловлен иными причинами. Это связано с тем, что дефицит УДФ-ГТ и гипербилирубинемия в целом не оказывают цитопатического действия на гепатоциты, и гиперферментемия не свойственна таким пациентам [17]. Полученные данные подтверждаются исследованием S. Kamal и соавт. [18], где не было обнаружено значимой разницы в уровнях активности АЛТ и АСТ между пациентами с синдромом Жильбера и группой контроля.

При оценке лабораторных показателей носителей редких аллелей (A(TA)₅TAA, A(TA)₈TAA) была отмечена прямая зависимость между количеством TA-повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* и средними уровнями общего билирубина (см. рис. 5). По-видимому, число TA-повторов имеет обратную зависимость с уровнем экспрессии гена и активностью фермента – в исследованиях показано, что носительство A(TA)₅TAA ассоциировано с повышением промоторной активности гена [15], а A(TA)₈TAA, напротив, со снижением уровня УДФ-ГТ. Так, в исследовании E. Beutler и соавт. [4] показано, что носители A(TA)₅TAA обладали более высокой активностью УДФ-ГТ по сравнению с генотипом A(TA)₆TAA, а носители A(TA)₇TAA и A(TA)₈TAA – сниженной. Также среди исследуемых индивидуумов был обнаружен ранее не описанный *in vivo* генотип – инсерция девятого TA-повтора в промоторе гена *UGT1A1*. Несмотря на отсутствие литературных данных, в той же работе E. Beutler было показано, что синтезированный путем мутагенеза

промотор А(ТА)₉ТАА обладал активностью, схожей с А(ТА)₈ТАА.

Заключение. Таким образом, нами было проведено объемное исследование, посвященное лабораторным и молекулярно-биологическим характеристикам синдрома Жильбера в Российской Федерации. Большинство пациентов с подозрением на эту нозологию по результатам клинической картины и биохимических показателей являлись гомозиготными носителями инсерции седьмого повтора в промоторном регионе гена *UGT1A1*, что является лабораторным подтверждением диагноза. Число ТА-повторов в промоторном регионе гена *UGT1A1* напрямую влияет на степень повышения общего билирубина и его непрямой фракции. Также впервые был описан феномен инсерции девятого ТА-повтора и обнаружен генотип (ТА)₇/(ТА)₉. Вопрос о протективном влиянии генотипов *UGT1A1* на липидный профиль остаётся открытым и требует дальнейшего углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tukey R.H., Strassburg C.P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 581–616.
2. Canu G., Minucci A., Zuppi C., Capoluongo E. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2013; 50: 273–80.
3. Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C., Gantla S., de Boer A., Oostra B.A. et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1171–5.
4. Beutler E., Gelbart T., Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 8170–4.
5. Auclair C., Hakim J., Boivin P., Troube H., Boucherot J. Bilirubin and paranthrophenol glucuronyl transferase activities of the liver in patients with Gilbert's syndrome. An attempt at a biochemical breakdown of the Gilbert's syndrome. *Enzyme.* 1976; 21: 97–107.
6. Travan L., Lega S., Crovella S., Montico M., Panontin E., Demarini S. Severe neonatal hyperbilirubinemia and UGT1A1 promoter polymorphism. *J. Pediatr.* 2014; 165: 42–5.
7. Bosma P.J. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J. Hepatol.* 2003; 38: 107–17.
8. Burchell B., Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 14(10): 960-6.
9. Lin J.P., O'Donnell C.J., Schwaiger J.P., Cupples L.A., Lingenhel A., Hunt S.C. et al. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2006 Oct 3; 114(14):1476-81.
10. Boon A.-C., Hawkins C.L., Bisht K., Bakrania B., Coombes J.S., Wagner K.-H. et al. Reduced circulating oxidized LDL is associated with hypocholesterolemia and enhanced thiol status in Gilbert's syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52: 2120–7.
11. Zhang M., Wang H., Huang Y., Xu X., Liu W., Ning Q., Chen T., Qi J. Compound heterozygous UGT1A1*28 and UGT1A1*6 or single homozygous UGT1A1*28 are major genotypes associated with Gilbert's syndrome in Chinese Han people. *Gene.* 2021; 781: 145526.
12. Vukovic M., Radlovic N., Lekovic Z., Vucicevic K., Maric N., Kottur N. et al. UGT1A1 (TA)_n Promoter Genotype: Diagnostic and Population Pharmacogenetic Marker in Serbia. *Balkan J. Med. Genet.* 2018; 21(1): 59-68.
13. Lampe J.W., Bigler J., Horner N.K., Potter J.D. UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics.* 1999 Jun; 9(3): 341-9.
14. Iolascon A., Faienza M.F., Centra M., Storelli S., Zelante L., Savoia A. (TA)₈ allele in the UGT1A1 gene promoter of a Caucasian with Gilbert's syndrome. *Haematologica.* 1999 Feb; 84(2): 106-9.
15. Maruo Y., Nishizawa K., Sato H., Sawa H., Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics.* 2000; 106: E59.
16. Fang J.L., Lazarus P. Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes. from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13(1): 102-9.
17. Kaplan M., Hammerman C., Maisels M.J. Bilirubin genetics for the nongeneticist: Hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation. *Pediatrics.* 2003; 111: 886–93.
18. Kamal S., Abdelhakam S., Ghoraba D., Massoud Y., Aziz K.A., Hassan H. et al.. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: a longitudinal study. *BMC Gastroenterology.* 2019 Feb 4; 19(1): 22.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Воротников И.К., Соколов Н.Ю., Ермилова В.Д., Мочалова А.С., Кушлинский Н.Е.

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ ТИПОМ ОПУХОЛИ

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

Представлены результаты иммуноферментного исследования растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L (sPD-1 и sPD-L1) в сыворотке крови 88 больных раком молочной железы (РМЖ) в различных стадиях заболевания в возрасте от 30 до 83 лет. В группу контроля вошли 55 практически здоровых женщин в возрасте от 19 до 82 лет. Уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ высоко значимо ($p < 0,0001$) отличаются от нормы, причем эти изменения разнонаправлены: уровень растворимого рецептора более чем в 6 раз снижен, а уровень растворимого лиганда в 5,5 раза повышен. Каждый из маркеров индивидуально, а также их соотношение обладают очень высокой чувствительностью (94-100%) и специфичностью (95-100%) относительно здорового контроля. Статистически значимых различий уровней sPD-1 и sPD-L1 в зависимости от стадии заболевания в целом, отдельных критериев системы TNM, гистологического строения, степени злокачественности, рецепторного статуса и молекулярного типа опухоли, не обнаружено. Не выявлено, в частности, значимых особенностей уровней данных маркеров при тройном негативном РМЖ, при котором довольно успешно применяются анти-PD-1/PD-L1 препараты. Для оценки независимой от клинико-морфологических факторов прогностической значимости растворимых форм PD-1 и PD-L1 и возможности их использования в качестве малоинвазивных тестов для предсказания чувствительности и мониторинга эффективности соответствующей терапии необходимо длительное наблюдение за больными и исследование уровня маркеров в динамике на фоне лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы; sPD-1; sPD-L1; молекулярный тип; сыворотка крови.

Для цитирования: Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Воротников И.К., Соколов Н.Ю., Ермилова В.Д., Мочалова А.С., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L в сыворотке крови больных раком молочной железы: взаимосвязь с клинико-морфологическими особенностями и молекулярным типом опухоли. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 76-80. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-76-80>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 04.11.2021

Принята к печати 04.12.2021

Опубликовано 23.02.2022

Gershtein E.S., Korotkova E.A., Vorotnikov I.K., Sokolov N.Yu., Ermilova V.D., Mochalova A.S., Kushlinskii N.E.

SOLUBLE FORMS OF PD-1/PD-L IMMUNE CHECKPOINT RECEPTOR AND LIGAND IN BLOOD SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS: ASSOCIATION WITH CLINICAL PATHOLOGIC FACTORS AND MOLECULAR TYPE OF THE TUMOR

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

Results of enzyme-linked immunosorbent assay of the soluble forms of PD-1/PD-L immune checkpoint receptor and ligand (sPD-1 and sPD-L1) in pretreatment blood serum of 88 breast cancer patients at various disease stages aged 30–83 years are presented. The control group included 55 practically healthy women aged 19–82 years. Serum sPD-1 and sPD-L1 levels in breast cancer patients highly significantly ($p < 0.0001$) differ from control and these changes are opposite: soluble receptor level is more than 6-fold decreased, while soluble ligand concentration – 5.5 fold increased. Both markers separately, as well as their ratio demonstrate very high sensitivity (94-100%) and specificity (95-100%) in relation to healthy control. No statistically significant associations of sPD-1 and sPD-L1 levels with clinical stage, individual TNM system criteria, tumor histological structure, grade, receptor status, and molecular type were established. In particular, no significant peculiarities of the markers' levels in triple negative breast cancer successfully treated with anti-PD-1/PD-L1 preparations were revealed. Long-term follow-up and dynamic studies of sPD-1 and sPD-L1 serum levels in the course of treatment are required for evaluation of their independent from clinical and morphological factors prognostic significance and the possibility of application as low invasive tests for prediction and monitoring of corresponding targeted therapy efficiency.

Key words: breast cancer; sPD-1; sPD-L1; tumor molecular type; blood serum.

For citation: Gershtein E.S., Korotkova E.A., Vorotnikov I.K., Sokolov N.Yu., Ermilova V.D., Mochalova A.S., Kushlinskii N.E. Soluble forms of PD-1/PD-L immune checkpoint receptor and ligand in blood serum of breast cancer patients: association with clinical pathologic factors and molecular type of the tumor. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 76-80 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-76-80>

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

Information about authors:

Gershtein E.S., <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>;
Korotkova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-2509-5232>;
Vorotnikov I.K., <https://orcid.org/0000-0001-6699-0738>;
Sokolov N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0706-9575>;
Ermilova V.D., <https://orcid.org/0000-0003-1601-7782>;
Mochalova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7681-5383>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 04.11.2021

Accepted 04.12.2021

Published 23.02.2022

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место по заболеваемости среди злокачественных опухолей у женщин. Улучшение ранней диагностики и совершенствование методов терапии РМЖ, в том числе создание и успешное применение специфических молекулярно-направленных («таргетных») препаратов, подавляющих активность ключевых сигнальных путей, стимулирующих пролиферацию опухолевых клеток, существенно повысили эффективность лечения этого тяжелого и социально значимого заболевания. Однако проведение как неоадьювантной, так и адьювантной системной и местной терапии не безразлично для больной, и показания к ее применению должны быть четко определены.

Стандартными факторами, позволяющими прогнозировать клиническое течение РМЖ, до сих пор остаются такие параметры, как размер опухоли, поражение периферических лимфатических коллекторов, гистологическая форма, степень злокачественности. Важными этапами на пути к персонализированному лечению РМЖ стало внедрение в клиническую практику исследования статуса рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов – РЭ и прогестерона – РП) для определения показаний к назначению эндокринной терапии и обязательная оценка экспрессии мембранного рецептора HER2/neu или амплификации его гена при решении вопроса о применении герцептина, вошедшая в практику вместе с внедрением этого первого таргетного препарата. В настоящее время используется комплексный подход, в котором все эти три маркера, наряду с маркером пролиферации Ki-67, служат основой современной молекулярной классификации РМЖ, позволяющей разделить его на подтипы, определяющие характер и интенсивность проводимого лечения [1].

В последние годы в дополнение к хорошо известным методам лекарственной, эндокринной и лучевой терапии в практику лечения больных РМЖ активно внедряются иммунотерапевтические подходы, направленные на подавление так называемых «контрольных точек иммунитета», которые в физиологических условиях контролируют выраженность и длительность аутоиммунного ответа, предотвращая повреждение собственных тканей, а при развитии онкологических заболеваний способствуют ускользанию опухоли от иммунной реакции организма.

Одной из ключевых «контрольных точек иммунитета» является белок программируемой клеточной гибели PD-1 (programmed cell death protein 1) и его лиганды –

PD-L1 и PD-L2. PD-1 представляет собой мембранный рецептор I типа, принадлежащий к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток и экспрессирующийся на их поверхности. Наиболее значимый лиганд – PD-L1, известный также как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1-го типа (B7-H1), в норме экспрессируется на антигенпрезентирующих дендритных и макрофагоподобных клетках периферических органов, на клетках плаценты, островков поджелудочной железы и сетчатки. В определенных условиях экспрессия PD-L1 может наблюдаться и на T- и B-лимфоцитах, естественных киллерах, макрофагах, мезенхимальных стволовых и эпителиальных клетках, а также на клетках опухолей.

Активация PD-1/PD-L1 пути стимулирует апоптоз антигенспецифичных T-клеток в лимфоузлах и одновременно подавляет апоптоз регуляторных супрессорных T-клеток, что и позволяет опухоли уйти от иммунного ответа организма. В связи с этим моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1, предотвращающие их взаимодействие друг с другом и ингибирующие иммуносупрессивные эффекты опухолей, активно используют в терапии многих онкологических заболеваний [2]. В последние годы предпринимаются и достаточно серьезные попытки применения этого вида иммунотерапии при РМЖ, в первую очередь, при наиболее агрессивном и плохо поддающимся стандартному лечению тройном негативном (РЭ-РП-HER2-) раке [3, 4]. Комбинации ингибиторов PD-1/PD-L1 с ингибиторами полиАДФ-рибозополимеразы (ПАРП), митоген-активируемой протеинкиназы и CTLA-4 используются в лечении РМЖ, обладающего множественной лекарственной устойчивостью [5].

Также как и при других видах молекулярно-направленной терапии, для успешного применения анти-PD-1/PD-L1 препаратов необходимы четкие критерии отбора потенциально чувствительных пациентов. Наиболее очевидным подходом является оценка экспрессии PD-1 и PD-L1 на опухолевых клетках и инфильтрирующих опухоли лимфоцитах иммуногистохимическими (ИГХ) методами или с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию PD-1 и PD-L1 рассматривают и в качестве молекулярных маркеров общего прогноза онкологических заболеваний и выживаемости пациентов. Уже продемонстрировано неблагоприятное влияние высокой активности PD-1/PD-L1 пути, в первую очередь, повышенной экспрессии PD-L1 на клиническое течение целого ряда опухолей [6], в том числе РМЖ [7-10].

В то же время, по данным ряда крупных рандомизированных исследований, связь результатов ИГХ опреде-

ления экспрессии PD-1 и PD-L1 с эффективностью соответствующей иммунотерапии оказалась неоднозначной [11]. Скорее всего, наличие этих противоречий связано с трудностями стандартизации ИГХ метода, результаты которого зависят от техники подготовки образцов, применяемых антител, различающихся по специфичности и средству к различным эпитопам исследуемых белков, а также от критериев, используемых при интерпретации полученных данных. Одной из важнейших проблем ИГХ тестирования PD-1 и PD-L1 является и то, что эти молекулы экспрессируются не только на клетках самой опухоли, но и на инфильтрирующих ее клетках иммунной системы, причем на данном этапе исследований неизвестно, какой тип экспрессии более значим для предсказания ответа на иммунотерапию. Другой проблемой является наличие не связанных с мембраной форм данных белков, которые могут давать ложноположительные результаты; при этом их роль в патогенезе опухолей тоже не очень ясна.

В решении хотя бы части проблем, связанных с ИГХ тестированием, может помочь исследование растворимых форм PD-1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), обнаруженных относительно недавно в периферической крови, в том числе, и онкологических больных [12]. Происхождение растворимых форм точно не установлено, однако, как и у других мембранных белков, они могут образовываться либо в результате гидролитического отщепления внеклеточного домена мембраносвязанной молекулы, либо на более раннем этапе – при альтернативном сплайсинге мРНК этой нативной мембранной формы. В экспериментальных исследованиях показана способность sPD-1 подавлять активность PD-1/PD-L1(2) пути, блокируя связывание находящегося на опухолевых клетках лиганда с мембранным рецептором Т-лимфоцитов. sPD-L1 также способен снизить активность PD-1/PD-L1(2) пути, блокируя рецептор, но он может также стимулировать апоптоз Т-лимфоцитов, аналогично мембранному белку, т.е. подавлять противоопухолевый иммунитет.

Большинство публикаций о роли sPD-1 и sPD-L1 при разных онкологических заболеваниях, вышедших в последние несколько лет, суммированы в фундаментальном обзоре [12], а также в мета-аналитических работах [13, 14], однако это направление активно развивается, и еще несколько исследований опубликовано уже после выхода этих обобщающих статей [15, 16].

Цель исследования – сравнительная оценка содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ и практически здоровых женщин, анализ взаимосвязи уровня этих маркеров с основными клинико-морфологическими особенностями и молекулярными типами РМЖ.

Материал и методы. В исследование вошли 88 больных РМЖ в возрасте от 30 до 83 лет (медиана – 53 года), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с января 2019 г. по март 2020 г. Группа контроля включала 55 практически здоровых женщин в возрасте от 19 до 82 лет (медиана – 48 лет). Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Определение стадий заболевания и гистологическая классификация РМЖ проведены в соответствии с рекомендациями ВОЗ: ПА стадия выявлена у 12, ПВ – у 16 больных; 11 пациенток имели IIIA, 27 – IIIB и 19

– IIIC стадию заболевания; у 6 пациенток диагностирован первично-множественный рак обеих молочных желез. У 67 (76%) пациенток опухоль охарактеризована как инфильтративный рак неспецифического типа, у 13 выявлена протоковая и у 8 дольковая аденокарцинома. Молекулярную классификацию РМЖ проводили на основании данных ИГХ исследований. Люминальный А тип (PЭ+ПП+ HER2- Ki-67<20%) выявлен у 2 пациенток; люминальный В (PЭ+ПП+/-; HER2- Ki-67>30% или HER2+ Ki-67 любой) – у 46; HER2-положительный (PЭ-ПП- HER2+) – у 8, тройной негативный (базальный; PЭ-ПП- HER2-) – у 28 пациенток.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа «Human PD-L1 Platinum ELISA» и «Human PD-1 ELISA kit» (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0». При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, тест корреляции рангов Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В таблицах представлены показатели медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q1; Q3).

Результаты и обсуждение. Уровень sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ статистически значимо выше, а уровень sPD-1 – ниже, чем в группе контроля: медианы различались соответственно в 5,4 и в 6,3 раза (табл. 1; в обоих случаях $p < 0,0001$). Уровни маркеров в сыворотке крови больных односторонним и первично-множественным РМЖ практически не различались.

У всех больных РМЖ уровень sPD-1 не превышает 20,2 пг/мл, в группе контроля столь низкий уровень маркера встречается только в одном случае, т.е. чувствительность и специфичность теста составляют соответственно 100 и 98%. Для sPD-L1 наилучшее соотношение чувствительности и специфичности – 94 и 95% соответственно достигается при пороговом уровне 15 пг/мл. Соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 у больных РМЖ выше 2,1, в контрольной группе оно не превышает 1,23. При пороговом уровне 1,25 этот тест обладает 99% чувствительностью и 100% специфичностью. Интересно отметить, что при других злокачественных опухолях (рак почки, яичников, желудка, саркомы костей) мы не наблюдали столь выраженных разнонаправленных изменений концентраций растворимых форм PD-1 и PD-L1, циркулирующих в периферической крови [15, 16].

В общей группе, включавшей и больных РМЖ, и практически здоровых женщин, выявлены слабые, но статистически значимые корреляции уровней маркеров с возрастом – положительная для sPD-L1 ($r_s = 0,26$; $p < 0,001$) и отрицательная для sPD-1 ($r_s = -0,19$; $p < 0,05$). Такая же тенденция отмечена и в группе больных РМЖ, но она не достигает уровня статистической значимости. Значимых различий в уровнях изучаемых маркеров в сыворотке крови больных РМЖ с сохраненной менструальной функцией и пациенток, находящихся в менопаузе, не выявлено.

При анализе взаимосвязи уровней исследуемых маркеров в сыворотке крови с показателями распространенности РМЖ статистически значимых различий в зависимости от стадии заболевания в целом и отдельных критериев системы TNM не обнаружено (табл. 2).

По гистологическому строению опухоли в 76% случаев представляли собой инфильтративный рак неспецифического типа, у 13 пациенток выявлена протоковая и у 8 дольковая аденокарцинома. Значимых различий сывороточного содержания sPD-L1 и sPD-1 в зависимости от гистологического типа, а также от степени злокачественности опухоли также не наблюдали. Нужно отметить при этом, что все опухоли имели либо умеренную (G2), либо высокую (G3) степень злокачественности (табл. 3).

Одной из важнейших характеристик РМЖ, определяющих как общий прогноз заболевания, так и персонализированный подход к выбору стратегии и тактики лекарственного лечения, является рецепторный статус опухоли, включающий в настоящее время рецепторы стероидных гормонов (РЭ и РП) и рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2), а также молекулярный тип РМЖ, формирующийся на основе этих показателей и уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67. В обследованной группе больных РЭ-положительными оказались 57%, РП-положительными – 50%, HER2-положительными – 24% опухолей. Низкая экспрессия Ki-67 (< 20%) отмечена только в 2-х случаях; соответственно наиболее благоприятный люминальный А тип РМЖ был только у двух пациенток. Преобладающим был люминальный В тип (46 пациенток: 72% HER2-, 28% HER2+). Наиболее неблагоприятный тройной негативный вариант РМЖ диагностирован у 28 (33%) пациенток.

Выраженных различий в уровнях sPD-L1 и sPD-1 в зависимости от статуса РЭ и HER2 не обнаружено, однако уровень sPD-L1 был статистически значимо выше у пациенток с РП-отрицательными опухолями по сравнению с теми, у кого опухоль была РП-положительной ($p < 0,05$; табл. 4). Можно также отметить тенденцию к повышению уровня обоих маркеров при HER2+ опухолях (см. табл. 4). Не удалось выявить и статистически значимых различий в зависимости от молекулярного типа опухоли, хотя медиана концентрации sPD-L1 в сыворотке крови 8 больных с HER2- опухолями почти вдвое превышает этот показатель при всех других молекулярных вариантах РМЖ (табл. 5).

В большинстве работ, посвященных клиническому значению PD-1/PD-L1 сигнального пути при РМЖ, изучали экспрессию этих молекул на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TILs). В некоторых исследованиях было показано, что наличие PD-1+ TILs ухудшает прогноз заболевания [8, 10], другие авторы пришли к противоположному заключению [7, 17]. Достаточно противоречивые данные опубликованы и о прогностическом значении экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках, ее корреляции с клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими факторами, соотношении с экспрессией PD-1 на TILs [9, 18]. Результатов исследования растворимых форм PD-1 и PD-L1 при РМЖ не представлено. Можно, однако, отметить две работы, в которых исследовали уровни мРНК этих маркеров в плазме крови [19, 20]. В одной из них [19] продемонстрировано ухудшение прогноза заболевания при высоких уровнях мРНК PD-1 в плазме крови, в другом [20] – предложена диагностическая панель маркеров, включающая PD-1 и PD-L1, которая позволяет

Таблица 1

Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ и здоровых доноров

Показатель	Больные РМЖ (n=88)		Группа контроля (n=55)	
	Min-max	Me, Q1-Q3	Min-max	Me, Q1-Q3
sPD-1, пг/мл	1,16-20,2	7,46* 6,05-9,13	11,4-138	47,1* 34,7-59,9
sPD-L1, пг/мл	1,57-526	48,7* 37,8-72,5	0-41,8	8,91* 5,61-19,3

Примечание. * – $p_{1,2} < 0,0001$.

Таблица 2

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ в зависимости от показателей распространенности опухоли

Показатель распространенности	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Me	Q1-Q3	Me	Q-Q3
Стадия					
IIA	12	7,16	5,02-9,98	46,9	39,7-65,2
IIB	15	7,26	6,17-8,40	49,9	36,6-72,5
IIIA	11	8,8	5,23-11,9	51,0	44,5-113
IIIB	27	6,91	5,61-8,95	45,8	26,7-80,9
IIIC	19	7,65	6,54-10,1	48,7	39,6-61,9
Размер первичной опухоли (T)					
T ₁	5	8,77	8,42-11,7	41,4	27,0-48,1
T ₂	31	6,73	5,23-8,40	47,4	38,9-67,3
T ₃	9	8,77	6,17-10,8	49,9	35,3-61,9
T ₄	40	7,46	6,00-8,86	49,9	37,6-81,4
Метастазы в регионарных лимфоузлах (N)					
N ₀	21	6,67	5,28-8,40	46,4	38,9-59,8
N ₁	29	7,47	5,84-8,77	50,6	37,4-82,2
N ₂	17	7,46	5,80-9,14	48,1	38,5-55,4
N ₃	18	7,56	6,54-9,04	48,6	39,6-61,2

Примечание. Здесь и в табл. 3 – 5: n – число больных.

Таблица 3

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Степень дифференцировки опухоли	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3
G2	59	7,26	5,44-9,04	49,3	37,6-61,9
G3	22	8,03	6,67-9,14	46,1	38,5-74,2

Таблица 4

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ с учетом статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2

Рецепторы	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3
РЭ+	48	6,89	5,53-8,86	48,2	35,1-55,0
РЭ-	36	8,08	6,40-9,09	49,4	41,0-89,3
РП+	42	7,01	5,61-8,95	46,3*	33,5-54,2
РП-	42	7,85	6,26-9,03	50,9*	41,4-82,2
HER2+	20	8,30	6,70-8,97	53,3	38,1-89,0
HER2-	64	7,21	5,70-8,99	48,0	38,1-61,5

Примечание. * – $p < 0,05$.

Таблица 5

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных РМЖ в зависимости от молекулярного типа опухоли

Молекулярный тип РМЖ	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Ме	Q1-Q3	Ме	Q1-Q3
Люминальный А	2	7,60	4,41-10,8	44,5	39,0-49,9
Люминальный В (HER2-отрицательный)	33	6,91	5,44-8,95	48,0	29,9-56,8
Люминальный В (HER2-положительный)	13	6,87	6,54-8,40	48,5	37,8-54,7
HER2-положительный (нелюминальный)	8	8,69	7,85-10,8	89,0	43,9-220
Трижды негативный (PЭ- PII- HER2-)	28	7,56	6,26-8,90	47,8	41,0-82,1

различить рак и доброкачественные заболевания молочных желез. В целом, вопрос о клиническом значении различных подходов к исследованию маркеров контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L при РМЖ остается дискуссионным и требует дальнейшего изучения.

Заключение. Уровни растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L в сыворотке крови больных РМЖ высоко значимо отличаются от нормы, причем эти изменения разнонаправлены: уровень растворимого рецептора более чем в 6 раз снижен, а уровень растворимого лиганда в 5,5 раза повышен. Каждый из маркеров индивидуально, а также их соотношение обладают очень высокой чувствительностью (94-100%) и специфичностью (95-100%) относительно здорового контроля, однако возможность их использования для дифференциации больных РМЖ и пациенток с доброкачественными новообразованиями молочных желез требует дальнейшего изучения.

Уровни sPD-L1 и sPD-1 в сыворотке крови не зависят от основных клинических, морфологических и молекулярных характеристик РМЖ. В частности, не выявлено значимых особенностей уровней данных маркеров при тройном негативном РМЖ, при котором довольно успешно применяются анти-PD-1/PD-L1 препараты. Для оценки независимой от клинико-морфологических факторов прогностической значимости растворимых форм PD-1 и PD-L1 и возможности их использования в качестве малоинвазивных тестов для предсказания чувствительности и мониторинга эффективности соответствующей терапии необходимо длительное наблюдение за больными и исследование уровня маркеров в динамике на фоне лечения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-15, 17-20 см. REFERENCES)

16. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Чанг В.Л., Короткова Е.А., Алферов А.А., Конторшиков М.М. и др. Прогностическая значимость растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком желудка. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(3):139-46.

REFERENCES

1. Trop I., LeBlanc S.M., David J., Lalonde L., Tran-Thanh D., Labelle M., El Khoury M.M. Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. *Radiographics : a review pub-*

lication of the Radiological Society of North America, Inc. 2014; 34(5):1178-95.

2. Hamanishi J., Mandai M., Matsumura N., Abiko K., Baba T., Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int. J. Clin. Oncol.* 2016; 21(3):462-73.

3. Setordzi P., Chang X., Liu Z., Wu Y., Zuo D. The recent advances of PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for breast cancer immunotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* 2021; 895:173867.

4. Noguchi E., Shien T., Iwata H. Current status of PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in breast cancer. *Japan J. Clin. Oncol.* 2021; 51(3):321-32.

5. Liu S., Chen S., Yuan W., Wang H., Chen K., Li D., Li D. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget.* 2017; 8(59):99901-12.

6. Zhang Y., Kang S., Shen J., He J., Jiang L., Wang W., Guo Z., Peng G., Chen G., He J. et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine.* 2015; 94(6):e515.

7. Matikas A., Zerdes I., Lovrot J., Sifakis E., Richard F., Sotiriou C. et al. -1 protein and gene expression as prognostic factors in early breast cancer. *ESMO open.* 2020; 5(6):e001032.

8. Sun S., Fei X., Mao Y., Wang X., Garfield D.H., Huang O. et al. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 2014; 63(4):395-406.

9. Tsang J.Y., Au W.L., Lo K.Y., Ni Y.B., Hlaing T., Hu J. PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017; 162(1):19-30.

10. Muenst S., Soysal S.D., Gao F., Obermann E.C., Oertli D., Gillanders W.E. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 139(3):667-76.

11. Yuasa T., Masuda H., Yamamoto S., Numao N., Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017; 22(4):629-34.

12. Zhu X., Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(57):97671-82.

13. Wei W., Xu B., Wang Y., Wu C., Jiang J., Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine.* 2018; 97(3):e9617.

14. Ding Y., Sun C., Li J., Hu L., Li M., Liu J., Pu L., Xiong S. The Prognostic Significance of Soluble Programmed Death Ligand 1 Expression in Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scan. J. Immunol.* 2017; 86(5):361-7.

15. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Morozov A.A., Goryacheva I.O., Filipenko M.L., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Bazaev V.V., Kazantseva I.A. Soluble Ligand of the Immune Checkpoint Receptor (sPD-L1) in Blood Serum of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 166(3):353-7.

16. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Chang V.L., Korotkova E.A., Alferov A.A., Kontorshchikov M.M., Sokolov N.Y., Karamysheva E.I., Ognerubov N.A., Stilidi I.S. Prognostic significance of soluble forms of immune checkpoint PD-1/PDL1 receptor and ligand in blood plasma of gastric cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2021; 66(3):139-46. (in Russian)

17. Noske A., Mobus V., Weber K., Schmatloch S., Weichert W., Kohne C.H. et al. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur. J. Cancer.* 2019; 114:76-88.

18. Vidula N., Yau C., Rugo H.S. Programmed cell death 1 (PD-1) receptor and programmed death ligand 1 (PD-L1) gene expression in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2021; 187(2):387-95.

19. Noda M., Masuda T., Ito S., Tobo T., Kitagawa A., Hu Q. et al. Circulating PD-1 mRNA in Peripheral Blood is a Potential Biomarker for Predicting Survival of Breast Cancer Patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2020; 27(10):4035-43.

20. Liu C., Sun B., Xu B., Meng X., Li L., Cong Y. et al. A panel containing PD-1, IL-2Ralpha, IL-10, and CA15-3 as a biomarker to discriminate breast cancer from benign breast disease. *Cancer Management Res.* 2018; 10:1749-61.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Лебеденко А.А.¹, Афонин А.А.¹, Семерник О.Е.¹, Логинова И.Г.¹, Гунько В.О.¹, Ларичкин А.В.¹, Аллилуев И.А.², Галкина Г.А.¹, Панова И.В.¹

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ – НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

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

²ФГАУ ВО «Южный федеральный университет», 344006, Ростов-на-Дону, Россия

В настоящее время бронхиальная астма (БА) является одной из самых актуальных медицинских и социальных проблем, молекулярные аспекты формирования и развития которой недостаточно изучены, а диагностика несовершенна. Проведение протеомного анализа при БА позволит не только выявить новые биомаркеры, специфичные для данного заболевания, но и приблизиться к пониманию его патогенетических механизмов.

Цель исследования: изучить протеомный профиль сыворотки крови детей с БА для выявления белков, ассоциированных с данным заболеванием.

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование детей, страдающих БА, и пациентов контрольной группы. Протеомный анализ обедненной сыворотки крови включал высокоразрешающий двухмерный электрофорез (1 направление: иммобилиновые стрипы 17 см, pH 3-10, 2-направление: денатурирующий электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле), окраску белковых пятен на гелях флуоресцентным красителем Flamingo, идентификацию белков методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии при помощи поискового алгоритма Mascot и базы данных Swiss-Prot. Сопоставление протеомного профиля сыворотки крови больных БА и пациентов контрольной группы позволило установить, что продукция ряда белков снижена при указанной патологии. Среди них были идентифицированы белки в диапазоне молекулярных масс 16-33 кДа ($p < 0,05$): глутатионпероксидаза 3, транстиретин, компоненты комплемента C4b и C3. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при БА происходят изменения в протеоме сыворотки крови детей, затрагивающие белки, которые играют важную роль в иммунных реакциях, транспорте лигандов и антиоксидантной защите. Особое внимание следует уделить идентифицированным в ходе данной работы белкам-отличиям (глутатионпероксидазе, транстиретину, C3 и C4b фрагментам системы комплемента) или их комбинациям. Изучение особенностей их экспрессии позволит расширить наши представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе хронического воспаления при данном заболевании.

Ключевые слова: протеомный анализ; бронхиальная астма; диагностика; дети; белки-маркеры; сыворотка крови.

Для цитирования: Лебеденко А.А., Афонин А.А., Семерник О.Е., Логинова И.Г., Гунько В.О., Ларичкин А.В., Аллилуев И.А., Галкина Г.А., Панова И.В. Протеомный анализ сыворотки крови – новый подход к поиску диагностических маркеров бронхиальной астмы у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 81-84. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-81-84>

Для корреспонденции: Семерник Ольга Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. каф. детских болезней № 2; e-mail: semernick@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.04.2021

Принята к печати 23.07.2021

Опубликовано 23.02.2022

Lebedenko A.A.¹, Afonin A.A.¹, Semernik O.E.¹, Loginova I.G.¹, Gunko V.O.¹, Larichkin A.V.¹, Alliluyev I.A.², Galkina G.A.¹, Panova I.V.¹

PROTEOMIC ANALYSIS OF BLOOD SERUM – A NEW APPROACH TO THE SEARCH FOR DIAGNOSTIC MARKERS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

¹Rostov State Medical University, 344012, Rostov-on-Don, Russia ;

²Southern State University, 344006, Rostov-on-Don, Russia

Currently, bronchial asthma (BA) is one of the most pressing medical and social problems, the molecular aspects of the formation and development of BA are insufficiently studied and the diagnosis is not perfect. Carrying out proteomic analysis of BA will not only reveal new biomarkers specific to this disease, but also bring us closer to understanding its pathogenetic mechanisms. The purpose of the study: to study the proteomic profile of blood serum of children with BA to identify proteins associated with this disease. A comprehensive clinical and laboratory examination of children suffering from BA and control group patients was performed. Proteomic analysis of depleted blood serum included high-resolution two-dimensional electrophoresis (1 direction: immobilized strips 17 cm, pH 3-10, 2 direction: denaturing electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel), protein staining on gels with fluorescent dye Flamingo, protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry using the search algorithm Mascot and the Swiss-Prot database. Comparison of the proteomic profile of BA serum and the control group patients serum allowed us to establish that the production of a number of proteins is reduced in this pathology. Among them, proteins in the molecular weight range of 16-33 kDa ($p < 0.05$) were identified: glutathione peroxidase 3, transthyretin, complement components C4b and C3. Research shows that changes in the children's serum proteome occur in BA, affecting proteins that play an important role in immune responses, ligand transport, and antioxidant protection. Special attention should be paid to the differences identified in the course of this work (glutathione peroxidase, transthyretin, C3 and C4 fragments of the complement system) or their combinations. Studying the features of their expression will expand our understanding of the molecular mechanisms underlying chronic inflammation of this disease.

