

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67
1 • 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

ЯНВАРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

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

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

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издania 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-rl.ru**
**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 1. 1–64.

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
1 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JANUARY

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. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Воробьев С.В., Янишевский С.Н., Емелин А.Ю., Лебедев А.А., Лебедев С.П., Макаров Ю.Н., Усиков А.С., Клотченко С.А., Васин А.В.

Перспективы применения биологических сенсоров на основе графена в ранней диагностике болезни Альцгеймера (обзор литературы) 5

Головня Е.Г., Харитиди Т.Ю., Сотников А.В., Соменова О.В., Кушлинский Н.Е.

Диагностические уровни биомаркеров сепсиса у детей с онкологическими заболеваниями 13

Конторищикова К.Н., Казарина Л.Н., Гулян У.Г., Пурсанова А.Е., Конторищиков М.М., Захарова А.Р., Гущина О.О.

Мониторинг биохимических показателей ротовой жидкости у больных с предраковыми заболеваниями слизистой оболочки рта, использующих ортопедические конструкции. 19

ГЕМАТОЛОГИЯ

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Щербинина А.Е., Леонович С.В., Зуева Е.В., Гаранина В.Д., Гультяева Е.П., Ярославская Е.И., Калюжная Е.Н., Горбатенко Е.А., Капустина А.А., Гапон Л.И.

Оценка эритроцитарных параметров общего анализа крови у пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию 24

ЦИТОЛОГИЯ

Старкова М.В., Славнова Е.Н., Зикиряходжаев А.Д.

Применение флуоресцентной иммуноцитохимии в интраоперационной диагностике метастазов в сторожевых лимфатических узлах при раннем раке молочной железы. 31

ИММУНОЛОГИЯ

Муркамилов И.Т.

Двунаправленное влияние маркеров воспаления и снижения скорости клубочковой фильтрации при хронической болезни почек 37

Фейзханова Г.У., Волошин С.А., Новиков А.А., Александрова Е.Н., Смолдовская О.В., Рубина А.Ю.

Определение ревматоидного фактора и белков острой фазы воспаления на биочипах у пациентов с ревматоидным артритом. 43

Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Петров С.Б., Тунева Н.А.

Сравнительная оценка результатов выявления *CagA*-положительных штаммов *Helicobacter pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами в различном биологическом материале 48

МИКРОБИОЛОГИЯ

Иванов М.Э., Фурсова Н.К., Потапов В.Д.

Суперсемейства эффлюксных насосов *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы) 53

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ольховский И.А., Горбенко А.С., Комаровский Ю.Ю., Столяр М.А., Васильева Д.И., Епифанова О.С., Ходов Д.А., Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л.

Модификация изотермического теста выявления ДНК возбудителей клещевого боррелиоза 59

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Vorobev S.V., Yanishevskij S.N., Emelin A.Yu., Lebedev A.A., Lebedev S.P., Makarov Yu.N., Usikov A.S., Klotchenko S.A., Vasin A.V.*
Prospects for the use of graphene-based biological sensors in the early diagnosis of Alzheimer's disease (review of literature)5
- Golovnya E.G., Kharitidi T.Yu., Sotnikov A.V., Somonova O.V., Kushlinskii N.E.*
Diagnostic levels of sepsis biomarkers in children with oncological diseases.....13
- Kontorshchikova K.N., Kazarina L.N., Gulyan U.G., Pursanova A.E., Kontorshchikov M.M., Zakharova A.R., Gushchina O.O.*
Monitoring of biochemical parameters of the oral fluid in patients with recancerous of the oral mucosa.....19

HEMATOLOGY

- Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Shcherbinina A.E., Leonovich S.V., Zueva E.V., Garanina V.D., Gultiaeva E.P., Yaroslavskaya E.I., Kalyuzhnaya E.N., Gorbatenko E.A., Kapustina A.A., Gapon L.I.*
Estimation of erythrocyte parameters of general blood analysis in patients with SARS-CoV-2 -associated pneumonia.24

CYTOLOGY

- Starkova M.V., Slavnova E.N., Zikiryakhodzhaev A.D.*
Application of fluorescent immunocytochemistry in intraoperative diagnostics of metastases in sentinel lymph nodes in early breast cancer31

IMMUNOLOGY

- Murkamilov I.T.*
The bi-directional effect of markers of inflammation and a decrease in glomerular filtration rate in chronic kidney disease37
- Feyzkhanova G.U., Voloshin S.A., Novikov A.A., Aleksandrova E.N., Smoldovskaya O.V., Rubina A.Yu.*
Analysis of rheumatoid factor and acute phase proteins using microarrays in patients with rheumatoid arthritis43
- Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Petrov S.B., Tuneva N.A.*
Comparative assessment of the results of detection of CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* by molecular-genetic and immunochromatographic methods in different biological materials48

MICROBIOLOGY

- Ivanov M.E., Fursova N.K., Potapov V.D.*
Pseudomonas aeruginosa efflux pump superfamily (review of literature)53

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Komarovskiy Yu.Yu., Stolyar M.A., Vasileva D.I., Epifanova O.S., Khodov D.A., Rudakova S.A., Rudakov N.V., Oskorbin I.P., Filipenko M.L.*
Modification of isothermal test for detecting DNA of pathogens of tick-borne borreliosis.59

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Воробьев С.В.^{1,3}, Янишевский С.Н.^{1,2}, Емелин А.Ю.², Лебедев А.А.^{4,5}, Лебедев С.П.⁵, Макаров Ю.Н.^{4,6}, Усиков А.С.^{4,6}, Клотченко С.А.⁷, Васин А.В.^{7,8}

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ГРАФЕНА В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» Минобрнауки России, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ ФГБУН «Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе» Минобрнауки РФ, 194021, Санкт-Петербург, Россия;

⁶ ООО Группа компаний «Нитридные кристаллы», 194156, Санкт-Петербург, Россия;

⁷ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава РФ, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

⁸ Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого Минобрнауки России, 194021, Санкт-Петербург, Россия

Среди наиболее значимых вызовов, предъявляемых современной медицине, находится проблема когнитивных расстройств. Актуальность ее исследования определяется широким распространением нарушений высших корковых функций, их существенным негативным влиянием, оказываемым на качество жизни больных, а также высокими экономическими затратами со стороны государства и родственников пациента, направленными на организацию лечебно-диагностического и реабилитационного процессов. В качестве основной причины когнитивных нарушений у лиц пожилого возраста выступает болезнь Альцгеймера. В настоящее время разработаны и широко применяются на практике критерии диагностики этой нозологической формы. Однако необходимо отметить, что наиболее эффективно их использование при наличии у пациента развернутой клинической картины, на стадии деменции. Кроме того, они предусматривают проведение в ряде случаев исследования биомаркеров в ликворе или при помощи позитронно-эмиссионной томографии, что представляет собой определенные технические сложности. Особенно существенные проблемы возникают на преддементных стадиях. Такое положение диктует необходимость поиска новых перспективных методов диагностики, которые будут обладать высокой чувствительностью и специфичностью, а также возможностью применения на ранних стадиях болезни Альцгеймера в том числе в амбулаторных условиях. В статье приведены сведения о современных методах компьютерной нейровизуализации, рассмотрены направления исследования отдельных биомаркеров, а также показаны перспективы использования диагностических тестовых панелей, разработанных на основе графеновых биосенсоров, с учетом последних достижений нанотехнологий и их интеграции в медицинскую науку.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; когнитивные нарушения; деменция; биомаркер; графен; биосенсор; обзор.

Для цитирования: Воробьев С.В., Янишевский С.Н., Емелин А.Ю., Лебедев А.А., Лебедев С.П., Макаров Ю.Н., Усиков А.С., Клотченко С.А., Васин А.В. Перспективы применения биологических сенсоров на основе графена в ранней диагностике болезни Альцгеймера (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 5-12.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-5-12>

Для корреспонденции: Воробьев Сергей Владимирович, д-р мед. наук, гл. науч. сотр. НИЛ неврологии и нейрореабилитации НМИЦ им. В.А. Алмазова, проф. каф. клин. лаб. диагностики СПбГПМУ; e-mail: sergiognezdo@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.07.2021

Принята к печати 14.09.2021

Опубликовано 28.01.2022

Vorobev S.V.¹, Yanishevskij S.N.^{1,2}, Emelin A.Yu.², Lebedev A.A.^{4,5}, Lebedev S.P.⁵, Makarov Yu.N.^{4,6}, Usikov A.S.^{4,6}, Klotchenko S.A.⁷, Vasin A.V.^{7,8}

PROSPECTS FOR THE USE OF GRAPHENE-BASED BIOLOGICAL SENSORS IN THE EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE (REVIEW OF LITERATURE)

¹ Almazov National Medical Research Centre, 197341, Saint-Petersburg, Russia;

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, 194044, Saint-Petersburg, Russia;

³ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 197101, Saint Petersburg, Russia;

⁵ Ioffe Institute, 194021, Saint Petersburg, Russia;

⁶ Nitride Crystals Group Ltd., 194156, Saint Petersburg, Russia;

⁷ Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint Petersburg, Russia;

⁸ Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 197376, Saint Petersburg, Russia

Among the most significant challenges presented to modern medicine is the problem of cognitive disorders. The relevance of her research is determined by the wide spread of disorders of the higher cortical functions, their significant negative impact on the quality of life of patients, as well as high economic costs on the part of the state and the patient's relatives aimed at organizing medical, diagnostic and rehabilitation processes. The main cause of cognitive impairment in the elderly is Alzheimer's disease. Currently, the criteria for the diagnosis of this nosological form have been developed and are widely used in practice. However, it should be noted that their use is most effective if the patient has a detailed clinical picture, at the stage of dementia. In addition, they provide for the study of biomarkers in a number of cases in the cerebrospinal fluid or using positron emission tomography, which presents certain technical difficulties. Especially significant problems arise in the pre-dement stages. This situation dictates the need to search for new promising diagnostic methods that will have high sensitivity and specificity, as well as the possibility of application in the early stages of Alzheimer's disease, including in outpatient settings. The article provides information about modern methods of computer neuroimaging, discusses the research directions of individual biomarkers, and also shows the prospects for using diagnostic test panels developed on the basis of graphene biosensors, taking into account the latest achievements of nanotechnology and their integration into medical science.