Key words: proteomic analysis; bronchial asthma; diagnostics; children; protein markers; blood serum.

For citation: Lebedenko A.A., Afonin A.A., Semernik O.E., Loginova I.G., Gunko V.O., Larichkin A.V., Alliluyev I.A., Galkina G.A., Panova I.V. Proteomic analysis of blood serum – a new approach to the search for diagnostic markers of bronchial asthma in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 81-84 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-81-84>

Information about authors:

Lebedenko A.A.,	https://orcid.org/0000-0003-4525-1500 ;	Larichkin A.V.,	https://orcid.org/0000-0002-1207-0554 ;
Afonin A.A.,	https://orcid.org/0000-0003-1078-8391 ;	Alliluyev I.A.,	https://orcid.org/0000-0001-7654-0650 ;
Semernik O.E.,	http://www.orcid.org/0000-0002-3769-8014 ;	Galkina G.A.,	https://orcid.org/0000-0001-6809-0995 ;
Loginova I.G.,	https://orcid.org/0000-0001-7718-3528 ;	Panova I.V.,	https://orcid.org/0000-0001-5068-7136 .
Gunko V.O.,	https://orcid.org/0000-0001-8607-9052 ;		

For correspondence: Semernik Olga, PhD, associate professor of the Children's diseases № 2 Department; e-mail: semernick@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.04.2021

Accepted 23.07.2021

Published 23.02.2022

Введение. Бронхиальная астма (БА) в настоящее время является одной из самых актуальных медицинских и социальных проблем, имеющих важное практическое значение. По распространенности, тяжести течения, сложности диагностики и терапии, затратам на лечение данная нозология занимает ведущее место среди других хронических неинфекционных заболеваний. В разных странах БА болеют от 4 до 35% населения [1]. В России заболеваемость среди детей варьирует от 1 до 10% [2]. В основе этой патологии лежит хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором играют роль многие клетки и клеточные элементы, а именно: тучные клетки, эозинофилы и Т-лимфоциты [2]. Кроме того, БА включает сложные взаимодействия различных факторов на молекулярном уровне, что затрудняет понимание ее патогенеза. В отличие от моногенных заболеваний, мультифакториальные заболевания вызываются не самостоятельно функционирующими белками, а постоянно взаимодействующими белковыми сетями [3]. Сыворотка крови содержит динамическую совокупность белков, синтезируемых тканями и клетками организма, которые опосредуют гомеостаз через регуляцию межклеточной коммуникации, иммунных реакций, функций сосудистых и эндотелиальных клеток, ремоделирования тканей и т.д. Сывороточные белки и другие циркулирующие факторы могут непосредственно регулировать работу сложных сигнальных сетей, координирующих развитие и прогрессирование БА.

Среди современных методических подходов молекулярной медицины именно протеомный анализ позволяет одновременно анализировать всю совокупность белков в исследуемом образце и определять белковые профили (паттерны), характерные для того или иного заболевания [4]. В связи с этим, проведение протеомных исследований сыворотки крови у больных, страдающих БА, позволит не только выявить информативные маркеры хронического аллергического воспаления и новые терапевтические мишени, но и приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе данного заболевания у детей.

Цель исследования: изучить протеомный профиль сыворотки крови детей с БА для выявления белков, ассоциированных с данным заболеванием.

Материал и методы. Проведено проспективное обследование 8 больных с тяжелым неконтролируемым течением БА. Диагноз верифицирован на основании Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики» [2]. Для каждого больного был подобран в пару идентичный по полу, возрасту ребе-

нок I группы здоровья, не имеющийотягощенного личного и семейного аллергического анамнеза. Средний возраст обследованных пациентов составил 11,44±4,67 лет.

Критериями включения в данное исследование были: наличие подтвержденного диагноза БА, отсутствие сопутствующей хронической патологии со стороны других органов и систем, возраст младше 18 лет. Критерии исключения: наличие установленных хронических и острых заболеваний бронхолегочной системы (туберкулез, острый трахеобронхит, пневмония и др.), возраст пациентов старше 18 лет, отсутствие подписанного информированного согласия.

Комплексное клинико-лабораторное обследование детей, включающее сбор анамнестических данных, оценку физического состояния, определение общего и специфических IgE, а также исследование функции внешнего дыхания с применением пикфлоуметрии, спиррографии и бодиплетизмографии. Все исследования выполнены по стандартным методикам. Также всем детям проведено исследование протеомного профиля сыворотки крови, включающее высокоразрешающий электрофорез и времяпролетную масс-спектрометрию.

Взятие крови у пациентов проводили натощак из вены (4 мл) в пробирки с активатором свертывания. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин (1600g), полученную сыворотку аликвотировали и хранили в присутствии коктейля ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific», США) при -86°C до проведения исследования. Перед использованием образцы размораживали при комнатной температуре в течение 15 мин и немедленно обрабатывали. Обеднение сыворотки (удаление альбумина и иммуноглобулина G) проводили с использованием наборов Aurum Serum Protein Mini Kit (Bio-Rad, США) согласно протоколу фирмы производителя. Затем обедненные образцы концентрировали и обессоливали на пористых фильтрах Amicon Ultra 10кDa (Millipore, США). Определение белка в образцах проводили по методу Брэдфорд [5]. Загрузка белка на 1 гель составляла 125 мкг.

Разделение белков сыворотки проводили методом двумерного электрофореза (2Д-ЭФ) [6]. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) осуществляли с использованием иммобилизованных стрипов с линейным градиентом pH (17 см, pH=3-10, Ready Strip IPG Strips, «Bio-Rad», США) на приборе Protein IEF Cell («Bio-Rad», США). Буфер для ИЭФ включал 7М мочевины, 2М тиомочевину, 1% дитиотреитол, 1% амфолиты 3-10, 4% CHAPS, 0,05% бромфеноловый синий («Bio-Rad», США). Программа ИЭФ,

после пассивной регидратации образцов течение 15 ч при 20°C, включала следующие этапы: 250 В быстро – 30 мин, до 10000 В линейно – 2 ч, до достижения общих 45000 В×ч быстро, 1000 В быстро – удержание. Вертикальный электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили в камере Protean II xi Multi-Cell (Bio-Rad, США) при силе тока 40 мА на гель в течение 5 часов. В качестве стандартов молекулярных масс использовали набор белков SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, США).

Для визуализации белковых зон (после завершения 2-го направления 2Д-ЭФ) гели окрашивали флуоресцентным красителем Flamingo (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя, а затем сканировали на приборе Chemidoc MP (Bio-Rad, США). Анализ изображений гелей, включающий сопоставление пятен на электрофореграммах, полученных от разных образцов, проводился с помощью специального программного обеспечения PDQuest, версия 8.0.1. (Bio-Rad, США).

Участки ПААГ-геля, содержащие интересующие белки, вырезали и подвергали трипсинолизу согласно методике [7] и смешивали с матрицей – 2,5-дигидроксibenзойной кислотой (Bruker, Германия). Масс-спектры триптических гидролизатов белков были получены на MALDI-TOF-масс-спектрометре Microflex LRF (Bruker, Германия). Для получения и анализа масс-спектров использовали программы FlexControl версии 3.4 и FlexAnalysis версии 3.4 (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации белков использовали программу BioTools версии 3.2 (Bruker, Германия), по масс-листу каждого белкового пятна проводили поиск соответствующих кандидатов в базе данных Swiss-Prot (2013_12) с использованием локальной версии программы Mascot Search 2.4.1 (Matrix Science, США), принимая точность определения массы ионов равной 0,01%, таксон Homo sapiens, одно пропущенное расщепление, модификации: окисление метионина и алкилирование цистеинов ацетамидом. Достоверным считали идентификацию белка с индексом достоверности идентификации – Score > 50 и при проценте покрытия аминокислотной последовательности белка по базам данных совпадающими пептидами – Sequence Coverage > 15%.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica (версия 6.0 фирмы «StatSoft Inc.»). Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. При анализе частоты встречаемости белков в сыворотке пациентов двух групп использовали критерий χ^2 -критерий (для таблиц 2x2 – в точном решении Фишера). Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты. Сопоставление протеомного профиля сыворотки крови пациентов контрольной и основной групп позволило выявить четыре белка отличия с молекулярными массами в диапазоне 16-33 кДа, уровень которых снижен при БА ($p < 0,05$): глутатионпероксидаза 3 (GPX3), транстиретин (ГТНУ), компоненты комплемента C4b и C3 (см. таблицу).

Обсуждение. Оценив основные функции выявленных белковых молекул, можно предположить к каким изменениям в патогенезе БА приведет снижение их экспрессии.

Идентифицированная нами глутатионпероксидаза 3 – основной селенозависимый антиоксидантный фермент, осуществляющий защиту эпителия трахеи, бронхов и альвеол от окислительного повреждения. Для функционирования GPX3 необходимо поддержание концентрации восстановленной формы глутатиона (GSH) – ключевого компонента редокс-буферной системы, который обеспечивает устойчивое поддержание тиол-дисульфидного равновесия и антиоксидантной защиты внутри клетки [8].

Кроме того, в исследованиях, проведенных К. Seki и соавт. [9], было показано, что FceRI-опосредованное высвобождение лейкотриенов LTC₄ из тучных клеток в основном регулируется количеством внутриклеточного GSH. Авторы сделали вывод о том, что окислительный стресс значительно повышает содержание глутатиона в клетках бронхолегочной системы, запуская тем самым не только воспалительную реакцию, но и лейкотриен-опосредованное сокращение гладкой мускулатуры бронхов.

Установленное уменьшение уровня GPX3 у пациентов основной группы, очевидно, свидетельствует об истощении резервов антиоксидантной системы на фоне избыточного накопления активных форм кислорода, что создает условия для перенапряжения системы редокс-гомеостаза и дальнейшего развития окислительного стресса – одного из ключевых звеньев патогенеза БА, а также может усиливать вторичные патологические изменения дыхательных путей и лёгочной ткани на фоне уже сформировавшегося заболевания [10].

В свою очередь, изменение баланса между восстановленной и окисленной формой глутатиона вследствие нарушения активности и/или экспрессии ферментов, вовлеченных в его метаболизм, в частности GPX3, может нарушать рецептор-индуцированную и опосредованную АФК передачу сигналов, контролирующую иммунные и воспалительные реакции в бронхолегочной системе, что, очевидно, имеет немаловажное значение в патогенезе БА [11].

Основной функцией транстиретина является транспорт тироксина и витамина А, связанного с ретинол-связывающим белком (РСБ), к периферическим тканям. Связывание с транстиретином стабилизирует комплекс ретинола с РСБ, тем самым уменьшая почечную фильтрацию последнего и обеспечивая его рециркуляцию после того, как ретинол будет доставлен в клетки [12].

Белки отличия сыворотки крови, ассоциированные с бронхиальной астмой

Название белка (ID)	№ в Swiss-Prot	Mr, кДа	pI	Score	Sequence coverage	Число пептидов, вошедших в идентификацию	Биологический процесс
Глутатионпероксидаза 3	P22352	25,8	9,1	67,3%	37,6	9	Антиоксидантная защита
Транстиретин	P02766	16	5,4	68,7%	129	8	Транспорт лигандов
Компонент комплемента C4b	P0C0L5	32,6	6,4	74,1	67,2	10	Активация системы комплемента
Компонент комплемента C3	P01024	21,6	6,1	113	15,4	12	Активация системы комплемента

Примечание. ID – аббревиатура названия белков в соответствии с базами данных; Mr – молекулярная масса белков; pI – изоэлектрическая точка белков.

Экспрессия ТТНУ подавляется под действием сигналов воспалительных цитокинов во время острой фазы воспаления [13], а также снижение уровня этого внеклеточного белка установлено при системном воспалении [14].

Сниженное содержание транстретина в сыворотке крови пациентов основной группы, по-видимому, может способствовать высвобождению переносимых им лигандов, создавая их свободные пулы, опосредуя гипертиреоидные и гиперретиноидные состояния. Несвязанные формы ретиноидов, избыток которых преимущественно накапливается в легочной ткани, обладают мембраноповреждающим действием, усиливают разобщенность клеток и их гибель, что в свою очередь, приводит к активации процессов пролиферации и регенерации эпителиальных тканей и, как следствие, ремоделированию бронхов при БА [15]. Физиологические дозы витамина А и его производных модулируют дифференцировку эпителиальных Т-клеток, регуляцию и созревание В-клеток, в частности, через стимуляцию цитокинов, Т-киллеров и баланс между Th-1 и Th-2 типами Т-клеток. Однако, избыток ретиноидных соединений, высвобождаемых в свободной форме, способен стимулировать киллерную активность и пролиферацию Т-лимфоцитов, изменяя субпопуляционные соотношения этих клеток в сторону преобладания Т-хелперов, играющих ключевую роль в патогенезе БА [16].

Выявленные в нашем исследовании компоненты каскада комплемента, обеспечивая гуморальную защиту организма от действия чужеродных агентов, т.е. реализации иммунного ответа организма человека. Экспрессия этих белков значительно изменяется в сыворотке крови при воспалении и повреждении тканей [17]. Помимо печени, клетки легких альвеолярного типа II продуцируют С4 и С3, последний также синтезируется и секретируется бронхиальными эпителиальными клетками [18]. Активация С3 – центрального фактора комплемента, который участвует как в классическом, так и альтернативном пути, – происходит под действием С3-конвертазы с образованием фрагментов С3b и С3a, обладающих свойствами анафилоксина и хемотаксина. В результате активации компонента С4 образуется крупный опсонизирующий фрагмент С4b, непосредственно присоединяющийся к мембране клетки-мишени или антителу. Установлено, что биодоступность компонента С4b, может ограничиваться С4b-связывающим белком, который лимитирует его функцию [19].

Снижение содержания данных фракций комплемента в сыворотке крови больных БА может быть связано с их избыточным потреблением при сверхактивации системы комплемента в периоде обострения заболевания и свидетельствует об истощении защитных функций организма ребенка, страдающего БА.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при БА происходят изменения в протеоме сыворотки крови детей, затрагивающие белки, которые играют важную роль в иммунных реакциях, транспорте лигандов и антиоксидантной защите. Идентифицированные в ходе данной работы белки (глутатионпероксидаза, транстретин, С3 и С4b фрагменты системы комплемента) представляют большой научный и практический интерес. Исследование данных молекул достаточно перспективно и позволяет использовать протеомный анализ сыворотки крови для поиска новых диагностических маркеров бронхиальной астмы у детей. А изучение особенностей их экспрессии позволяет расширить наши представления о мо-

лекулярных механизмах, лежащих в основе хронического воспаления при данном заболевании.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-9, 11-24, 26-28
см. REFERENCES)

2. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» 5-е изд., испр. и доп. М.: Атмосфера; 2017.
10. Полоников А.В., Иванов В.П., Богомазов А.Д., Солодилова М.А. Генетико-биохимические механизмы вовлеченности ферментов антиоксидантной системы в развитии бронхиальной астмы. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(4): 427-39. DOI: 10.18097/PBMC20156104427.

REFERENCES

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2020 update). Available at: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_final_wms.pdf.
2. National program «Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention» 5th ed. [Natsional'naya programma «Bronkhial'naya astma u detey. Strategiya lecheniya i profilaktika» 5th ed.]. Moscow: Atmosfera; 2017. (in Russian)
3. Emilsson V., Ilkov M., Lamb J.R., Finkel N., Gudmundsson E.F., Pitts R. et al. Co-regulatory networks of human serum proteins link genetics to disease. *Science*. 2018; 361(6404): 769-73. DOI: 10.1126/science.aag1327.
4. Priyadharshini V.S., Teran L.M. Personalized Medicine in Respiratory Disease: Role of Proteomics. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2016; 102: 115-46. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2015.11.008.
5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
6. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68: 850-8.
7. Görg A, Boguth G, Obermaier C., Posch A., Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*. 1995; 16: 1079-86.
8. Sahiner U.M., Birben E., Erzurum S., Sackesen C., Kalayci Ö. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2018; 29(8): 789-800. DOI: 10.1111/pai.12965.
9. Seki K., Hisada T., Kawata T., Kamide Y., Dobashi K., Yamada M. et al. Oxidative stress potentially enhances FcεRI-mediated leukotriene C4 release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 27; 439(3): 357-62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.081.
10. Polonikov A.V., Ivanov V. P., Bogomazov A.D., Solodilova M.A. Genetic and biochemical mechanisms of involvement of antioxidant system enzymes in the development of bronchial asthma. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(4): 427-39. DOI: 10.18097/PBMC20156104427. (in Russian)
11. Hoffman S., Nolin J., McMillan D., Wouters E., Janssen-Heininger Y., Reynaert N. Thiol redox chemistry: role of protein cysteine oxidation and altered redox homeostasis in allergic inflammation and asthma. *J. Cell Biochem.* 2015; 116(6): 884-92. DOI: 10.1002/jcb.25017.
12. Li Y., Wongsiriroj N., Blaner W.S. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014; 3(3): 126-39. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04.
13. Berry D.C., Croniger C.M., Ghyselinck N.B., Noy N. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol. Cell. Biol.* 2012; 32(19): 3851-9. DOI: 10.1128/MCB.00775-12.
14. Schofield J.P.R., Burg D., Nicholas B., Strazzeri F., Brandsma J., Staykova D. et al. Stratification of asthma phenotypes by airway proteomic signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019; 144(1): 70-82. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.03.013.
15. Marquez H.A., Cardoso W.V. Vitamin A-retinoid signaling in pulmonary development and disease. *Mol. Cell Pediatr.* 2016; 3(1): 28. DOI: 10.1186/s40348-016-0054-6.
16. Huang Z., Liu Y., Qi G., Brand D., Zheng S.G. Role of Vitamin A in the Immune System. *J. Clin. Med.* 2018; (9)6: pii: E258. DOI: 10.3390/jcm7090258.
17. Kulkarni H.S., Liszewski M.K., Brody S.L., Atkinson J.P. The complement system in the airway epithelium: An overlooked host defense mechanism and therapeutic target? *J. Allergy Clin. Immunol.* 20 018; 141(5): 1582-1586.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.11.046.
18. Pandya P.H., Wilkes D.S. Complement system in lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2014; 51(4): 467-73. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0485TR.
19. Ermer D., Blom A.M. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol. Lett.* 2016; 169: 82-92. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.11.014.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ройтман А.П.¹, Седова Н.А.^{1,2}, Иванова Е.А.³, Годков М.А.^{1,4}

ЗНАЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ И ГОРМОНОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ОЦЕНКЕ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

¹ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия;

²ГБУЗ Консультативно-диагностический центр № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, 107564, Москва, Россия;

³ГБУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы, 125284, Москва, Россия;

⁴ГБУЗ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, 129010, Москва, Россия

Основными проявлениями метаболического синдрома (МС) являются нарушения углеводного, липидного обменов и их гормональной регуляции. Сочетанный характер метаболических нарушений может существенно влиять на течение и прогноз хронической сердечной недостаточности (ХСН) у пожилых людей с МС.

Цель работы – определение особенностей сочетанного определения метаболических лабораторных показателей и биологических активных факторов жировой ткани у больных с ХСН и метаболическим синдромом при различных вариантах течения заболевания.

Было проведено сравнение группы пациентов, имеющих ХСН, осложненную МС (n=37) и группы пациентов с ХСН без МС (n=37). Были исследованы показатели липидного обмена – холестерин (ХС) и липопротеины (ЛП), липидтранспортной системы (АпоА1 и АпоВ), лептин, адипонектин и резистин и их взаимные соотношения. Оказалось показательным отношение уровней АпоВ/АпоА1, которое составило у больных ХСН без МС 0,80±0,32, у больных ХСН с МС 1,12±0,46 (p<0,05). Выявлена значимая корреляционная связь соотношения уровней АпоВ/АпоА1 с абдоминальным ожирением (r=0,42, p<0,05), функциональным классом ХСН (r=0,463, p<0,05), уровнем ХС-ЛПНП (r=0,518, p<0,05), триглицеридами (r=0,476, p<0,05). Также, значимые результаты получены для отношения лептин/адипонектин. Для этого соотношения вывели 4 ранга в зависимости от величины отношения лептин (нг/мл)/адипонектин (мкг/мл): менее 1 – придавался ранг 0, при значениях отношения в диапазоне 1 – 3 – ранг 1, в диапазоне 3,1 – 6 – ранг 2, при превышении значения 6 – ранг 3. Из 22 пациентов, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, все в начале госпитализации имели ранг 0 или 1 отношения АпоВ/АпоА1.

Ранжирование значений отношений уровней АпоВ/АпоА1 и особенно лептин/адипонектин может позволить предположить вероятность успешного лечения ХСН или вероятность ухудшения состояния пациентов, вплоть до летального исхода.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность; метаболический синдром; липидный обмен; аполипопротеины; холестерин; липопротеины; лептин; адипонектин; резистин.

Для цитирования: Ройтман А.П., Седова Н.А., Иванова Е.А., Годков М.А. Значение лабораторных показателей липидтранспортной системы и гормонов жировой ткани в оценке течения хронической сердечной недостаточности у больных с метаболическим синдромом. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022; 67 (2): 85-90.

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-85-90>

Для корреспонденции: Ройтман Александр Польевич, д-р мед.наук, проф.; e-mail: a-roitman@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.11.2021

Принята к печати 10.01.2022

Опубликовано 23.02.2022

Roytman A.P.¹, Sedova N.A.^{1,2}, Ivanova E.A.³, Godkov M.A.^{1,4}

THE IMPORTANCE OF LABORATORY PARAMETERS OF THE LIPID TRANSPORT SYSTEM AND ADIPOSE TISSUE HORMONES IN ASSESSING THE COURSE OF CHRONIC HEART FAILURE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education «Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation», 125993, Moscow, Russia;

² State Budgetary Healthcare Institution «Consultative and Diagnostic Center No. 2 of the Moscow City Health Department», 107564, Moscow, Russia;

³ State Budgetary Healthcare Institution «S.P. Botkin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department», 125284, Moscow, Russia;

⁴ State Budgetary Healthcare Institution «N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine of the Moscow Department of Healthcare», 129010, Moscow, Russia

The main manifestations of metabolic syndrome (MS) are disorders of carbohydrate and lipid metabolism and their hormonal regulation. The combined nature of metabolic disorders can significantly affect the course and prognosis of CHF in elderly people with metabolic syndrome.

To determine the features of the combined effect of metabolic laboratory parameters and biological active factors of adipose tissue in patients with CHF and metabolic syndrome on the course of the disease. A comparison was made between a group of patients

with CHF complicated by MS ($n=37$) and a group of patients with CHF without MS ($n=37$). The parameters of lipid metabolism (cholesterol CH and lipoproteins LP), the lipid transport system (ApoA1 and ApoB), leptin, adiponectin and resistin and their mutual relations were studied.

The ratio of ApoB/ApoA1 levels was indicative, which was 0.80 ± 0.32 in patients with CHF without MS, and 1.12 ± 0.46 in patients with CHF with MS ($p < 0.05$). A significant correlation was found between the ratio of ApoB/ApoA1 levels and abdominal obesity ($r=0.42$, $p < 0.05$), functional class of CHF ($r=0.463$, $p < 0.05$), LDL-C level ($r=0.518$, $p < 0.05$), and triglycerides ($r=0.476$, $p < 0.05$). Also, significant results were obtained for the leptin/adiponectin ratio. For this ratio, 4 ranks were derived depending on the value of the leptin (ng/ml)/adiponectin (mcg/ml) ratio: less than 1 – rank 0 was assigned, with values of the ratio in the range 1 – 3 – rank 1, in the range 3.1 – 6 – rank 2, and above the value 6 – rank 3. Of the 22 patients who had improved CHF at the end of hospitalization, all at the beginning of hospitalization had a rank 0 or 1 ApoB/ApoA1 ratio.

Thus, ranking the values of the ratio of ApoB/ApoA1 levels, and especially leptin/adiponectin, can suggest the probability of successful treatment of CHF or the probability of deterioration of the patient's condition, up to a fatal outcome.

Key words: chronic heart failure; metabolic syndrome; lipid metabolism; apolipoproteins; cholesterol; lipoproteins; leptin; adiponectin; resistin.

For citation: Roytman A.P., Sedova N.A., Ivanova E.A., Godkov M.A. The importance of laboratory parameters of the lipid transport system and adipose tissue hormones in assessing the course of chronic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 85-90 (in Russ).

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-85-90>

For correspondence: Roytman A.P.; e-mail: a-roitman@mail.ru

Information about authors:

Roytman A.P., <https://orcid.org/0000-0003-2592-6857>;

Sedova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-4990-7733>;

Ivanova E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1336-7592>;

Godkov M.A., <https://orcid.org/0000-0001-9612-6705>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 23.11.2021

Accepted 10.01.2022

Published 23.02.2022

Введение. Основными проявлениями метаболического синдрома (МС) являются нарушения углеводного, липидного обменов и их гормональной регуляции. Сочетание нескольких компонентов – абдоминального ожирения (АО), инсулинорезистентности, гипергликемии, дислипидемии, обуславливает более быстрое развитие хронической сердечной недостаточности (ХСН) [9]. У людей старше 60 лет МС выявляется в 45% случаев; у больных с ХСН и МС отмечается более высокая смертность по сравнению с больными без МС [10]. Висцеральная жировая ткань и печень синтезируют и секретируют в кровоток биологически активные вещества (лептин, адипонектин, аполипопротеины), обладающие способностью вызывать метаболические сдвиги [1]. В то же время в основе лечения ХСН лежат воздействия на факторы, повреждающие миокард и активирующие нейрогуморальную систему [6]. Сочетанный характер метаболических нарушений может существенно влиять на течение и прогноз ХСН у пожилых людей с МС [7].

Клинические, функциональные и лабораторные исследования являются основой оценки тяжести ХСН и МС [11]. Лабораторными показателями, непосредственно определяющими МС, являются параметры липидного обмена – холестерин и липопротеины, липидтранспортной системы (аполипопротеины ApoA1 и ApoB), глюкоза, уровень которых во многом определяется гормонами висцеральной жировой ткани (лептин, адипонектин, резистин). Для оценки сочетанного определения метаболических лабораторных показателей и биологических активных факторов жировой ткани для прогноза клинических проявлений и степени тяжести ХСН с МС мы использовали метод ранжирования.

Цель работы – выявить особенности сочетанного определения метаболических лабораторных показате-

лей и биологических активных факторов жировой ткани у больных с ХСН и метаболическим синдромом для прогноза течения заболевания.

Материал и методы. Проанализировали 2 группы пациентов: 1-я группа – больные ХСН без МС (37 пациентов, возраст 77 ± 11 лет); 2-я группа – больные ХСН с МС (37 пациентов, возраст 71 ± 13 лет). Диагноз ХСН устанавливали согласно Национальным рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) и Общества специалистов по сердечной недостаточности (ОССН) по диагностике и лечению ХСН. Функциональный класс (ФК) ХСН оценивали по критериям NYHA (Нью-Йоркской Ассоциации Сердца). Диагноз МС устанавливался по критериям ВНОК от 2009 г. Критерии включения в 1-ю группу – доказанная ХСН (клиника, объективный осмотр, ЭхоКГ), отсутствие признаков МС. Критерии включения во 2-ю группу – доказанная ХСН, наличие АО (объем талии у мужчин >94 см, у женщин >80 см) и любых двух из следующих признаков: триглицериды (ТГ) $\geq 1,7$ ммоль/л; холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) у мужчин $<1,0$ ммоль/л, у женщин $<1,2$ ммоль/л; холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) $>3,0$ ммоль/л, артериальное давление (АД) $\geq 130/85$ мм рт. ст., глюкоза натощак $\geq 6,1$ ммоль/л, нарушение толерантности к глюкозе (глюкозо-толерантный тест $\geq 7,8$ ммоль/л и $\leq 11,1$ ммоль/л).

Из-за использования в период пребывания в клинике разных схем лечения анализировали уровни лабораторных маркеров при поступлении.

Определение показателей липидного обмена – общий холестерин (ОХС), ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, триглицериды (ТГ) в сыворотке крови проводили на биохимическом анализаторе KoneLab-20 (США) с использованием

диагностических наборов реактивов фирмы «ДиаСис» (Германия). Определение концентрации АпоА1 и АпоВ проводили методом нефелометрии с помощью диагностических наборов реагентов на анализаторе белков Turboх plus, производства Orion Diagnostika (Финляндия). Исследование индивидуальных белков и гормонов проводили после однократного размораживания сыворотки венозной крови, хранившейся при -20°C не более 6 месяцев. Определение концентрации лептина, адипонектина и резистина производили методом иммуноферментного анализа с использованием реагентов «HUMAN LEPTIN ELISA» («Diagnostic System Laboratories Inc.», США), «Human Adiponectin ELISA Kit» («B-Bridge International», Inc., США) «Human Resistin ELISA Kit» (BioVendor, Brno, Чехия). Результаты анализировали с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics version 23 и Microsoft Excel 2010. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде $M \pm m$ (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего).

Эхокардиографическое обследование. Оценивали толщину межжелудочковой перегородки (МЖП), задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ), массу миокарда левого желудочка (ММ ЛЖ), размер левого предсердия (ЛП) и сократимость миокарда левого и правого желудочков. Всем пациентам проводилось измерение толщины эпикардального жира (ТЭЖ) с помощью стандартной двухмерной ЭхоКГ. Толщину слоя эпикардального жира (ЭЖ) измеряли в конце систолы за свободной стенкой правого желудочка. Показатели, характеризующие гипертрофию миокарда левого желудочка, во 2-й группе достоверно превышали таковые в 1-й группе обследованных. Масса миокарда ЛЖ (ММ ЛЖ) у больных ХСН и МС составила 356 ± 15 г, у больных ХСН без МС – 240 ± 53 г ($p < 0,05$). Толщина МЖП во 2-й группе превышала таковую у больных 1-й группы (15 ± 3 и 12 ± 2 мм, соответственно, $p < 0,05$).

По данным ЭхоКГ-исследования, у больных обеих групп отмечалась дилатация левых отделов сердца, более выраженная у больных с МС. Фракция выброса ЛЖ у обследованных пациентов с клинически выраженной ХСН по данным УЗИ определялась как сохранная.

Толщина межжелудочковой перегородки у больных с МС была существенно больше, чем у пациентов ХСН без МС ($6,5 \pm 0,6$ и $4,3 \pm 0,9$ мм, соответственно, $p < 0,05$). У пациентов с ХСН и МС отмечена достоверная корреляционная связь ТЭЖ с лептином ($r = 0,36$, $p < 0,05$), МЖП ($r = 0,30$, $p < 0,05$), ЗСЛЖ ($r = 0,46$, $p < 0,05$), повышенным уровнем глюкозы натощак ($r = 0,58$, $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. В нашем наблюдении из 74 пациентов у 68 больных наблюдалась гипертоническая болезнь, СД 2 типа – у 24 человек. У всех больных при поступлении была одышка, в том числе у 14 – в покое. В клинике они получали стандартную терапию ХСН, включавшую ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, бета-адреноблокаторы, спиронолактон, калийсберегающие мочегонные препараты.

Среднее значение ИМТ соответствовало ожирению I степени – 31 ± 6 кг/м².

Артериальной гипертензией (АГ) страдали 33 человека (89%) 1 группы и все 37 человек (100%) во 2 группе; наличие сахарного диабета (СД) установлено у 4 (11%) в 1 группе и у 20 больных (54%) во 2 группе. Самыми частыми вариантами МС было сочетание абдоминаль-

ного ожирения (АО), артериальной гипертензии (АГ) и 1) сниженного уровня ЛПВП, повышенного уровня гликемии натощак (17 человек, 46%); 2) сниженного уровня ЛПВП (5 человек, 14%); 3) сниженного уровня ЛПВП, повышенного уровня гликемии натощак, повышенного уровня ЛПНП (3 человека, 8%). ХСН протекала тяжелее у больных с МС: ХСН II ФК диагностирована у 9 больных без МС и у 4 больных с МС; ХСН III ФК была у 28 больных без МС и 33 больных с МС. В исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН у 13 больных без МС и 9 больных с МС, без изменений ХСН осталась соответственно у 21 и 24 пациентов, летальный исход у 3 и 4, соответственно. Через 6 месяцев наблюдения у 15 больных без МС и у 16 с МС отмечалось клиническое ухудшение с нарастанием функционального класса ХСН. В течение 6 месяцев после госпитального периода умерло 5 пациентов без МС и 6 пациентов с МС.

Уровень показателей липидного обмена. Липидограмма в нашем исследовании включала определение ОХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, ТГ, традиционно рассматриваемых при исследованиях, связанных с метаболическими заболеваниями сердечно-сосудистой системы (ССС), объединенных в МС.

Показатели липидного метаболизма по средним показателям между группами существенно не отличались. В группе больных ХСН без МС ОХС был $4,15 \pm 0,23$ ммоль/л, ХС-ЛПНП – $2,38 \pm 0,14$ ммоль/л, ХС-ЛПВП – $0,80 \pm 0,04$ ммоль/л. У больных ХСН с МС уровень ОХС составил $4,03 \pm 0,21$ ммоль/л, ХС-ЛПНП – $2,55 \pm 0,16$ ммоль/л, ХС-ЛПВП – $0,74 \pm 0,05$ ммоль/л. Достоверные различия получены при определении ТГ (в 1-й группе – $1,06 \pm 0,06$ ммоль/л, во 2-й группе $1,42 \pm 0,12$ ммоль/л, $p < 0,05$). Системный анализ липидных показателей выявил достоверное увеличение уровня ХС-ЛПНП у больных III ФК ($2,84 \pm 0,22$ ммоль/л) по сравнению с больными ХСН II ФК ($2,34 \pm 0,11$ ммоль/л). Уровень ХС-ЛПВП был ниже, чем рекомендуемый ВНОК (ХС-ЛПВП $> 0,9$ ммоль/л), что интерпретируется как неблагоприятный фактор, способствующий коронарному атеросклерозу.

АпоА1 и АпоВ являются показателями липидтранспортной системы. АпоВ является маркером липопротеинов, обеспечивающих доставку холестерина периферийным органам и тканям (прямой транспорт). АпоА1 является маркером ЛПВП, обеспечивающим транспорт холестерина от тканей в печень (обратный транспорт) [4].

Средний уровень АпоА1 в 1-й группе составил $1,23 \pm 0,05$ г/л, во 2-й группе $1,51 \pm 0,28$ г/л ($p > 0,05$). Концентрация АпоА1 была меньше нижней границы референсных значений у больных 1-й группы в 30% наблюдений, у больных 2-й группы в 50% случаев. Достоверных различий содержания маркера у больных II и III ФК не выявлено. Наиболее низкие средние показатели АпоА1 отмечались у пациентов с летальным исходом в течение 6 месяцев наблюдения (1-я группа $1,50 \pm 0,07$, 2-я группа $0,91 \pm 0,20$ г/л).

Средние значения концентрации АпоВ у больных ХСН без МС составили $0,94 \pm 0,05$ г/л, у больных ХСН с МС $1,21 \pm 0,07$ г/л ($p > 0,05$). Уровень АпоВ у большинства больных в обеих группах находился в пределах референсных значений. У 5 больных 1-й группы и у 8 больных 2-й группы уровень АпоВ был повышен. Достоверных различий содержания АпоВ у больных с II и III ФК ХСН не установлено.

Более показательным было отношение уровней АпоВ/АпоА1, которое составило у больных ХСН без

МС $0,80 \pm 0,32$, у больных ХСН с МС $1,12 \pm 0,46$ ($p < 0,05$). Выявлена значимая корреляционная связь соотношения уровней АпоВ/АпоА1 с АО ($r=0,42$, $p < 0,05$), функциональным классом ХСН ($r=0,463$, $p < 0,05$), уровнем ХС-ЛПНП ($r=0,518$, $p < 0,05$), ТГ ($r=0,476$, $p < 0,05$).

Однако указать на практике вероятность клинических проявлений и степень тяжести ХСН на основании вышеперечисленных лабораторных показателей оказалось достаточно проблематично. Для практического использования мы применили ранжирование показателей, включая оценку сочетанного изменения метаболических лабораторных показателей. На рис. 1 представлены результаты ранжирования отношения АпоВ/АпоА1, при котором при значении АпоВ/АпоА1 менее 0,7 придавался ранг 0, при значениях отношения АпоВ/АпоА1 в диапазоне 0,7-0,9 ранг 1, в диапазоне 0,91- 1,1 – ранг 2, при превышении значения 1,1 соответственно ранг 3.

Среди больных ХСН, имевших для отношения АпоВ/АпоА1 ранг 0, было больше пациентов без МС, чем с МС (20 и 13, соответственно), тогда как у больных с рангом 3 больше было больных с МС. Из 22 пациентов, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, все в начале госпитализации имели ранг 0 или 1 отношения АпоВ/АпоА1.

Лабораторные маркеры активации жировой ткани. Висцеральная жировая ткань синтезирует и секретирует в кровотоке биологически активные вещества, обладающие способностью вызывать сдвиги углеводного и липидного метаболизма.

Лептин относится к адипокинам – гормонам жировой ткани. Ожирение связано со снижением чувствительности тканей к лептину. Лептинорезистентность, в сочетании с повышенной концентрацией в плазме триглицеридов, способствует отложению жирных кислот в мышцах, миокарде и усилению неокислительного пути метаболизма жирных кислот, влекущих за собой нарушение обмена глюкозы [3]. За референсный диапазон лептина, измеренный иммуноферментным методом, принят интервал 5-10 нг/мл. Средний уровень лептина составил в группе больных ХН без МС $23,4 \pm 5,4$ нг/мл, в группе больных ХСН с МС $69,5 \pm 13,8$ нг/мл ($p < 0,01$). В группе ХСН без МС у 15 из 37 больных уровень лептина не превышал референсных значений, большинство показателей находились в диапазоне 10-30 нг/мл. Среди больных ХСН с МС показатели лептина в 11 наблюде-

ниях были выше 70 нг/мл, в 7 – более 100 нг/мл. У больных III ФК ХСН показатели лептина почти в два раза превышали таковые у пациентов II ФК ($52,8 \pm 10,2$ нг/мл и $28,0 \pm 6,2$ нг/мл, соответственно, $p < 0,01$). У больных ХСН и МС, умерших в течение 6 мес., средний уровень лептина был в диапазоне 75,5-91,1 нг/мл.

Адипонектин – практически единственный защитный фактор, уменьшающий инсулинорезистентность как в жировой ткани, так и в печени, и в мышцах. У людей с висцеральным ожирением более низкий уровень адипонектина связан с МС, эндокринными и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Низкий уровень адипонектина это независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Референсный диапазон адипонектина 0,5–30 мкг/мл. У больных ХСН без МС содержание адипонектина составило $20,6 \pm 1,4$ мкг/мл, у больных ХСН с МС $13,0 \pm 1,3$ мкг/мл, различия были достоверными ($p < 0,01$).

У пациентов II ФК ХСН и значения адипонектина достоверно превышали уровни в группе больных III ФК ХСН ($18,4 \pm 2,8$ и $12,9 \pm 2,6$, соответственно, $p < 0,05$). У больных ХСН и МС, умерших в течение 6 месяцев наблюдения, уровень адипонектина был в пределах 7,53-17,12 мкг/мл, у пациентов, проживших этот период – 11,87-35,4 мкг/мл.

Резистин синтезируется жировой тканью и относится к классу богатых цистеином белков – резистиноподобных молекул и рассматривается как прогностический маркер развития и неблагоприятного течения ССЗ. У здоровых людей содержание резистина в плазме крови варьирует от 7,3 до 21,3 нг/мл [2]. У больных ХСН без МС содержание резистина составило $9,4 \pm 1,2$ нг/мл, у больных ХСН с МС $11,5 \pm 1,3$ мкг/мл, достоверных различий не выявлено. Уровень резистина, превышающий референсный диапазон, определен у 1 больного 1-й группы и 3 больных 2-й группы (в каждой по 37 пациентов).

Корреляционные связи. Получены значимые результаты по корреляции апобелков и показателей липидного метаболизма. В группе ХСН без МС (1 группа) не выявлено значимых корреляционных связей между отношением АпоВ/АпоА1, тогда как в группе ХСН с МС выявлены тесные корреляционные связи между, с одной стороны, АпоВ/АпоА1 и, с другой стороны, уровнем ОХС ($r=0,53$, $p < 0,01$), ХС-ЛПНП ($r=0,52$, $p < 0,01$), ТГ ($r=0,69$, $p < 0,01$). В этой группе выявлена корреляционная связь между АпоВ/АпоА1 и выраженностью АО ($r=0,42$, $p < 0,01$). Во всей исследованной совокупности выявлены положительные корреляционные связи между, с одной стороны, АпоВ/АпоА1 и, с другой стороны, уровнем ОХС ($r=0,33$, $p < 0,01$), ХС-ЛПНП ($r=0,45$, $p < 0,01$), ТГ ($r=0,61$, $p < 0,01$), лептином ($r=0,28$, $p=0,03$), и отрицательная корреляционная связь между отношением АпоВ/АпоА1 и ХС-ЛПВП.

Среди пациентов с ХСН и МС между параметром, отражающим транспорт ХС в организме, и содержанием липидов в системе циркуляции, включая ОХС, ХС-ЛПНП и ТГ, сформирована взаимозависимость, в то время как у пациентов с ХСН без МС такой достоверно выраженной зависимости не проявляется.

У больных МС и ХСН установлены прямые корреляционные связи лептина с антропометрическими показателями. Коэффициент корреляции между лептином и ТЭЖ составлял суммарно по обеим группам $r=0,54$ ($p < 0,05$) и отдельно у больных ХСН без МС (1 группа)

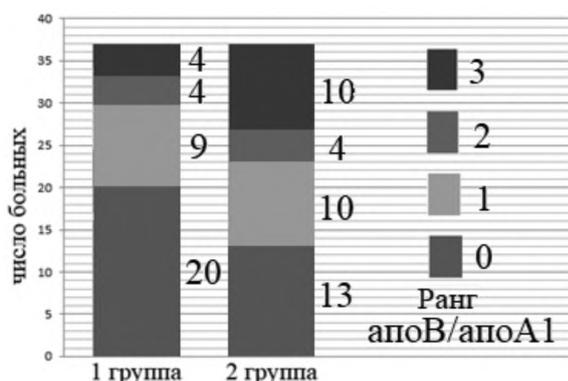


Рис. 1. Распределение больных ХСН без МС (1-я группа) и ХСН с МС (2-я группа) в зависимости от уровня рангов, присвоенных отношению АпоВ/АпоА1.

$r=0,49$ ($p=0,04$), и больных ХСН с МС (2 группа) $r=0,36$ ($p=0,04$). В группе больных ХСН с МС выявлены достоверные корреляционные связи лептина с массой миокарда ЛЖ ($r=0,68$, $p<0,05$), толщиной межжелудочковой перегородки ($r=0,42$, $p<0,05$), задней стенкой левого желудочка ($r=0,54$, $p<0,05$). Обратная достоверная корреляционная связь имела место в группе больных ХСН с МС лептина с адипонектином ($r=-0,44$, $p<0,01$).

Ранжирование показателей гормональной активности жировой ткани провели как по отдельным гормонам (лептин, адипонектин, резистин), так и по разным сочетаниям гормонов. Наиболее значимые результаты получены для отношения лептин/адипонектин (рис.2). Для этого соотношения вывели 4 ранга в зависимости от величины отношения лептин (нг/мл)/адипонектин (мкг/мл): менее 1 – придавался ранг 0, при значениях отношения в диапазоне 1 – 3 ранг – ранг 1, в диапазоне 3,1 – 6 – ранг 2, при превышении значения 6 – соответственно ранг 3.

Большинство пациентов с ХСН без МС имели нулевой ранг отношения лептин/адипонектин, только 3 из 37 пациентов попали в группы с рангом 2-3. В то же время больше половины (22 из 37) пациентов с ХСН и МС распределились в группы с рангом 2-3. При сопоставлении значений рангов отношения лептин/адипонектин и клинических исходов ХСН выявили, что из 22 пациентов, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, 18 пациентов имели нулевой ранг, 4 имели ранг 1. Из 8 пациентов с ХСН без МС, умерших в период госпитализации или в течение 6 месяцев после госпитализации, все имели ранги 1-3; из 10 умерших больных ХСН с МС все имели ранг 2-3 отношения лептин/адипонектин.

В нашем исследовании сделана попытка сопоставить уровень лабораторных показателей и клинические исходы. Мы ограничились представлением лабораторных показателей, полученных при поступлении больных в стационар. В период пребывания в клинике применялись различные схемы лечения, включая назначение ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, бета-адреноблокаторов, калийсберегающих диуретиков, при этом учесть ятрогенные влияния не представлялось возможным. Для применения метода ранжирования результатов в группу больных ХСН без МС и с МС включили одинаковое количество пациентов. Для отнесения в группу с МС использовали критерии ВНОК, при этом основным признаком наличия МС служило обнаружение АО [8].

Показатели липидного метаболизма у больных ХСН в обеих группах практически не выходили за рекомендуемые ВНОК диапазоны для пациентов с ССЗ и существенно не отличались в исследуемых группах. Этот результат объясняется повышением требовательности к образу жизни и питанию у больных с появлением признаков ССЗ (гипертензия, одышка, нарушения мозгового кровообращения и инфаркты в анамнезе).

В качестве более значимых показателей нарушения липидного метаболизма рассматриваются апобелки структуры липопротеинов. АпоВ – маркер липидтранспортной системы, направленной на доставку холестерина периферийным клеткам (атерогенный эффект), АпоА1 – маркер обратного транспорта холестерина из периферических органов в печень (антиатерогенное действие). Средний уровень апобелков в группах был в пределах референсных значений: АпоВ только у 13 из

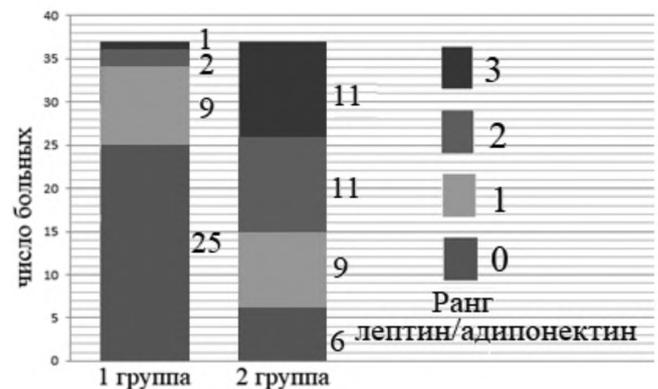


Рис. 2. Распределение больных ХСН без МС (1-я группа) и ХСН с МС (2-я группа) в зависимости от уровня рангов, присвоенных отношению лептин/адипонектин.

74 больных был выше референсных значений; уровень АпоА1 был ниже референсных значений менее, чем у половины пациентов, не обнаружено различий содержания маркера у больных II и III ФК. В то же время ранжирование отношения уровней АпоВ/АпоА1 позволило выявить определенную закономерность: чем выше ранг отношения уровней АпоВ/АпоА, тем меньше пациентов, у которых в исходе госпитализации достигнуто улучшение ХСН, больше пациентов с МС.

Уровень гормонов для прогностических целей можно оценивать с 2-х позиций: первая – гормональные сдвиги, которые вызывают изменения метаболизма и, соответственно, показателей липидного и углеводного метаболизма; вторая – гормональная реакция, которая направлена на нормализацию основных метаболических показателей. В последнем случае изменения концентрации гормонов могут быть более показательными, чем показатели изменения содержания субстратов. По-видимому, уровень гормонов висцеральной жировой ткани меняется у больных ХСН для компенсации метаболических сдвигов.

В результате самым значимым выявленным изменением у больных ХСН было увеличение уровня лептина. Лептин координирует многие нейроэндокринные процессы человека в соответствии с его энергетическими запасами. В нашем исследовании выявлены значимые изменения уровня лептина; средние значения у больных ХСН были выше референсных значений, особенно в группе ХСН с МС и у больных III ФК ХСН. Соответственно, самые высокие уровни концентрации лептина были среди больных ХСН и МС, умерших в течение 6 месяцев. Уровень адипонектина среди больных ХСН был в пределах референсных значений, но он был достоверно ниже у больных с МС, чем без МС, и ниже в группе больных III ФК ХСН, чем в группе II ФК ХСН. Существенных изменений концентрации резистина не выявлено. Резистин принадлежит к семейству цистеинсодержащих доменовых белков, вовлеченных в процессы воспаления. По-видимому, в исследуемой группе больных ХСН воспалительная реакция не была доминирующей. Наиболее выразительными были расхождение рангов отношения уровней лептин/адипонектин. У 34 из 37 пациентов с ХСН без МС имелся нулевой ранг отношения лептин/адипонектин, тогда как больше половины пациентов с ХСН и МС имели ранги 2-3. Такое

распределение не было неожиданным, если учесть, что при ожирении уровень лептина повышается у подавляющего числа тучных людей, и у больных сахарным диабетом 2 типа развивается резистентность к лептину. В нашем наблюдении было установлено, что большинство больных с ХСН, умерших в период госпитализации или в течение 6 месяцев после лечения в стационаре, имели ранг отношения уровней лептин/адипонектин 2-3, а больные, у которых в результате лечения в стационаре достигнуто улучшение ХСН, имели низкий (0-1) ранг этого отношения.

Выводы:

1. У больных ХСН, отягощение МС проявляется более высоким функциональным классом ХСН, большим значением отношения уровней АпоВ/АпоА1 и существенным повышением концентрации лептина и меньшим содержанием адипонектина.

2. Ранжирование значений отношений уровней АпоВ/АпоА1 и особенно лептин/адипонектин, может позволить предположить вероятность успешного лечения ХСН или вероятность ухудшения состояния пациентов, вплоть до летального исхода.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 9-11 см. REFERENCES)

1. Вербовой А.Ф., Митрошина Е.В. Адипокины и сердечно-сосудистая система. *Эндокринология. Новости, мнения, обучение*. 2014; 2 (7): 11-7.
2. Вербовой А.Ф., Цанова И.А., Вербовая Н.И., Галкин Р.А. Резистин – маркер сердечно-сосудистых заболеваний. *Ожирение и метаболизм*. 2017; 14 (4): 5-9.
3. Драпкина О.М., Шепель Р.Н., Деева Т.А. Оценка уровня лептина в плазме крови у пациентов с метаболическим синдромом и ишемической болезнью сердца. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2016; 15 (3): 43-8.
4. Кадомцева Л.В., Зуфаров А.А., Поликарпова Н.В. Аполипопротеины В и А1 – как маркеры риска развития сердечно – сосудистых заболеваний. *Вестник экстренной медицины*. 2019; 12 (5): 67-70.
5. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Т. 1. Долгов В.В., Меньшиков В.В., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.

6. Клинические рекомендации. Российское кардиологическое общество. Хроническая сердечная недостаточность. Москва; 2020.
7. Нестеров В.С., Урванцева И.А., Воробьев А.С. Хроническая сердечная недостаточность: современные проблемы и пути их решения. *Лечащий врач*. 2018; 7: 11-4.
8. Соснова Е.А. Метаболический синдром. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2016; 3 (4): 172-80.

REFERENCES

1. Verbovoy A.F., Mitroshina E.V. Adipokines and the cardiovascular system. *Endokrinologiya. Novosti, mneniya, obuchenie*. 2014; 2 (7): 11-7. (in Russian)
2. Verbovoy A.F. Canava I.A., Verbovaya N.I., Galkin R.A. Resistin – a marker of cardiovascular diseases. *Ozhirenie i metabolism*. 2017; 14 (4): 5-9. (in Russian)
3. Drapkina O.M., Shepel' R.N., Deeva T.A. Evaluation of the level of leptin in blood plasma in patients with metabolic syndrome and coronary heart disease / *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2016; 15 (3): 43-8. (in Russian)
4. Kadomtseva L.V., Zufarov A.A., Polikarpova N.V. Apolipoproteins B and A1 – as markers of cardiovascular disease risk. *Vestnik ekstremnoy meditsiny*, 2019; 12 (5): 67-70. (in Russian)
5. Clinical laboratory diagnostics. National leadership. Vol. 1 [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Natsional'noe rukovodstvo]. Dolgov V.V., Men'shikov V.V., eds. Moscow: Geotar-Media; 2013. (in Russian)
6. Clinical recommendations. Russian Society of Cardiology. Chronic heart failure. Moscow; 2020. (in Russian)
7. Nesterov V.S., Urvantseva I.A., Vorob'ev A.S. Chronic heart failure: current problems and ways to solve them. *Lechashiy vrach*. 2018; 7: 11-4. (in Russian)
8. Sosnova E.A. Metabolic syndrome. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegireva*. 2016; 3 (4): 172-80. (in Russian)
9. Perrone-Filardi P., Paolillo S., Costanzo P., Savarese G., Trimarco B., Bonow R. The role of metabolic syndrome in heart failure. *European Heart Journal*. 2015; 36 (39): 2630-4.
10. Purwowiyoto S.L., Prawara A.S. Metabolic syndrome and heart failure: mechanism and management. *Medicine and Pharmacy Reports*. 2021; 94 (1): 15-21.
11. Rochlani Y., Pothineni N.V., Kovelamudi S., Mehta J. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2017; 8 (11): 215-25.

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

О КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ D-ДИМЕРА В КРОВИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

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

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

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

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

Представлены результаты разработки технологии количественного определения D-димера (продукта деградации фибрина) в крови с использованием набора реагентов «ИХА-D-димер», основанного на принципе иммунохроматографического анализа (ИХА), с инструментальным учётом результатов. Регистрация и обработка оцифрованного с помощью программного обеспечения к ИХ-анализатору показателя интенсивности окрашивания тест-полосы, позволяет количественно измерять содержание D-димера в пробе (в нг DDU/мл).

Эффективность предложенного подхода оценена на 258 клинических образцах, исследованных методом ИХА с визуальным и приборным учётом результатов, в сравнении с иммуноферментным анализом. Показана высокая воспроизводимость оцифрованных результатов ИХА. Коэффициент вариации (CV) для образцов с содержанием D-димера в диапазоне 100-300 нг DDU/мл (околопороговом по отношению к патологическим значениям) составлял 2,5-5,1%; прослежена тенденция к увеличению CV при дальнейшем росте концентрации D-димера. Установлена высокая корреляция оцифрованного результата ИХА с данными, полученными методом ИФА, что позволяет рекомендовать изучаемый вариант исследования к широкому использованию в ургентной медицине.

Ключевые слова: иммунохроматография; иммуноферментный анализ; D-димер; диагностика; тромбоз.

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А. О количественном определении содержания D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 91-96. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-91-96>

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» за оказанную помощь в организации и выполнении исследований.

Поступила 22.10.2021

Принята к печати 26.01.2022

Опубликовано 23.02.2022

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

ABOUT QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE D-DIMER IN THE BLOOD BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHOD

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

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

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

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

The paper presents the results of the development of a technology for the quantitative determination of D-dimer in blood with an immunochromatographic (LFIA) kit of reagents «LFIA-D-dimer» and instrument accounting of the results. Registration and processing of the digitized indicator of the intensity of staining of the LFIA-test strip using the LFIA-analyzer software allows quantifying the D-dimer content in the sample (in ng DDU/ml).

The effectiveness of the proposed approach was evaluated on 258 clinical samples examined in the LFIA with visual and instrument accounting of the results, in comparison with the indicators of D-dimer determination in ELISA. The high reproducibility of the digitized LFIA results was shown – the coefficient of variation (CV) for samples in the range of 100-300 ng DDU/ml (near-threshold in relation to pathological values) was 2.5-5.1%; a tendency to increase CV with a further increase in the concentration of D-dimer was traced. A high correlation of the digitized LFIA result with the research data in the ELISA has been established, which makes it possible to recommend the technology for widespread use in urgent medicine.

Key words: immunochromatographic assay; enzyme-linked immunosorbent assay; D-dimer diagnostics; thrombosis.

For citation: Akinshina Yu. A., Mardany S. G., Rotanov S. V., Pomazanov V. V., Kiseleva V. A. About quantitative determination of the D-dimer in the blood by immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 91-96 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-91-96>

For correspondence: Akinshina Yulia 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>;
Mardany 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>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.10.2021

Accepted 26.01.2022

Published 23.02.2022

Введение. Определение D-димера в крови является одним из информативных лабораторных показателей, характеризующих развитие тромботических состояний. В клинической практике этот маркер указывает на появление гиперкоагуляции в сосудистом русле и неразрывно связанный с этим процесс активации эндогенного фибринолиза [1-3]. В обычных условиях между процессами свертывания крови и деградации фибрина устанавливается динамическое равновесие, но при ряде патологических состояний происходит сдвиг системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции. К факторам, повышающим риск развития венозных тромбозов, относят: пожилой возраст пациентов, наличие сопутствующих заболеваний, сопровождающихся нарушением гемостаза (злокачественные опухоли, варикозная болезнь, тромбоз флебит, нарушения обмена липидов), состояния после ортопедических операций (эндопротезирование крупных суставов, реконструктивные вмешательства при переломах трубчатых костей), приём оральных контрацептивов, беременность, длительную гиподинамию [4].

Образование тромба происходит при участии тромбина, который превращает фибриноген в нерастворимый фибрин, формирующий основной каркас тромба. Процесс происходит в несколько стадий, в результате формируется полимер, в котором молекулы фибриногена соединяются «конец в конец» и образуются поперечные D=D связи. Через определённое время происходит активация плазмина – основного фермента фибринолиза, который последовательно расщепляет фибрин на фрагменты, обозначаемые как продукты деградации сгустка фибрина: D-димеры и тримеры D-E-D, поскольку он не способен расщеплять ковалентную связь между D-доменами. При повышенном фибринолизе плазмин также способен расщеплять и молекулы фибриногена, однако в этом случае образуются отдельные фрагменты D и E [4-6].

У здоровых людей концентрация D-димера в крови не превышает 500 нг ФЭЕ (фибриноген-эквивалентных единиц)/мл или 250 нг DDU (D-dimer unit)/мл. Избыток его в крови свидетельствует об активном фибринолизе сгустка нерастворимого фибрина, его концентрация зависит от размера и длительности существования тромба. Повышение уровня D-димера в плазме наблюдается примерно через 2 ч после начала тромбоза [7]; он метаболизируется, в основном, в почках. Время полужизни D-димера в кровотоке, по данным ряда исследователей, при сохранной функции почек составляет около 6-8 ч, и они оценивают этот маркер как ранний динамичный показатель венозного тромбоза [6, 7]. Другие исследовате-

ли обращают внимание на его длительную циркуляцию в крови (до 24 ч и более) и возможность выявления повышенной концентрации в течение нескольких недель после острого тромбоза [8]. Все перечисленное способствует активному использованию тестов определения D-димера в качестве предикторов осложнений, связанных с венозным тромбозом.

На фоне эпидемии новой коронавирусной инфекции появилось большое количество научных сообщений о тромботических осложнениях COVID-19 и необходимости быстрой диагностики возникающих urgentных состояний, в том числе с определением уровня D-димера в крови [9-12]. Эксперты Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) полагают, что повышение уровня D-димера в 3-4 раза и более, у пациента с COVID-19 является предиктором летального исхода и достаточным показанием для госпитализации [13].

Для определения уровня D-димера применяют три метода: турбидиметрический (микроратексная агглютинация), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографию (ИХ) [4, 5, 8].

Технология микроратексной агглютинации с фотометрической регистрацией (иммунотурбидиметрия) заключается в том, что при добавлении плазмы пациента (содержащей D-димер) к реагенту (взвесь микроратексных частиц, покрытых антителами к D-димеру) происходит микроагглютинация, сопровождающаяся увеличением оптической плотности (ОП) реакционной среды. Измеряемый показатель ОП пропорционален концентрации D-димера в исследуемом образце. Иммунотурбидиметрический метод реализован на базе автоматических биохимических анализаторов.

Наиболее чувствительным методом определения D-димера является ИФА (позволяет определять до 60 нг DDU/мл). Исследование методом ИФА достаточно длительно по времени исполнения и проводится в клинико-диагностической лаборатории с серией образцов.

Имунохроматографический анализ (ИХА) относится к высокотехнологичным методам, позволяющим определять D-димер вне лабораторных условий в течение 15-20 минут. Это делает ИХА незаменимым при большом спектре исследуемых показателей (антигены возбудителей инфекционных заболеваний и антитела к ним, молекулярные маркеры воспалительных процессов, онкозаболеваний, гормональные нарушения и др.). Исследования с применением ИХА позволяют на ранней стадии обнаруживать нарушение свертывания крови и осуществлять динамическое наблюдение за показателями.

ИХ-определение D-димера характеризуется скоростью проведения анализа и высокой чувствительностью. Оперативность получения результатов лабораторных исследований необходима при тяжёлых тромботических осложнениях, когда концентрация D-димера может существенно изменяться в течение одного часа. От точности и своевременности результатов проведенного определения зависят меры предупреждения возможных осложнений. Все перечисленное явилось основанием для разработки и организации производства оригинальных ИХ-наборов реагентов, позволяющих качественно определять D-димер выше определённого установленного порогового значения в режиме реального времени [14-17]. Однако клиницистам необходимы технологии и количественного определения уровня D-димера в крови доступными экспресс-методами.

Цель исследования – изучение возможности и оценка клинической эффективности количественного определения уровня D-димера в крови человека на основе технологии ИХА при инструментальной оценке результатов на стрипах с помощью портативного анализатора.

Материал и методы. Использованы экспериментально-производственные серии ИХ набора реагентов «ИХА-Д-димер» (РУ №РЗН 2019/8987 от 07.10.2019), разработанные и изготовленные ЗАО ЭКОлаб (г. Электрогорск Московской обл.) по технологии, описанной ранее [14-17]. При создании наборов применены моноклональные антитела мыши (клон DD2 – ко всей молекуле D-димера, ООО «Хайтест», Москва), для тестовой зоны – козы антитела к IgG мыши («Имтек», Москва). При подборе концентраций антител с целью обеспечения необходимой чувствительности теста (400 нг ФЭЕ/мл или 200 нг DDU)/мл использован рекомбинантный D-димер с аттестованной концентрацией (ООО «Хайтест», Москва), содержащий иммунодоминантную последовательность.

Исследование уровня D-димера в плазме крови ИХ-методом проводили при комнатной температуре. В лунки для образцов на тест-кассетах последовательно вносили по 1 капле (40 мкл) пробы (плазмы крови) и 1 капле буферного раствора (0,05М Трис-буфер с 0,1% БСА; pH=7,2). Тестирование каждого образца выполняли на новой тест-кассете. Результат качественного анализа учитывали визуально через 10 мин после внесения пробы. Результаты исследования с образованием двух хорошо различимых полос розового или слабого розового цвета в контрольной и тестовой зонах реакционной полоски оценивали как положительные (при содержании D-димера выше 400 нг ФЭЕ/мл или 200 нг DDU/мл.). Отрицательные результаты анализа фиксировали при появлении только одной окрашенной полосы в контрольной зоне (при уровне D-димера менее 400 нг ФЭЕ/мл или 200 нг DDU/мл.). При отсутствии формирования окрашенной полосы в зоне контроля результат определения считали недействительным, и исследование соответствующей пробы проводили повторно [15, 16].

Инструментальную оценку интенсивности окрашивания реакционных полос в тестовой и контрольной зонах на стрипах «ИХА-Д-димер» осуществляли с помощью портативного ИХ-анализатора модели «IGLOO Reader» (фирма Experiment X Germany GmbH, Germany); в настоящее время прибор проходит регистрационные испытания в Российской Федерации. Принцип действия заключается в оценке интенсивности окрашивания тестовой и контрольной полос ИХ-стрипа. Результат каж-

дого измерения анализатор передавал на персональный компьютер, где с применением программного обеспечения «DXCare» и «DXStudio», разработанного создателями ИХ-анализатора, оцифрованное значение интенсивности окраски, сопоставлялось с калибровочным графиком и отображалось на экране в условных единицах оптической плотности (усл.ед.опт.пл.) и в нг DDU/мл.

Для количественного определения D-димера в стандартных образцах предприятия (СОП-259) ЗАО «ЭКОлаб» и при исследовании клинических образцов использовали ИФА-набор реагентов для определения D-димера в плазме крови российского производителя, разрешённого к применению в РФ (РУ №РЗН 2019/8716 от 06.08.2019). Этот набор обеспечивает выполнение одностадийного «сэндвич» варианта твёрдофазного ИФА; минимальная определяемая концентрация D-димера – 10 нг DDU/мл. В наборе используются калибраторы на основе очищенного нативного D-димера. В соответствии с инструкцией интерпретация полученных результатов осуществляется на основании данных, полученных при клинической апробации этого набора реагентов. Так, у 80% здоровых доноров концентрация D-димера в плазме крови варьировала в диапазоне 0-250 нг DDU/мл, у 97% здоровых доноров – 0-285 нг DDU/мл. На этом основании в инструкции к набору реагентов определение уровня D-димера более 285 нг DDU/мл рекомендовано относить к положительным результатам исследования (содержание D-димера выше нормы), концентрацию менее 250 нг DDU/мл – к отрицательным (содержание D-димера не повышено); результаты определения в диапазоне 250-285 нг DDU/мл – оценивать как неопределённые [16].

Сравнительные испытания качественного и количественного определения D-димера в плазме крови человека с использованием технологии ИХА с визуальным и инструментальным учётом результатов исследования проведены со стандартными образцами предприятия (СОП-259) ЗАО «ЭКОлаб» и клиническими пробами плазмы крови людей.

Все исследования проводили согласно инструкциям, прилагаемым к соответствующим наборам реагентов, анализатору и программному обеспечению.

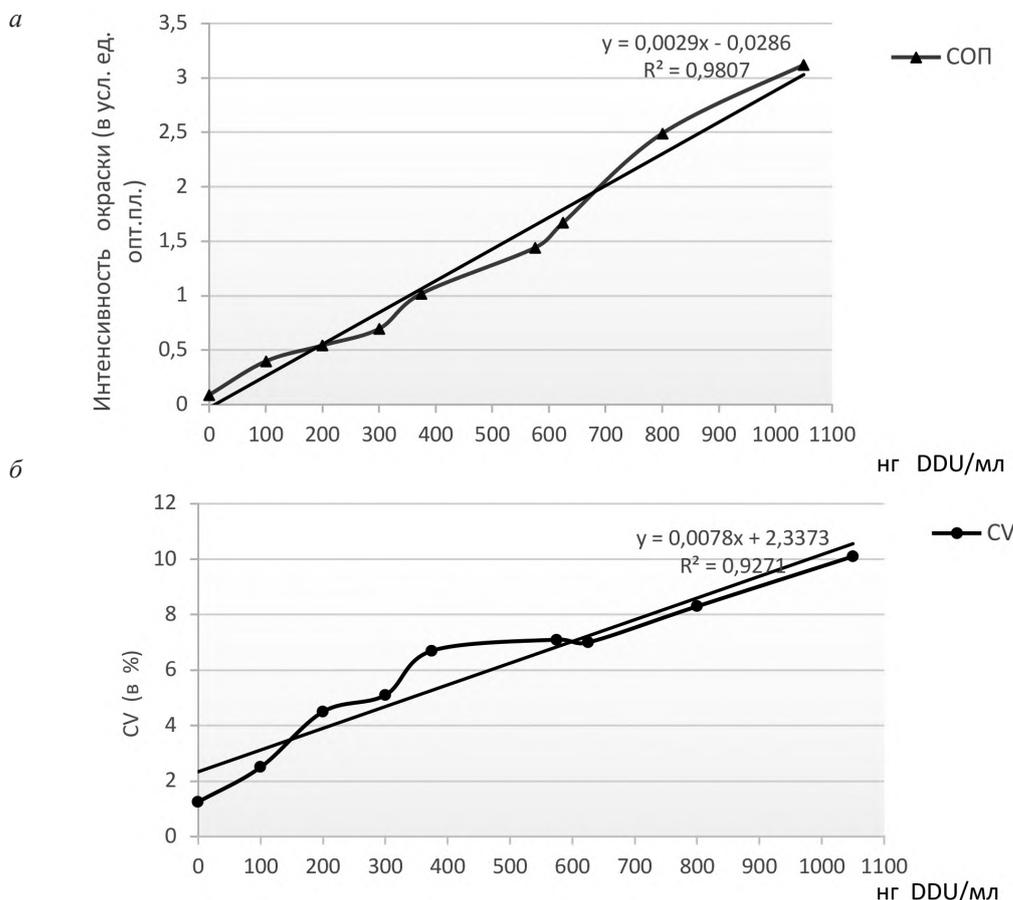
Стандартные образцы предприятия ЗАО «ЭКОлаб» представляли собой 9 пулов стабилизированной консервированной плазмы крови человека с разными уровнями D-димера, количественно аттестованные в ИФА (табл. 1).

Клиническими образцами служили пробы плазмы крови 106 здоровых доноров (мужчин и женщин от 18 до 60 лет), полученные из диагностического центра «EiClinic» (г. Электрогорск), и 152 пациентов с повышенным содержанием D-димера (мужчин и женщин в возрасте старше 60 лет), проходивших лабораторное диагностическое обследование в медицинских учреждениях Люберецкого района. Все клинические образцы получали при пункции локтевой вены пациентов в день обращения и сборе крови в вакутейнеры с ЭДТА в качестве стабилизатора. После центрифугирования пробирок (в режиме 1500 об/мин в течение 5 мин) плазму крови в объеме 1,5 – 2,0 мл из пробирок отбирали в эппендорфы, которые сохраняли при температуре минус 18°C до начала проведения исследования.

Результаты. Построение калибровочной кривой для количественного определения D-димера в плазме крови методом ИХА проведено по результатам измерений СОП-259 (n=9). Каждый образец СОП-259, предварительно аттестованный по содержанию D-димера в количе-

Аттестованные значения содержания D-димера в СОП-259

Образцы СОП-259	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Содержание D-димера (нг DDU/мл, по данным ИФА)	0	108	212	305	375	577	625	823	1054
Среднее значение оптической плотности в ИФА, ед.опт.пл.	0,090	0,102	0,431	0,612	0,802	1,120	2,321	3,281	3,489
Интенсивность окраски в ИХА, усл.ед.опт.пл.	0,158	0,398	0,544	0,696	1,24	1,44	1,67	2,49	3,12



Калибровочная кривая определения D-димера в образцах СОП-259 методом ИХА с инструментальной оценкой результата на анализаторе (а) и график вариации ошибки измерения (CV) в зависимости от концентрации D-димера в пробе (б).