Key words: *Alzheimer's disease; cognitive impairment; dementia; biomarker; graphene; biosensor; review.*

For citation: Vorobev S.V., Yanishevskij S.N., Emelin A.Yu., Lebedev A.A., Lebedev S.P., Makarov Yu.N., Usikov A.S., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Prospects for the use of graphene-based biological sensors in the early diagnosis of Alzheimer's disease (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 5-12 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-5-12>

For correspondence: Vorobev S.V., Dr. Sci. Med., chief researcher laboratory of neurology and neurorehabilitation Almazov National Medical Research Centre, professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics Saint-Petersburg State Pediatric Medical University; e-mail: sergiognezd@yandex.ru

Information about authors:

Vorobev S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4830-907X>;

Yanishevskij S.N., <https://orcid.org/0000-0002-6484-286X>;

Emelin A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-4723-802X>;

Lebedev A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0829-5053>;

Lebedev S.P., <https://orcid.org/0000-0002-5078-1322>;

Makarov Y.N., <https://orcid.org/0000-0002-3711-2650>;

Usikov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5320-3632>;

Klotchenko S.A., <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>;

Vasin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1391-7139>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 14.07.2021

Accepted 14.09.2021

Published 28.01.2022

Введение. В повседневной жизни человеку постоянно приходится обрабатывать, анализировать, систематизировать и запоминать существенный объем поступающей информации, которую в последующем можно будет применить в практических целях. В значительной степени это становится возможным за счет способности реагировать на поступающие сигналы, поддерживать и концентрировать умственную работоспособность. Итогом такой деятельности является возможность планирования и выбора цели, выработка и реализация сложных действий, контроль повседневной деятельности с ее коррекцией в случае необходимости. Реализация этих навыков осуществляется не изолированно, а в тесном контакте с другими людьми в рамках существующего

социума, посредством речевого общения, возможности понимания эмоций и логики действий других лиц. Все это становится возможным благодаря реализации когнитивных (высших корковых) функций. Поэтому изменение их работы приводит к нарушениям бытового, профессионального и социального функционирования, а в случае тяжелых расстройств полностью дезинтегрирует всю деятельность человека. Именно этот аспект выводит проблему диагностики и терапии когнитивных нарушений в состав приоритетных задач современной медицины и общества.

Нужно отметить, что медико-социальная значимость нарушений высших корковых функций обусловлена не только их выраженным дезадаптирующим влиянием на

жизнедеятельность, но также обусловлена широким распространением и высокими затратами на терапию, диагностику и уход. Так, по данным протокола, проведенного в рамках международного консорциума COSMIC, включавшего анализ 11 популяционных исследований, с выборкой более 20 тысяч человек, умеренные когнитивные нарушения (УКН) обнаруживаются у 5,0-36,7% лиц старше 60 лет в зависимости от популяции [1]. Деменция на сегодняшнее время диагностирована у 50 млн человек, в то же время к 2050 г. ожидается увеличение этой цифры до 152 млн [2]. При этом на долю болезни Альцгеймера приходится до 70 % от общего количества тяжелых нарушений высших корковых функций [3].

Общие затраты на ведение пациентов с деменцией составляют ежегодно до 1 трлн долларов США [2]. Существенным является и тот факт, что финансовые потери в значительной степени зависят от степени тяжести когнитивных нарушений и увеличиваются при их прогрессировании. В частности, у больных с результатом по шкале MMSE, равным 21 баллу они составляют до 4861 долларов США, при 20 баллах – 5929 долларов, а при результате 10 баллов возрастают до 26 496 долларов [4]. Естественно, что ранняя и точная диагностика болезни Альцгеймера обеспечит формирование наиболее рационального и эффективного подхода к ведению пациентов, будет способствовать пролонгации периода их профессиональной активности, бытовой и социальной независимости, оптимизирует нагрузку на медицинские и социальные организации, а также на родственников больных и ухаживающих лиц, что в конечном счете обеспечит значимую финансовую экономию.

Современные критерии диагностики болезни Альцгеймера. Для диагностики болезни Альцгеймера до настоящего времени достаточно широко используются критерии NINDS-ADRDA (National Institute of Neurological Disorders and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Однако их применение позволяет установить только вероятный или возможный диагноз заболевания, находящегося на стадии выраженных клинических проявлений. Кроме того, чувствительность этих критериев составляет 81%, а специфичность – 70% [5]. В то же время для установления достоверного диагноза необходимо проведение патоморфологического исследования головного мозга, которое выполняется посмертно, либо, в крайне редких случаях, посредством биопсии. Естественно, такой порядок значительно осложняет диагностический поиск. Вследствие этого в 2011 г. группой исследователей Национального института по проблемам старения и ассоциации по изучению болезни Альцгеймера – NIA-AA (National Institute of Aging/Alzheimer's Association) были предложены новые критерии диагностики, позволяющие разграничить клинические аспекты заболевания и его патоморфологические и патофизиологические признаки. При этом были выделены 3 стадии заболевания: бессимптомная доклиническая, преддементная (практически аналогичная стадии умеренных когнитивных нарушений – УКН), деменция [6]. Основной акцент в диагностике бессимптомной доклинической стадии сделан на исследовании биомаркеров вследствие значительной трудности обнаружения у пациентов когнитивных нарушений посредством нейропсихологического обследования и высокой вероятности ошибки [7]. Диагностические критерии преддементной стадии имеют два варианта: один основан на клинических признаках, вто-

рой дополнен исследованием биомаркеров. В качестве последних предложены маркеры амилоидоза и нейродегенерации. На основании сочетания наличия этих компонентов выделяют пациентов с низкой, сомнительной, средней и высокой вероятностью преддементной стадии болезни Альцгеймера [8]. В 2018 г. та же исследовательская группа для оценки стадии и прогрессирования заболевания предложила отдельно выделять биомаркеры амилоидоза, таупатии и нейродегенерации [9, 10].

Проблема исследования биомаркеров в диагностике болезни Альцгеймера. Исследование биомаркеров производится либо посредством лабораторного анализа их содержания в цереброспинальной жидкости (в частности определение снижения β -амилоида и накопление τ -протеина), либо посредством визуализации в структурах головного мозга с помощью проведения ПЭТ с соответствующими лигандами (например с фторбеттапиром (18F-AV-45) или Питтсбургской субстанцией (PiB) – для определения амилоида или ^{18}F -AV1451 – для определения белка τ) [11, 12]. Кроме того, для диагностики нейродегенерации используется ПЭТ с ^{18}F -дезоксиглюкозой, МР-морфометрия, а также структурная МРТ с последующим применением специализированных шкал, таких как шкала глобальной церебральной атрофии (Global Cortical Atrophy, GCA или шкала Pasquier), шкала атрофии медиальной височной доли (Medial Temporallobe Atrophy, MTA), шкала атрофии теменной доли Koedam [13, 14]. При этом необходимо отметить, что несмотря на безусловное повышение качества диагностического поиска посредством внедрения в практику исследования уровня β -амилоида и τ -протеина, а также применения новых методов нейровизуализации, решить многие проблемы, связанные с корректной и своевременной постановкой диагноза болезни Альцгеймера, не удалось. Так, в частности, накопление β -амилоида происходит на ранних этапах болезни и возрастает по мере ее прогрессирования. В то же время накопление τ -протеина отмечается на развернутых стадиях болезни Альцгеймера, а также при ряде других нозологических форм. Этот аспект с одной стороны снижает специфичность данного теста, а с другой стороны нивелирует его значимость на ранних, додементных, этапах. Кроме того, для определения уровня этих веществ в цереброспинальной жидкости необходимо проведение люмбальной пункции, что практически делает невозможным использование этих методов на амбулаторном этапе. Проведение ПЭТ является весьма дорогостоящим методом, требующим наличия сложного оборудования, вследствие чего может проводиться только в крупных специализированных центрах, что резко снижает доступность к нему пациентов. Кроме того, в нашей стране ПЭТ с лигандами как к β -амилоиду, так и к τ -протеину, к сожалению, не проводится вовсе. Выполнение МР-морфометрии также имеет значительные технические сложности и требует наличия специального программного обеспечения и подготовленного персонала, поэтому выполняется практически только в исследовательских целях, но не находит широкого применения в клинической практике. Исходя из этих позиций сохраняется высокая целесообразность разработки принципиально новых методов диагностики, которые можно применять как в амбулаторных, так и стационарных условиях. При этом эти методы должны быть малоинвазивны, достаточно просты технически при проведении и интерпретации результатов, позволять диагностировать болезнь на ранних этапах, обладать высокой

чувствительностью и специфичностью, а также иметь приемлемую цену.

Исходя из выше сказанного, одним из наиболее перспективных направлений является изучение динамики изменения концентраций отдельных биомаркеров в биологических средах, отражающих различные составляющие патохимических процессов, формирующихся на разных стадиях болезни Альцгеймера. Среди них можно выделить маркеры повреждения тел нейронов и их отростков (аксонов, дендритов), маркеры повреждения астроцитов, вещества, отражающие развитие оксидантного стресса и митохондриальную дисфункцию, воспаление, апоптоз и ряд других. При этом такой маркер тем больше будет соответствовать поставленным диагностическим целям, чем сильнее он соответствует следующим параметрам: 1) имеет четкие биокинетические свойства; 2) быстро определяется в доступных биологических средах; 3) имеет высокую чувствительность и специфичность в отношении повреждения вещества головного мозга; 4) содержание биомаркера в биологических жидкостях коррелирует с тяжестью повреждения; 5) обеспечивает информацию о характере повреждения мозгового вещества; 6) отражает динамику заболевания и эффективность лечения; 7) прогнозирует функциональный исход; 8) легко идентифицируется и измеряется при помощи широко доступных, несложных методик [15]. Для болезни Альцгеймера к биомаркерам установлены дополнительные критерии, которые включают высокую чувствительность и специфичность (более 85%), наличие при подсчете априорного распределения вероятностей, положительной прогностической ценности (более 80%) по отношению к больным и отрицательной прогностической ценности по отношению к здоровым лицам [16]. К сожалению, подобрать вещество, обладающее оптимальным сочетанием данных свойств на сегодняшний день, не представляется возможным. Учитывая современные знания о патогенезе болезни Альцгеймера можно сказать, что накопление как β -амилоида, так и τ -протеина является вторичным по отношению к предшествующим, более ранним патобиохимическим событиям, протекающим в клетках головного мозга. Поэтому обнаружение их в цереброспинальной жидкости может свидетельствовать о том, что патологический процесс уже прошел определенную точку невозврата, за которой возможности терапии резко снижаются. В таких условиях огромную значимость приобретает необходимость выявления веществ, изменение содержания которых в биологических средах не только отражает степень прогрессирования патологического процесса, но и может помочь диагностике на ранних этапах, до формирования развернутой клинической картины. При этом значительной перспективой в этом направлении обладает исследование крови, как один из наиболее доступных для исследования биологических субстратов, в том числе на уровне амбулаторного звена.

Среди маркеров, предложенных для исследования в сыворотке крови, выступает τ -протеин. Однако оказалось, что сам по себе этот белок лучше показывает острое поражение головного мозга, но обладает достаточно низкой чувствительностью при диагностике болезни Альцгеймера. При этом он плохо коррелирует с накоплением β -амилоида в головном мозге и содержанием τ -белка в ликворе [17, 18]. С этими же целями предпринимались попытки проводить контроль уровня β -амилоида в плазме крови. Однако полученные резуль-

таты оказались весьма противоречивы, и не всегда уровень β -амилоида в крови коррелировал с его содержанием в цереброспинальной жидкости [19; 20; 21].

Еще одним маркером, предложенным для исследования являются легкие цепи нейрофиламентов – НФЛ (Neurofilament Light Chain, NfL). Они представляют собой один из основных компонентов цитоскелета и кроме поддержания внутренней структуры клеток активно участвуют в транспорте различных веществ в аксональные окончания. При ряде заболеваний, в том числе, нейродегенеративной природы, установлено существенное повышение их уровня как в цереброспинальной жидкости, так и в крови [22]. Помимо этого, было определено, что уровень НФЛ в биологических средах достоверно увеличивается за 10-20 лет до развития симптомов при семейных формах болезни Альцгеймера, что делает этот биомаркер весьма перспективным кандидатом для ранней диагностики [23, 24].

На наш взгляд, достаточно эффективным должно быть использование в качестве прогностических факторов оценки течения заболевания так называемых амилоид-деградирующих энзимов. К подобным, в частности, относится цинк-зависимая металлопротеаза неприлизин. Было установлено, что активность неприлизина достоверно снижается в коре головного мозга у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера [25]. Помимо этого, обнаружено снижение его активности и в плазме крови, коррелирующее с результатами, полученными по шкалам MMSE и ADAS-cog [26]. Также в качестве признака нейродегенерации предложено использовать повышенные уровни нейрогранина, который является одним из основных постсинаптических кальмодулин-связывающих белков. Его повышенный выход из клетки отражает процессы нарушения синаптической передачи, формирующиеся при болезни Альцгеймера [27, 28]. Кроме рассмотренных, на роль биомаркеров претендует еще достаточно большое количество веществ. В частности, на сайте Альцгеймеровского форума (alzbiomarker.alzforum.org) проведены результаты мета-анализа данных с подбором панели биомаркеров, исследование которых в крови является перспективным с позиций диагностики болезни Альцгеймера [29]. Подробный анализ предложенных к использованию биомаркеров может являться темой отдельного анализа.

Необходимо отметить, что для внедрения в клиническую практику тестов, направленных на детекцию тех или иных веществ в крови в рамках диагностического поиска при нейродегенеративной патологии, необходимо решить две основные проблемы, а именно повысить их чувствительность и специфичность. С одной стороны, содержание определенных биомаркеров в крови определяется не только их нейрональной фракцией, но и периферической составляющей, формирующейся за счет их образования в иных органах или тканях. При этом «церебральная» часть может быть достаточно невелика, вследствие незначительного проникновения данного конкретного вещества из центральной нервной системы через гематоэнцефалический барьер в кровь. С другой стороны, применяющиеся на практике или в научных целях лабораторные методы исследования, такие как иммуноферментный анализ, иммупреципитация, флуориметрический метод и ряд других не обладают достаточно высокой чувствительностью, позволяющей достоверно определять низкие концентрации веществ и их изменения. Широкое использование же других методов,

не представляется возможным, вследствие необходимости наличия сложной дорогостоящей аппаратуры и высококвалифицированного персонала для постановки проб и учета результатов, как, например, при масс-спектрометрии, спектроскопии одиночных молекул, цифровом фермент-связанном иммуносорбентном анализе или анализе кинетики радиоизотопов, обладающим помимо прочего еще и негативным лучевым воздействием на организм обследуемого [30 - 35]. При этом повышение специфичности может быть решено путем разработки тестовой панели, включающей в себя несколько биомаркеров, отражающих формирование различных биохимических процессов. В то же время повышение чувствительности возможно посредством разработки биологических сенсоров, основанных на новых физических принципах.

Графен и возможности его использования в диагностике болезни Альцгеймера. Успехи в развитии нанотехнологий, произошедшие за последнее время, продемонстрировали огромный потенциал интеграции передовых решений в медицинскую науку. Одним из перспективных материалов, на основе которого возможно построение панели биосенсоров является графен. Этот материал представляет собой состоящую из атомов углерода двумерную гексагональную кристаллическую решетку толщиной в один атом и обладает достаточно уникальными свойствами. К ним относятся высокая механическая прочность, тепло- и электропроводность, химическая стабильность и биосовместимость, высокая подвижность носителей заряда, максимальное отношение площади к объему и низкий уровень шумов. Такое сочетание свойств обеспечивает значимое изменение электропроводности графена при осаждении на нем даже незначительных, исчезающе малых концентраций посторонних веществ [36, 37].

В первой работе К. Новоселова и А. Гейма [38] по получению и исследованию графена, использовался метод exfoliation («отшелушивание»), который сводится к отделению от кристалла графита чешуйки, толщиной в один атом. До сих пор получаемые по этой технологии образцы графена обладают наилучшим структурным совершенством. Именно на этих образцах были получены наиболее важные результаты, подтвердившие двумерный характер данного материала. Но их малые размеры, неправильная и заранее непредсказуемая геометрическая форма не позволяют их использовать в промышлен-

ности. Вторыми по уровню структурного совершенства являются пленки графена, получаемые термодеструкцией поверхности карбида кремния (SiC). Этим методом можно получать структуры промышленно важных габаритов, которые ограничиваются только размерами исходной подложки SiC, то есть до 6 дюймов (150 мм). В ФТИ им А.Ф. Иоффе, наряду с другими мировыми научными группами, был освоен способ получения графена методом термодеструкции поверхности монокристаллических подложек SiC. Кроме того, была разработана методика предростового отжига подложек SiC, позволяющая улучшить качество исходной полированной поверхности подложек, что в свою очередь положительно сказалось на качестве выращиваемого графена. Также сотрудниками ФТИ им А.Ф. Иоффе адаптирован ряд современных методик исследования нанобъектов: атомно-силовая микроскопия (АСМ), спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС), Кельвин-зондовая силовая микроскопия (КЗСМ) под характеризацию графеновых пленок.