ственном ИФА, исследован в ИХА в 4 повторях. Средние значения интенсивности окраски реакционных зон тест-полосок, измеренные на ИХ-анализаторе в усл.ед.опт.пл, и значения содержания D-димера в нг DDU/мл применены для построения калибровочного графика с использованием программы «DXSafe» (см. рисунок, а, б).

При изучении калибровочного графика (см. рисунок, а) установлена прямая пропорциональная зависимость концентрации D-димера в пробе, выраженная в нг DDU/мл и оцифрованного значения интенсивности окраски тест-полоски на ИХ-стрипе в усл.ед.опт.пл. ($R=0,9807$). Установлено, что визуально определяемая окраска тестовой линии на ИХ-стрипе начинала проявляться при исследовании СОП-259 №3 (аттестованного в 212 нг DDU/мл), что соответствует общепринятому пороговому уровню D-димера, выше которого содержание этого анализа считается патологически повышенным.

В интересующем нас околопороговом диапазоне содержания D-димера и соответствующей интенсивности окраски тест-полоски в ИХА (200 ± 100 нг DDU/мл) ко-

эффициенты вариации (CV) результатов 4-х повторных измерений были наименьшими: при исследовании СОП-259 № 2 (108 нг DDU/мл) CV составлял 2,5%, для СОП-259 № 3 (212 нг DDU/мл) – 4,5%, для СОП-259 № 4 (305 нг DDU/мл) – 5,1% (см. рисунок, б). Прослеживается тенденция к увеличению величины CV с увеличением концентрации D-димера в пробе ($R=0,9271$). Максимальный CV – 10,1% наблюдали при исследовании СОП-259 №9 (1054 нг DDU/мл).

Несмотря на установленную тенденцию к повышению вариативного отклонения аналитического измерения, величина CV не превышала значения 12-15%, что рекомендовано в качестве предельных величин в регламентирующих документах Минздрава России по контролю качества клинических лабораторных исследований для большинства биохимических исследований [18, 19]. В диапазоне значений 200-800 нг DDU/мл коэффициент вариации (CV) варьировал в пределах 4,5-8,3%, что позволяет обеспечивать достаточно высокую воспроизводимость результатов измерений.

Исследование 106 образцов плазмы крови здоровых доноров в ИХА с визуальным учётом результата не выявило формирования окрашенной тестовой полосы, что свидетельствовало об отсутствии в этих пробах повышенного содержания D-димера. При измерении результатов исследований на этих же тест-кассетах с помощью портативного анализатора «IGLOO Reader», аналитический результат варьировал в интервале от 0,120 до 0,432 усл.ед.опт.пл. или 0-198 нг DDU/мл, что показало необходимую клиническую специфичность использованного набора «ИХА-D-димер». По результатам последующего исследования этих проб в ИФА содержание D-димера составляло 0-201 нг DDU/мл. Расхождение значений, полученных разными методами, составляло $\pm 0-8$ нг DDU/мл.

При исследовании 152 образцов, полученных от лиц старше 60 лет, в ИХА визуально наблюдали 60 слабоположительных результатов (в виде светлой окрашенной полосы бледно-розового цвета, слабее линии контроля) и 96 положительных результатов (с образованием полосы более интенсивного розового цвета), что указывало на повышенное (более 200 нг DDU/мл) содержание в них D-димера.

Применение ИХ-анализатора для измерения интенсивности окраски тест-полос, отражающей количество D-димера в исследованных пробах плазмы крови людей этой группы, установило широкий разброс показателей: от 0,551 до 5,69 усл.ед.опт.пл. или от 220 до 1023 нг DDU/мл, соответственно. Полученные показатели также были сопоставлены с результатами определения D-димера методом ИФА (табл. 2).

Проведённый анализ данных позволил установить, что определяемый визуальный сигнал (в виде слабой полосы светло-розового цвета) детектировался, начиная с концентрации аналита 220 нг DDU/мл в пробе, что соответствовало 0,551 усл.ед.опт.пл., измеренным с помощью ИХ-анализатора. Последующее нарастание величины оцифрованного прибором сигнала в зависимости от увеличения интенсивности окраски тест-полос (что отражает увеличение концентрации D-димера в пробе) происходило неравномерно. Для выявления зависимости величины оцифрованного показателя интенсивности окраски ИХ-тест-полоски (и содержания D-димера, рассчитанного программой «DXStudio» по результатам калибровки) и результатов определения D-димера в

ИФА все данные, полученные с клиническими образцами этой группы, были дополнительно разделены на 7 подгрупп (с интервалом в 100 нг DDU/мл): 201-300, 301-400, 401-500 нг DDU/мл и так далее (табл. 2).

Установлено, что в первых 4-х подгруппах с содержанием D-димера от 220 до 600 нг DDU/мл (по данным ИФА) оцифрованный сигнал, измеренный анализатором (от 0,450 до 1,180 усл.ед.опт.пл.), возрастал на 0,2-0,3 усл.ед.опт.пл. на каждые 100 нг DDU/мл, что соответствует прямой пропорциональной зависимости сопоставляемых показателей.

При более высоких концентрациях D-димера в следующих 3-х подгруппах (от 601 до 1008 нг DDU/мл соответственно) увеличение измеренного сигнала окраски тест-полосок происходило на 2-3 усл.ед.опт.пл. на каждые 100 нг DDU/мл. По нашему мнению, это свидетельствовало об отклонении измеряемых показателей от прямой пропорциональной зависимости при высоком содержании D-димера в пробах.

Обсуждение. Ввиду высокого отрицательного предиктивного значения определения повышенного содержания D-димера в крови обследуемых пациентов, рекомендуется более широко использовать иммунохроматографический метод исследования на тест-полосках с целью раннего выявления нарушений свертывания крови и внутрисосудистого формирования тромбов. Целесообразность использования ИХА наборов реагентов диктуется значительной экономией времени врача для принятия клинического решения. Исследование на ИХ-стрипах выполняется в режиме "point of care" (по месту нахождения пациента) и занимает около 10-15 минут. В то же время ИФА выполняется в клинической лаборатории по мере формирования значительной аналитической серии клинических проб и осуществляется в течение 2-2,5 часов. Дополнительное время расходуется на доставку клинических образцов в лабораторию и предоставление полученных результатов исследования.

Применение набора реагентов «ИХА-D-димер» показало достаточно высокую точность и воспроизводимость результатов выполняемых диагностических исследований и возможность использования его не только для качественного определения (нормального или повышенного содержания), но и количественного исследования уровня D-димера.

Таблица 2

Содержание D-димера в клинических образцах, измеренное в ИХА (с визуальным и инструментальным учётом результатов) и в ИФА

Количество исследованных образцов	Исследование в ИХА с визуальным учётом (отрицательный / положительный)	Исследование в ИХА с измерением на ИХ-анализаторе		Концентрация D-димера по данным ИФА (нг DDU/мл)
		усл.ед.опт.пл.	нг DDU/мл	
Здоровые доноры (n=106)				
Всего 106	отрицательный	0,120-0,432	0-198	0-201
Пациенты в возрасте старше 60 лет (n=152)				
51	слабоположительный	0,450-0,606	205-287	220-292
9	слабоположительный	0,545-0,885	309-389	311-395
23	положительный	0,754-0,998	406-506	404-513
34	положительный	0,965-1,180	520-597	516-600
10	положительный	2,580-3,180	611-712	610-685
17	положительный	2,150-5,690	720-811	723-791
8	положительный	3,010-5,220	886-1023	866-1008
Всего 152	слабоположительный и положительный	0,450-5,690	205-1023	220-1008

Для количественной характеристики содержания D-димера, особенно на этапах первичного медицинского обследования или в процессе динамического наблюдения за пациентами, показано измерение результата ИХА на тест-кассетах «ИХА-D-димер» с помощью портативных ИХ-анализаторов (например: модели «IGLOO Reader» или других с прилагаемым к этим измерительным средствам программным обеспечением).

Полученные в работе результаты позволили рекомендовать использование кассет набора «ИХА-D-димер» с инструментальной оценкой результата на автоматическом анализаторе для исследования клинических образцов со слабоположительными и положительными результатами, где показания прибора в интервале 0,450-1,180 усл.ед.опт.пл. наиболее точно отражают патологически увеличенную концентрацию D-димера в пробе (от 200 до 600 нг DDU /мл); средняя ошибка измерения в этом интервале составляла 2,2-10,5%. Инструментальная оценка результатов ИХ-исследования относительно простая в исполнении и доступна для внедрения в медицинских организациях.

В случаях более высокой концентрации D-димера в крови – 601-1000 нг DDU/мл, средняя ошибка результата измерения, по отношению к результатам ИФА, может составлять 7-10%, при еще более высоких концентрациях – 22-34%. При выявлении высоких показателей содержания этого анализатора в крови необходимо подтверждение полученного экспресс-результата путём направления пробы крови в клиническую лабораторию для последующего исследования D-димера методом ИФА.

Использование набора реагентов «ИХА-D-димер» обеспечивает быстрое определение нормального и повышенного уровня D-димера в крови. Это помогает своевременно диагностировать или исключить развитие тромбоза у больного, в случае необходимости незамедлительно приступить к антикоагулянтной терапии, что может значительно снизить частоту развития осложнений и летальных случаев.

Заключение. Полученные результаты позволяют рекомендовать ИХА набор реагентов «ИХА-D-димер», исходно разработанный для качественного исследования, для применения с целью количественного определения D-димера в крови при инструментальном учёте результатов. Назначение качественного набора реагентов будет расширено в соответствии с обновленной нормативной документацией и проведением необходимых регистрационных процедур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильманов А.Ж. D-димер: Что? Как? У кого? С какой целью? *Клинико-лабораторный консилиум*. 2009; 31(6): 38-46.
2. Савельев В. С., Чазов Е. И., Гусев Е. И. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозомболических осложнений. *Флебология*. 2010; 4(2): 1-37.
3. Гриневич Т.Н. Венозные тромбозы в травматологии и ортопедии: трудности диагностики. *Новости хирургии*. 2010; 18 (1): 124-32.
4. Орадова А.Ш., Турсынова С.К., Канжигалина З.К., Касенова Р.К. Исследование D-димера в клинико-диагностической лаборатории. *Вестник Казахского национального университета*. 2014; 2 (2): 279-81.
5. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Берковский А.Л., Маркова М. Л. D-димер – диагностический и прогностический маркер тромботических заболеваний. *Медицинский совет*. 2020; 1: 256-66.
6. Соловьева И. В. D-димер: клиническое значение для пожилых пациентов. *Консилиум. Лабораторная диагностика*. 2017; 8 (158): 28-9.

7. Шайкенова Л.Б. Методы лабораторного исследования D-димера. *Вестник Казахского национального университета*. 2013; 1(4): 304-5.
8. Галстян Г.М. Коагулопатия при COVID-19. *Пульмонология*. 2020; 30 (5): 645-57.
9. Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Нишакова Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С. Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 536-40.
10. Акиншина Ю.А., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. *Электроторск*; 2019; 1: 10-4.
11. Акиншина Ю.А., Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (11): 654-8.
12. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдонина А.С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГОУ ВО «ГТТУ»; 2017.
13. Приказ Минздрава России № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
14. Приказ Минздрава России № 220 от 26.05.2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

REFERENCES

1. Gil'manov A.Zh. D-Dimer: What? How? From whom? For what purpose? *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2009; 31(6): 38-6. (in Russian)
2. Savel'ev V.S., Chazov E. I., Gusev E. I. Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications. *Flebologiya*. 2010; 4(2): 1-37. (in Russian)
3. Grinevich T.N. Venous thrombosis in traumatology and orthopedics: diagnostic difficulties. *Novosti khirurgii*. 2010; 18 (1): 124-32. (in Russian)
4. Oradova A.Sh., Tursynova S.K., Kanzhigalina Z.K., Kasenova R.K. D-dimer study in the clinical diagnostic laboratory. *Vestnik Kazhskogo natsional'nogo universiteta*. 2014; 2 (2): 279-81. (in Russian)
5. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Berkovsky A.L., Markova M.L. D-dimer – diagnostic and prognostic marker of thrombotic diseases. *Meditsinskiy sovet*. 2020; 1: 256-66. (in Russian)
6. Solov'yova I.V. D-dimer: clinical significance for elderly patients. *Consilium. Laboratornaya diagnostika*. 2017; 8 (158): 28-9. (in Russian)
7. Shaikenova L.B. Methods of laboratory investigation of D-dimer. *Vestnik Kazhskogo natsional'nogo universiteta*. 2013; 1(4): 304-5. (in Russian)
8. Galstyan G.M. Coagulopathy in COVID-19. *Pulmonologiya*. 2020; 30 (5): 645-57. (in Russian)
9. Nikitina A.V., Akinshina Ju.A., Nishhakova N.E., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test to detect hidden blood in feces. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (9): 536-40. (in Russian)
10. Akinshina Yu. A., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer. In: Prospects for the introduction of innovative technologies in medicine and pharmacy. Collection of materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation [Sbornik materialov VI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]. *Elektrogorsk*; 2019; 1: 10-4. (in Russian)
11. Akinshina Yu. A., Nikitina A. V., Amelina E. A., Mardanly S. G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (11): 654-8. (in Russian)
12. 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)
13. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 45 from 07.02.2000 “About the system of measures to improve the quality of clinical laboratory research in healthcare institutions of the Russian Federation”. (in Russian)
14. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 220 from 26.05.2003 “On the approval of the industry standard “Rules for in-laboratory quality control of quantitative methods of laboratory research using control materials”. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Борзова Н.Ю., Раджабова Н.Р., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Малышкина А.И.

НОВЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН С УГРОЖАЮЩИМИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

На основании исследования содержания и функциональной активности CD8⁺ T-клеток памяти в субпопуляции цитотоксических T-лимфоцитов определить новый критерий прогнозирования исхода беременности у женщин с угрожающими преждевременными родами. Обследованы 56 женщин с угрожающими преждевременными родами (УПР) в сроке 22-34 нед беременности, которые вошли в основную группу. В зависимости от исхода беременности были выделены 2 подгруппы пациенток: в 1 подгруппу вошли 22 женщины, у которых беременность завершилась преждевременными родами; во 2-ю – 34 женщины со своевременными родами. Контрольную группу составили 56 женщин без признаков угрозы прерывания беременности на момент обследования и родившие своевременно. Методом проточной цитофлуориметрии в периферической венозной крови в субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов определяли содержание Tcm, Tem и Temra клеток. Содержание CD8⁺клеток, продуцирующих GranzymeB, оценивали в субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов (CD8⁺GrB⁺), а также в пуле Tcm, Tem, Temra клеток. Статистический анализ осуществлялся в программах «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3». Для пациенток с угрозой преждевременных родов было характерно достоверное повышение относительного содержания CD8⁺ T-лимфоцитов в периферической крови по сравнению с группой контроля ($p=0,001$). При сравнении данного показателя в подгруппах женщин с угрозой преждевременных родов установлено, что преждевременные роды ассоциировались с достоверно более высокими показателями относительного содержания CD8⁺ лимфоцитов ($p=0,03$) по сравнению с показателями подгруппы женщин, родивших в срок. При проведении оценки полученных результатов установлено, что в группе пациенток с угрожающими преждевременными родами, чья беременность завершилась преждевременными родами, процентное содержание CD8⁺Temra GranzymeB-продуцирующих клеток было достоверно ниже, чем в группе женщин родивших своевременно ($p=0,003$). Содержание Tcm, Tem клеток памяти, продуцирующих GranzymeB, в подгруппах женщин с исходом беременности своевременные и преждевременные роды не имело достоверных различий по сравнению с группой контроля. Таким образом, прогнозирование преждевременных родов возможно при значении GranzymeB-продуцирующих CD8⁺Temra равно 8,2% и менее (чувствительность – 87,9%, специфичность – 85%, точность – 87,9%). Выявление нового критерия позволит своевременно прогнозировать преждевременные роды и способствовать выбору оптимальной тактики ведения беременности, обоснованному проведению профилактики респираторного дистресс-синдрома плода и перевода женщины в акушерский стационар, предназначенный для оказания высокотехнологической помощи недоношенным новорожденным.

Ключевые слова: преждевременные роды; функциональная активность T-лимфоцитов; адаптивный иммунитет; цитотоксичность.

Для цитирования: Борзова Н.Ю., Раджабова Н.Р., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Малышкина А.И. Новый прогностический критерий исхода беременности у пациенток с угрожающими преждевременными родами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 97-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-97-100>

Для корреспонденции: Раджабова Наида Рустамовна, аспирант каф. акушерства и гинекологии, неонатологии, анестезиологии и реаниматологии; e-mail: nailaradjabova@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.08.2021

Принята к печати 25.12.2021

Опубликовано 23.02.2022

Borzova N. Yu., Radjabova N. R., Sotnikova N. Yu., Kudryashova A. V., Malysheva A. I.

NEW PROGNOSTIC CRITERIA FOR PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH THREATENED PREMATURE LABOR

Ivanovo Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov of the Russian Ministry of health, Ivanovo, Russia

To identify new criteria for predicting the outcome of pregnancy in women with threatened preterm labor based on the establishment of the characteristics of differentiation and functional activity of memory T-cells in the population of CD8⁺ T-lymphocytes. The study involved 56 women with threatened preterm labor at 22-34 weeks of pregnancy. Depending on the outcome of pregnancy, patients were divided into 3 groups: Group I included 22 women by premature labor; group II – 34 women whose pregnancy ended by deliver at term. By tricolor flow cytometry method the content of peripheral Tn, Tcm, Tem and Temra cells in CD8⁺ population was studied. Statistical analysis was carried out using programs «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3».

Patients with the threat of preterm birth were characterized by a significant increase in the relative content of CD8⁺ T-lymphocytes in the peripheral blood compared to the control group ($p=0,001$). When comparing this indicator in the subgroups of women with the threat of preterm birth, it was found that preterm birth was associated with significantly higher relative CD8⁺ lymphocyte counts ($p=0,03$) compared to the indicators of the subgroup of women who gave birth on time. When evaluating the results obtained, it was found that the percentage of CD8⁺Temra GranzymeB-producing cells in the group of patients with threatened preterm birth, whose pregnancy ended in preterm birth, was significantly lower than in the group of women who gave birth on time ($p=0,003$). The content of Tcm, Tem memory cells producing GranzymeB in the subgroups of women with pregnancy outcomes

of timely and preterm birth did not have significant differences compared to the control group. Thus, the prediction of preterm birth is possible with a value of GranzymeB-producing CD8 + Tem equal to 8.2% or less (sensitivity-87.9%, specificity-85%, accuracy-87.9%).

Thus, the identification of a new criterion will make it possible to predict preterm birth in a timely manner and promote the choice of optimal pregnancy management tactics, reasonable prevention of fetal respiratory distress syndrome and transfer of a woman to an obstetric hospital designed to provide high-tech care to premature newborns.

Key words: *preterm labor; differentiation of T cells; adaptive immunity; cytotoxicity.*

For citation: Borzova N. Yu., Radjabova N.R., Sotnikova N. Yu., Kudryashova A.V., Malyshkina A.I. New prognostic criterion for the outcome of pregnancy in patients with threatening preterm birth. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 97-100 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-97-100>

For correspondence: *Rajabova Naila Rustamovna*, post-graduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Resuscitation; e-mail: nailaradjabova@yandex.ru

Information about authors:

Borzova N. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-2247-3963>;

Radjabova N.R., <https://orcid.org/0000-0002-0726-1655>;

Sotnikova N. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>;

Kudryashova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-8501-1029>;

Malyshkina A.I., <https://orcid.org/0000-0002-1145-0563>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 27.08.2021

Accepted 25.12.2021

Published 23.02.2022

Введение. Преждевременные роды (ПР) — одна из значимых проблем в охране здоровья матери и ребенка, в настоящее время не имеющая тенденции к снижению [1]. По данным ВОЗ, ежегодно 15 млн детей рождаются преждевременно.

В течение последних лет были достигнуты значительные успехи в выхаживании недоношенных новорожденных, однако, преждевременные роды до сих пор обуславливают преобладающую часть всей перинатальной смертности: являются причиной неонатальной смертности в 70%, младенческой смертности в 36% и отдаленных неврологических последствий у детей в 25-50% случаев.[2]. Преждевременные роды являются «большим акушерским синдромом», характеризующимся множеством этиопатогенетических факторов. По данным литературы, важную роль в патогенезе преждевременных родов играют хронические воспалительные процессы [3]. Наряду с этим, причиной угрожающих преждевременных родов может быть и асептическое воспаление, связанное с неадекватной активацией Т-клеток на антигены плода. [4]. Эти данные позволяют предположить, что при преждевременных родах происходит избыточная стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Однако характер их функциональной активности при преждевременных родах недостаточно изучен.

Цель исследования: на основании исследования содержания и функциональной активности CD8+ Т-клеток памяти в субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) определить новый критерий прогнозирования исхода беременности у женщин с угрожающими преждевременными родами.

Материал и методы. На базе акушерской клиники ФГБОУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ были отобраны и обследованы 56 женщин с угрожающими преждевременными родами (УПР) на момент исследования (О47.0 по МКБ-10) в сроках 22-34 недель беременности, которую вошли в основную группу. Локальный этический комитет одобрил проведение данного исследования.

На участие в исследовании от каждой женщины было получено письменное информированное согласие. Путем ретроспективного анализа в зависимости от исхода беременности было выделено 2 подгруппы пациенток: в 1-ю подгруппу вошли 22 женщины, у которых беременность завершилась преждевременными родами (О60.0 по МКБ-10); во 2-ю подгруппу – 34 женщины со своевременными родами (О80.0 по МКБ-10). Контрольную группу составили 59 пациенток без признаков угрожающих преждевременных родов на момент обследования и родившие своевременно. Материалом для исследования служила венозная кровь из кубитальной вены. В субпопуляции ЦТЛ определяли содержание центральных клеток памяти – Tcm (CD45RA⁺CD62L⁺), претерминально-дифференцированных – Tem (CD45RA⁺CD62L⁻) и терминально-дифференцированных – Temra (CD45RA⁺CD62L⁻) клеток на проточном цитофлуориметре FACSCantoII в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США) методом проточной цитофлуориметрии. В работе использовали моноклональные антитела производства eBioscience (США). Исследовали содержание клеток, продуцирующих GranzymeB, в общем пуле CD8+ лимфоцитов (CD8+GrB+), а так же в пулах CD8+ Tcm (CD45RA-CD62L+GrB+), Tem (CD45RA-CD62L-GrB+), Temra (CD45RA+CD62L-GrB+).

Статистический анализ полученных результатов проводился после проверки рядов на нормальность распределения – по критериям Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка, по общепринятым методам вариационной статистики. Данные представлены в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m), статистическая значимость показателей в группах определялась по t-критерию Стьюдента и считали статистически значимой при уровне $p < 0,05$. Поиск точки разделения расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ). Статистический анализ осуществлялся с использованием пакетов прикладных лицензионных программ программам «Statistica for Windows 13.0», «Microsoft Excel 2019» и «MedCalc 19.3».

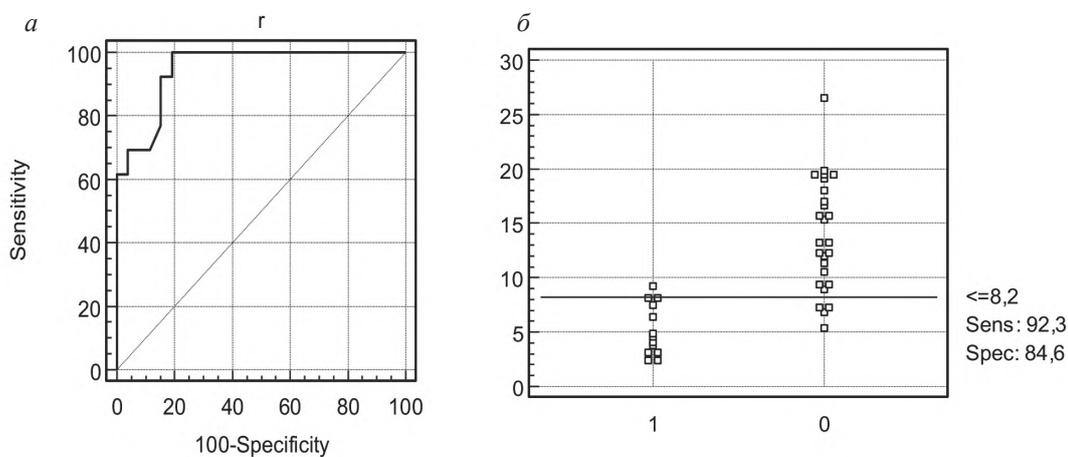
Результаты. Проведенный анализ полученных результатов показал, что для пациенток с угрозой преждевременных родов было характерно достоверное повышение относительного содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической венозной крови по сравнению с группой контроля (31,59±0,96 и 26,3±0,55; $p=0,001$). При сравнении данного показателя в подгруппах женщин с УИР установлено, что преждевременные роды ассоциировались с достоверно более высокими показателями относительного содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов ($p=0,03$) по сравнению с показателями подгруппы женщин, родивших в срок. Сравнительный анализ процентного содержания Tcm, Tem, Temra клеток, продуцирующих Granzyme B, в популяции CD8⁺ лимфоцитов представлен в таблице. Установлено, что у женщин с исходом беременности преждевременными родами отмечалось снижение содержания GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток, по сравнению с группой женщин родивших своевременно, а так же по сравнению с группой контроля ($p=0,003$ и $p=0,006$, соответственно). Статистически значимых различий в содержании CD8⁺ Tcm и CD8⁺ Tem клеток, продуцирующих Granzyme B между показателями 1 и 2 подгруппы выявлено не было ($p>0,05$ во всех случаях). Сравнительный анализ относительного содержания CD8⁺ Tcm, CD8⁺ Tem и CD8⁺ Temra клеток, продуцирующих Granzyme B, в подгруппе женщин с исходом беременности своевременными родами и

контролем, показал, что достоверных различий в группах нет ($p>0,05$ во всех случаях).

В результате исследования были получены данные, позволившие разработать прогностический критерий преждевременных родов у женщин с угрозой прерывания беременности в сроках 22-34 недель на момент исследования. С этой целью был проведен ROC-анализ в сравниваемых группах, который позволил выявить пограничные значения исследуемого критерия, классифицировать истинно положительные и истинно отрицательные результаты, определить чувствительность и специфичность прогностической модели. Количественную интерпретацию ROC-анализа даёт показатель AUC (area under ROC curve) – площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных значений.

По нашим данным, при относительном содержании GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток в популяции CD8⁺ лимфоцитов, равном 8,2% или менее, прогнозируют преждевременные роды. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,956 (см. рисунок).

По экспертной шкале значения показателей AUC в интервале 0,9–1,0 свидетельствуют об «отличном» качестве критерия, что определило его высокий уровень чувствительности 92%, специфичности 85% и точности 87,9% [6].



ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания GranzymeB-продуцирующих CD8⁺ Temra в периферической венозной крови у женщин с исходом беременности своевременными родами (0) и преждевременными родами (1). *a* – показатель относительного содержания GranzymeB-продуцирующих CD8⁺ Temra; *b* – относительный показатель GranzymeB-продуцирующих CD8⁺ Temra в периферической венозной крови у женщин контрольной группы (0) и преждевременными родами (1).

Сравнительный анализ процентного содержания GranzymeB-продуцирующих Tcm, Tem, Temra клеток в популяции CD8⁺ лимфоцитов, %

Показатели	Основная группа(УИР), n=56		Контроль, n = 59
	1 подгруппа (преждевременные роды), n = 22	2 подгруппа (своевременные роды), n = 34	
CD45RA-CD62L+GrB+ (Tcm)	3,83±0,91	2,77±0,56	2,39±0,33
CD45RA-CD62L-GrB+ (Tem)	7,69±2,3	7,54±1,0	10,1±1,1
CD45RA+CD62L-GrB+ (Temra)	6,75±0,8 $p_1=0,006$ $p_2=0,003$	11,6±1,1	11,91±1,7

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости по сравнению с контролем; p_2 – уровень статистической значимости между 1 и 2 подгруппами.

Обсуждение. Можно предположить, что отмеченная нами избыточная стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов является одним из патогенетических механизмов угрожающих преждевременных родов. Однако, характер изменений в функциональном состоянии цитотоксических Т-лимфоцитов имеет значительные различия и зависит от степени выраженности патологического процесса. Беременность женщин, имевших достоверно более низкие показатели относительного содержания GranzymeB-продуцирующих терминально-дифференцированных клеток (GrB+CD62L-CD45RA+) в популяции CD8+ лимфоцитов при поступлении в стационар, несмотря на проводимую сохраняющую терапию, завершилась преждевременно. Традиционно считается, что CD8+Т-лимфоциты являются субпопуляцией Т-лимфоцитов, обладающей высокой цитотоксической активностью, что имеет чрезвычайное значение в условиях инвазии полуаллогенных плодовых клеток в эндометрий при беременности. Ранее было показано, что у женщин с привычным выкидышем и угрозой невынашивания на момент обследования в 5-10 недель в периферической крови повышен уровень GranzymeB-продуцирующих клеток в популяции терминально-дифференцированных CD8+ лимфоцитов, независимо от последующего исхода беременности (самопроизвольный выкидыш, преждевременные и своевременные роды) [5]. Выявленное нами снижение содержания эффекторных GranzymeB-продуцирующих клеток CD8+ лимфоцитов в периферической крови при угрожающих преждевременных родах может быть обусловлено их миграцией в зону плацентации [6]. В работе M.Arenas-Hernandez и соавт. [7] отмечалось повышение уровня терминально-дифференцированных GranzymeB-продуцирующих CD8+ клеток на границе «мать-плод» (в базальной децидуальной оболочке) при спонтанных преждевременных родах. Одной из причин данного явления может быть субклинический хориоамнионит, который является важным фактором развития преждевременных родов и характеризуется инфильтрацией материнских CD8+ Т-клеток в хориоамниотические мембраны [6,7]. Эти цитотоксические Т-клетки могут индуцировать апоптоз трофобласта и повреждать плодовые структуры, что может вести к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов, которые не только усиливают родовую активность, но и ведут к активации клеток врожденного иммунитета, принимающих непосредственное участие в развязывании родовой деятельности. В настоящее время считается, что хронические воспалительные поражения плаценты представляют собой материнское антифетальное отторжение, и этот процесс может быть связан с развитием новой формы синдрома системного воспалительного ответа плода, характеризующегося повышением уровня хемокина для Т-клеток плазмы плода (CXCL10) [8, 9].

Заключение. Таким образом, выявление нового критерия позволит своевременно прогнозировать преждевременные роды и способствовать выбору оптимальной тактики ведения беременности, обоснованному проведению профилактики респираторного дистресс-синдрома плода и перевода женщины в акушерский стационар, предназначенный для оказания высокотехнологической помощи недоношенным новорожденным.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 7–9 см. REFERENCES)

1. Информационный бюллетень ВОЗ «Новорожденные: снижение смертности» 19.11.2019 г.
3. Ходжаева З.С., Шмаков Р.Г., Адамян Л.В., Артымук Н.В., Башмакова Н.В., Беженарь В.Ф. и др. Преждевременные роды. Клинические рекомендации. М.; 2020.
5. Иваненкова, Н. И., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю. Дифференцировка периферических т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности. *Медицинская иммунология*. 2015; 17: 267.
6. Борзова Н.Ю., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Раджабова Н.Р. Способ прогнозирования исхода беременности при угрожающих преждевременных родах. Патент РФ № 2741500; 2021.

REFERENCES

1. WHO Newsletter “Newborns: reducing mortality”. 19 September 2019.
2. Davey M.A., Watson L., Rayner J.A., Rowlands S. Risk scoring systems for predicting preterm birth with the aim of reducing associated adverse outcomes. *Cochrane database Syst. Rev.* 2011; 9:11.
3. Khodzhayeva Z.S., Shmakov R.G., Adamyan L.V. et al., eds. Clinical recommendations. Premature birth. Moscow; 2020. (in Russian)
4. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13:23–33.
5. Ivanenkova N. I., Borzova, N. Yu. Sotnikova N. Yu. Differentiation of peripheral t-helper cells and cytotoxic T-lymphocytes in women with habitual miscarriage, depending on the outcome of pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya* . 2015; 17:267. (in Russian)
6. Borzova N. Yu., Malyshkina A. I., Sotnikova N. Yu., Kudryashova A.V., Radzhabova N. R. A method for predicting the outcome of pregnancy in threatened premature birth. Patent RF No. 2741500; 2021.
7. Arenas-Hernandez M., Romero R., Xu Y, Panaitescu B, Garcia-Flores V, Miller D. et al. Effector and activated T cells induce preterm labor and birth that is prevented by treatment with progesterone. *The Journal of Immunology* 2019; 202.9: 2585-2608.
8. Labarrere CA, Hardin JW, Haas DM, Kassab GS. Chronic villitis of unknown etiology and massive chronic intervillitis have similar immune cell composition. *Placenta*. 2015; 36(6): 681-6.
9. Romero R., Chaemsaihong P., Chaiyasit N., Docheva N., Dong Z., Kim C. J. et al. CXCL10 and IL-6: Markers of two different forms of intra-amniotic inflammation in preterm labor. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 2017; 78(1):e12685.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Куцевалова О. Ю.¹, Козель Ю. Ю.¹, Алавердян А. И.², Гусак Д. А.³

АНАЛИЗ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ИНФЕКЦИЙ КРОВОТОКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ЮНОНА® LABSTAR 100

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава РФ, 105064, Москва, Россия

Проведён анализ спектра возбудителей инфекции кровотока с помощью автоматического бактериологического анализатора ЮНОНА® Labstar 100 (Китай). Приоритетными патогенами инфекций крови являются грамотрицательные бактерии 62,3% случаев. Грамположительные бактерии встречаются в 32,1% случаев инфекций крови. Грибы рода Candida, как самые распространённые возбудители инвазивных микозов по частоте встречаемости не превышает 3,7% инфекций крови. Obligatные анаэробные бактерии выделяются из крови в 1,9% случаев. Исследование крови с помощью автоматического анализатора ЮНОНА® Labstar 100 позволяет расширить видовой спектр возбудителей и сократить время выдачи результатов. Все испытанные коммерческие питательные среды к автоматическому анализатору ЮНОНА® Labstar 100 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., Китай) соответствуют заявленным требованиям.

Ключевые слова: инфекции; сепсис; диагностика; возбудители.

Для цитирования: Куцевалова О.Ю., Козель Ю.Ю., Алавердян А.И., Гусак Д.А. Анализ этиологии структуры инфекций кровотока с использованием автоматического бактериологического анализатора Юнона® Labstar. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 101-105. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105>

Для корреспонденции: Куцевалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, зав. лаб. клинической микробиологии; e-mail: Olga_kutsevalova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ООО «МедикаГрупп».

Поступила 27.12.2021

Принята к печати 14.01.2022

Опубликовано 23.02.2022

Kutsevalova O.Yu¹, Kozel Yu.Yu¹, Alaverdyan A.P.², Gusak D.A³

ANALYSIS OF THE ETIOLOGY OF THE ATRUCTURE OF BLOODSTREAM INFECTIONS USING THE AUTOMATIC BACTERIOLOGICAL ANALYZER YUNON® LABSTAR

¹National Medical Research Centre for Oncology, 344037, Rostov-on-Don, Russia;

²Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A. I. Evdokimov, 127473, Moscow, Russia;

³Helmholtz National Medical Research Center for Eye Diseases, 105064, Moscow, Russia

The analysis of the etiology of pathogens of blood flow was carried out using an automatic bacteriological analyzer YUNONA® Labstar 100. In the etiology of blood infections, the most common pathogens are gram-negative bacteria 62.3%. Gram-positive pathogens are much less common – 32.1%. Yeast fungi of the genus Candida, as the most common causative agents of invasive mycoses, in terms of frequency of occurrence is not higher than 3.7%. Anaerobic bacteria – 1.9%. A blood test using the automatic analyzer JUNONA® Labstar 100 allows you to expand the species spectrum of pathogens and reduce the time for issuing results. All tested commercial culture media for the automatic analyzer YUNONA® Labstar 100 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., China)

Key words: infections; sepsis; diagnostics; pathogens.