Одним из основных достоинств метода роста графена на SiC является возможность использования высокоточных подложек. Выращенный на таких подложках графен не требуется переносить на другую диэлектрическую подложку, структуры графен/SiC могут сразу использоваться для создания различных приборов. Еще одним достоинством данного метода роста является определенная ориентация графеновых доменов, которая задается SiC подложкой, что позволяет получать пленки графена большой площади с выделенной азимутальной ориентацией доменов. На рис. 1, а представлено изображение рельефа поверхности SiC подложки после роста графена, полученное методом АСМ. Наблюдаемые на изображении узкие продольные террасы, которые покрываются графеном во время роста, определяют общие электрические характеристики выращенной графеновой пленки. Сами террасы разделены между собой ступеньками нанометрового размера (рис. 1, б). Проводимость графеновой пленки вдоль данных террас выше, чем ее проводимость поперек террас. Таким образом, выбор направления протекания тока в графеновой пленке путем ориентации структуры прибора вдоль террас позволяет улучшить его электрические характеристики.

Среди перспективных направлений применения графеновых пленок рассматривается создание сверхчув-

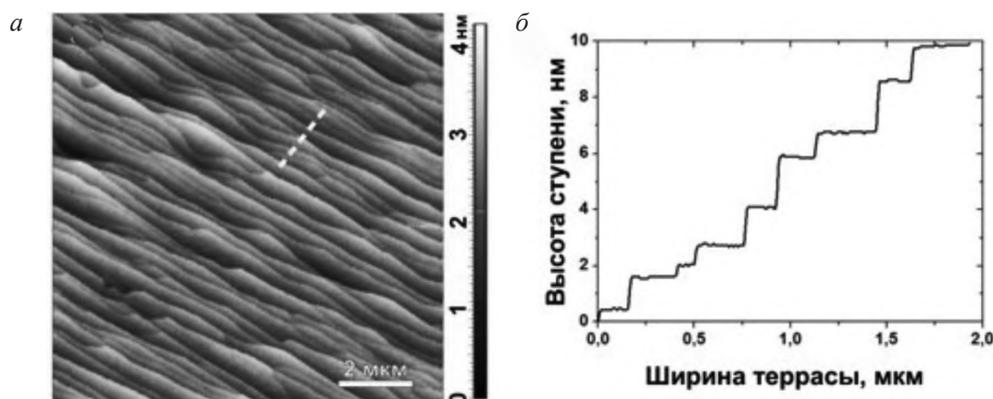


Рис 1. Изображение пленки графена, полученное методом АСМ. а – АСМ карта рельефа поверхности подложки SiC после роста графена, б – профиль поверхности, полученный вдоль пунктирной линии.

ствительных сенсоров, принцип работы которых основан на изменении сопротивления графена при адсорбции на его поверхности молекул различных соединений. Сенсор представляет собой полоску графена, расположенную на изолирующей подложке SiC с двумя омическими контактами по бокам (рис. 2, а, б). Омические контакты предназначены для создания электрического соединения между графеном и контактными выводами измерительного оборудования.

Сама по себе пленка графена в сенсоре (в чипе) не является селективно-чувствующим сенсором и может адсорбировать на свою поверхность разные вещества и биомолекулы. Для использования графена в качестве биосенсора, селективно чувствующим присоединение детектируемых молекул, применяют дополнительную функционализацию (обработку) его поверхности [39, 40]. Такая обработка создает дополнительные ковалентные связи для иммобилизации специфических антител на поверхности графена.

Каждое антитело (Ab) имеет определенный сайт связывания, который взаимодействует только со строго специфическим уникальным элементом белка – антигена (Ag), что позволяет производить детекцию этого вещества. Этот принцип имеет фундаментальное значение в функционировании иммунной системы человека [41]. Взаимодействие Ab-Ag осуществляется по принципу ключ-замок (key-lock) трехмерной пространственной комплементарности внешних электронных облаков антитела и молекул антигена. *In vitro* эти реакции лежат в основе многих иммунологических методов и широко используются в лабораторной практике.

Концепция биосенсора на пленках графена основана на создании условий для контролируемого прямого взаимодействия Ab-Ag на поверхности графена. Именно это взаимодействие приводит к практически мгновенному изменению электронного состояния графена (его сопротивления), которое может быть зарегистрировано электронным оборудованием. Разрабатываемая концепция биосенсора универсальна для обнаружения белковых соединений различной природы. В реакции взаимодействия Ab-Ag принимают участие только комплементарные (родственные) антитела и антигены, что обеспечивает селективность биосенсора. Посредством этой реакции возможна качественная оценка наличия того или иного протеина в обследуемом биологическом субстрате.

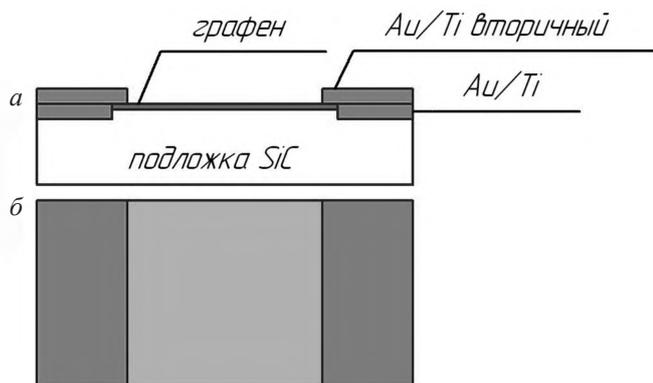


Рис. 2. Схематическое изображение топологии сенсора на основе структуры графен/SiC. а – вид сбоку, б – вид сверху.

В случае предварительной калибровки биосенсоров, когда известен отклик в виде конкретной величины изменения сопротивления на определенные концентрации искомого антигена, становится возможным количественное определение содержания белка в пробе [42].

Авторским коллективом проводилась серия экспериментов с подготовленными и функционализированными чипами на основе пленок графена на SiC подложках по исследованию их чувствительности при контакте с разбавленными растворами антигенов вируса гриппа А и В в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), концентрация которых изменялась на 5 порядков, начиная со сверхнизкой величины 1 fg/ml (10^{-15} г/мл) до 100 pg/ml (10^{-10} г/мл) [43]. Заметим, что концентрация 100 pg/ml является предельной для детектирования вирусов методом полимеразной цепной реакции.

В ходе проведения эксперимента было установлено, что отклик чипа с иммобилизованным антителом вируса гриппа В на воздействие антител вируса гриппа А незначительно меняется с изменением концентрацией антигена А около некоторого среднего значения. При этом, диапазон отклика фактически указывает на отсутствие влияния реакции некомплементарных антитела В и антигена А на электронное состояние пленки графена в чипе. В тоже время воздействие на чип комплементарного ему антигена В демонстрирует четкую зависимость отклика чипа от концентрации антигена. Кроме того, в данном случае наблюдается высокая специфичность антител-антигенной реакции на поверхности графена в чипе (рис. 3, а, б).

Результаты, полученные в эксперименте по детектированию вирусов гриппа чипами на основе пленок графена на подложках SiC, показали принципиальную работоспособность концепции биосенсора, основанной на реакции специфического связывания антитела с комплементарным ему антигеном непосредственно на поверхности графена. При этом продемонстрирована как высокая чувствительность, так и специфичность подобных сенсоров.

В литературе имеются некоторые данные, подтверждающие возможности использования биосенсоров на основе графена в диагностическом процессе болезни Альцгеймера. Так, экспериментально была проверена возможность детекции β -амилоида и τ -белка. Установлено, что селективность метода достигает 98%, показывая крайне высокий порог чувствительности, который достигал 100 фемтограмм на мл (для сравнения чувствительность иммуноферментного анализа не превышала 150 нанограмм на мл) [44]. Подобные результаты были продемонстрированы и в другом исследовании, где также установлена высокая чувствительность сенсоров на основе графена, значительно превышающая содержание β -амилоида в плазме крови. Кроме того, определено, что ответ сенсоров в виде изменения сопротивления имеет линейную корреляцию с концентрацией растворенного амилоида [45]. Помимо детекции белков, предпринимается попытка использования технологии графеновых сенсоров в генетических исследованиях. В частности, была разработана платформа, использующая графеновые квантовые точки, с иммобилизованными на ней ДНК-зондами для определения носительства генотипа АпоЕ4. В эксперименте она продемонстрировала высокую чувствительность, повторяемость и селективность результатов [46]. Учитывая полученные предварительные данные о возможности использования биосенсоров на основе графена с целью обнаружения амилоидо- и таупатии, в рамках ранней диагностики болезни Альцгеймера пред-

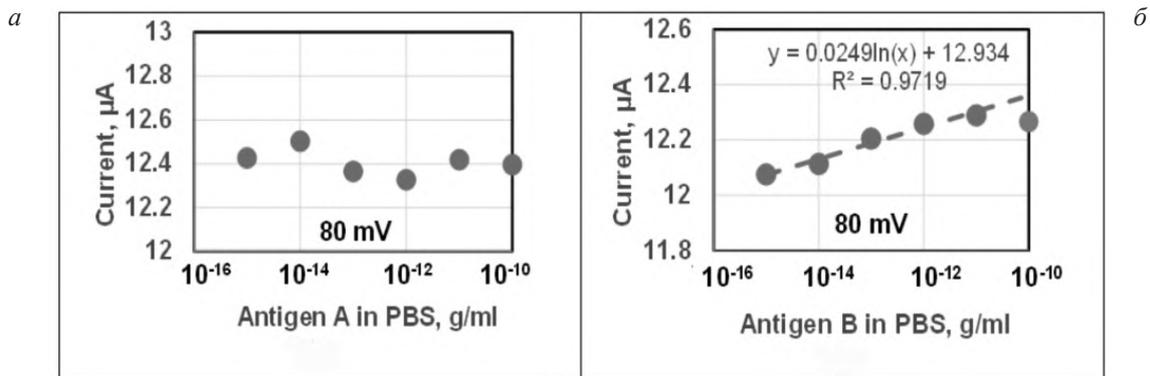


Рис. 3. Отклик чипа с иммобилизованным антителом вируса гриппа В в зависимости от концентрации антигена вируса А (а) или В (б) в растворе PBS. Пунктирная линия представляет аппроксимацию данных логарифмической функцией с параметром $R^2=0,97$.