For citation: Kutsevalova O.Yu., Kozel Yu.Yu., Alaverdyan A.I., Gusak D.A. Analysis of the etiology of the structure of bloodstream infections using the automatic bacteriological analyzer Yunon® Labstar. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 101-105 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105>

For correspondence: Kutsevalova Olga Yurievna Ph.D., Head of the Laboratory of Clinical Microbiology; e-mail: Olga_kutsevalova@mail.ru

Information about authors:

Kutsevalova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7452-6994>;

Kozel Yu.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6681-3253>;

Alaverdyan A.I., <https://orcid.org/0000-0002-6369-7699>;

Gusak D.A., <https://orcid.org/0000-0002-6917-8259>.

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

Acknowledgment. The research was carried out with the support of MedicaGroup LLC.

Received 27.12.2021
Accepted 14.01.2022
Published 23.02.2022

Введение. В Международных рекомендациях по ведению больных с тяжёлым сепсисом и септическим шоком 2016 г. особое значение придается ранней диагностике инфекций кровотока методом гемокультивирования и адекватной антимикробной терапии при тяжёлом сепсисе и септическом шоке [1].

Своевременная диагностика инфекций кровотока призвана способствовать ранним и адекватным лечебным мероприятиям, которые могут предотвратить развитие сепсиса и как следствие – высокую летальность. С появлением автоматических анализаторов крови с непрерывным контролем роста микроорганизмов наступил новый этап в развитии культурального метода диагностики бактериемии и сепсиса. Чувствительность и специфичность данного метода чрезвычайно зависят от строгого соблюдения рекомендаций, начиная от показаний для посева крови и заканчивая оценкой полученных результатов [2].

Коммерческие флаконы для гемокультивирования, позволяют обнаружить рост большинства клинически значимых микроорганизмов в течение 6-8 ч инкубации (до 24 ч), что позволяет уже в течение 24-48 ч идентифицировать возбудителя до вида и определить антибиотикограмму для адекватной антимикробной химиотерапии. Автоматический анализатор гемокультур сокращает время получения сигнала роста гемокультуры, поскольку анализатор тестирует процесс роста микроорганизмов во флаконах каждые 10 минут. При использовании автоматического анализатора гемокультур в лаборатории отпадает необходимость тратить время на периодический просмотр флаконов, засеянных кровью, устраняется возможная контаминация при периодических высевах [3].

Главной задачей микробиологического исследования крови является быстрое получение результата: индикация и идентификация чистой культуры возбудителя, получение заключения о резистентности выделенного микроорганизма для назначения этиотроп-

ной антимикробной терапии. Быстрые и достоверные результаты требуют применения высококачественных питательных сред в связи с различными потребностями микроорганизмов для роста [4]. Диагностика инфекций кровотока является одной из наиболее важных функций лаборатории клинической микробиологии и особую актуальность приобрела в эпоху пандемии COVID-19 [5, 6].

Микробиологические исследования крови проводятся при заболеваниях, связанных с проникновением микробов в ток крови. В норме кровь человека стерильна. В ток крови микробы попадают в результате осложнений при различных манипуляциях, когда развиваются бактериемия, сепсис, бактериальный шок. Исследование крови на содержание микробов следует проводить у больных с длительной лихорадкой неясного генеза, особенно у лиц с пониженным иммунным статусом [7-9, 11].

Бактериемия представляет собой фазу патогенеза общих и системных гнойно-воспалительных заболеваний, выполняющую функцию передачи возбудителя другим хозяевам или переноса его в иные места локализации и выделения. На определённом этапе патогенеза возбудитель из первичного очага локализации проникает в кровь, циркулирует в ней определённый срок, при этом гибнет значительная часть возбудителя, вызывая интоксикацию, остальные захватываются клетками лимфоидной и макрофагальной систем, и уничтожаются или персистируют в них. Размножения возбудителя в крови не происходит, поскольку кровь сохраняет свои бактерицидные свойства. Бактериемия нередко осложняет течение тяжёлых форм инфекций, вызываемых условно-патогенными микробами (УПМ). В этих случаях бактериемия нередко переходит в сепсис и септикопиемию [7-12].

Материал и методы. Проведён анализ посевов проб крови у больных, находившихся на лечении в лечебно-профилактических учреждениях г. Ростова-на-Дону с января по октябрь 2020 г. с подозрением на инфекцию крови. За исследуемый период проведено 1544 исследования проб крови от 772 пациентов.

Посев крови проводили на автоматическом анализаторе ЮООНА® Labstar 100 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., Китай) (рис. 1).

Для посева использованы среды питательные с нейтральным антибиотиком для культивирования аэробов ЮООНА®, среды питательные для культивирования аэробов ЮООНА®, среды питательные для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮООНА®. Посев крови осуществляли согласно Руководству по эксплуатации анализатора бактериологического автоматического ЮООНА® LABSTAR 100 и Методических указаний 4.2.2039-05 [13].

Для проведения контроля питательных сред для посева крови использованы референс-штаммы из международных коллекций: ATCC 25285 *Bacteroides fragilis*; ATCC 49619 *Streptococcus pneumoniae*; ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*; ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*; ATCC 25922 *Escherichia coli*; ATCC 90028 *Candida albicans*; ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*.



Рис. 1. Автоматический анализатор ЮООНА® Labstar 100.

Для контроля ростовых свойств питательных сред в пробирках готовили стандартизированное разведение контрольного штамма 1:10 000 и вносили 10 мкл полученной взвеси в пробирку с питательной средой (посевная доза 100 КОЕ/пробирку). Контроль качества питательных сред штаммами грибов рода *Candida* принципиально не отличались от аналогичных процедур, проводимых с контрольными штаммами бактерий.

Результаты испытаний считались удовлетворительными, если питательные среды обеспечивали рост использованных контрольных штаммов, а референс-штаммы формировали в течение регламентированного срока (быстро растущие бактерии – за 24–48 ч, грибы – за 72 ч), колонии характерной морфологии и достаточного размера [14].

Идентификацию выделенных чистых гемокультур до вида и чувствительность штаммов к антимикробным препаратам (АМП) определяли на автоматическом анализаторе Vitek 2 (BioMerieux, Франция).

Результаты. На первом этапе исследования проверены ростовые свойства. Все исследуемые референс-штаммы показали возможности роста на питательных средах в соответствии с их биологическими особенностями.

Среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА®, среда питательная для культивирования аэробов ЮОНОА®, среда питательная для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА® обеспечивали рост аэробных и факультативно анаэробных бактерий, к которым относились энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ), стрептококки, энтерококки. Среда питательная с нейтрализатором антибиотиков для культивирования анаэробов ЮОНОА® обеспечивала рост облигатных анаэробных бактерий *V. fragilis*.

Питательная среда для детей с нейтрализатором антибиотиков и среда питательная для культивирования аэробов с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА® обеспечивала рост грибов *C. albicans*.

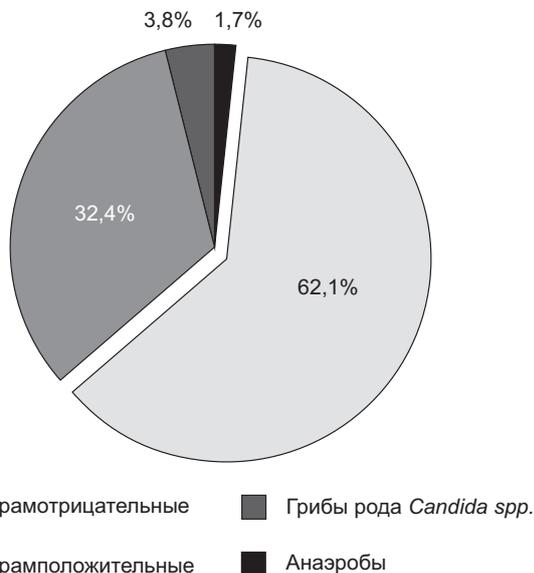


Рис. 2. Патогены инфекций кровотока.

Наибольшее количество септических осложнений возникало в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), судя по количеству поступавших из ОРИТ проб крови (от 531 пациента, что составило 68,8%). При микробиологическом исследовании крови положительный результат получен у 231 (29,9%) пациента. В 70,1% случаев кровь оказалась стерильной, поскольку рост во флаконах со средой питательной с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА®, средой питательной для культивирования аэробов ЮОНОА®, средой питательной для детей с нейтрализатором антибиотиков для культивирования аэробов ЮОНОА® отсутствовал.

Анализ высокого процента отсутствия роста показал, что кровь на посев врачи направляют с целью как подтвердить инфекционный процесс, так и для его исключения. Не всегда соблюдались условия, влияющие на положительный результат посева крови: время забора крови (бактерии попадают в кровоток за 1 ч до озноба и лихорадки), объем забранной крови (чем больше собрано крови, тем более точный результат можно получить), равномерное распределение по флаконам (посев крови должен включать 1 аэробный и 1 анаэробный флакон), качество транспортировки образца (образец не отправлен в лабораторию сразу же после забора крови). Любое несоблюдение условий ведет к предотвращению обнаружения роста бактерий из крови [14].

При микробиологическом исследовании крови от больных с септическими осложнениями выделено 235 гемокультур микроорганизмов. У 227 обследованных пациентов из крови выделен возбудитель в монокультуре. У 4-х обследованных пациентов из крови выделены ассоциации микроорганизмов, состоящие из двух видов возбудителей: *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae* и *Candida parapsilosis*; *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida parapsilosis*; *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*). Выделенные микроорганизмы принадлежали к 15 родам и 19 видам (см. таблицу, рис. 2).

В развитии инфекции крови ведущая этиологическая роль принадлежит грамотрицательным бактериям – 146 штаммов (62,1%). В первую очередь: *Klebsiella pneumoniae* – 53 (22,5%), *Pseudomonas aeruginosa* – 30 (12,8%), *Escherichia coli* – 23 (9,8%), *Acinetobacter baumannii* – 19 (8,1%). Другие энтеробактерии встречались реже: *Enterobacter cloacae* – 9 (3,8%), *Citrobacter freundii* – 4 (1,7%).

В единичных случаях возбудителями инфекции крови являлись культуры *Stenotrophomonas maltophilia* – 3 (1,3%). Появились новые возбудители инфекций кровотока, которые также выделены в единичных случаях: по 2 (0,85%) штамма *Achromobacter xylosoxidans* и *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia insidiosa* 1 (0,4%). Следует отметить ведущую этиологическую роль энтеробактерий, на долю которых приходилось 60,9% изолированных гемокультур.

Всего же на долю грамположительных кокков приходилось 32,4% (76 штамма) от общего количества изолированных из крови гемокультур. Основными возбудителями инфекции крови среди грамположительных бактерий в основном являлись: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. Крайне редко являлись возбудителями инфекции кровотока *Staphylococcus* spp. и связано это с их низкой вирулентностью. *Streptococcus*

Видовой спектр возбудителей инфекций крови

Микроорганизмы	Частота встречаемости	
	абс.	%
Грамотрицательные палочки:		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	53	22,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	12,8
<i>Escherichia coli</i>	23	9,8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19	8,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	3,8
<i>Citrobacter freundii</i>	4	1,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	1,3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2	0,8
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	0,8
<i>Ralstonia insidiosa</i>	1	0,4
Грамположительные кокки:		
<i>Enterococcus faecalis</i>	38	16,2
<i>Enterococcus faecium</i>	30	12,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	1,3
Анаэробные бактерии:		
<i>B. fragilis</i>	4	1,7
Дрожжевые грибы:		
<i>C. albicans</i>	3	1,3
<i>C. parapsilosis</i>	3	1,3
<i>C. glabrata</i>	2	0,8
<i>C. krusei</i>	1	0,4
Всего:	235	

pneumoniae выделен из крови от пациентов с гнойным плевритом в единичных случаях.

Грибы рода *Candida* spp., как самые распространённые возбудители инвазивных микозов и фунгемии, составили 3,8% (9 больных) изолированных гемокультур. В видовом спектре грибов преобладали *Candida non albicans* (*C. parapsilosis* – 3 штамма, *C. glabrata* – 2 штамма, *C. krusei* – 1 штамм).

Облигатные анаэробные бактерии выделены из крови у 4 (1,7%) больных с тяжёлыми абдоминальными инфекциями, что, по всей видимости, обусловлено их транслокацией в кровь из биотопа толстой кишки. Все штаммы облигатных анаэробных бактерий идентифицированы, как *Bacteroides fragilis*.

Обсуждение. Бактериемия и сепсис могут быть вызваны практически всеми видами патогенных микробов и УИМ. Среди грамотрицательных бактерий среди патогенов бактериемии и сепсиса преобладают *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*. Практически в два раза реже в этиологии инфекции крови встречаются грамположительные микроорганизмы, в частности, грамположительные кокки видов *E. faecium* и *E. faecalis*. Грибы рода *Candida* spp. являются ведущими возбудителями фунгемии. Появились данные, о возросшей частоте встречаемости грибов рода *Candida* spp. у больных с COVID-19 [15-

16]. По данным ряда авторов, включение в режимы эмпирической антимикробной терапии АМП, активных против грибов, является актуальным только в онкогематологии, поскольку значение грибов в этиологической структуре при других видах патологии существенно ниже [17]. Тем не менее, согласно Временным методическим рекомендациям, профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) Версия 13 (14.10.2021) риск развития COVID-ИК у больных без специфических факторов риска (например, при выраженной нейтропении) считается невысоким, и рутинная первичная антифунгальная профилактика не рекомендуется [6].

Большое количество госпитализаций, связанных с тяжёлым состоянием больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, скученность в палатах, катетеризация, длительное нахождение на ИВЛ, лечение кортикостероидами – все эти и другие факторы существенно утяжеляют ситуацию с инфекционными осложнениями. Пациенты, которые переболели COVID-19, ещё долго являются носителями полирезистентных госпитальных штаммов.

Ежегодно в мире отмечается не менее миллиона клинически проявляющихся случаев проникновения бактерий в кровоток, 30-50% из которых заканчивается летально. Инфицирование крови напрямую связано с развитием тяжёлых иммунодефицитных состояний, особенно имеющих вторичное происхождение. Нередко положительный посев крови становится первым указанием на генерализацию инфекционного процесса и влияет на выбор режимов эмпирической антибактериальной терапии [18-19]. В связи с этим результаты микробиологического исследования крови имеют важное значение для своевременной диагностики развития жизнеугрожающих инфекционных осложнений. Полученные данные показывают зависимость характера бактериемии от происхождения вторичного иммунодефицитного состояния, что позволяет прогнозировать её этиологию и при необходимости обосновать проведение лечебно-профилактических мероприятий, как в отношении отдельно взятого пациента, так и в масштабах клинических подразделений стационаров.

Выводы:

1. Патогенами высокого уровня приоритетности, выделяемыми из крови пациентов, находившихся на лечении в лечебно-профилактических учреждениях г. Ростова-на-Дону с подозрением на инфекцию крови, следует считать грамотрицательные бактерии; патогенами среднего уровня приоритетности – *E. faecium*, *E. faecalis*, грибы рода *Candida* spp.; патогенами низкого уровня приоритетности – облигатные анаэробные бактерии.

2. Исследование крови с помощью автоматического анализатора ЮНОНА® Labstar 100 позволяет расширить видовой спектр возбудителей и сократить время выдачи результатов.

3. Все испытанные коммерческие питательные среды к автоматическому анализатору ЮНОНА® Labstar 100 (SCENKER Biological Technology Co., Ltd., Китай) соответствуют заявленным требованиям.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 5, 11, 15, 16
 см. REFERENCES)

- Багирова Н.С. Диагностика бактериемии. *Consilium Medicum*. 2002; 4 (1): 46-54.
- Боронина Л. Г. Расширение возможностей в диагностике бактериемии и сепсиса у детей в многопрофильном стационаре. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10):613-9.

4. Боронина Л.Г., Самагова Е.В., Кукушкина М.П., Панова С.А., Устюгова С.С., Внутривлабораторный контроль качества питательных сред для автоматического бактериологического анализатора ЮОНА® LABSTAR 50. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 110-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114>.
6. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 13 (14.10.2021).
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник. Воробьев А.А., ред. 2-е изд. испр. и доп. М.: Медицинское информационное агентство; 2015.
8. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Борисова О.Ю., Бурбелло А.Т. Маркеры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 435-42.
9. Воробьев А.А., Миронов А.Ю., Несвижский Ю.В., Нечаев Д.Н. Учение об инфекции. Воробьев А.А., ред. М.: ММА им. И. М. Сеченова; 2000.
10. Истратов В.Г., Миронов А.Ю., Руднева В.Г., Горшенина И.Ю., Воробьев А.А. Изучение патогенетических механизмов интоксикации у больных с анаэробной неклостридиальной инфекцией. *Вестник РАМН*. 1996; 2: 41-3.
11. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии. Учебное пособие. Миронов А.Ю., ред. Ростов-на-Дону: Ростовский госмедуниверситет; 2011.
12. Митрохин С.Д., Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г. Антимикробная химиотерапия внутрибольничных инфекций в онкологическом стационаре. Учебное пособие. Ростов-на-Дону: Ростовский госмедуниверситет; 2011.
13. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания 4.2.203905. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2005.
14. Внутривлабораторный контроль качества питательных сред для клинических лабораторных исследований. Клинические рекомендации. М.: Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»; 2014.
17. Клясова Г.А. Антимикробная терапия. Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. ФГБУ «Гематологический науч. центр Минздрава России». Савченко В.Г., ред. М.: Практика; 2012.
18. Полухина О.В., Суборова Т.Н., Кузин А.А., Петров А.Н., Осовских В.В., Гранов Д.А. и др. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 14(1):43-8. DOI:10.15789/2220-7619-2014-1-43-48.
19. Куцевалова О.Ю., Лысенко И.Б., Козель Ю.Ю. и др. Комплексный подход к диагностике бактериальных и грибковых инфекций кровотока у пациентов онкологического профиля. *Южно-Российский онкологический журнал*. 2020; 1 (4): 15-21.
4. Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Panova S.A., Ustyugova S.S., Inside laboratory quality control of culture media for the automatic bacteriological analyzer YUNONA® LABSTAR 50. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (2): 110-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114>. (in Russian)
5. Hughes S. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020 Oct; 26 (10): 1395-9. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.06.025. Epub 2020 Jun 27.
6. Interim Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Treatment of Novel Coronavirus Infection (COVID-19). Version 13 (10/14/2021).
7. Medical microbiology, virology and immunology. Textbook. 2nd ed. Vorob'yov A.A., ed. [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya I immunologiya]. Moscow: MIA; 2015. (in Russian)
8. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Borisova O. Yu., Burbello A.T. Markers of inflammation and bloodstream infection (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (7): 435-42. (in Russian)
9. Vorob'yov A.A., Mironov A. Yu., Nesvizhsky Yu. V., Nechaev D.N. The doctrine of infection [Uchenie ob infektsii]. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: MMA im. I.M.Sechenov; 2000. (in Russian)
10. Istratov V.G, Mironov A. Yu., Rudneva V.G., Gorshenina I. Yu., Vorob'yov A.A. Study of pathogenetic mechanisms of intoxication in patients with anaerobic non-clostridial infection. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 1996; 2: 41-3. (in Russian)
11. Mironov A. Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V. Fundamentals of clinical microbiology and immunology: textbook [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii I ummunologii. Uchebnoe posobie]. Mironov A.Yu., ed. Rostov-on-Don: Rostovskiy gosmeduniversitet; 2011. (in Russian)
12. Mitrokhin S.D., Mironov A. Yu., Kharseeva G.G. Antimicrobial chemotherapy of nosocomial infections in an oncological hospital. Textbook [Antimikrobnaya khimioterapiya vnutribol' nichnykh infektsiy v onkologicheskome statsionare. Uchebnoe posobie]. Rostov-na-Donu: Rostovskiy gosmeduniversitet; 2011. (in Russian)
13. Technique for collecting and transporting biomaterials to microbiological laboratories. Methodical instructions 4.2.203905. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of Russia; 2005. (in Russian)
14. Intralaboratory quality control of culture media for clinical laboratory research. Clinical guidelines. Moscow: Association of Specialists and Organizations of the Laboratory Service «Federation of Laboratory Medicine»; 2014. (in Russian)
15. Bolukbaşı Y., Genç G E, Orhun G, Kuşucu M A, Çagatay A, Onel M et al. First Case of COVID-19 Positive Candida auris Fungemia in Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2021 Oct;55(4):648-55. DOI: 10.5578/mb.20219716.
16. Sari A.P., Damindro N., Yohanes A., Mokoagow M.I. Role of tocilizumab for concomitant systemic fungal infection in severe COVID-19 patient: Case report. *Medicine* (Baltimore). 2021 Mar 26;100(12): e25173. DOI: 10.1097/MD.00000000000025173.
17. Klyasova G.A. Antimicrobial therapy. Collection of diagnostic algorithms and treatment protocols for blood systems. FGBU "Hematological Research Center of the Ministry of Health of Russia". Savchenko V.G., ed. Moscow: Praktika; 2012. (in Russian)
18. Polukhina O.V., Suborova T.N., Kuzin A.A., Petrov A.N., Osovskikh V.V., Granov D.A. et al. The spectrum of bacteremia pathogens in patients with immunodeficiency states of various origins. *Infektsiya I immunitet*. 2014; 14 (1): 43-8. (in Russian) DOI: 10.15789/2220-7619-2014-1-43-48.
19. Kutsevalova O.Yu., Lysenko I.B., Kozel Yu.Yu. An integrated approach to the diagnosis of bacterial and fungal infections of the bloodstream in cancer patients. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal*. 2020; 1 (4): 15-21. (in Russian)

REFERENCES

1. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical Care Medicine*. 2017; 45 (3): 486-552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255.
2. Bagirova N.S. Diagnosis of Bacteremia. *Consilium Medicum*. 2002; 4 (1): 46-54. (in Russian)
3. Boronina L. G. Expansion of opportunities in the diagnosis of bacteremia and sepsis in children in a multidisciplinary hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 613-9. (in Russian)

Немченко У.М., Григорова Е.В., Погодина А.В., Белькова Н.Л., Воропаева Н.М., Романица А.И., Григорьева Е.А., Савелькаева М.В., Рычкова Л.В.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ КИШЕЧНИКА У ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

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

*Функциональные расстройства кишечника (ФРК) у детей и подростков являются одной из распространённых патологий пищеварительного тракта. Цель исследования – изучить структуру микробиоты толстой кишки у подростков с ожирением и установить её взаимосвязи с клиническими проявлениями заболевания ФРК. В исследование включено 20 подростков в возрасте 11-17 лет. В основную группу вошли 13 подростков с клинически подтверждённым диагнозом ожирение (стандартное отклонение индекса массы тела (SDS ИМТ) более 2,0) в сочетании с ФРК. Группу контроля составили 7 подростков с нормальной массой тела и отсутствием абдоминальных жалоб (SDS ИМТ=0,66). Клинические симптомы со стороны кишечника диагностировали на основе Римских критериев IV. Консистенцию кала оценивали по Бристольской шкале форм стула. Исследование биологического материала проводили культуральным методом. У подростков с ожирением и ФРК наблюдается снижение концентрации представителей бифидофлоры, увеличение микробной плотности *Escherichia coli* с изменёнными свойствами, чрезмерный рост потенциально патогенных энтеробактерий. Наличие условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* связано с болями в животе при дефекации. У подростков с ожирением в группе с неоформленным стулом в составе кишечной микробиоты регистрировали *Clostridium spp.**

Ключевые слова: микробиота кишечника; функциональные расстройства кишечника; подростки; ожирение.

Для цитирования: Немченко У.М., Григорова Е.В., Погодина А.В., Белькова Н.Л., Воропаева Н.М., Романица А.И., Григорьева Е.А., Савелькаева М.В., Рычкова Л.В. Взаимосвязь состава микробиоты и функциональных расстройств кишечника у подростков с ожирением. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2):106-109.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-106-109>

Для корреспонденции: Немченко Ульяна Михайловна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. микробиома и микроэкологии; e-mail: umnemch@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 121022500178-3

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.07.2021

Принята к печати 01.09.2021

Опубликовано 23.01.2022

Nemchenko U.M., Grigorova E.V., Pogodina A.V., Belkova N.L., Voropaeva N.M., Romanitsa A.I., Grigoryeva E.A., Savelkaeva M.V., Rychkova L.V.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE COMPOSITION OF THE MICROBIOTA AND FUNCTIONAL INTESTINAL DISORDERS IN OBESE ADOLESCENTS

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

*Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) in children and adolescents are one of the most common pathologies of the digestive tract. The aim of the study was to study the structure of the colon microbiota in obese adolescents and to establish its relationship with the clinical manifestations of the disease FGIDs. The study included 20 adolescents aged 11-17 years. The main group included 13 adolescents with a clinically confirmed diagnosis of obesity (the standard deviation of the body mass index (SDS BMI) is more than 2,0) in combination with FGIDs. The control group consisted of 7 adolescents with normal body weight and no abdominal complaints (SDS BMI=0,66). Clinical symptoms from the bowel re diagnosed on the basis of the Rome IV. The consistency of feces was evaluated using the Bristol Stool Form Scale. The study of biological material was carried out by standard bacteriological methods. It is shown that in adolescents with obesity and FGIDs, there is a decrease in the concentration of representatives of bifidoflora, an increase in the microbial density of *Escherichia coli* with altered properties and an excessive growth of potentially pathogenic enterobacteria. It is established that the presence of conditionally pathogenic bacteria is sem. *Enterobacteriaceae* is associated with abdominal pain during defecation. In obese adolescents in the group with unformed stools, *Clostridium spp* was recorded as part of the intestinal microbiota.*

Key words: intestinal microbiota; functional gastrointestinal disorders; adolescents; obesity.

For citation: Nemchenko U.M., Grigorova E.V., Pogodina A.V., Belkova N.L., Voropaeva N.M., Romanitsa A.I., Grigoryeva E.A., Savelkaeva M.V., Rychkova L.V. The relationship between the composition of the microbiota and functional intestinal disorders in obese adolescents. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 106-109 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-106-109>

For correspondence: Nemchenko U.M., PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; e-mail: umnemch@mail.ru

Information about authors:

Nemchenko U.M., [https:// orcid: 0000-0002-7656-342X](https://orcid.org/0000-0002-7656-342X);

Grigorova E.V., [https://0000-0001-6588-2591](https://orcid.org/0000-0001-6588-2591);

Pogodina A. V., [https://0000-0001-8533-3119](https://orcid.org/0000-0001-8533-3119);

Belkova N. L., [https:// 0000-0001-9720-068X](https://orcid.org/0000-0001-9720-068X);

Voropaeva N. M., <https://0000-0001-7026-2522X>;
Romanitsa A. I., <https://0000-0001-5294-6808>;
Grigoryeva E. A., <https://0000-0002-4535-9397>;
Savelkaeva M. V., <https://0000-0001-6793-6493>;
Rychkova L. V., <https://0000-0003-2910-0737>.

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of the budget theme № 121022500178-3.*

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

Received 22.07.2021

Accepted 01.09.2021

Published 23.01.2022

Введение. Функциональные расстройства кишечника (ФРК) считаются распространённым явлением у детей всех возрастов и включают ряд хронических или повторяющихся желудочно-кишечных симптомов, которые нельзя объяснить структурными или биохимическими отклонениями [1]. От 10% до 20% детей школьного возраста, особенно подросткового, испытывают частые и сильные боли в животе, влияющие на их активность и психосоматическое состояние [2]. При использовании диагностических критериев Rome IV у 25% детей старше 4 лет отмечаются признаки ФРК, более 50% требуется обращение к специалистам и лечение у гастроэнтеролога. ФРК являются серьёзной социально-экономической проблемой для общества [3]. Этиология ФРК до сих пор неясна, патогенетические механизмы изучены частично. Патогенез ФРК связывают с изменением моторики кишечника, висцеральной гиперчувствительностью, нарушением кишечных рефлексов, психологическими расстройствами, пищевой непереносимостью, желудочно-кишечной инфекцией, дисбалансом кишечной микробиоты [4, 5]. Современные данные указывают на повышенную распространённость ФРК у детей и подростков с ожирением [6, 7]. Ожирение является мультифакторным заболеванием [6, 8]. Одним из важных факторов являются изменения в составе микробиоты толстой кишки у детей и подростков, например, высокая обсеменённость энтеробактериями [9].

Существует предположение о том, что микробиота толстой кишки у пациентов с ФРК дисбиотична, что может приводить к увеличению ферментации, избыточному газообразованию, развитию характерных для этого заболевания симптомов [10]. Данные о взаимосвязи клинических симптомов с видовым и количественным составом микробиоты противоречивы, необходимы дальнейшие исследования в этой области [11].

Цель исследования – изучение структуры микробиоты толстой кишки у подростков с ожирением и установление её взаимосвязи с клиническими проявлениями заболевания ФРК.

Материал и методы. Объект исследования – подростки в возрасте 11-17 лет. В основную группу вошли 13 подростков с клинически подтверждённым диагнозом ожирение (стандартное отклонение индекса массы тела (SDS ИМТ) более 2,0) в сочетании с ФРК. Группу контроля составили 7 подростков с нормальной массой тела и отсутствием абдоминальных жалоб (SDS ИМТ=0,66). Исследование проведено на базе Клиники НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск) в период с декабря 2016 г. по июль 2018 г. Критерии включения в исследование: наличие ожирения (SDS ИМТ >2) с ФРК или нормальной массы тела (SDS ИМТ >-2, но <1). Критерии исключения: наличие острых и обострение хронических заболеваний; симптоматические, ятрогенные, моногенные

и синдромальные формы ожирения; наличие тяжёлых соматических заболеваний; наличие подтверждённых органических заболеваний со стороны нижних отделов пищеварительного тракта, паразитарные инвазии, ферментопатии; поражение других органов и систем, протекающих с симптомами диспепсии; антибактериальная терапия (АБТ) и/или лечение про- и пребиотиками в течение последних 6 месяцев; острая кишечная инфекция (ОКИ) в течение последних 6 месяцев.

Клинические симптомы со стороны кишечника оценивали на основе Римских критериев IV [4]. Для верификации диагноза ФРК подростки проконсультированы гастроэнтерологом. Консистенцию стула оценивали с помощью Бристольской шкалы форм стула (БШФС (Bristol Stool Form Scale)): плотному стулу соответствуют типы 1 и 2, жидкому – типы 6 и 7, типы 3, 4, 5 – нормальный стул [10]. В зависимости от преобладающей формы кала, основную группу подростков разделили на подгруппы: подростки с ФРК с замедленной, затруднённой или систематически недостаточной дефекацией (запором) (ФРК-З, $n=7$), с неоформленным стулом (ФРК-Д, $n=2$), с сочетанием разных типов форм стула – комбинации типов 1 или 2 с 6 или 7 – неустойчивый стул (ФРК-Н, $n=4$).

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 6 от 21.12.2015 г.), с соблюдением этических принципов Хельсинской Декларации ВМА 1964 г. (ред. 2013 г.) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утверждёнными приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 200Н. Исследование выполнено с информированного согласия подростков старше 15 лет или родителей/законных представителей детей младше 15 лет на участие в исследовании.

Исследование 20 образцов фекалий проведено бактериологическим методом, описанным ранее, учёт количественного и видового состава микробиоты кишечника – согласно отраслевому стандарту¹ [9, 12]. Результаты представлены в виде числа бактерий на грамм влажной массы кала (колониобразующие единицы/г (КОЕ/г)). Выделенные кишечные палочки (*E. coli* – КП) идентифицировали по вариантам согласно ферментативной активности: КП с нормальными ферментативными свойствами (НФС) и КП с изменёнными свойствами (ИС) (слабыми ферментативными свойствами и/или с гемолитической активностью). Статистический анализ полученных результатов проводили при помощи программ StatTech v1.1.0 (разработчик – ООО «Статтех», Россия), Microsoft Excel 2010. Для установления связи между факторным (наличие ФРК, форма стула по БШФС) и ре-

¹Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава РФ № 231 от 09.06.2003 г.

зультативным (состав микробиоты) признаками, данные рассчитывали с помощью критерия χ^2 Пирсона, критический уровень значимости (p) принят равным 0,05.

Результаты. На первом этапе исследования определяли категории исхода и тип ФРК в соответствии с БШФС. Основные различия между группами касались частоты дефекации и связанных с ней болей в животе (регистрировались только в основной группе), изменение формы кала также зависело от диагноза: в основной группе, согласно БШФС, преобладал второй тип, у двух подростков доминировал неоформленный и у четырёх – неустойчивый стул. В контрольной группе наблюдался только 3 и 4 тип, соответствующий нормальному стулу ($p=0,001$, $\chi^2=20$). Сравнительная характеристика значимых клинических симптомов в обследуемых группах представлена в табл. 1.

Характер микроэкологического дисбаланса, встречающийся у обследованных подростков, представлен в табл. 2.

По результатам бактериологического анализа установлено, что независимо от диагноза, у всех подростков регистрировали дисбиотические нарушения (см. табл. 2). В основной группе преобладала 1-я степень дисбиоза кишечника (у семи подростков), связанная со снижением концентрации индигенной микрофлоры: бифидобактерий и нормальной кишечной палочки. Вторая степень дисбиоза толстой кишки (снижение концентрации бифидобактерий, появление штаммов КП с ИС и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) зарегистрирована у 4-х подростков основной группы, эубиоз кишечника (микроэкологическая норма) наблюдали у 2-х обследованных основной группы. В группе контроля не зарегистрировано дисбиотических нарушений второй степени и эубиоза, у всех подростков наблюдали дисбиотические нарушения первой степени, значимых различий между группами не было ($p=0,099$, $\chi^2=4,62$).

В основной группе наблюдали снижение концентрации бифидобактерий до 6,92 КОЕ/г у десяти и КП

Таблица 1

Спектр значимых клинических симптомов со стороны кишечника у подростков (в абсолютных значениях)

Категории исхода	Основная группа (n=13)	Контрольная группа (n=7)	Уровень значимости, p
Частота дефекаций (раз в день/неделю)			
Стул более 3-х раз в день	5	0	<0,001*
Стул менее 3 раз в неделю	8	0	
Стул 5-7 раз в неделю	0	7	
Боли в животе, связанные с дефекацией			
При каждом акте	1	0	<0,001*
Иногда, периодически	12	0	
Нет	0	7	
Преобладающая форма стула (по Бристольской шкале форм стула)			
Тип 2 (ФРК-З)	7	0	<0,001*
Тип 3-4	0	7	
Тип 6 (ФРК-Д)	2	0	
Неклассифицируемый (ФРК-Н)	4	0	

Примечание. ФРК-З: ФРК с запором, ФРК-Д: ФРК с неоформленным стулом; * – критерий χ^2 Пирсона ($p \leq 0,05$).

НФС до 5,76 КОЕ/г у пяти подростков. У восьми подростков КП идентифицировали как изменённую, с потерей некоторых биохимических свойств. УПМ сем. *Enterobacteriaceae* (суммарно) в диагностически значимой концентрации 10^4 – 10^6 КОЕ/г определяли у шести подростков основной группы. В контрольной группе также наблюдали снижение концентрации индигенной микрофлоры – бифидобактерий до 6,12 КОЕ/г у всех обследованных, КП НФС до 5,75 КОЕ/г у 3-х обследованных подростков. У одного подростка в контрольной группе отмечено наличие КП с ИС, УПМ сем. *Enterobacteriaceae* не регистрировали ($p < 0,05$, $\chi^2=4,62$).

Проведён анализ влияния различных показателей микробиоценоза кишечника на отсутствие или наличие клинических симптомов. После статистической обработки всех клинических параметров в зависимости от дисбиотических нарушений выявлено, что только наличие УПМ сем. *Enterobacteriaceae* влияло на такое проявление ФРК, как «боли в животе, связанные с дефекацией» ($p < 0,05$, $\chi^2=5,12$).

Анализ взаимосвязи между формами стула по БШФС и составом кишечной микробиоты подростков с различными вариантами ФРК показал, что *Clostridium* spp. регистрировали только в группе ФРК-Д ($p < 0,05$, $\chi^2=9$), по другим микроорганизмам статистически значимых различий не выявлено.

Обсуждение. Появляется всё больше данных, свидетельствующих о решающей роли кишечной микробиоты в некоторых физиологических процессах организ-

Таблица 2

Частота регистрации индигенной и условно-патогенной микробиоты в толстой кишке и её взаимосвязь с ФРК (в абсолютных значениях)

Параметры	Основная группа (n=13)	Контрольная группа (n=7)	Уровень значимости, p
Степень дисбиоза кишечника			
Эубиоз:	2	0	-
1-я степень	7	7	>0,05
2-я степень	4	0	-
Представители индигенной и условно-патогенной микробиоты толстой кишки			
<i>Bifidobacterium</i> spp. (10^9 - 10^{10} КОЕ/г*)	3	0	>0,05
<i>Bifidobacterium</i> spp. ($<10^9$ КОЕ/г*)	10	7	>0,05
<i>Lactobacillus</i> spp. ($>10^8$ КОЕ/г*)	8	4	>0,05
<i>Lactobacillus</i> spp. (10^7 - 10^8 КОЕ/г*)	5	3	>0,05
КП НФС (10^7 - 10^8 КОЕ/г*)	8	4	>0,05
КП НФС ($<10^7$ КОЕ/г*)	5	3	>0,05
КП ИС (суммарно)	8	1	>0,05
УПМ сем. <i>Enterobacteriaceae</i> ($>10^4$ КОЕ/г*)	6	0	<0,05**
<i>Enterococcus</i> spp. (10^5 - 10^8 КОЕ/г*)	5	2	>0,05
<i>Clostridium</i> spp. ($<10^5$ КОЕ/г*)	3	1	>0,05

Примечание. * – Титр согласно ОСТ 91500.11.0004-2003; КП НФС: *E. coli* с нормальными ферментативными свойствами, КП ИС: *E. coli* с изменёнными ферментативными свойствами, УПМ: условно-патогенные микроорганизмы; ** – критерий χ^2 Пирсона ($p \leq 0,05$).

ма-хозяина, об её участии в патогенезе различных заболеваний [13]. Наличие боли при дефекации, изменение частоты и консистенции стула на фоне дисбиотических нарушений первой и второй степени в основной группе указывает на роль кишечной микробиоты в формировании основных клинических симптомов ФРК.

Уменьшение содержания микроорганизмов, свойственных нормальной биоте толстой кишки (бифидо- и лактобактерий), выявлено не только у подростков с ФРК, но и в группе контроля, однако КП ИС и УПМ сем. *Enterobacteriaceae* регистрировали только в основной группе, что свидетельствует о более глубоких дисбиотических нарушениях в биоценозе толстой кишки у подростков с ожирением и ФРК [9]. У подростков основной группы, предъявляющих жалобы на боль при дефекации, регистрировались УПМ сем. *Enterobacteriaceae*, что вероятно, связано со способностью энтеробактерий производить аммиак и сероводород, способствующие накоплению газа в просвете кишечника.

Анализ литературы показывает, что связь между дисбиотическими изменениями и расстройствами ЖКТ изучали в основном при синдроме раздражённого кишечника (СРК) и роль кишечных бактерий при СРК хорошо описана [11]. Бактерии рода *Clostridium* давно привлекают внимание исследователей, как микроорганизмы, тесно связанные с симптомами СРК. Клостридии выбраны в качестве целевой группы в исследовании L. Rigsbee и соавт. [14], установивших, что нарушение метаболизма кишечных газов, повышенная чувствительность толстой кишки связаны с наличием фекальных клостридий и симптомами СРК. В нашем исследовании наличие *Clostridium* spp. связано только с группой ФРК-Д, что подтверждает их роль в патофизиологии ФРК [15].

Заключение. У подростков с ожирением и ФРК состав кишечной микробиоты отличается от таковой у подростков без ФРК. Нарушение состава кишечной микробиоты, связанное с повышением уровня потенциальных патобиотон приводит к развитию микровоспаления в кишечной стенке и усугубляет симптоматику ФРК. Модуляция кишечной микробиоты путём изменения рациона питания, использования антибиотиков, пробиотиков и противовоспалительных средств может быть предложена в качестве стратегий лечения симптомов ФРК.

ЛИТЕРАТУРА пп. 1-5, 7, 9, 11, 13-15
см. REFERENCES)

6. Погодина А.В., Романица А.И., Рычкова Л.В. Ожирение и функциональные расстройства кишечника у детей. *Педиатр.* 2021;12(1):59-69.
8. Бальжиева В.В., Байрова Т.А., Рычкова Л.В., Аюрова Ж.Г., Колесников С.И. Этногенетические аспекты ожирения у детей и подростков. *Вопросы детской диетологии.* 2017;15(5):29-34.
10. Бельмер С.В., Разумовский А.Ю., Хавкин А.И., ред. *Болезни кишечника у детей (в 2-х томах).* М.:МЕДПРАКТИКА-М; 2018.
12. Меньшиков В.В., ред. *Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие.* Клиническая микробиология. Том 3. Москва: Лабора; 2009.

REFERENCES

1. Boronat A.C., Ferreira-Maia A.P., Matijasevich A., Wang Y.P. Epidemiology of functional gastrointestinal disorders in children and adolescents: A systematic review. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23 (21): 3915-27.
2. Peralta-Palmezano J.J., Guerrero-Lozano R. Prevalence of Functional Gastrointestinal Disorders in School Children and Adolescents. *Korean J. Gastroenterol.* 2019; 73 (4):207-12. <https://doi.org/10.4166/kjg.2019.73.4.207>.
3. Fifi A.C., Velasco-Benitez C., Saps M. Functional Abdominal Pain and Nutritional Status of Children. A School-Based Study. *Nutrients.* 2020; 12 (9):2559. <https://doi.org/10.3390/nu12092559>.
4. Drossman D.A. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. *Gastroenterology.* 2016; 150 (6):1262-79. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.032>.
5. Hyams J.S., Di Lorenzo C., Saps M., Shulman R.J., Staiano A., van Tilburg M. Functional Disorders: Children and Adolescents. *Gastroenterology.* 2016; 150(6):1456-68. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.015>.
6. Pogodina A.V., Romanitsa A.I., Rychkova L.V. Obesity and functional disorders of the intestines in children. *Pediatr.* 2021; 12(1):59-69. (in Russian)
7. Tambucci R., Quitadamo P., Ambrosi M., De Angelis P., Angelino G., Stagi S., Verrotti A., Staiano A., Farello G. Association Between Obesity/Overweight and Functional Gastrointestinal Disorders in Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2019; 68 (4):517-20. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002208>.
8. Bal'zhevia V.V., Bairova T.A., Rychkova L.V., Ayurova Zh.G., Kolesnikov S.I. Ethnogenetic aspects of obesity in children and adolescents. *Voprosy detskoy dietologii.* 2017; 15(5):29-34. (in Russian)
9. Grigорова E.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Klimenko E.S., Pogodina A.V., Romanitsa A.I., Novikova E.A., Rychkova L.V. Metasequencing of v3-v4 variable regions of 16s rna gene in opportunistic microbiota and gut biocenosis in obese adolescents. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2021; 170 (3):321-5. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05060-3>.
10. Bel'mer S.V., Razumovskiy A.Yu., Havkin A.I., eds. *Intestinal diseases in children [Bolezni kishechnika u detey].* (Vol. 1, 2). Moscow: MEDPRAKTIKA-M; 2018. (in Russian)
11. Simrén M., Barbara G., Flint H.J., Spiegel B.M., Spiller R.C., Vanner S., Verdu E.F., Whorwell P.J., Zoetendal E.G.; Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut.* 2013; 62(1):159-76. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302167>.
12. Men'shikov V.V., eds. *Methods of clinical laboratory research: a reference guide. Clinical microbiology [Klinicheskaya mikrobiologiya].* (Vol. 3). Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
13. Tziatzios G., Gkolfakis P., Papanikolaou I.S., Mathur R., Pimentel M., Giamarellos-Bourboulis E.J., Triantafyllou K. Gut Microbiota Dysbiosis in Functional Dyspepsia. *Microorganisms.* 2020; 8(5):691. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050691>.
14. Rigsbee L., Agans R., Shankar V., Kenche H., Khamis H.J., Michail S., Paliy O. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107(11): 1740-51.
15. Carco C., Young W., Geary R. B., Talley N. J., McNabb W. C., Roy N. C. Increasing Evidence That Irritable Bowel Syndrome and Functional Gastrointestinal Disorders Have a Microbial Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2020; 10:468. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00468>.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Омарова С. М., Исаева Р. И., Багандова Д. Ш., Саидова П. С., Горелова В.Г.

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИСТЕРИЙ

ФГБОУ ВО Дагестанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 367000, Махачкала, Россия

*Приведены данные по разработке коммерческих питательных сред для изучения биологических свойств *L. monocytogenes*. Показана эффективность применения разработанных сред для определения важных идентификационных тестов – подвижности и лецитиназной активности листерий в процессе установления принадлежности выделенной культуры к патогенному виду.*

Предлагаемые питательные среды позволяют визуально чётко регистрировать подвижность и лецитиназную активность листерий, на этапе идентификации выделенных культур способствуя совершенствованию диагностики листериоза.

Ключевые слова: листерии; питательная среда; подвижность; лецитиназная активность; факторы патогенности; диагностика; идентификация.

Для цитирования: Омарова С. М., Исаева Р. И., Багандова Д. Ш., Саидова П. С., Горелова В.Г. Разработка и изучение питательных сред для определения биологических свойств листерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 110-114. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-110-114>

Для корреспонденции: Омарова Салидат Магомедовна, д-р биол. наук, проф., зав.каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: omarovanpo@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках финансирования НИР «НПО» Микроген».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.09.2021

Принята к печати 20.10.2021

Опубликовано 23.02.2022

Omarova S.M., Isaeva R. I., Bagandova D. Sh., Saidova P. S., Gorelova V.G.

DEVELOPMENT AND STUDY OF NUTRIENT MEDIA FOR DETERMINING THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LISTERIA

FSBEI HE Dagestan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 36700, Makhachkala, Russia

*The commercial nutrient media for investigation of the biologic properties of *L. monocytogenes* is developed. The efficiency of the use of developed media for determination of motility and lecithinase activity of *Listeria* in the establishment of the isolated culture to the pathogenic species is shown.*

*These nutrient media are developed for visually accurate registration of the motility and lecithinase activity of *Listeria* when identifying the isolated cultures improving the diagnostics of listeriosis.*

Key words: *Listeria*; nutrient medium; motility; lecithinase activity; pathogenic factor; diagnostics; identification.

For citation: Omarova S.M., Isaeva R.I., Bagandova D. Sh., Saidova P.S., Gorelova V.G. Development and study of nutrient media for determining the biological properties of *Listeria*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 110-114 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-110-114>

For correspondence: Omarova Salidat Magomedovna, Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology; e-mail: omarovanpo@mail.ru

Information about authors:

Omarova S.M., <https://orcid.org/0000-0002-4034-0742>;

Isaeva R.I., <https://orcid.org/0000-0001-5959-2125>;

Bagandova D.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0738-1008>;

Saidova P.S., <https://orcid.org/0000-0003-0236-891X>;

Gorelova V.G., <https://orcid.org/0000-0002-0210-4781>.

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

Acknowledgment. *This work was carried out within the framework of funding for the research work «NPO» Microgen».*

Received 29.09.2021

Accepted 20.10.2021

Published 23.02.2022

На этапе идентификации листерий используют ряд тестов, для подтверждения принадлежности выделенной культуры к *Listeria* spp. и установления принадлежности выделенной культуры к патогенному для человека виду *Listeria monocytogenes* [5–9, 11, 14, 19]. Предполагаемые колонии листерий, выросшие на селективных диагностических средах для дальнейшей идентифика-

ции и изучения, высевают на специальные питательные среды, используя тесты определения подвижности и лецитиназной активности листерий. Последний является показателем их патогенности [1–4, 13, 15].

Важным идентификационным тестом для *Listeria* spp. является тест на подвижность, в котором используется высокая подвижность клеток при 22–25° С и от-

сутствие подвижности при 37°С. Листерии, выросшие при 22°С, выглядят как тонкие короткие палочки с вращательной или подпрыгивающей активностью [12, 13]. Для определения подвижности листерий используют посев уколом в полужидкий агар. При 22°С для подвижной культуры листерий характерен специфический рост в форме зонтика. Помимо модификаций полужидких сред лабораторного приготовления для определения подвижности имеются специальные коммерческие среды ряда зарубежных фирм изготовителей, например, фирмы «Hi Media» (Индия).

Одним из важнейших факторов патогенности *L. monocytogenes* является лецитиназа, которая необходима для выживания листерий в процессе внутриклеточного паразитизма. Для выявления лецитиназной активности при культивировании на питательных средах, в которые добавлен лецитин, необходим гидрофобный сорбент, например, активированный уголь. Добавление активированного угля позволяет устранить из питательной среды секретлируемый листериями продукт, подавляющий выявление лецитиназной активности у *L. monocytogenes*. В результате в присутствии угля у *L. monocytogenes* наблюдается четко выраженная лецитиназная активность, которая при выращивании на плотных питательных средах даёт плотную зону помутнения вокруг колоний [10].

Для определения лецитиназной активности *L. monocytogenes*, предлагается ряд сред, в том числе среда ГРМ № 1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболонск) и HiMedia Motility medium фирмы «HiMedia» (Индия). Использование разных сред для постановки данного теста демонстрирует различия в индукции лецитиназной активности на средах одного наименования, выпускаемых разными фирмами изготовителями. Вероятно, это может быть связано с компонентным составом питательных сред и внешними условиями культивирования.

Цель исследования – создание отечественных коммерческих питательных сред для определения подвижности и лецитиназной активности листерий. Разработка сред целевого назначения пополнит комплекс мероприятий, проводимых при выделении и идентификации культур листерий из исследуемого материала различного происхождения.

В лабораторной практике для определения подвижности микроорганизмов используют полужидкие среды с различным содержанием агара: от 0,2 до 0,5%. При разработке рецептуры сухой питательной среды для определения подвижности листерий в сухой питательный бульон (СПБ на основе каспийской кильки, производства НПО «Питательные среды», Махачкала), взятый за основу как оптимальный для роста и размножения листерий, что было определено в ранее проведенных нами исследованиях при разработке сред для выделения, накопления и идентификации листерий (патенты РФ № 2158758; 2000 г. и № 2201957; 2001 г.), добавляли различные количества агара микробиологического (0,2–0,5%), натрия хлорида от 0,2 до 1,0%. Для усиления роста добавляли 2,0 г/л экстракта кормовых дрожжей (ЭКД). Это количество ЭКД определено в серии опытов как оптимальное.

Приступая к исследованию вариантов среды для определения подвижности тест-штаммов листерий, учитывали их способность и свойства проявлять подвижность только при температуре 22–25°С, так как при температуре (37±1)°С инкубации наступает тепловой

шок (стресс) микроорганизмов, вследствие чего они теряют подвижность [13]. Посевы инкубировали при температурах (23±1)°С и (37±1)°С.

Изучение свойств тест-штаммов листерий по тесту подвижности на экспериментальных сериях среды проводили согласно методическим рекомендациям на музейных и свежевыделенных штаммах *Listeria* spp. [10–12].

Исследования показали, что более благоприятным для определения подвижности листерий являлся образец с 3,0 г/л агара микробиологического, так как обеспечивал визуально регистрируемый учёт подвижности тест-штаммов при температуре (23±1)°С через 18±2 ч инкубации, при этом наблюдали, рост культур листерий по ходу укола петли в виде раскрывающегося зонтика. В среде с содержанием агара 2,0 г/л визуальный учёт затруднён, ввиду отсутствия четко видимого роста по ходу укола петли суточной культуры тест-штаммов. Изучение подвижности листерий в среде с 5,0 г/л микробиологического агара дал отрицательный результат: фиксировали рост листерий по уколу характерный для неподвижных микроорганизмов.

Установлено оптимальное содержание в среде для определения подвижности листерий агара микробиологического – 3,5 г/л и питательной основы СПБ – 15,0 г/л, позволявших проводить четкую регистрацию данного теста.

Биологическая характеристика предлагаемой среды изучена на широком наборе свежевыделенных штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала различного происхождения, предоставленном из музейной коллекции лаборатории легионеллёза ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава РФ. Среда обеспечивала визуальную регистрацию подвижности свежевыделенных штаммов *L. monocytogenes* в виде характерного роста в форме зонтика, через 18±2 ч инкубации при температуре (23±1)°С, тогда как на контрольной среде подвижность культур отмечена только через 36 ч культивирования (табл. 1).

Среды для определения лецитиназной активности обычно содержат питательную основу, буфер и *ex tempore* добавленный яичный желток. При работе с листериями имеются свои особенности. При культивировании на питательных средах, в которые добавлен лецитин, лецитиназная активность листерий выявляется чрезвычайно слабо или вообще не наблюдается. Это связано с негативной ауторегуляцией, которой подвергаются все гены патогенности *L. monocytogenes*. Исследованиями И. С. Тартаковского и соавт. [13] установлено, что секретлируемый листериями продукт, выполняющий функции ауторепрессора, может быть устранен из среды гидрофобным сорбентом, например, активированным углём. При этом происходит активация генов патогенности, следовательно, увеличение уровня факторов патогенности в среде, в том числе, лецитиназы [13, 16, 17].

Учитывая вышеизложенное, в питательную среду было введено различное количество активированного угля согласно МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» и ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». В каждый испытуемый образец *ex tempore* добавлено 5% желточной эмульсии.

В экспериментальных сериях с различными концентрациями активированного угля отмечены варианты ин-

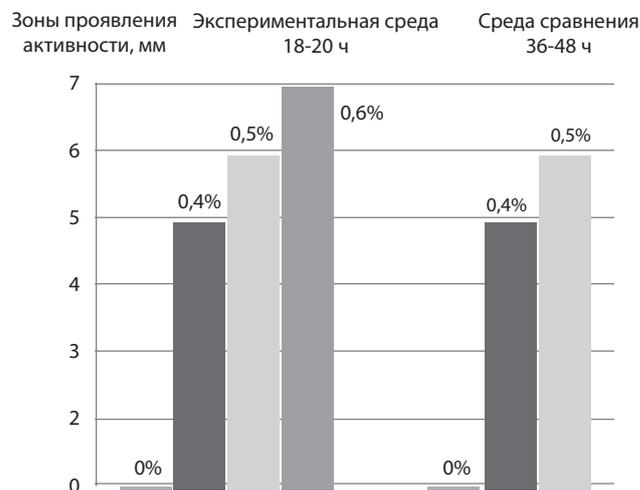
MICROBIOLOGY

дукции лецитиназной активности. Наиболее выражено лецитиназная активность выявлялась в образцах среды с активированным углём в концентрации 0,5% – у 12 исследованных штамма, ширина зоны помутнения среды – от 5 до 7 мм. У 12 штаммов выявлена активность лецитиназы в присутствии 0,2% активированного угля, но более слабая, чем при 0,5% (1–2 мм). Два штамма не обладали лецитиназной активностью, как в присутствии угля, так и без него. Отобран образец наиболее благоприятный для индукции лецитиназной активности листерий с концентрацией активированного угля 0,5 г/л.

Испытания среды для определения лецитиназной активности *L. monocytogenes*, в сравнении с отечественной средой ГРМ-1 (г. Оболенск), показали преимущество предлагаемого препарата по времени проявления лецитиназной активности (появления зон помутнения среды вокруг роста колоний). На испытуемой среде учет результатов был возможен через (18±2) ч, в то время как на среде сравнения не ранее, чем 36-48 ч. На наш взгляд, преимущество предлагаемой нами среды для определения лецитиназной активности перед аналогичной отечественной средой объясняется тем, что используемое нами сырьё – сухой питательный бульон из каспийской кильки превосходит по ростовым свойствам рыбную муку, применяемую при изготовлении среды ГРМ-1 (см. рисунок, табл. 2).

Свойства разработанной среды изучены на штаммах *L. monocytogenes*, предоставленных из коллекции лабори-

тории легионеллёза НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Среда обеспечивала чёткую регистрацию проявления лецитиназной активности свежевыделенными штаммами *L. monocytogenes* через 18±2 ч культивирования, тогда



Лецитиназная активность тест-штамма *L. monocytogenes* 4в в процессе культивирования на разработанной и контрольной средах с различным содержанием активированного угля: 0%, 0,4%, 0,5%, 0,6%.

Таблица 1

Определение подвижности свежевыделенных штаммов *L. monocytogenes* на экспериментальной среде и среде сравнения

Клинические штаммы <i>L. monocytogenes</i>	Визуальная характеристика роста	Экспериментальная среда (18±2) ч		Контрольная среда (HiMedia Motility medium)			
				(18±2) ч		(36±2) ч	
		Температура инкубации		Температура инкубации		Температура инкубации	
		(23±1)°C	(37±1)°C	(23±1)°C	(37±1)°C	(23±1)°C	(37±1)°C
401Л	Рост по ходу укола в виде зонтика	++	-	±	-	++	-
402Л	-//-	++	-	±	-	++	-
403Л	-//-	++	-	±	-	++	-
404Л	-//-	++	-	±	-	++	-
405Л	-//-	++	-	±	-	++	-
2Э	-//-	++	-	±	-	++	-
5Э	-//-	++	-	±	-	++	-
1109	-//-	++	-	±	-	++	-
1113	-//-	++	-	±	-	++	-
121У	-//-	++	-	±	-	++	-
1183	-//-	++	-	±	-	++	-
322Л	-//-	++	-	±	-	++	-
323Л	-//-	++	-	±	-	++	-
324Л	-//-	++	-	±	-	++	-
325Л	-//-	++	-	±	-	++	-
326Л	-//-	++	-	±	-	++	-
327Л	-//-	++	-	±	-	++	-
328Л	-//-	++	-	±	-	++	-
329Л	-//-	++	-	±	-	++	-
330Л	-//-	++	-	±	-	++	-
331Л	-//-	++	-	±	-	++	-
332Л	-//-	++	-	±	-	++	-
333Л	-//-	++	-	±	-	++	-

Примечание. (++) – наличие четко выраженного роста по уколу в виде зонтика; (-) – отсутствие роста; (±) – рост по уколу сомнительный.

Таблица 2

Сравнительное изучение лецитиназной активности *L. monocytogenes* на различных питательных средах

Исследованные штаммы	Предлагаемая среда		Среда ГРМ №1	
	с активированным углем 0,5%	без активированного угля	с активированным углем 0,5%	без активированного угля
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 5214 (4a)	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 10527 (4в)	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 213	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 7973	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 21	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 56	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 138	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 5348	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 55143	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 5214	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 10527	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 616	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> EGD	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 61/18	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 77	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. I	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> VСХИ-52	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. III	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. II	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> Тернополь	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> VСХИ-19	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> Бурьнь	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 944	+++	-	++	-
Время инкубации	18±2 ч	18±2 ч	36-48 ч	36-48 ч

Примечание. (+) – зона помутнения среды шириной 1-2 мм; (++) – зона помутнения среды шириной 2-4 мм; (+++) – зона помутнения среды шириной 5-7 мм; (-) – отсутствие зоны помутнения на среде.

как на среде сравнения проявление лецитиназной активности отмечали через 36-48 ч инкубации (табл. 2).

Таким образом, разработаны отечественные коммерческие сухие питательные среды для определения подвижности и лецитиназной активности культур *Listeria* spp. Качество сред достигнуто за счёт введения в состав сбалансированного количества ингредиентов, что обеспечивает чёткую идентификацию и дифференциацию *Listeria* spp. от других бактерий, сходных по морфологическим и биохимическим свойствам. Важнейшим элементом современных схем выделения листерий является применение дифференциально-диагностических питательных сред. Их использование значительно повышает эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами лабораторного изготовления.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 16-18 см. REFERENCES)

1. Беляева Н.М., Цурикова Н.Н., Трякина И.П. Листерииоз: этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение: учебное пособие. Москва: ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ; 2014.

2. Гальцева Г.В., Федоренко Л.М., Инжеватова В.Б., Буланова Е.Е. Лабораторная диагностика листериоза. *Успехи современного естествознания*. 2006; 1: 52-3.

3. Ермолаева С.А., Тартаковский И.С. Регуляция экспрессии факторов вирулентности у *L. monocytogenes*. *Микробиология*. 2001; 3: 106-10.

4. Зайцева Е.А., Сопов Г.П. Микробиологическая характеристика *L. Monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006; 2: 3-6.

5. Зайцева Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *L. monocytogenes*. Дис. д-ра мед. наук. Москва; 2010.

6. Ибрагимова М.Л. Современные аспекты листериозной инфекции (обзор литературы). *Вестник Алма-Атинского государственного института усовершенствования врачей*. 2016; 1: 75-80.

7. Каральник Б.В., Денисова Т.Г. Славко Е.А., Мека-Меченко Т.В., Тугамбаев Т.И. Лабораторная диагностика листериоза: проблемы и возможности. *Journal of central Asian health serves*. 2016; 10 (4): 46-51.

8. Кладова О.В., Анджель А.Е., Компаниец Ю.В., Гришкевич Н.Л. К вопросу дифференциальной диагностики листериоза. *Детские инфекции*. 2019; 18 (3): 61-6.

MICROBIOLOGY

9. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В., Бродина Н.С., Тартаковский И.С., Васкес-Боланд Х.А. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 3 (3): 266-73.
10. Листерииз: методические рекомендации Комитета здравоохранения № 11 г. Москвы. М.; 2001.
11. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах. Методические указания МУК 4.2.1122-02. М.: Минздрав России; 2002.
12. Омарова С.М., Исаева Р.И., Ахмедова Р.С. Микробиологические аспекты листериозной инфекции беременных и новорожденных. Махачкала: ИПЦ ДГМУ; 2017.
13. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002.
14. Храмов М.В., Костенко Ю.Г., Батаева. Листерииз: лабораторная диагностика в современных условиях: материалы II Национального конгресса бактериологов. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3): 299.
7. Karal'nik B.V., Denisova T.G., Slavko E.A., Meka-Mechenko T.V., Tugambaev T.I. Laboratory diagnosis of listeriosis: problems and opportunities. *Journal of central Asian health serves*. 2016; 10 (4): 46-51. (in Russian)
8. Kladova O.V., Angel A.E., Kompaniets Yu.V., Grishkevich N.L. On the issue of differential diagnosis of listeriosis. *Detskie infektsii*. 2019; 18 (3): 61-6. (in Russian)
9. Karpova T.I., Ermolaeva S.A., Lopyrev I.V., Brodinova N.S., Tartakovskiy I.S., Vasquez-Boland H.A. New methods for identifying *Listeria monocytogenes*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2001; 3 (3): 266-73. (in Russian)
10. Listeriosis. Methodical recommendations (No. 11) of the Moscow health committee. Moscow; 2001. (in Russian)
11. Control methods. Biological and microbiological factors. Organization of control and methods for detecting *Listeria monocytogenes* bacteria in food. МУК 4.2.1122-02. Moscow: Minzdrav RF; 2002. (in Russian)
12. Omarova S.M., Isaeva R.I., Akhmedova R.S. Microbiological aspects of listeria infection in pregnant women and newborns. Makhachkala: Informatsionno-pechatnyi tsentr Dagestanskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta; 2017. (in Russian)
13. Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. Listeria: role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. Moscow: Meditsina dlya vseh; 2002. (in Russian)
14. Khramov M.V., Kostenko Yu.G., Bataeva. Listeriosis: laboratory diagnostics in modern conditions: materials of the II National Congress of Bacteriologists: materials of the II National Congress of Bacteriologists. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3): 299. (in Russian)
15. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskiy I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 174: 137-41.
16. Peel M., Donachie W., Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDC-PAGE and Western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 1988; 143: 2171-8.
17. Vazquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S. et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell- to-cell spread. *Infect. Immun.* 1992; 60 (1): 219-30. DOI: 10.1128/iai.60.1.219-230.
18. Weaver R.F. Morphological, physiological, and biochemical characterization. In book: James G.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. US Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta; 1989: 39-43.

REFERENCES

1. Belyaeva N.M., Tsurikova N.N., Tryakina I.P. Listeriosis: etiology, epidemiology, clinic, diagnosis, treatment: textbook. Moscow: GBOU DPO RMAPO Minzdrava RF; 2014. (in Russian)
2. Galtseva G.V., Fedorenko L.M., Inzhevatoва V.B., Bulanova E.E. Laboratory diagnostics of listeriosis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2006; 1: 52-3. (in Russian)
3. Ermolaeva S.A., Tartakovskiy I.S. Regulation of expression of virulence factors in *L. monocytogenes*. *Mikrobiologiya*. 2001; 3: 106-10. (in Russian)
4. Zaitseva E.A., Sopov G.P. Microbiological characteristics of *L. monocytogenes* isolated from various sources in Primorsky Krai. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; 2: 3-6. (in Russian)
5. Zaitseva E.A. System for the analysis of microbiological and molecular genetic markers for the detection of highly virulent strains of *L. monocytogenes*. Dis. Moscow; 2010. (in Russian)
6. Ibragimova M.L. Modern aspects of listeriosis infection (literature review). *Vestnik Alma-atinskogo gosudarstvennogo instituta usovershenstvovaniya vrachey*. 2016; 1: 75-80. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Хамитова И. В.¹, Лаврентьева И. Н.¹, Семёнов А. В.²

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ГРУППАХ РИСКА

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 197101, Санкт-Петербург, Россия;

²Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 620030, Екатеринбург, Россия

Парвовирусная инфекция (ПВИ) широко распространена, характеризуется воздушно-капельным, гемотрансмиссивным и вертикальным путями передачи. Парвовирус В19 (PVB19) проявляет тропность к быстроделяющимся клетками эритропоэтического ряда. По принципу повышенной вероятности инфицирования PVB19 и серьёзности последствий, к группе повышенного риска относятся иммунокомпрометированные лица, особенно с гематологическими проявлениями заболеваний. На основании результатов собственных исследований и анализа данных литературы предложены алгоритмы лабораторного обследования на ПВИ в отдельных группах риска с учётом особенностей развития и проявления ПВИ в каждой группе: у ВИЧ инфицированных, у больных онкогематологического профиля, которым показана аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) (реципиенты крови и костного мозга), у больных с хроническими анемиями паразитарной этиологии. Для каждой группы определён основной клинический или лабораторный показатель, медицинская процедура или физиологическая характеристика больного, исходя из которых исследование на ПВИ является целесообразным. Для ВИЧ-инфицированных пациентов основным критерием обследования на ПВИ является стойкая анемия. Для пациентов онкогематологического профиля основанием для обследования на ПВИ является процедура алло-ТГСК, которая планируется или проводится данному больному. Для больных малярией – возраст больного, так как именно у детей младшего возраста коинфицирование малярийным плазмодием и парвовирусом В19 может явиться фатальным. Использование предложенных алгоритмов диагностики ПВИ в группах риска может способствовать выявлению причин неблагоприятного развития основного заболевания, связанных с инфицированием PVB19, и своевременной коррекции применяемой терапии.

Ключевые слова: парвовирусная инфекция; парвовирус В19; алгоритм лабораторной диагностики; группа риска; алло-ТГСК; малярия; ВИЧ-инфекция.

Для цитирования: Хамитова И. В., Лаврентьева И. Н., Семёнов А. В. Алгоритм лабораторной диагностики парвовирусной инфекции в группах риска. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 115-122.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-115-122>

Для корреспонденции: Хамитова Ирина Викторовна, канд. биол. наук, зав. центральной клинико-диагностической лабораторией; e-mail: div-o@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2021

Принята к печати 25.06.2021

Опубликовано 23.02.2022

Khamitova I. V.¹, Lavrentieva I. N.¹, Semenov A. V.²

ALGORITHM FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF PARVOVIRAL INFECTION IN RISK GROUPS

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint Petersburg, Russia;

²Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, 620030, Ekaterinburg, Russia

Parvovirus infection (PVI) is widespread, characterized by airborne, bloodborne and vertical transmission routes. Parvovirus B19 (PVB19) exhibits tropism to erythropoietic cells. According to the increased likelihood principle of PVB19 infection and the severity of the consequences, immunocompromised individuals, especially those with hematological manifestations of diseases, are in increased risk group. Based on the own research results and analysis of the published data, we have proposed specific algorithms for PVI laboratory testing in individual risk groups, taking into account the peculiarities of the development and infection manifestation in each group: in HIV-infected patients, in oncohematological patients to whom allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) have been prescribed (blood and bone marrow recipients), as well as in patients with chronic anemia of parasitic etiology. For each group, the main clinical or laboratory marker, treatment procedure, or patient physiological parameters have been determined, based on which it was recommended to test for PVI. For HIV-infected patients, the main criterion for PVI testing is persistent anemia. For oncohematological patients, the basis for PVI testing is allo-HSCT procedure, which is planned or performed for this particular patient. For malaria patients, the patient's age was considered as major criterion, since in malaria and PVI coinfecting young children can lead to a fatal outcome. The proposed PVI diagnostics algorithms use in risk groups can help to predict the severe course of underlying disease associated with PVB19 infection, and timely correct the therapy used.

Key words: parvovirus infection; parvovirus B19; laboratory diagnostic algorithm; risk group; allo-HSCT; malaria; HIV-infection.

For citation: Khamitova I. V., Lavrentieva I. N., Semenov A. V. Algorithm for laboratory diagnostics of parvoviral infection in risk groups. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 115-122 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-115-122>

For correspondence: Khamitova I.V., candidate of biological sciences, Chief, Central Clinic Diagnostics Laboratory; e-mail: div-o@mail.ru

Information about authors:

Khamitova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-1966-7860>;
Lavrentieva I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>;
Semenov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 13.06.2021

Accepted 25.06.2021

Published 23.02.2022

Введение. Парвовирусная инфекция (ПВИ) – вирусное заболевание, широко распространённое в мире. Основной путь передачи ПВИ – воздушно-капельный. Инфицирование может происходить при переливании крови или её компонентов, при пересадке органов и тканей, трансплацентарно от матери к плоду [1, 2]. Распространённость РVВ19-специфических IgG-антител в популяции зависит от возраста: от 2 до 20% у детей в возрасте до 5 лет, от 15 до 40% у детей в возрасте от 5 до 18 лет и от 40 до 80% у взрослого населения [2-4]. Заражение РVВ19, как правило, происходит в детском и подростковом возрасте.