ложено использовать их для определения и иных веществ, таких, как нейротрансмиттеры, показатели оксидантного стресса и другие [47].

Заключение. Таким образом, разработка панели определения биомаркеров на основе графеновых сенсоров имеет большие перспективы. Эта работа позволит глубже понять патобиохимические процессы, развивающиеся в рамках данного заболевания. Кроме того, учитывая потенциально высокую чувствительность и специфичность, подобная панель может кардинально увеличить наши возможности диагностики болезни Альцгеймера, особенно на ранних этапах, будет способствовать выделению лиц с повышенным риском развития клинических проявлений, поможет оценить вероятность ближайшего прогноза течения, а также эффективность проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–8, 10–12, 15–25, 27–32, 34, 35, 37–41, 43–47 см. REFERENCES)

9. Емелин А.Ю., Лобзин В.Ю., Воробьев С.В. Когнитивные нарушения: руководство для врачей. М.: ПАО «Т8 Издательские технологии»; 2019.
13. Незнанов Н.Г., Ананьева Н.И., Залуцкая Н.М., Стулов И.К., Гальсман И.Е., Бельцева Ю.А. Визуальная шкальная МРТ оценка атрофических изменений головного мозга в диагностике ранней стадии болезни Альцгеймера (1 этап исследования). *Обзорные психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева*. 2016; 4: 61–5.
14. Литвиненко И.В., Емелин А.Ю., Лобзин В.Ю., Колмакова К.А. Нейровизуализационные методы диагностики болезни Альцгеймера и цереброваскулярных заболеваний, сопровождающихся когнитивными нарушениями. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2019; 11(3S): 18–25.
26. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Козлова Д.И., Кочкина Е.Г., Федорова Я.Б., Гаврилова С.И. Активность холинэстераз и неприлизина плазмы крови как потенциальные биомаркеры синдрома мягкого когнитивного снижения и болезни Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015; 12: 110–7.
33. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 249–56.
36. Лебедев А.А., Давыдов В.Ю., Новиков С.Н., Литвин Д.П., Макаров Ю.Н., Климович В.Б. и др. Биосенсоры на основе графена. *Письма в журнал технической физики*. 2016; 42(14): 28–35.
42. Усиков А.С., Лебедев С.П., Роевков А.Д., Бараш И.С., Новиков С.В., Пузык М.В. и др. Исследование чувствительной способности графена для применений в качестве биосенсоров. *Письма в журнал технической физики*. 2020; 46(10): 3–6.

REFERENCES

1. Sachdev P.S., Lipnicki D.M., Kochan N.A., Crawford J.D., Thalamuthu A., Andrews G. et al. The Prevalence of Mild Cognitive Impairment in Diverse Geographical and Ethnocultural Regions: The COSMIC Collaboration. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0142388. <http://doi: 10.1371/journal.pone.0142388>.
2. Patterson C. Alzheimer's Disease International; London: 2018. *World Alzheimer report*. 2018: 1–48; <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2018.pdf>.
3. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7 (3): 137–52. <http://doi:10.1038/nrneurol.2011.2>.
4. Hauber A.B., Gnanasakthy A., Snyder E.H., Bala M.V., Richter A., Mauskopf J.A. Potential savings in the cost of caring for Alzheimer's Disease. Treatment with rivastigmine. *Pharmacoeconomics*. 2000; 17 (4): 351–60. <http://doi: 10.2165/00019053-200017040-00005>.
5. McKhann G.M., Knopman D.S., Chertkow H., Hyman B.T., Jack Jr. C.R., Kawas C.H. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheim Dement*. 2011; 7(3): 263–9. <http://doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
6. Jack Jr. C.R., Albert M.S., Knopman D.S., McKhann G.M., Sperling R.A., Carrillo M.C. et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheim Dement*. 2011; 7 (3): 257–62. <http://doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.004>.
7. Sperling R.A., Aisen P.S., Beckett L.A., Bennett D.A., Craft S., Fagan A.M. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheim Dement*. 2011; 7(3): 280–92. <http://doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003>.
8. Albert M.S., DeKosky S.T., Dickson D., Dubois B., Feldman H.H., Fox N.C. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheim Dement*. 2011; 7(3): 270–9. <http://doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008>.
9. Emelin A.Yu., Lobzin V.Yu., Vorob'ev S.V. Cognitive disorders: a guide for doctors. Moscow: PАО «Т8 Izdatel'skie Tekhnologii»; 2019. (in Russian)
10. d'Abramo C., D'Adamo L., Giliberto L. Significance of Blood and Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Sensitivity, Specificity and Potential for Clinical Use. *J. Pers. Med*. 2020; 10(3): 116. <http://doi: 10.3390/jpm10030116>.
11. Harada R., Okamura N., Furumoto S., Tago T., Yanai K., Arai H. et al. Characteristics of Tau and Its Ligands in PET Imaging. *Biomolecules*. 2016; 6 (1): 7. <https://doi.org/10.3390/biom6010007>.
12. Camus V., Payoux P., Barré L., Desgranges B., Voisin T., Tauber C. et al. Using PET with 18F-AV-45 (florbetapir) to quantify brain amyloid load in a clinical environment. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2012; 39(4): 621–31. <http://doi: 10.1007/s00259-011-2021-8>.

BIOCHEMISTRY

13. Neznanov N.G., Anan'eva N.I., Zaluckaya N.M., Stulov I.K., Gal'sman I.E., Bel'ceva Yu.A. et al. Visual school MRI assessment of atrophic changes in the brain in the diagnosis of early-stage Alzheimer's disease (stage I of the study). *Obozrenie psikiatrii i meditsinskoy psikhologii im. V.M. Bekhterev*. 2016; 4: 61-5. https://psychiatr.ru/files/magazines/2016_12_obozr_1003.pdf. (in Russian)
14. Litvinenko I.V., Emelin A.Yu., Lobzin V.Yu., Kolmakova K.A. Neuroimaging methods for the diagnosis of Alzheimer's disease and cerebrovascular diseases accompanied by cognitive impairment. *Nevrologiya, Neyropsikiatriya, Psikhosomatika*. 2019; 11(3S): 18-25. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2019-3S-18-25>. (in Russian)
15. Papa L., Robinson G., Oli M., Pineda J., Demery J., Brophy G. et al. Use of biomarkers for diagnosis and management of traumatic brain injury patients. *Expert Opin Med Diagn*. 2008; 2(8): 937-45. <https://doi.org/10.1517/17530059.2.8.937>.
16. Lewczuk P., Riederer P., O'Bryant S.E., Verbeek M.M., Dubois B., Visser J.P. et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *World J. Biol. Psychiatry*. 2018; 19(4): 244-328. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1375556>.
17. Mielke M.M., Hagen C.E., Wennberg A.M.V., Airey D.C., Savica R., Knopman D.S. et al. Association of plasma total tau level with cognitive decline and risk of mild cognitive impairment or dementia in the mayo clinic study on aging. *JAMA Neurol*. 2017; 74(9): 1073-80. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1359>.
18. Pereira J.B., Westman E., Hansson O. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association between cerebrospinal fluid and plasma neurodegeneration biomarkers with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2017; 58: 14-29. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.002>.
19. Jia L., Qiu Q., Zhang H. Chu L., Du Y., Zhang J. et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement*. 2019; 15(8): 1071-80. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.05.002>.
20. Rembach A., Faux N.G., Watt A.D., Pertile K.K., Rumble R.L., Trounson B.O. et al. Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014; 10(1): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.12.006>.
21. Hanon O., Vidal J.S., Lehmann S., Bombois S., Allinquant B., Tréluuyer J.-M. et al. Plasma amyloid levels within the Alzheimer's process and correlations with central biomarkers. *Alzheimers Dement*. 2018; 14(7): 858-68. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.01.004>.
22. Khalil M., Teunissen C.E., Otto M., Piehl F., Sormani M.P., Gatteringer T. et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol*. 2018; 14(10): 577-89. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>.
23. Weston P.S.J., Poole T., O'Connor A., Heslegrave A., Ryan N.S., Liang Y. et al. Longitudinal measurement of serum neurofilament light in presymptomatic familial Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* 2019; 11(1): 19. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0472-5>.
24. Schultz S.A., Strain J.F., Adedokun A., Wang Q., Preische O., Kuhle J. et al. Serum neurofilament light chain levels are associated with white matter integrity in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*. 2020; 142: 104960. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104960>.
25. Zhang H., Liu D., Wang Y., Huang H., Zhao Y., Zhou H. Meta-analysis of expression and function of neprilysin in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2017; 657: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.060>.
26. Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N., Kozlova D.I., Kochkina E.G., Fedorova Ya.B., Gavrilova S.I. Plasma cholinesterase and neprilysin activity as potential biomarkers of mild cognitive decline syndrome and Alzheimer's disease. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakov*. 2015; 12: 110-7. <https://doi.org/10.17116/jnevro2015115112110-117>. (in Russian)
27. Casaleto K.B., Elahi F.M., Bettcher B.M., Neuhaus J., Bendlin B.B., Asthana S. et al. Neurogranin, a synaptic protein, is associated with memory independent of Alzheimer biomarkers. *Neurology*. 2017; 89(17): 1782-8. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004569>.
28. Zetterberg H., Bendlin B.B. Biomarkers for Alzheimer's disease-preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol. Psychiatry*. 2021; 26(1): 296-308. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0721-9>.
29. Alzforum.org [electronic resource]. <http://www.alzforum.org/alz-biomarker>.
30. Wennström M., Surova Y., Hall S., Nilsson C., Minthon L., Hansson O. et al. The Inflammatory Marker YKL-40 Is Elevated in Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer's but Not Parkinson's Disease or Dementia with Lewy Bodies. *PLoS ONE*. 2015; 10(8): e0135458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135458>.
31. Janelidze S., Stomrud E., Palmqvist S., Zetterberg H., van Westen D., Jeromin A. et al. Plasma β -Amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci. Rep*. 2016; 6: 26801. <https://doi.org/10.1038/srep26801>.
32. Song L., Lachno D.R., Hanlon D., Shepro A., Jeromin A., Gemani D. et al. A digital enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive measurement of amyloid- β 1-42 peptide in human plasma with utility for studies of Alzheimer's disease therapeutics. *Alzheimers Res Ther*. 2016; 8(1): 58. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0225-7>.
33. Bocharova Yu.A., Chebotar' I.V., Mayanskiy N.A. Opportunities, problems and prospects of mass spectrometric technologies in medical microbiology (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(4): 249-56. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256>. (in Russian)
34. Ovod V., Ramsey K.N., Mawuenyega K.G., Bollinger J.G., Hicks T., Schneider T. et al. Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement*. 2017; 13(8): 841-9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.2266>.
35. Verberk I.M.W., Slot R.E., Verfaillie S.C.J., Heijst H., Prins N.D., van Berckel B.N.M. et al. Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes. *Ann. Neurol*. 2018; 84(5): 648-58. <https://doi.org/10.1002/ana.25334>.
36. Lebedev A.A., Davydov V.Yu., Novikov S.N., Litvin D.P., Makarov Yu.N., Klimovich V.B. et al. Graphene-based biosensors. *Pis'ma v zhurnal tekhnicheskoy fiziki*. 2016; 42(14): 28-35. <https://journals.ioffe.ru/articles/viewPDF/43411>. (in Russian)
37. Chauhan N., Maekawa T., Kumar D.N.S. Graphene based biosensors-Accelerating medical diagnostics to new-dimensions. *J. Mater. Res*. 2017; 32(15): 2860-82. <https://doi.org/10.1557/jmr.2017.91>.
38. Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V., Hill E.W., Blake P., Katsnelson M.I. et al. Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene. *Nat. Mater*. 2007; 6(9): 652-5. <https://doi.org/10.1038/nmat1967>.
39. Georgakilas V., Otyepka M., Bourlino A.B., Chandra V., Kim N., Kemp K.C. et al. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. *Chem. Rev*. 2012; 112(11): 6156-6214. <https://doi.org/10.1021/cr3000412>.
40. Tehrani Z., Burwell G., Mohd Azraie M.A., Castaing A., Rickman R., Almarashi J.Q.M. et al. Generic epitaxial graphene biosensors for ultrasensitive detection of cancer risk biomarker. *2D Materials*. 2014; 1(2): 025004. <https://doi.org/10.1088/2053-1583/1/2/025004>. (in Russian)
41. Davies D.R., Sheriff S., Padlan E.A. Antibody-Antigen Complexes. *J. Biological Chemistry*. 1988.263(22):10541-4. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.59.1.439>.
42. Usikov A.S., Lebedev S.P., Roenkov A.D., Barash I.S., Novikov S.V., Puzyk M.V. et al. Investigation of the sensitivity of graphene for use as biosensors. *Pis'ma v zhurnal tekhnicheskoy fiziki*. 2020; 46(10): 3-6. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2020.10.49421.18250>. (in Russian)
43. Lebedev A.A., Davydov S.Y., Eliseyev I.A., Roenkov A.D., Avdeev O., Lebedev S.P. et al. Graphene on SiC Substrate as Biosensor: Theoretical Background, Preparation and Characterization. *Materials (Basel)*. 2021; 14(3): 590. <https://doi.org/10.3390/ma14030590>.
44. Demeritte T., Nellore B.P.V., Kanchanapally R., Sinha S.S., Pramanik A., Chavva S.R. et al. Hybrid Graphene Oxide Based Plasmonic-Magnetic Multifunctional Nanoplatfor for Selective Separation and Label-Free Identification of Alzheimer's Disease Biomarkers. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015; 7(24): 13693-700. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03619>.
45. Sun L., Zhong Y., Gui J., Wang X., Zhuang X., Weng J. A hydrogel biosensor for high selective and sensitive detection of amyloid-beta oligomers. *Int. J. Nanomedicine*. 2018; 13: 843-56. <https://doi.org/10.2147/IJN.S152163>.
46. Mars A., Hamami M., Bechnak L., Patra D., Raouafi N. Curcumin-graphene quantum dots for dual mode sensing platform: Electrochemical and fluorescence detection of APOe4, responsible of Alzheimer's disease. *Anal. Chim. Acta*. 2018; 1036: 141-6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.075>.
47. Toyos-Rodríguez C., García-Alonso F.J., de la Escosura-Muñiz A. Electrochemical Biosensors Based on Nanomaterials for Early Detection of Alzheimer's Disease. *Sensors (Basel)*. 2020; 20(17): 4748. <https://doi.org/10.3390/s20174748>.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Головня Е.Г., Харитиди Т.Ю., Сотников А.В., Сомонова О.В., Кушлинский Н.Е.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ УРОВНИ БИОМАРКЕРОВ СЕПСИСА У ДЕТЕЙ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия

Представлены данные о диагностических уровнях маркеров сепсиса в плазме крови у 117 пациентов с онкологическими заболеваниями в возрасте от 1 года до 18 лет. Пациенты были разделены на 4 группы в зависимости от исхода клинического течения воспалительного процесса или инфекционных осложнений: 1-я группа – больные с отсутствием осложнений противоопухолевого лечения ($n=13/11,1\%$), 2-я группа – наличие у больных системного воспалительного ответа ($n=64/54,7\%$), 3-я группа – пациенты с сепсисом ($n=27/23,1\%$), 4-я группа – пациенты с септическим шоком ($n=13/11,1\%$). Пороговый уровень пресепсина между группами 1 и 2 составил 202 нг/мл, 371 нг/мл между группами 1 и 3, 604 нг/мл между группами 2 и 3 и 1500 нг/мл между группами 3 и 4. Для прокальцитонина пороговый уровень между группами 1 и 2 составил 0,23 нг/мл, 0,48 нг/мл между группами 1 и 3, 0,51 нг/мл между группами 2 и 3 и 3,9 нг/мл между группами 3 и 4. Пороговое значение С-реактивного белка у пациентов с солидными опухолями составило 12,6 г/л между группами 1 и 2. У пациентов с онкогематологическими заболеваниями пороговый уровень С-реактивного белка составил 43,4 г/л между группами 2 и 3 и 77,1 г/л между группами 2 и 4. По результатам ROC-анализа выявлено преимущество пресепсина перед прокальцитонином и С-реактивным белком при определении степени тяжести септических осложнений у детей с онкопатологией.

Ключевые слова: сепсис; дети; онкология; пресепсин; прокальцитонин; С-реактивный белок.

Для цитирования: Головня Е.Г., Харитиди Т.Ю., Сотников А.В., Сомонова О.В., Кушлинский Н.Е. Диагностические уровни биомаркеров сепсиса у детей с онкологическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 13-18. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-13-18>

Для корреспонденции: Головня Евгений Геннадьевич, мл. науч. сотр. лаб. клинической биохимии; e-mail: golovnya_e@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 28.10.2021

Принята к печати 03.11.2021

Опубликовано 28.01.2022

Golovnya E.G., Kharitidi T.Yu., Sotnikov A.V., Somonova O.V., Kushlinskii N.E.