Возбудитель ПВИ – парвовирус В19 (РVВ19) проявляет тропность к клеткам эритроидного ростка костного мозга (прерывает эритропоэз), эмбриональным тканям печени, селезёнки, сердца, кишечника; зрелым гранулоцитам, мегакариоцитам; эндотелиальным гладкомышечным клеткам сосудов, тканям плаценты.

РVВ19 является патогенным вирусом человека и причиной многих заболеваний. ПВИ может быть связана с широким спектром патологий и клинических проявлений – от бессимптомных или доброкачественных форм до угрожающих жизни состояний. Тяжесть заболевания зависит от возраста, иммунного и гематологического статуса инфицированных людей. Продуктивная репликация РVВ19 в костном мозге при острой инфекции ведёт к гибели эритробластов, обуславливает вирусемию, ведущую к системному распространению вируса и может быть причиной поздних клинических проявлений. ПВИ может иметь тяжёлые последствия для пациентов с иммунодефицитными состояниями. По принципу повышенной вероятности возникновения ПВИ и серьёзности последствий инфицирования, зависящих от механизмов патогенеза, отсутствия иммунитета и неспособности организма адекватно реагировать на развитие ПВИ, можно выделить следующие группы повышенного риска: онкобольные, ВИЧ-инфицированные, больные с врождёнными нарушениями иммунной системы (ПИД), больные с хроническими гемолитическими заболеваниями, пациенты в состоянии иммуносупрессии, перенесшие операцию по пересадке органов или костного мозга, больные хроническими инфекционными заболеваниями. У таких пациентов ПВИ может спровоцировать тяжёлые формы анемии, скоротечный апластический криз, васкулиты, артриты, миокардиты, неврологические расстройства, гепатиты, отторжение трансплантата [5-13].

Лабораторный диагноз инфекции РVВ19 опирается на многопараметрический подход, максимально сочетающий как детекцию вируса, так и оценку ответной иммунной реакции организма на ПВИ. В связи со схожестью симптоматики с другими экзантемными и аутоиммунными заболеваниями необходимы методы, которые позволят установить этиологию заболевания и провести дифференциальную диагностику [14]. Обнаружение ви-

русспецифических антител (IgM, IgG) в крови является основным методом рутинной лабораторной диагностики ПВИ. Тесты, определяющие ДНК вируса, дают дополнительную ценную информацию о вирусемии и присутствии парвовируса В19 в тканях [15, 16].

Накоплен большой опыт в лабораторной диагностике ПВИ, продолжается разработка более совершенных диагностических методов и алгоритмов определения патогенетической роли РVВ19 в заболеваниях человека. В литературе отсутствуют данные по алгоритмам лабораторной диагностики ПВИ в отдельных группах риска (больные с иммунодефицитными состояниями, онкогематологические больные, больные с паразитарными заболеваниями).

Цель – разработать алгоритм лабораторной диагностики ПВИ у лиц из отдельных групп риска: ВИЧ-инфицированные; больные онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК (реципиенты крови и костного мозга); больные с хроническими анемиями паразитарной этиологии.

Материал и методы. В период 2016-2020 гг. на лабораторные маркёры ПВИ (ДНК РVВ19, и/или IgM-антитела и/или IgG-антитела) исследованы образцы плазмы крови пациентов в возрасте 23-57 лет с подтверждённой ВИЧ-инфекцией ($n=231$); образцы крови детей и подростков в возрасте 0,6-19 лет ($n=54$), которым выполнялась аллогенная трансплантация стволовых клеток (алло-ТГСК). Большинство обследованных (49 из 54) наблюдали в течение 2 месяцев после алло-ТГСК. Образцы плазмы крови больных в возрасте 0,25-65 лет с подтверждённым диагнозом «малярия» ($n=316$). Клинически заболевание протекало в «неосложнённой» или «осложнённой» формах. Подробно результаты исследований опубликованы ранее [17-20].

Особенностью, выявленной в некоторых группах риска, например, у детей с онкогематологическими заболеваниями, явилось отсутствие в образцах крови IgM-антител к РVВ19. При этом обнаруживались специфические IgG антитела к РVВ19 и ДНК вируса, что свидетельствует о наличии инфекционного процесса. Очевидна необходимость применения специальных алгоритмов лабораторного обследования больных из групп риска на маркёры ПВИ, отличающихся от общепринятых протоколов диагностики большинства инфекционных заболеваний, согласно которым наличие IgM-антител в клинических образцах трактуется как показатель острой инфекции, а иммуноглобулины класса М определяются в первую очередь.

Результаты и обсуждение. **ВИЧ-инфицированные пациенты.** Вирусные коинфекции у пациентов с ВИЧ-позитивным статусом, приводящие к изменению степени тяжести течения этих инфекций – важная проблема здравоохранения. Анемия является одним из осложнений ВИЧ-инфекции [25]. Парвовирус В19 можно рас-

смаивать в качестве одного из вероятных этиологических агентов возникновения и развития анемии при ВИЧ-инфекции.

При обследовании 231 пациента с ВИЧ-инфекцией на наличие IgG-антител, серопревалентность к PVB19 в целом составила $79,2 \pm 2,67\%$. В возрастной группе 23-30 лет IgG антитела обнаруживались в $54,2 \pm 2,67\%$ случаев. У пациентов 31-40 лет и 41-50 лет специфические IgG к PVB19 выявлялись в $83,3 \pm 4,22\%$ и $80,0 \pm 6,32\%$ образцов соответственно. В возрастной группе 50 лет и старше доля серопозитивных снижалась до $46,2 \pm 13,83\%$, что возможно связано угнетением гуморального иммунного ответа до неопределяемого уровня из-за нарушений иммунного ответа ВИЧ инфицированных пациентов [17]. В 2,6% случаев в образцах крови обнаружена ДНК PVB19 с низким уровнем вирусной нагрузки. Эти показатели согласуются с результатами работ А. Abdollahi и соавт. [21] и R.F. Pereira и соавт. [22]. Несмотря на достаточно высокую серопревалентность к PVB19, около половины обследованных пациентов в возрасте до 30 лет, в возрасте 51 год и старше не имели защитных антител к PVB19. Такие пациенты находятся в группе риска по первичному инфицированию PVB19.

У двух ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфицированием PVB19 наблюдалась стойкая анемия, что позволяет предполагать её связь с ПВИ (табл. 1).

Описанные в литературе случаи стойкой анемии, явившейся результатом аплазии эритроцитарного роста костного мозга, имеют тяжёлые проявления, рецидивирующее течение и сложно поддаются лечению. При своевременной диагностике и терапии внутривенными иммуноглобулинами анемия компенсируется [23-26].

Для ВИЧ-инфицированных пациентов основным критерием обследования на ПВИ является стойкая анемия. В случаях хронической (стойкой) анемии у пациентов с ВИЧ-инфекцией рекомендуется определение ДНК PVB19 в крови методом ПЦР и определение специфических IgG к PVB19 методом ИФА. Если ДНК PVB19 и специфические IgG к PVB19 не выявлены, то этиологическим агентом анемии парвовирус В19 не является, но при этом сохраняется высокий риск инфицирования PVB19. Отсутствие ДНК PVB19 и наличие IgG свидетельствует о том, что анемия пациента не связана с инфицированием парвовирусом В19, при этом риск заражения расценивается как низкий.

В случае обнаружения ДНК PVB19 и отсутствия специфических IgG к PVB19, рекомендуется провести исследование на маркер острой ПВИ – IgM к PVB19. В случае обнаружения IgM PVB19 речь идёт о недавнем инфицировании и острой инфекции, о высоком риске прогрессирования анемии. Отсутствие IgM к PVB19 может свидетельствовать о хронической ПВИ на фоне угнетения гуморального иммунного ответа до неопределяемого уровня из-за нарушений иммунного ответа

ВИЧ-инфицированных пациентов. Что влечет высокий риск прогрессирования анемии и отягощения течения основного заболевания.

Обнаружение ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 позволяет говорить о хронической ПВИ и о возможной роли парвовируса В19 в развитии анемии.

Для оценки риска развития анемии, ассоциированной с ПВИ, пациентам с ВИЧ-инфекцией рекомендуется использовать серологические методы определения специфических иммуноглобулинов к PVB19 в сыворотке/плазме крови и определение ДНК PVB19 согласно разработанному алгоритму (рис. 1).

Больные онкогематологического профиля (реципиенты костного мозга). В исследовании включены больные онкогематологическими заболеваниями, которым проводилась алло-ТГСК. В когорте обследованных больных серопревалентность составила $68,5-80,4\%$, что более чем в 2 раза выше, чем среди здорового населения той же возрастной категории [1, 4, 18, 20]. Средние значения уровня анти-PVB19 IgG составили $21,7-24,8$ МЕ/мл. ДНК PVB19 определялась в $29,4-34,8\%$ случаев (рис. 2). Ни в одном образце крови не обнаружены специфические антитела IgM к PVB19.

Парвовирус В19, выявленный как в исходных пробах, так и через 30-60 суток после алло-ТГСК, с высокой степенью вероятности стал причиной развития целого ряда неблагоприятных реакций: развития нейтро- и тромбоцитопений ($r = -0,422$; $p = 0,002$, $r = -0,422$; $p = 0,001$ соответственно), замедление восстановления количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови ($r = -0,281$; $p = 0,02$; $r = -0,303$, $p = 0,01$ соответственно), нарушение приживления трансплантата ($r = 0,315$; $p = 0,034$).

Достоверная корреляция выявлена между исходной вирусной нагрузкой (до алло-ТГСК) и уровнями IgG-антител к парвовирусу в разные сроки наблюдения. Наиболее отчетливо установлена зависимость между наличием ДНК PVB19 до алло-ТГСК и интенсивностью гуморального ответа через 60 сут после алло-ТГСК (до алло-ТГСК: $r = 0,367$, $p = 0,003$; на 30 день: $r = 0,274$, $p = 0,02$; на 60 день: $r = 0,461$, $p = 0,0004$). Медицинская значимость повышения уровня IgG к парвовирусу В19 для данной группы больных состояла в нарушении приживления трансплантата, которое, в целом, выявлялось чаще через 60 сут после алло-ТГСК ($r = 0,315$; $p = 0,034$; $n = 46$).

Показана достоверная корреляция между низким содержанием нейтрофилов и тромбоцитов (в меньшем мере – эритроцитов) в крови больных и повышенными концентрациями вирусспецифических IgG-антител. Это может свидетельствовать о связи между продолжительной персистенцией парвовируса и замедленным восстановлением гемопоэза в сроки 30-60 суток после алло-ТГСК.

Наличие в крови вирусной В19 ДНК на 30 сут после алло-ТГСК ассоциировано с фебрильной нейтропенией

Таблица 1

Гематологические показатели ВИЧ-инфицированных пациентов, с выявленной ДНК PVB19

Пациенты	Возраст, годы	Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/л$ (референсный интервал: ж. – 3,9-4,7; м. – 4,0-5,0)	Количество лейкоцитов, $\times 10^9/л$ (референсный интервал: 4,0-9,0)	Количество тромбоцитов, $\times 10^9/л$ (референсный интервал: 180,0-320,0)	ДНК PVB19, МЕ /мл
Женщины	31	2,8	4,2	165	2279
Мужчины	42	3,6	4,5	190	218

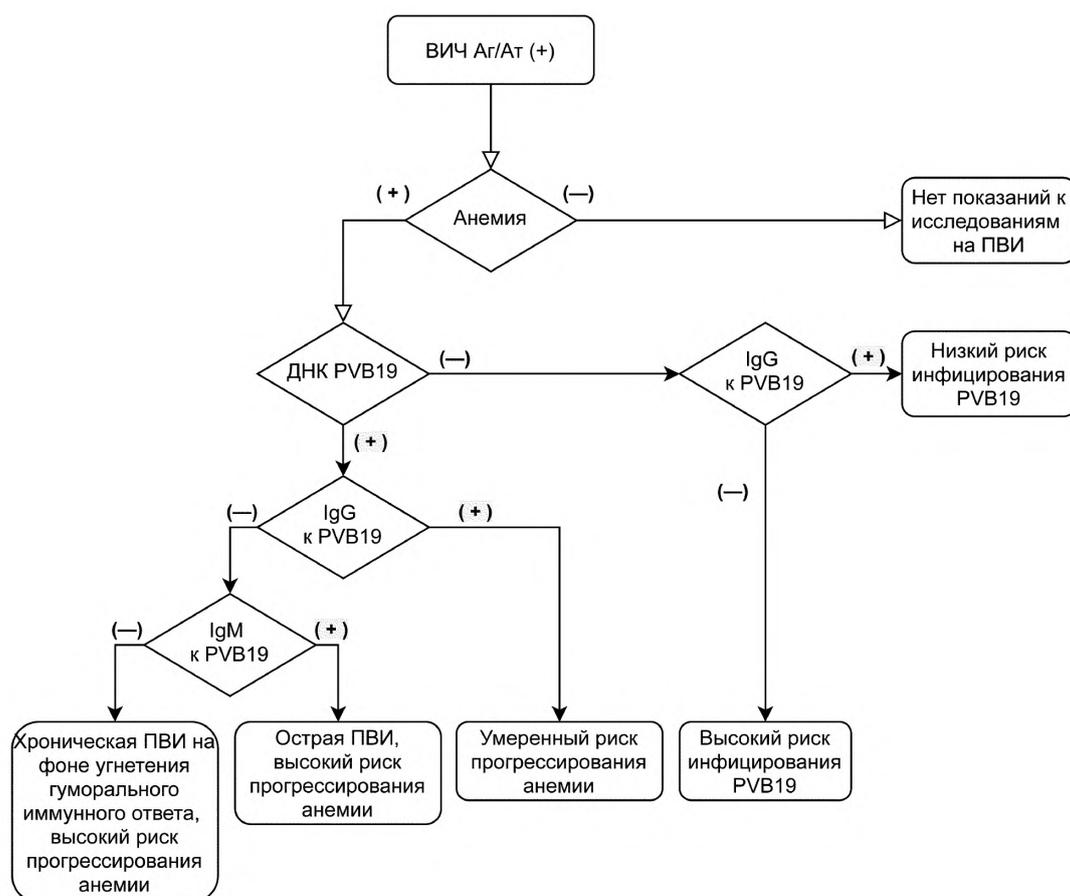


Рис. 1. Схема обследования ВИЧ-инфицированных пациентов на маркёры ПВИ.

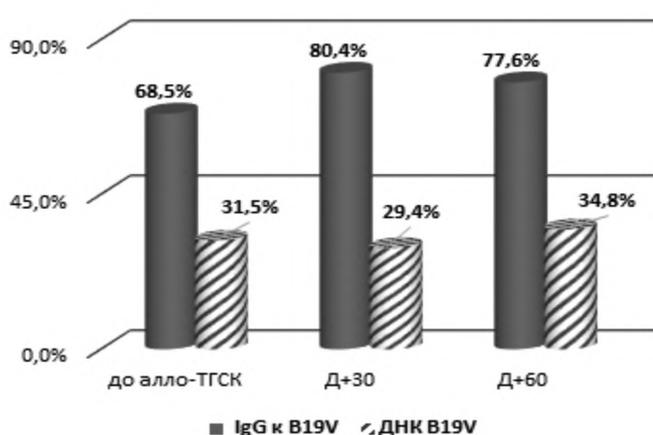


Рис. 2. Выявление IgG-антител и ДНК PVB19 в различные сроки наблюдения у больных до алло-ТГСК, на 30-й и 60-й день после алло-ТГСК.

в эти сроки – в 100% случаев (14/14), тогда как при отсутствии ДНК парвовируса фебрильная нейтропения отмечалась у 68% больных (23/34) ($p=0,016$; $RR=1,478$; $95\% CI: 1,172-1,865$).

По данным ряда авторов, распространённость PVB19 у детей, перенесших трансплантацию, составляет 9,3%. Вирусная нагрузка ДНК PVB19 с вероятностью недав-

ней первичной инфекции выше, чем у взрослых пациентов, у которых чаще наблюдалась реактивация ПВИ. Вирусная нагрузка коррелировала с анемией и иммуносупрессией [27, 28].

В целом полученные в данной группе больных результаты доказывают, что инфицирование парвовирусом B19 может отягощать течение основного заболевания у пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Для данной категории пациентов рекомендуется определять маркёры ПВИ до проведения алло-ТГСК и через 30/60 дней после алло-ТГСК. Рекомендуется определение парвовирусной ДНК в крови методом ПЦР и количественное определение специфических IgG к PVB19 методом ИФА (рис. 3).

Отсутствие ДНК PVB19 и отсутствие специфических IgG к PVB19 как до трансплантации, так и после нее, расценивается как повышенный риск инфицирования парвовирусом B19 и требует наблюдения в динамике. В случае отсутствия ДНК PVB19 и наличия специфических IgG к PVB19 риск инфицирования снижается.

В случае обнаружения ДНК PVB19 и отсутствия IgG к PVB19 рекомендуется исследование на маркёр острой ПВИ – IgM к PVB19 для подтверждения острой ПВИ. В случае обнаружения IgM к PVB19 речь идёт о недавнем инфицировании и острой инфекции, риск возникновения осложнений высокий.

При обнаружении ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 выше 20 МЕ/мл до трансплантации можно говорить о хронической ПВИ, при этом имеется высокий риск

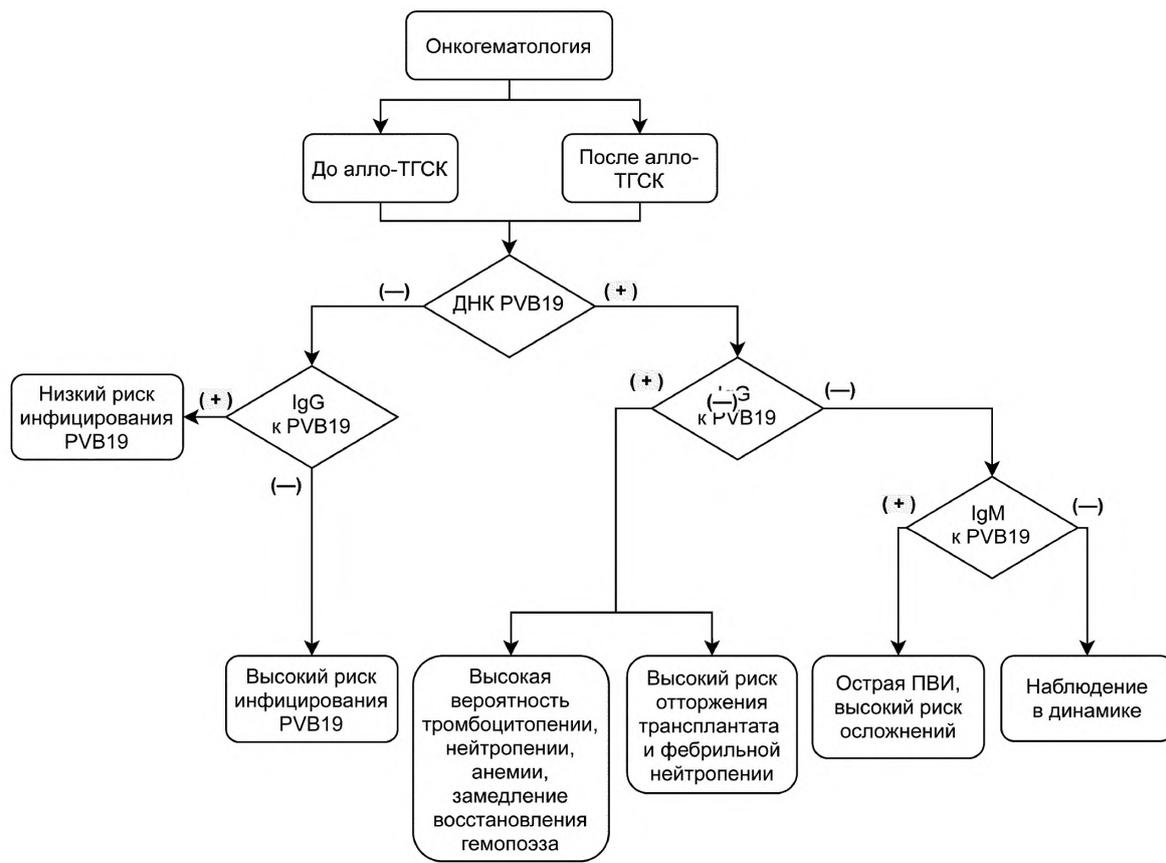


Рис. 3. Схема обследования больных онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК на маркеры ПВИ.

Таблица 2

Влияние инфицирования PVB19 на течение заболевания у больных малярией (M±m)

Течение малярии	Количество больных, в том числе, умерших, абс / %	Обнаружение ДНК PVB19	
		ДНК PVB19 «+», абс / %	ДНК PVB19 «-», абс / %
Неосложнённое	177/56,0±2,79	15/27,3±2,75	162/62,1±3,0
Осложнённое	139/44,0±2,79	40/72,7±2,75	99/37,9±3,0
В том числе, летальный исход	8 / 2,53%	6 / 10,9%	2 / 0,8%
Всего	316/100	55/17,4±2,13	261/82,6±2,13

нарушения приживления трансплантата, развития нейтропении и тромбоцитопении, замедления восстановления эритроцитов и тромбоцитов после алло-ТГСК. Обнаружение ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 выше 20 МЕ/мл после алло-ТГСК свидетельствует о продолжительной персистенции парвовируса, при этом сохраняется высокий риск развития фебрильной нейтропении.

Хронические анемии паразитарной этиологии (малярия). Хронические анемии, вызванные простейшим рода *Plasmodium*, широко распространены в местностях, эндемичных по малярии. По сведениям ряда авторов, инфицирование PVB19 может спровоцировать тяжёлое течение малярии [29-31].

У серонегативных лиц при первичном инфицировании парвовирус в острой фазе может вызывать нарушение образования эритроцитов вплоть до 5-7 дней, что ведёт к значительному снижению гемоглобина [32]. Эритроциты являются основной мишенью малярийного плазмодия, который, размножаясь, разрушает их и вызывает анемию различной степени тяжести. Инфициро-

вание ПВИ происходит на фоне снижения клеточного иммунитета, вызванного *P. falciparum* [33, 34]. В эндемичных для малярии регионах тяжёлые формы анемии являются главной причиной детской смертности, составляя от 17 до 54% случаев [35].

В нашем исследовании в группе с коинфицированием PVB19 и *P. falciparum* показатели осложнений и смертности оказались существенно выше [19] и наблюдались у 40 из 55 (72,7±2,75%) пациентов, причём в 6 случаях (10,9±4,40%) заболевание закончилось смертью (табл. 2).

В группе больных малярией без ПВИ осложнения имели место у 99 из 261 больного (37,9±3,0%); из них умерли 2 (0,8±0,54%) человека. Вероятность развития осложнённого течения малярии при сочетанной инфекции достоверно выше, чем при отсутствии ПВИ ($p < 0,0001$; RR=1,917; 95% CI: 1,532-2,399). Негативное влияние инфицирования PVB19 на течение малярии особенно выражено у детей младшего возраста (рис. 4).

Среди детей до пяти лет абсолютное большинство случаев сочетанной ПВИ – 93,8±6,05% от общего коли-



Рис. 4. Распределение неосложнённого и осложнённого течения малярии с сочетанной парвовирусной инфекцией в разных возрастных группах.

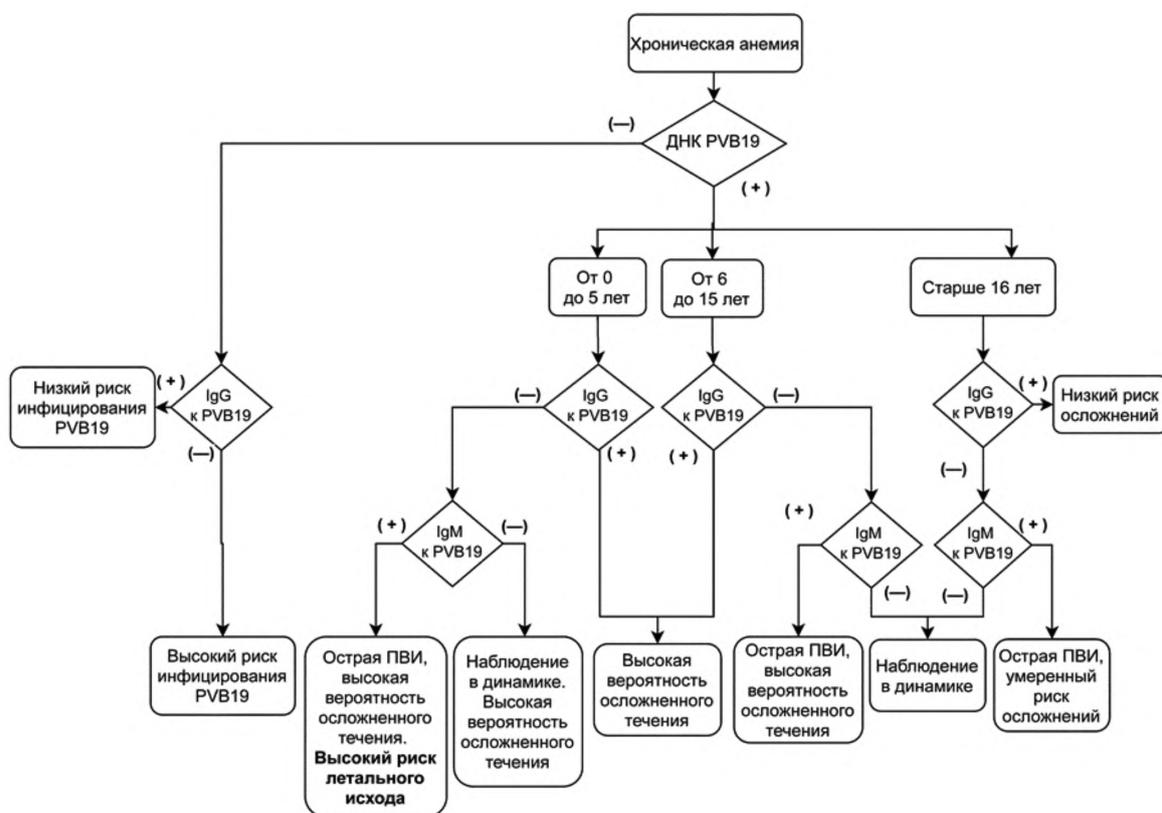


Рис. 5. Схема обследования больных с хронической анемией (паразитарной этиологии) на маркеры ПВИ.

чества детей данной возрастной группы – сопровождалось осложнённым течением малярии, что достоверно выше, чем при отсутствии ПВИ ($p=0,0001$; $RR = 2,44$; $95\% CI: 1,780-3,357$). В этой же группе инфицирование PVB19 достоверно чаще приводило к смерти больного ($p=0,0003$; $RR = 13,688$; $95\% CI: 3,034-61,740$).

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей по изучению сочетанной ПВИ-малярийной инфекции у детей в регионах с высоким уровнем заболеваемости малярией: среди детей до 5 лет абсолютное большинство случаев ПВИ сопровождалось осложнённым течением малярии [32, 34].

Для оценки риска возникновения осложнённого течения основного заболевания (паразитарная инфекция

малярийным плазмодием), сопровождающегося хронической анемией, рекомендуется определять ДНК PVB19 в крови больного методом ПЦР и IgG к PVB19. Степень риска развития тяжёлого клинического течения болезни зависит от возраста больного, который рекомендуется оценивать в трёх возрастных группах: дети до 5 лет и подростки 6-15 лет и возрастная группа 16 лет и старше (рис. 5).

Случаи отсутствия ДНК PVB19 и отсутствия антител IgG к PVB19 в крови больного расцениваются как высокий риск инфицирования парвовирусом B19. При отсутствии ДНК PVB19 и обнаружении специфических антител IgG к парвовирусу пациент имеет иммунитет, риск инфицирования низкий.

Обнаружение ДНК парвовируса в крови больного малярией при отсутствии специфических антител IgG к парвовирусу может свидетельствовать о недавнем инфицировании (инкубационный период, стадия вiremии). Для подтверждения острой инфекции рекомендуется определять специфические IgM. При наличии IgM-антител риск возникновения осложнений (временная аплазия эритроцитарного ростка, снижение количества эритроцитов) – высокий. Если специфические IgM не обнаружены, рекомендуется наблюдение в динамике.

Для возрастной группы до 5 лет наличие ДНК в крови как при отсутствии, так и при обнаружении специфических антител к PVB19 расценивается как высокий риск осложнённого течения малярии с угрозой летального исхода. Для детей и подростков 6-15 лет риск утяжеления состояния, прогрессирования анемии высок, но риск летального исхода значительно снижается. В старшей возрастной группе от 16 лет и старше при вiremии в крови и обнаружении специфических антител IgG к PVB19 существует низкий риск возникновения осложнений.

Заключение. Исходя из полученных результатов и на основании имеющихся в литературе данных, предложены алгоритмы лабораторного обследования на ПВИ в группах риска с учётом особенностей развития и проявления ПВИ в каждой группе. Для каждой группы риска определён основной клинический или лабораторный показатель, медицинская процедура или физиологическая характеристика больного, исходя из которых исследование на ПВИ является целесообразным. Для ВИЧ-инфицированных пациентов основным критерием обследования на ПВИ является стойкая анемия. Для пациентов онкогематологического профиля основанием для обследования на ПВИ является процедура аллотрансфузии, которая планируется или проводится данному больному. Основопологающим фактором обследования больных малярией является возраст больного, так как именно у детей младшего возраста коинфицирование малярийным плазмодием и парвовирусом B19 может являться фатальным. Использование предложенных алгоритмов диагностики ПВИ в группах риска может способствовать выявлению причин неблагоприятного развития основного заболевания, связанных с инфицированием PVB19, и своевременной коррекции применяемой терапии.

PVB19 является активно циркулирующим вирусом: лабораторные маркеры ПВИ широко распространены в группах риска (больные с вторичными иммунодефицитами, обусловленными вирусными и паразитарными заболеваниями, пациенты онкогематологического профиля) и с высокой степенью достоверности коррелируют с отягощением течения основного заболевания [8, 17-35], что подтверждает высокую медицинскую значимость ПВИ инфекции для этой категории больных.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4–16, 18, 21-35
см. REFERENCES)

3. Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Москалева Т.Н. Оценка распространения парвовирусной инфекции в Москве. Информационное письмо. Комитет здравоохранения г. Москвы. М.; 2004.

17. Хамитова И.В., Антипова А.Ю., Семёнов А.В., Лаврентьева И.Н. Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции у лиц с вторичными иммунодефицитами. Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Москва, 28-30 марта 2016 г. *Инфекционные болезни*. 2016; 14 (Приложение 1): 294.

19. Лаврентьева И.Н., Хамитова И.В., Слита А.В., Левковский А.Е., Диало А.А., Диало А.К., Соу Т.С., Найденова Е.В., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М. Влияние коинфицирования PVB19 и Plasmodium Falciparum на течение и прогноз малярии. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(3): 383-7.

20. Хамитова И.В., Лаврентьева И.Н., Левковский А.Е., Останкова Ю.В., Семенов А.В. Влияние коинфицирования PVB19 и P. Falciparum на течение и прогноз малярии у детей Гвинейской Республики. Всероссийский ежегодный конгресс «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» 11-12 октября 2018 г., Санкт-Петербург. *Журнал инфектологии*. 2018; 10(4) (Приложение 1): 138.

REFERENCES

1. Satake M., Hoshi Y., Taira R., Momose S.Y., Hino S., Tadokoro K.. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion*. 2011; 51(9): 1887-95.

2. Qiu J., Söderlund-Venermo M., Young N.S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017; 30(1): 43-113.

3. Tikhonova N.T., Gerasimova A.G., Moskaleva T.N. Assessment of the spread of parvovirus infection in Moscow. Information mail. Moscow Health service committee. Moscow; 2004. (in Russian)

4. Mor O., Ofir I., Pavel R., Bassal R., Kra-Oz Z., Cohen D. et al. Parvovirus B19V infection in Israel: prevalence and occurrence of acute infection between 2008 and 2013. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(1): 207-14.

5. Krishnan P., Ramadas P., Rajendran P.P., Madhavan P., Alex A., Jayaschandran V. et al. Effects of Parvovirus B19 Infection in Renal Transplant Recipients: A Retrospective Review of Three Cases. *Int. J. Angiol.* 2015; 24(2): 87-92.

6. Douvouiannis M., Litman N., Goldman D.L. Neurologic manifestations associated with parvovirus B19 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 1713-23.

7. Invernizzi R., Bastia R., Quaglia F. Pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in a heart transplant recipient. *Clin. Case Rep.* 2016; 4: 870-1.

8. Bihari C., Rastogi A., Saxena P., Rangegowda D., Chowdhury A., Gupta N. et al. Parvovirus b19 associated hepatitis. *Hepat. Res. Treat.* 2013. URL: <https://europepmc.org/article/pmc/3819764>.

9. Escher F., Modrow S., Sabi T., Kühl U., Lassner D., Schultheiss H.P. et al. Parvovirus B19 profiles in patients presenting with acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy. *Med. Sci. Monit.* 2008; 14: 589-97.

10. Fritch Lilla S.A., Burgett S.E., McGann K.A., Wechsler D.S. Persistent and prolonged parvovirus B19 viremia in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2015; 4: 38-40.

11. Marco H., Guermah I., Matas L., Hernández A., Navarro M., Lopez D. et al. Postinfectious glomerulonephritis secondary to erythrovirus B19 (Parvovirus B19): Case report and review of the literature. *Clin. Nephrol.* 2016; 85: 238-44.

12. Lundqvist A., Tolfvenstam T., Brytting M., Stolt C.M., Hedman K., Broliden K. Prevalence of parvovirus B19 DNA in bone marrow of patients with haematological disorders. *Scand. J. Infect. Dis.* 1999; 31(2): 119-22.

13. Waldman M., Kopp J.B. Parvovirus B19 and the kidney. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2: 47-56.

14. Rezaei F., Sarshari B., Ghavami N., Meysami P., Shadab A., Salimi H. et al. Prevalence and genotypic characterization of Human Parvovirus B19 in children with measles- and rubella-like illness in Iran. *J. Med. Virol.* 2016; 88(6): 947-53.

15. Gallinella G., Zuffi E., Gentilomi G., Manaresi E., Venturoli S., Bonvicini F. et al. Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J. Med. Virol.* 2003; 71: 135-9.

16. Maple P.A., Hedman L., Dhanilall P., Kantola K., Nurmi V., Söderlund-Venermo M. et al. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 947-56.