DIAGNOSTIC LEVELS OF SEPSIS BIOMARKERS IN CHILDREN WITH ONCOLOGICAL DISEASES

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478, Moscow, Russia;

The data on the diagnostic levels of sepsis markers in blood plasma in 117 patients with oncological diseases at the age from 1 to 18 years are presented. The patients were divided into 4 groups depending on the outcome of the clinical course of the inflammatory process or infectious complications: group 1 - patients with no complications of anticancer treatment ($n = 13/11.1\%$), group 2 - the presence of a systemic inflammatory response in patients ($n = 64/54.7\%$), group 3 - patients with sepsis ($n = 27/23.1\%$), group 4 - patients with septic shock ($n = 13/11.1\%$). The threshold level of presepsin between groups 1 and 2 was 202 pg/ml, 371 pg/ml between groups 1 and 3, 604 pg/ml between groups 2 and 3 and 1500 pg/ml between groups 3 and 4. For procalcitonin, the threshold level between groups 1 and 2 was 0.23 ng/ml, 0.48 ng/ml between groups 1 and 3, 0.51 ng/ml between groups 2 and 3 and 3.9 ng/ml between groups 3 and 4. The threshold value of C-reactive protein in patients with solid tumors was 12.6 g/l between groups 1 and 2. In patients with oncohematological diseases, the threshold level of C-reactive protein was 43.4 g / L between groups 2 and 3, 77.1 g / L between groups 2 and 4. According to the ROC analysis, presepsin was superior to procalcitonin and C-reactive protein in the diagnosis of septic complications.

Key words: sepsis; children; oncology; presepsin; procalcitonin; C-reactive protein.

For citation: Golovnya E.G., Kharitidi T.Yu., Sotnikov A.V., Somonova O.V., Kushlinskii N.E. Diagnostic levels of sepsis biomarkers in children with oncological diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 13-18 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-13-18>

For correspondence: Golovnya E.G., Senior Researcher, clinical biochemistry laboratory; e-mail: golovnya_e@mail.ru

Information about authors:

Golovnya E.G., <https://orcid.org/0000-0003-3446-9176>;

Kharitidi T.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-4680-1909>;

Sotnikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7240-8273>;

Somonova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4706-2439>;

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.10.2021

Accepted 03.11.2021

Published 28.01.2022

Введение. Успехи современной детской онкологии в значительной степени связаны с применением высокодозной и высокоинтенсивной химиотерапии, проведение которой сопряжено с высоким риском развития инфекционных осложнений. Сепсис остается одним из ведущих и грозных осложнений, развивающихся в процессе противоопухолевого лечения детей со злокачественными новообразованиями. При этом, септический шок (СШ) остается ведущей причиной гибели пациентов, а уровень смертности среди этой группы больных достигает 30-50% [1]. Для правильной оценки состояния пациентов необходимо использовать надежные биомаркеры. К сожалению, «идеального биомаркера» для ранней диагностики сепсиса в настоящее время не существует. Микробиологические пробы зачастую дают ложноотрицательные результаты, к тому же их проведение – это длительный процесс.

В 2016 г. Общество критической медицины (SCCM) и Европейское общество интенсивной терапии (ESICM) разработали новые критерии определения сепсиса. Основным отличием был уход от понятия синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) с акцентом на клинические проявления сепсиса (органная недостаточность, гипотензия, зависимость от вазопрессоров). Таким образом, сепсис – это системное жизнеугрожающее состояние, которое развивается в том случае, если ответ организма на инфекцию приводит к повреждению собственных тканей и органов. Септический шок можно определить как стойкую септико-индуцированную гипотензию, не разрешающуюся, несмотря на проведение инфузионной терапии [2, 3].

Патофизиология сепсиса является единым целым таких процессов, как ответ организма на проникновение патогена, иммунный ответ, активация системы комплемента и коагуляции, продукция белков острой фазы. Сепсис является синдромом системного воспалительного ответа на эндотоксическую агрессию [4]. Полагают, что инфекция запускает более сложный ответ в организме, в котором участвуют как провоспалительные, так и противовоспалительные механизмы, направленные на устранение инфекции и восстановление тканей с одной стороны, и повреждение органов и появление вторичного очага инфекции, с другой [5, 6].

Патогенные микроорганизмы активируют иммунокомпетентные клетки посредством взаимодействия с образ-распознающими рецепторами, а также улавливают эндогенные сигнальные молекулы, высвобождающиеся из поврежденных клеток, так называемые «молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением» (белки B1, S100, внеклеточные РНК, ДНК и гистоны). Эти молекулы так же высвобождаются при повреждениях, не связанных с участием патогенных микроорганизмов. В связи с этим можно предположить, что полиорганная недостаточность при сепсисе фундаментально не отличается от таковой при неинфекционных критических состояниях [7, 8].

Биомаркеры сепсиса могут представлять собой, не только метаболиты, присутствующие в жидкостях организма, но и белки в циркулирующих клетках крови. Вследствие того, что на патофизиологию и клиническое течение сепсиса также влияет возраст пациента, чувствительность и специфичность определенных биомаркеров могут различаться у новорожденных, детей, взрослых и пожилых людей [9, 10].

Основными маркерами сепсиса в настоящее время считают прокальцитонин (ПКТ), С-реактивный белок

(СРБ), пресепсин (ПСП). В связи с этим представлял интерес определения пограничных значений этих показателей для оценки степени тяжести инфекционных осложнений, в данном случае, у детей с онкологическими заболеваниями.

С-реактивный белок - представляет собой высококонсервативный белок плазмы, который участвует в острой фазе системного воспалительного ответа. СРБ – это молекула распознавания образов, связывающаяся с определенными молекулярными конфигурациями, которые выделяются вследствие гибели клеток или обнаруживаются на поверхности патогенов. Быстрое увеличение синтеза СРБ в течение нескольких часов после повреждения тканей инфекционным агентом предполагает, что он способствует защите организма и является частью врожденного иммунного ответа [11].

Прокальцитонин (ПКТ) - пептид, состоящий из 116 аминокислотных остатков, являющийся предшественником гормона кальцитонина. В норме ПКТ секретируется только нейроэндокринными клетками щитовидной железы. Однако, во время инфекции, уровень ПКТ возрастает в тысячи раз практически во всех тканях и типах клеток в ответ на выброс цитокинов и бактериальных токсинов [12, 13].

Пресепсин (ПСП) - молекула CD14 является рецептором к комплексу липополисахарид-липополисахарид связывающий белок. Карбоксильный конец этой молекулы погружен в мембрану клетки и проводит сигнал, вызванный эндотоксином при помощи Toll-подобных рецепторов 4 типа [14, 15]. CD14 представлен двумя формами: мембранной – mCD14 и растворимой – sCD14. Последняя имеет высокое сродство к ЛПС, и в основном экспрессируется на поверхности моноцитов/макрофагов, в меньшей степени – на поверхности нейтрофилов. В плазме крови при участии катепсина D происходит гидролиз sCD14, N-терминальный фрагмент которого и является ПСП [16, 17].

Материал и методы. В исследование включили 117 пациентов с онкологическими заболеваниями в возрасте от 1 до 18 лет. Больных разделили на 4 группы в зависимости от исхода клинического течения воспалительного процесса или инфекционных осложнений: 1-я группа – отсутствие осложнений лечения ($n=13/11,1\%$), 2-я группа – наличие системного воспалительного ответа ($n=64/54,7\%$), 3-я группа – сепсис ($n=27/23,1\%$), 4-я группа – септический шок ($n=13/11,1\%$). У большинства пациентов проводили исследование маркеров в ходе серийных наблюдений.

Содержание ПСП определяли в плазме крови на иммунохемилюминесцентном анализаторе Pathfast (Mitsubishi Chemical Medience Corporation), используя стандартный набор реагентов (PATHFAST Presepsin, PF1201-K). Определение содержания прокальцитонина проводили в плазме крови иммунохимическим методом с электрохемилюминесценцией (Cobas e601, Roche Diagnostics, Швейцария) согласно прилагаемой инструкции. Концентрацию СРБ определяли в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Швейцария).

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с использованием программ SPSS 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) и Statistica 12 (Statsoft, США). Исследуемые показатели обладали распределением, отличавшимся от нормального, и были представлены в виде медианы, минимального и максимального

значений. Данные проанализированы непараметрическим методом с использованием критерия Краскела–Уоллиса для сравнения статистической значимости различий медиан в исследуемых группах. Определение пороговых значений проводили с помощью ROC-анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Из 117 обследованных онкологических больных у 40 развился сепсис, у 13 из которых течение осложнилось септическим шоком (СШ). От сепсиса и СШ умерли 17 детей (42,5%). Смертность у детей от сепсиса составила 36,8% у девочек и 47,4% у мальчиков ($p=0,51$), возраст детей с сепсисом не отличался от такового у пациентов без сепсиса ($p=0,9$) и, в среднем, составил 8 лет. При солидных опухолях сепсис развивался значительно реже (24,1%), чем при гематологических новообразованиях (70,8%; $p=0,00011$). Показатели смертности статистически не отличались ($p=0,22$) и составили 52,9% при гематологических новообразованиях против 33,3% при солидных опухолях.