MICROBIOLOGY

17. Khamitova I.V., Antipova A.Ju., Semenov A.V., Lavrentyeva I.N.. Laboratory markers of parvovirus infection in persons with secondary immunodeficiency. Materials of the VIII Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation. Moscow, March 28-30, 2016. *Infektsionnye bolezni*. 2016; 14 (Suppl. 1): 294. (in Russian)
18. Khamitova I.V., Lavrentyeva I.N., Averyanova M.Yu., Chukhlovina A.B., Zubarovskaya L.S. et al. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2018; 7(1): 36-43.
19. Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K. et al. Impact of coinfection of PVB19 on the course and prognosis of malaria caused by Plasmodium falciparum. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8(3): 383-7. (in Russian)
20. Khamitova I.V., Lavrentyeva I.N., Levkovskij A.E., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., The effect of co-infection with PVB19 and P. falciparum on the course and prognosis of malaria in children of the Republic of Guinea. All-Russian annual congress «Infektsionnye bolezni u detey: diagnostika, lechenie i profilaktika». October 11-12, 2018, St. Petersburg. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10(4) (Suppl. 1): 138. (in Russian)
21. Abdollahi A., Shoar S., Sheikhabaei S., Mahdavian B., Rasoulinejad M. Status of immunity against PVB19 in HIV-infected patients according to CD₄(+) cell count, and antiretroviral therapy regimen groups. *Niger Med. J*. 2014; 55(1): 20-3.
22. Pereira R.F., Garcia R. de C., Azevedo K.M., Setúbal S., Siqueira M.A., Oliveira S.A.. Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014; 109: 168-73.
23. Liu W., Ittmann M., Liu J, Schoentag R., Tierno P, Greco M.A. et al. Human parvovirus B19 in bone marrows from adults with acquired immunodeficiency syndrome: a comparative study using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Hum. Pathol*. 1997; 28: 760-6.
24. Ramratnam B., Gollerkeri A., Schiffman F.J., Rintels P., Flanigan T.P. Management of persistent B19 parvovirus infection in AIDS. *Br. J. Haematol*. 1995; 91: 90-2.
25. Frickhofen N., Abkowitz J.L., Safford M., Berry J.M., Antunez-de-Mayolo J, Astrow A., et al. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann. Intern. Med*. 1990; 113: 926-33.
26. Chen M.Y., Hung C.C., Fang C.T., Hsieh S.M. Reconstituted immunity against persistent parvovirus B19 infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 32: 1361-5.
27. Gosset C., Viglietti D., Hue K., Antoine C., Glotz D., Pillebout E. How many times can parvovirus B19-related anemia recur in solid organ transplant recipients? *Transpl. Infect. Dis*. 2012; 14(5): 64-70.
28. Würdinger M., Modrow S., Plentz A. Impact of Parvovirus B19 Viremia in Liver Transplanted Children on Anemia: A Retrospective Study. *Viruses*. 2017; 9(6): 149.
29. Scarlata F., Gianelli E., Miceli S., Galimberti L., Antinori S. Acute Parvovirus B19 Infection and Anemia during Plasmodium falciparum Malaria. *Clin. Infectious Dis*. 2002; 35(11): 1449-51.
30. Toan N.L., Sy B.T., Song L.H., Luong H.V., Binh N.T., Binh Vu. Q. et al. Co-infection of human parvovirus B19 with Plasmodium falciparum contributes to malaria disease severity in Gabonese patients. *BMC Infect. Dis*. 2013; 13: 375.
31. Agarwal R., Baid R., Datta R., Saha M., Sarkar N. Falciparum malaria and parvovirus B19 coinfection: A rare entity. *Trop. Parasitol*. 2017; 7 (1): 47-8.
32. Wildig J., Michon P., Siba P, Mellombo M., Ura A., Mueller I. et al. Parvovirus B19 infection contributes to severe anemia in young children in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis*. 2006; 194(2): 146-53.
33. Ho M., Webster H.K., Looareesuwan S., Supanaranond W., Phillips R.E., Chanthavanich P. et al. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to Plasmodium falciparum. *J. Infect. Dis*. 1986; 153: 763-71.
34. Duedu K.O., Sagoe K.W., Ayeh-Kumi P.F., Affrim R.B., Adiku T., Huat L.B. The effects of co-infection with human parvovirus B19 and Plasmodium falciparum on type and degree of anaemia in Ghanaian children. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2013; 3(2): 129-39.
35. Slutsker L., Taylor T.E., Wirima J.J., Steketee R.W. In-hospital morbidity and mortality due to malaria-associated severe anaemia in two areas of Malawi with different patterns of malaria infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 88: 548-51.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Гвалдин Д.Ю., Тимошкина Н.Н., Ващенко Л.Н., Новикова И.А., Владимировна Л.Ю., Сторожакова А.Э., Сагакянц А.Б.

ПОЛИМОРФИЗМ RS4673 И УРОВЕНЬ ПАРАОКСОНАЗЫ 1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ – НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ АНТРАЦИКЛИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону, Россия

Целью настоящей работы являлось исследование эффективности молекулярно-генетических тестов, основанных на идентификации полиморфизма rs4673 *CYBA* (с.242C>T) и определении в плазме крови уровня параоксоназы 1 (PON1) у пациенток с онкозаболеванием молочной железы (РМЖ), для прогнозирования и диагностики антрациклин-опосредованной кардиотоксичности (АОК).

Проведено генотипирование rs4673 *CYBA* (с.242C>T) и исследование уровня PON1 в плазме крови 280 пациенток европеоидного типа с гистологически верифицированным диагнозом РМЖ, получавших комплексное лечение на базе НМИЦ онкологии.

По результатам наблюдения в течении как минимум 8 месяцев были выделены две группы: группа 1 (257 человек) без диагностированных сердечно-сосудистых изменений; группа 2 (23 человека) – пациентки с подострой и ранней хронической формой АОК. Установлено, что у носителей полиморфизма rs4673 повышается вероятность развития АОК в 6,8 раз ($p=0,001$). В плазме крови обеих групп больных было описано повышение уровня PON1 после четвертого курса по сравнению с исходным уровнем (группа 1 – $p=0,036$, группа 2 – $p=0,048$). Содержание исследуемого фермента было выше в плазме крови пациенток с диагностированной АОК по сравнению с больными без сердечно-сосудистых осложнений как до химиотерапии ($p=0,001$), так и после четвертого курса ($p=0,023$). Тест, основанный на определении концентрации PON1 в плазме крови больных после четвертого курса химиотерапии, отличался высокими метриками качества: чувствительность – 100%, специфичность – 70,8%, площадь под ROC-кривой (AUC) – 0,825 при пороговом уровне PON1 равным 2,9 нг/мл. Наличие генотипа T/T обуславливало высокий уровень PON1 в плазме крови после четвертого курса химиотерапии ($p=0,012$).

Представленные результаты обладают практической значимостью, поскольку позволяют получить данные о риске и ранней диагностике осложнений в короткие сроки, которые в дальнейшем могут быть верифицированы с помощью клинико-инструментальных методов.

Ключевые слова: рак молочной железы; антрациклин-опосредованная кардиотоксичность; *CYBA*; параоксоназа 1.

Для цитирования: Гвалдин Д.Ю., Тимошкина Н.Н., Ващенко Л.Н., Новикова И.А., Владимировна Л.Ю., Сторожакова А.Э., Сагакянц А.Б. Полиморфизм rs4673 и уровень параоксоназы 1 в плазме крови – новые перспективы в прогнозировании и ранней диагностике антрациклин-опосредованной кардиотоксичности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 123-128. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-123-128>

Для корреспонденции: Гвалдин Дмитрий Юрьевич, канд.биол.наук, науч. сотр. лаб. молекулярной онкологии; e-mail: 89dmitry@mail.ru

Финансирование. Финансирование осуществлялось в рамках государственного задания «Молекулярно-генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений у больных раком молочной железы, подвергнутых лекарственной терапии».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.08.2021

Принята к печати 24.09.2021

Опубликовано 23.02.2022

Gvaldin D. Yu., Timoshkina N.N., Vashchenko L.N., Novikova I.A., Vladimirova L. Yu., Storozhakova A.E., Sagakyants A B.

RS4673 AND PON1 LEVEL IN BLOOD PLASMA – NEW PROSPECTS IN PREDICTION AND EARLY DIAGNOSTICS OF ANTHRACYCLINE-MEDIATED CARDIOTOXICITY

National Medical Research Centre for Oncology, 344037, Rostov-on-Don, Russia

The purpose of this study was to research the effectiveness of molecular genetic tests based on the determination of the rs4673 *CYBA* polymorphism (с.242C>T) and the level of paraoxonase 1 (PON1) in the blood plasma of patients with breast cancer (BC) for predicting and diagnosing anthracycline-mediated cardiotoxicity (AMC).

The genotyping of rs4673 *CYBA* (с.242C>T) and the study of the PON1 level in the blood plasma of 280 patients of the Caucasian type with a histologically verified diagnosis of breast cancer, who received complex treatment on the basis of the National Medical Research Center of Oncology, were carried out.

Based on the results of observation for at least 8 months, two groups were identified: group 1 (257 people) without diagnosed cardiovascular changes; group 2 (23 people) – patients with subacute and early chronic AMC. It was found that carriers of the rs4673 polymorphism increase the likelihood of developing AMC by 6.8 times ($p = 0.001$). In the blood plasma of both groups of patients, an increase in the level of PON1 was described after the fourth course compared to the initial level (group 1 – $p = 0.036$, group 2 – $p = 0.048$). The level of the studied enzyme was higher in the blood plasma of patients with diagnosed AMC compared with patients without cardiovascular complications (before chemotherapy – $p = 0.001$, after the fourth course – $p =$

0.023). The test based on the measurement of the concentration of PON1 in the blood plasma of patients after the fourth course of chemotherapy was distinguished by high quality metrics: sensitivity – 100%, specificity – 70.8%, area under the ROC-curve (AUC) – 0.825 with a threshold level of PON1 equal to 2, 9 ng/μL. The presence of the T/T genotype caused a high level of PON1 in the blood plasma after the fourth course of chemotherapy ($p = 0.012$). The results of our work are of undoubted practical importance, since they allow us to obtain data on the prognosis and diagnosis of a patient in a short time, which can later be verified using clinical and instrumental methods.

Key words: breast cancer; anthracycline-mediated cardiotoxicity; CYBA; paraoxonase 1.

For citation: Gvaldin D.Yu., Timoshkina N.N., Vashchenko L.N., Novikova I.A., Vladimirova L.Yu., Storozhakova A.E., Sagakyants A.B. RS4673 and pon1 level in blood plasma – new prospects in prediction and early diagnostics of anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 123-128 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-123-128>

For correspondence: Gvaldin D.Y., PhD, scientific researcher at the laboratory of molecular oncology; e-mail: 89dmitry@mail.ru

Information about authors:

Gvaldin D.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8633-2660>;
Timoshkina N.N., <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>;
Vashenko L.N., <https://orcid.org/0000-0002-7302-7031>;
Novikova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>;
Vladimirova L.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4236-6476>;
Storozhakova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-0965-0264>;
Sagakyants A.B., <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>.

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

Acknowledgment. Funding was provided as part of the state assignment «Molecular genetic predispositions for cardiovascular complications in patients with breast cancer subjected to drug therapy».

Received 24.08.2021

Accepted 24.09.2021

Published 23.02.2022

Введение. Последние годы внесли существенные изменения в схемы лечения онкологических заболеваний, прежде всего, за счет появления новых таргетных препаратов и усовершенствования иммунотерапевтических подходов. Однако цитотоксическая химиотерапия, в основе которой лежит применение антрациклиновых антибиотиков, остается стандартом лечения различных типов злокачественных новообразований. На сегодняшний день до 60% онкологических больных получают антрациклиновые препараты [1]. Несмотря на их противоопухолевую эффективность, существует риск кардиотоксических проявлений, снижающих продолжительность и качество жизни пациентов.

Антрациклин-опосредованная кардиотоксичность (АОК) характеризуется широким спектром клинических проявлений, к которым относятся аритмии, кардиомиопатия, перикардит, дисфункция левого желудочка и сердечная недостаточность. Диагностика осложняется длительным бессимптомным периодом, характерным для ранней и поздней хронических форм. Клинико-инструментальных методов, таких, как электро- и эхокардиография, явно недостаточно для своевременного выявления кардиотоксических проявлений и коррекции терапевтической стратегии.

Длительный бессимптомный период течения АОК и поздняя диагностика посредством известных клинико-инструментальных методов побудили исследователей сосредоточить внимание на поиске молекулярно-генетических маркеров, способных прогнозировать риски и выявить ранние сердечно-сосудистые изменения на фоне химиотерапии. Считается, что наилучшим образом оценить индивидуальные риски АОК можно с помощью генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [1], тогда как диагностический потенциал приписывают циркулирующим в крови белкам и низкомолекулярным соединениям, уровень которых подвержен ранним изменениям в ответ на кардиотоксический эф-

фект [2]. Наше исследование является продолжением скрининговых работ [3-6] и посвящено оценке эффективности тестов, основанных на генотипировании наследственного полиморфизма rs4673 *CYBA* (с.242C>T) и уровня параоксоназы 1 (PON1) в плазме крови пациентов с раком молочной железы (РМЖ), для прогнозирования и диагностики АОК.

Материал и методы. В исследование вошли 280 пациенток (медиана возраста – 50 лет, размах варьирования – от 22 до 71 года) европеоидного типа с РМЖ без диагностированных сердечно-сосудистых изменений на дохимиотерапевтическом этапе, проходивших лечение на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» в 2019-2020 гг. Для всех пациенток было показано проведение 4 курсов химиотерапии с антрациклиновыми антибиотиками по схеме АС: доксорубин 60 мг/м²+ циклофосфамид 600 мг/м² в/в капельно в 1 день каждые 3 недели. По результатам обследования, с учетом анамнеза, инструментальных методов исследования – электрокардиографии, эхокардиографии, проведенных перед началом курсов химиотерапии, пациентки были разделены на две группы: группа 1 (257 человек) без диагностированных сердечно-сосудистых изменений; группа 2 (23 человека) – пациентки с подострой и ранней хронической формой АОК.

Однонуклеотидный полиморфизм rs4673 *CYBA* (с.242C>T) был выбран на основании базы полногеномного поиска ассоциаций генотип-фенотип The NHGRI-EBI GWAS Catalog [7] и фармакогенетического портала PharmGKB [8]. Для генотипирования rs4673 выделяли ДНК из крови с использованием DNA-sorb-B (AmpliSens, Russia) и проводили HRM-PCR (High Resolution Melt Polymerase chain reaction) на амплификаторе “CFX96” (Bio-Rad, США). Валидировали полученные результаты методом секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystems, США). Для HRM использованы праймеры:

прямой – 5'-TCTCGCCTTCCTCCCTCC-3', обратный – 5'-TAAAGGGCCCGAACAGCTTC-3', для секвенирования: прямой – 5'-AGGGCAGCAAAGGAGTCC-3', обратный – 5'-TGGGACAGTGGGGAGGGT-3'.

Измерение содержания PON1 до начала химиотерапии и после четвертого курса проводили в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы ELISA PON1 производства Cloud-Clone Corp. (Wuhan, China/USA) в соответствии с инструкцией производителя. Оценку результатов анализа осуществляли на анализаторе иммуноферментных реакций АИФР-01 (УНИПЛАН, Россия).

Статистический анализ распределения аллелей и генотипов проводили с использованием пакета «SNPassoc» в программной вычислительной среде R 4.0.4 [9]. Распределение частот аллелей и генотипов в когорте пациенток с РМЖ сравнивали с европейской популяцией, используя данные популяционной базы 1000Genomes и критерий χ^2 . Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий отвергали при пороговом уровне $p < 0,05$. Различия между группами и в динамике уровня PON1 оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Возможные ассоциации между содержанием фермента и генотипами rs4673 проверяли с помощью биномиальной регрессии. Критерии качества диагностического теста исследовали с помощью ROC-анализа и пакета «pROC» [10].

Проведенные исследования выполнялись в соответствии с принципами Хельсинской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

Результаты. Распределение частот аллелей и генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга в

группе 1 и европейской популяции, в отличие от группы 2 ($p=0,038$).

Сравнение частоты аллелей и генотипов rs4673 у больных РМЖ без признаков АОК не выявило статистически достоверных различий по сравнению с европейской популяцией (табл. 1). Напротив, в группе пациенток с АОК аллельная частота rs4673 и частота генотипов значительно отличались как от европейской популяции, так и от группы 1.

В ходе исследования возможных ассоциаций между rs4673 и риском развития АОК установлен значительный вклад данного полиморфизма в предрасположенность к сердечно-сосудистым осложнениям на фоне антрациклиновой химиотерапии (табл. 2). Так, наличие генотипов С/Т и Т/Т у больных РМЖ повышает вероятность развития АОК в 6,8 раз.

В ходе химиотерапевтического лечения (ХЛ) было отмечено повышение уровня PON1 после 4-го курса в двух группах (рис. 1, а). Однако, содержание исследуемого фермента было выше в плазме крови пациенток с диагностированной АОК по сравнению с больными без сердечно-сосудистых осложнений (рис. 1, б) не только после проведенной антрациклин-содержащей терапии, но и до начала лечения.

Мы сравнили диагностический потенциал тестов, основанных на измерении уровня PON1 в плазме крови до химиотерапии и после четвертого курса химиотерапии, с помощью ROC-анализа (рис. 2). Наилучшие метрики качества были характерны для теста (рис. 2, б), в основе которого лежит измерение содержания PON1 после четвертого курса химиотерапии в сравнении с тестом (рис. 2, а), где концентрация фермента измерялась до начала

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов с.242C>T rs4673 (CYBA) в группах больных без признаков АОК и больных с кардиотоксичностью в сравнении с европейской популяцией условно здоровых доноров

Генотипы /аллели	Группа 1, число (частота)	Группа 2, число (частота)	Европейская популяция (1000Genome), число (частота)	p
С/С	101 (0,393)	2 (0,087)	212 (0,421)	0,451*
С/Т	113 (0,440)	17 (0,739)	238 (0,473)	0,006**
Т/Т	43 (0,167)	4 (0,174)	53 (0,105)	0,011 ^c
С	315 (0,613)	21 (0,457)	662 (0,658)	0,082 ^a
Т	199 (0,387)	25 (0,543)	344 (0,342)	0,006 ^b 0,041 ^c

Примечание. * – p-значение, полученное при сравнении группы 1 с европейской популяцией; ** – p-значение, полученное при сравнении группы 2 с европейской популяцией; *** – p-значение, полученное при сравнении группы 2 с группой 1.

Таблица 2

Статистические характеристики моделей наследования с.242C>T rs4673 (CYBA)

Название модели	Генотипы	Группа 1, число (частота)	Группа 2, число (частота)	OR	95% ДИ: нижняя – верхняя границы	p	AIC
Кодоминантная модель	С/С	101 (0,393)	2 (0,087)	1		0,004	153,9
	С/Т	113 (0,440)	17 (0,739)	7,6	1,71-33,69		
	Т/Т	43 (0,167)	4 (0,174)	4,7	0,83-26,62		
Доминантная модель	С/С	101 (0,393)	2 (0,087)	1		0,001	152,7
	С/Т-Т/Т	156 (0,607)	21 (0,913)	6,8	1,56-29,62		
Рецессивная модель	С/С-С/Т	214 (0,833)	19 (0,826)	1		0,936	163,0
	Т/Т	43 (0,167)	4 (0,174)	1,05	0,34-3,23		
Сверхдоминантная модель	С/С-Т/Т	144 (0,56)	6 (0,261)	1		0,005	155,2
	С/Т	113 (0,44)	17 (0,739)	3,61	1,38-9,46		
Лог-аддитивная модель	-	257 (0,918)	23 (0,082)	1,85	1,01-3,39	0,043	158,9

Примечание. Здесь и в табл. 3: жирным шрифтом выделена лучшая модель в соответствие с критерием Акаике (AIC).

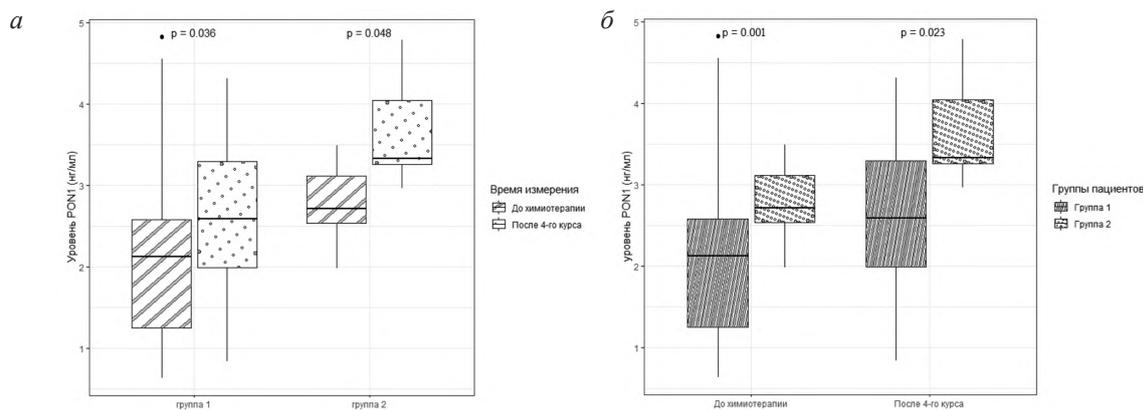


Рис. 1. Сравнение уровня PON1 в плазме крови (а) до химиотерапии и после четвертого курса химиотерапии; (б) в группе больных без признаков АОК и в группе с диагностированной кардиотоксичностью.

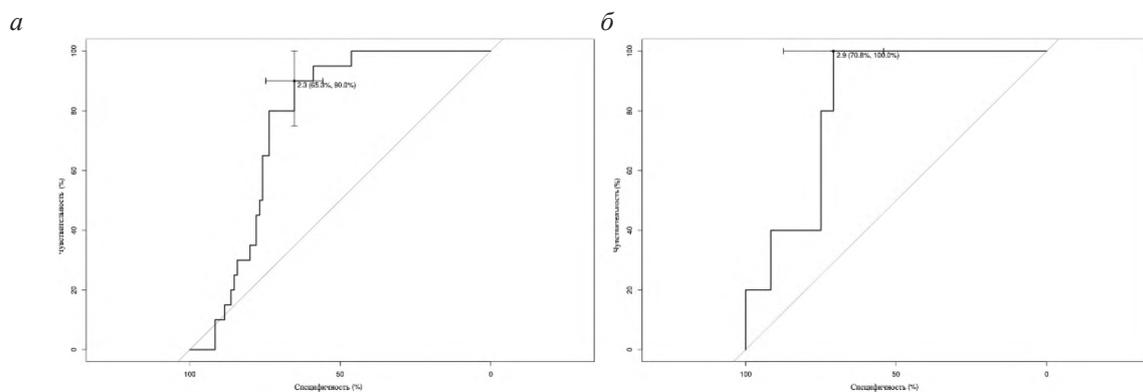


Рис. 2. ROC-кривые теста, основанного на измерении уровня PON1 в плазме крови до начала химиотерапии (а) и теста, основанного на измерении уровня PON1 в плазме крови после четвертого курса химиотерапии (б).

химиотерапии: чувствительность – 100%, специфичность – 70,8%, площадь под ROC-кривой (AUC) – 0,825 при пороговом уровне PON1 равным 2,9 нг/мкл против чувствительности равной 90%, специфичности – 65,3% и AUC – 0,762 при пороговом содержании PON1 равным 2,3 нг/мкл, соответственно.

Результаты регрессионного анализа продемонстрировали связь ТТ генотипа rs4673 с высоким уровнем PON1 после четвертого курса химиотерапии (табл. 3). Ассоциаций между генотипами rs4673 и содержанием фермента в плазме крови до начала химиотерапии обнаружено не было.

Обсуждение. Окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе АОК. Антрациклины такие, как доксорубин, проникая в ткань миокарда, подвергаются трансформации в семихиноны за счет взаимодействия с активными формами кислорода (АФК), продуцируемыми прооксидантными ферментами [11]. К таким ферментам относятся НАДФН-оксидазы (NOX) – группа трансмембранных белков, способных переносить электроны от НАДФН и восстанавливать кислород до супероксид-анион радикала и перекиси водорода [12]. НАДФН-оксидаза представляет собой сложно организованный мультисубъединичный фермент, включающий мембранные и цитозольные компоненты, которые активно взаимодействуют в ответ на широкий спектр стимулов, в результате включаются в осуществление множества функций, начиная защитой от инфекции и заканчивая передачей клеточных сигналов и регуляцией экспрессии генов [13].

Группа NOX представлена семью изоформами (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 и Duox2), широко распространенными в различных типах клеток. Однако в кардиомиоцитах преимущественно экспрессируется NOX2 [13]. Известно, что NOX2 в кардиомиоцитах способствует переходу доксорубина в семихиноновый радикал, который в свою очередь может принимать электрон от цитохрома с и взаимодействовать с гемом комплекса I электрон-транспортной сети митохондрий, тем самым, выполняя роль пускового механизма апоптотической программы [14].

Как упоминалось выше в состав НАДФН-оксидазных комплексов входят цитозольные компоненты (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} и ГТФаза Rac) и белковые элементы, расположенные в цитоплазматической мембране (gp91^{phox}, p22^{phox} и ГТФазный белок Rap1A) [13, 15]. Легкую альфа-субъединицу p22^{phox} кодирует ген *CYBA*, локализованный на длинном плече хромосомы 16. Полиморфизм rs4673 (с.242C>T) в 4 экзоне гена *CYBA* обуславливает изменения во вторичной структуре и каталитической активности NOX2 [16]. Ранее, L. Wojnowski и соавт. [17] предположили возможную ассоциацию между rs4673 и острой формой АОК (OR = 2,0; 95% ДИ: 1,0-3,9). В последующих исследованиях Y. Li и соавт. [18] продемонстрировали вклад Т/Т генотипа в повышение активности NOX. Данный генотип был связан с неблагоприятным прогнозом и низкой выживаемостью пациентов с диффузной В-клеточной лимфомой, проходивших курсы лечения по схеме R-CHOP [19]. Результаты нашего

Анализ ассоциаций генотипов с.242C>T rs4673 (CYBA) с уровнем PON1 после четвертого курса химиотерапии

Название модели	Генотипы	Me	SE	Dif	95% ДИ: нижняя – верхняя границы	p	AIC
Кодоминантная модель	C/C	2,718	0,3491	0		0,046	86,90
	C/T	2,660	0,3387	-0,0573	-1,158-1,043		
	T/T	4,355	0,7955	1,6371	0,317-2,958		
Доминантная модель	C/C	2,718	0,3491	0		0,333	90,80
	C/T-T/T	3,265	0,407	0,5478	-0,539-1,635		
Рецессивная модель	C/C-C/T	2,692	0,2389	0		0,012	84,90
	T/T	4,355	0,7955	1,6629	0,465-2,860		
Сверхдоминантная модель	C/C-T/T	3,229	0,3834	0		0,331	90,80
	C/T	2,660	0,3387	-0,5689	-1,693-0,555		
Лог-аддитивная модель	-	-	-	0,6886	0,024-1,353	0,054	87,74

Примечание. Me – среднее арифметическое, Se – стандартное отклонение, Dif – разница между средними.

исследования согласуются с литературными данными и свидетельствуют о связи доминантной модели rs4673 с риском подострой (первые проявления наблюдаются в течение нескольких недель с начала химиотерапии) и ранней хронической АОК (первые проявления обнаруживаются через год после завершения последнего курса химиотерапии) у больных РМЖ.

В норме генерация АФК в клетке нивелируется активностью ферментов антиоксидантной линии защиты, в число которых входят параоксоназы. Данное семейство представлено тремя ферментами – PON1, PON2 и PON3. Первая и третья изоформы синтезируются в печени, после чего секретируются в кровоток, где пребывают в связанном состоянии с липопротеинами высокой плотности. Вторая изоформа локализуется в митохондриях дофаминэргических нейронов и астроцитов, в меньшем количестве обнаруживается в митохондриях легких, печени, почек, сердца, тонкого кишечника и других органах [20]. Каталитический центр параоксоназ связан с широким спектром функциональных активностей. PON1 объединяет все типы активностей, характерных как для PON2 (лактоназная и слабая арилэстеразная активность), так и для PON3, которая проявляет высокие лактоназные, слабые арилэстеразные и параоксоназные свойства [21]. Кроме того, все изоформы участвуют в защите от окислительного стресса за счет реализации пероксидазной активности [22].

Важным регулятором экспрессии антиоксидантных ферментов является фактор транскрипции Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [23], которой посредством взаимодействия с промотором усиливает экспрессию глутатион-S-трансферазы, гамма-глутамилцистеин синтетазы и НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктазы типа I. Считается, что данный механизм лежит в основе положительной регуляции транскрипции PON1. В свою очередь, редокс-изменения, обусловленные активностью NOX, способны активировать ERK-сигнальный путь и, в конечном итоге, Nrf2. Интересно, что регуляция возможна и в обратном направлении: Nrf2 индуцирует транскрипцию NOX [24].

Высокая активность NOX тесно связана с ишемическими изменениями [25], которые являются наиболее распространенными проявлениями, выявляемыми на электрокардиограмме [26]. М.Р. Kasprzak и соавт. [27] показали, что ишемические изменения, возникающие после стентирования левой главной коронарной артерии, могут индуцировать транскрипцию PON1 и обуславливать повышение уровня данного фермента в сыворотке

крови больных со стенозом левой главной коронарной артерии. Можно предположить, что аналогичный механизм реализуется у больных с кардиотоксическими проявлениями, у которых уровень PON1 повышался в ходе химиотерапевтического лечения и был выше по сравнению с группой без сердечно-сосудистых осложнений (см. рис. 1). Нам удалось установить, что с помощью вышеупомянутого показателя можно с достаточно высокой точностью отследить изменения, характерные для АОК, уже после четвертого курса антрациклиновой химиотерапии (рис. 2, б).

Заключение. Проблема АОК не теряет своей актуальности в виду дефицита информативных методов прогнозирования и диагностики, которые ускорили бы реализацию персонализированного подхода и снизили бы риски возможных осложнений у онкологических больных. В нашей работе продемонстрировано, что генотипирование пациентов по полиморфизму rs4673 позволяет заранее стратифицировать группу риска, а определение уровня PON1 в плазме крови после четвертого курса химиотерапии – выявить больных с АОК и своевременно скорректировать выбранную тактику лечения. Описанные тесты являются малоинвазивными и не требуют существенных материальных расходов. Их выполнение дает возможность получить данные о прогнозе и диагнозе пациента в короткие сроки, которые в дальнейшем могут быть верифицированы с помощью клинико-инструментальных методов. Кроме того, результаты работы позволили приблизиться к пониманию фундаментальных аспектов патогенеза АОК. Их последующее изучение раскрывает широкие перспективы в разработке и совершенствовании схем лечения, позволяющих минимизировать риски сердечно-сосудистых осложнений у онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–19, 21–27
 см. REFERENCES)

- Кит О.И., Гвалдин Д.Ю., Омельчук Е.П., Тимошкина Н.Н. Современные представления о предикторах и биомаркерах ранней диагностики антрациклин-опосредованной кардиотоксичности (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(3): 141-8.
- Боровкова Е.И., Антипова Н.В., Корнеев Т.В., Шахпаронов М.И., Боровков И.М. Параоксоназ: универсальный фактор антиоксидантной защиты организма человека. *Вестник РАМН*. 2017; 72(1): 5–10.

REFERENCES

1. Bhatia S. Genetics of Anthracycline Cardiomyopathy in Cancer Survivors: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncol.* 2020; 2(4): 539-52.
2. Kit O.I., Gvaldin D.Yu., Omelchuk E.P., Timoshkina N.N. Current views on predictors and biomarkers of early diagnosis of anthracycline-mediated cardiotoxicity in patients with breast cancer (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(3): 141-8. (in Russian)
3. Schneider B.P., Shen F., Gardner L., Radovich M., Li L., Miller K.D. et al. Genome-Wide Association Study for Anthracycline-Induced Congestive Heart Failure. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23(1): 43-51.
4. Reichwagen A., Ziepert M., Kreuz M., Gödtel-Armbrust U., Rixecker T., Poeschel V. et al. Association of NADPH oxidase polymorphisms with anthracycline-induced cardiotoxicity in the RICOVER-60 trial of patients with aggressive CD20(+) B-cell lymphoma. *Pharmacogenomics.* 2015; 16(4): 361-72.
5. Demissei B.G., Hubbard R.A., Zhang L., Smith A.M., Sheline K., McDonald C. et al. Changes in Cardiovascular Biomarkers With Breast Cancer Therapy and Associations With Cardiac Dysfunction. *J. Am. Heart. Assoc.* 2020; 9(2): e014708.
6. Putt M., Hahn V.S., Januzzi J.L., Sawaya H., Sebag I.A., Plana J.C. et al. Longitudinal Changes in Multiple Biomarkers Are Associated with Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients Treated with Doxorubicin, Taxanes, and Trastuzumab. *Clin. Chem.* 2015; 61(9): 1164-72.
7. Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M., Harris L.W., Hayhurst J., Malangone C. et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1): D1005-D1012.
8. Whirl-Carrillo M., McDonagh E.M., Hebert J.M., Gong L., Sangkuhl K., Thorn C.F. et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2012; 92(4): 414-7.
9. González J.R., Armengol L., Solé X., Guinó E., Mercader J.M., Estivill X. et al. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007; 23(5): 644-5.
10. Robin X., Turck N., Hainard A., Tiberti N., Lisacek F., Sanchez J.C. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12: 77.
11. Capetta D., De Angelis A., Sapio L., Prezioso L., Illiano M., Quaini F. et al. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017: 1521020.
12. Skonieczna M., Hejmo T., Poterala-Hejmo A., Cieslar-Pobuda A., Buldak R.J. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017: 9420539.
13. Panday A., Sahoo M.K., Osorio D., Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 2015; 12(1): 5-23.
14. Songbo M., Lang H., Xinyong C., Bin X., Ping Z., Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2019; 307: 41-8.
15. Sorce S., Stocker R., Seredenina T., Holmdahl R., Aguzzi A., Chio A. et al. NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence? *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 112: 387-96.
16. Mazaheri M., Karimian M., Behjati M., Raygan F., Hosseinzadeh Colagar A. Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary artery disease: A case-control study and a computational analysis. *Ir. J. Med. Sci.* 2017; 186(4): 921-8.
17. Wojnowski L., Kulle B., Schirmer M., Schlüter G., Schmidt A., Rosenberger A. et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation.* 2005; 112(24): 3754-62.
18. Li Y.Y., Gong G., Geng H.Y., Qian Y. p22phox C242T gene polymorphism and overt diabetic nephropathy: a meta-analysis of 1,452 participants. *Korean J. Intern. Med.* 2017; 32(6): 1045-52.
19. Rossi D., Rasi S., Franceschetti S., Capello D., Castelli A., De Paoli L. et al. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia.* 2009; 23(6): 1118-26.
20. Borovkova E.I., Antipova N.V., Korneenko T.V., Shakhparonov M.I., Borovkov I.M. Paraonase: The Universal Factor of Antioxidant Defense in Human Body. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2017; 72(1): 5-10. (in Russian)
21. Taler-Verčič A., Goličnik M., Bavec A. The Structure and Function of Paraonase-1 and Its Comparison to Paraonase-2 and -3. *Molecules.* 2020; 25(24): 5980.
22. Shokri Y., Variji A., Nosrati M., Khonakdar-Tarsi A., Kianmehr A., Kashi Z. et al. Importance of paraonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: Genotypic and phenotypic evaluation. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020; 161: 108067.
23. Ponce-Ruiz N., Murillo-González F.E., Rojas-García A.E., Mackness M., Bernal-Hernández Y.Y., Barrón-Vivanco B.S. et al. Transcriptional regulation of human Paraonase 1 by nuclear receptors. *Chem. Biol. Interact.* 2017; 268: 77-84.
24. Kovac S., Angelova P.R., Holmström K.M., Zhang Y., Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1850(4): 794-801.
25. Duan J., Gao S., Tu S., Lenahan C., Shao A., Sheng J. Pathophysiology and Therapeutic Potential of NADPH Oxidases in Ischemic Stroke-Induced Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021; 2021: 6631805.
26. Trapani D., Zagami P., Nicolò E., Pravettoni G., Curigliano G. Management of Cardiac Toxicity Induced by Chemotherapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2885.
27. Kasprzak M.P., Olasińska-Wisniewska A., Grysczyńska B., Budzyń M., Lesiak M., Trojnarśka O. et al. Changes in the Nrf2/Keap1 Ratio and PON1 Concentration in Plasma of Patients Undergoing the Left Main Coronary Artery Stenting. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 8249729.