В ходе анализа получены значения медиан, минимальные и максимальные значения исследуемых биохимических маркеров в каждой группе пациентов (табл. 1).

Далее нами проведен расчет пороговых уровней и анализ возможности использования биохимических маркеров при оценке степени тяжести септических осложнений.

Пресепсин. При изучении концентрации ПСП в плазме крови в группах больных проведен ROC-анализ (рис. 1). При выделении группы пациентов без осложнений (1-я группа) от группы с ССВО (2-я группа) определили пороговое значение ПСП равное 202 пг/мл (чувствительность теста 75,6% и специфичность 89,5%), а пороговое

значение ПСП равное 371 пг/мл (чувствительность теста 92,6% и специфичность 94,7%) выделяло группу пациентов без осложнений от группы с сепсисом. Пороговое значение ПСП равное 604 пг/мл (чувствительность 84% и специфичность 89,1%) позволяло разделить пациентов с ССВО (2-я группа) и сепсисом (3-я группа). Пороговый уровень ПСП 1500 пг/мл (чувствительность 85,4% и специфичность 81,9%) разделило больных с сепсисом (3-я группа) и СШ (4-я группа).

Таким образом, определение уровня ПСП в плазме крови позволяет дифференцировать степень тяжести инфекционных осложнений у детей с онкологическими заболеваниями.

Прокальцитонин. В ходе изучения концентрации ПКТ в плазме крови определили медианные значения маркера в исследуемых группах пациентов методом построения ROC-кривых (рис. 2). Также выявлено пересечение значений маркера в группах, что затруднило их разделение. К тому же уровень биомаркера зачастую находился в так называемой «серой зоне» – от 0,5 до 2,0 нг/мл, что также затрудняло однозначную интерпретацию полученных результатов и требовало повторного анализа.

При разделении больных без каких-либо осложнений (1-я группа) от пациентов с ССВО (2-я группа) с учетом уровня ПКТ определили пороговое значение маркера равное 0,23 нг/мл (чувствительность 70,7% и специфичность 76,5%). Для разделения групп пациентов без осложнений (1-я группа) и с сепсисом (3-я группа) пороговое значение ПКТ составило 0,48 нг/мл (чувствительность 81,1% и специфичность 88,2%).

Оптимальное пороговое значение ПКТ – 0,51 нг/мл (чувствительность 75,8% и специфичность 67,9%) по-

Распределение медиан, минимальных и максимальных значений биомаркеров сепсиса в обследованных группах

| Группы | n | Пресепсин, пг/мл | Прокальцитонин, нг/мл | С-реактивный белок, г/л |
|--------------------|----|------------------|-----------------------|-------------------------|
| | | Ме (мин.; макс.) | Ме (мин.; макс.) | Ме (мин.; макс.) |
| 1. Без осложнений | 13 | 123 (61,9; 166) | 0,09 (0,06; 0,54) | 3 (1,3; 35,2) |
| 2. ССВО | 64 | 306 (101; 864) | 0,26 (0,05; 27,6) | 27,3 (3,3; 356) |
| 3. Сепсис | 27 | 1164 (146; 2330) | 2,27 (0,16; 80) | 69,7 (13,7; 311) |
| 4. Септический шок | 13 | 2103 (909; 7741) | 7,16 (4,16; 200) | 146 (20,4; 555) |

Примечание. n – число больных.

Пресепсин

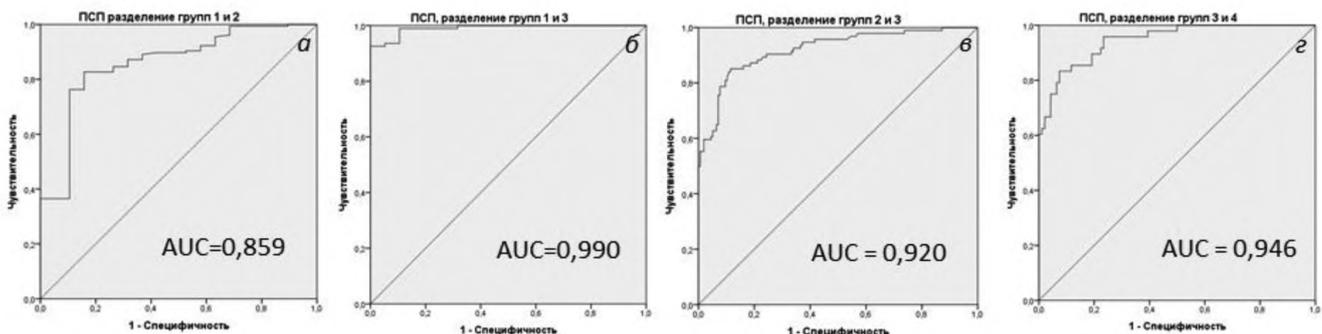


Рис. 1. Результаты ROC-анализа диагностической эффективности пресепсина: а – без осложнений vs ССВО; б – без осложнений vs Сепсис; в – ССВО vs Сепсис; г – Сепсис vs Септический шок.

Прокальцитонин

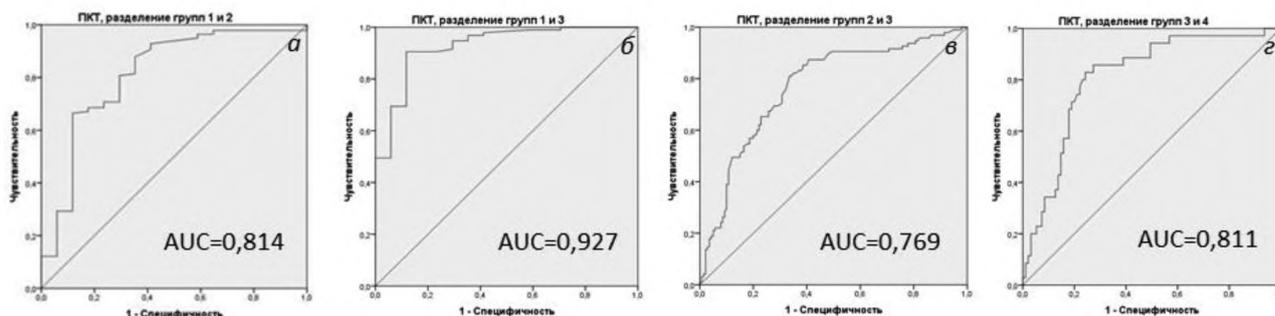


Рис. 2. Результаты ROC-анализа диагностической эффективности прокальцитонина. *а* – без осложнений vs ССВО; *б* – без осложнений vs Сепсис; *в* – ССВО vs Сепсис; *г* – Сепсис vs Септический шок.

С-реактивный белок

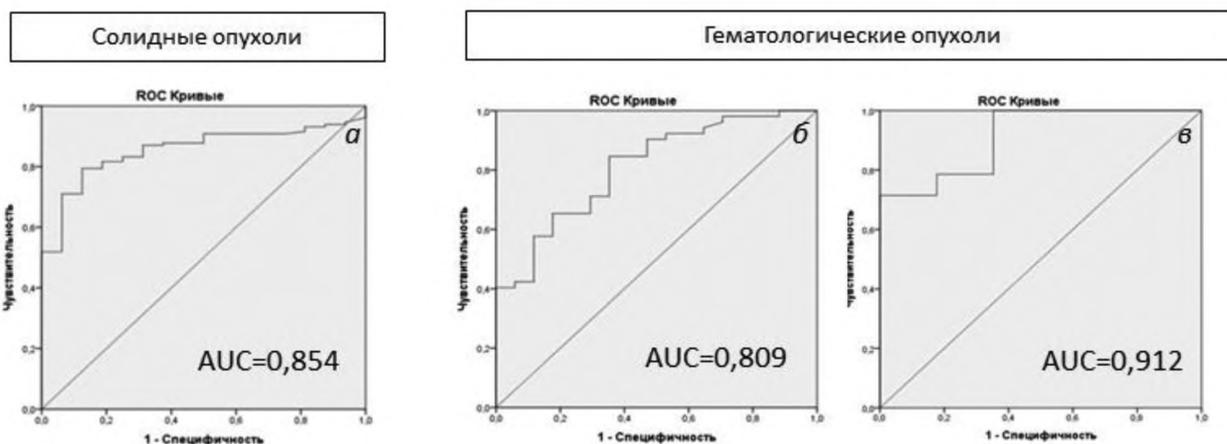


Рис. 3. Результаты ROC-анализа диагностической эффективности СРБ: *а* – без осложнений vs ССВО; *б* – ССВО vs Сепсис; *в* – ССВО vs Септический шок.

звляло выделить группу пациентов с ССВО (2-я группа) от пациентов с сепсисом (3-я группа), что соответствует общепринятому критерию (менее 0,5 нг/мл при отсутствии сепсиса). При разделении групп больных с сепсисом (3-я группа) и СШ (4-я группа) оптимальное пороговое значение ПКТ составило 3,9 нг/мл, а при значениях маркера выше 4 нг/мл у пациентов возможен СШ (чувствительность 77,1% и специфичность 77,9%), что отличается от ранее установленных норм (более 10 нг/мл для СШ) [18, 19].

Таким образом, ПКТ позволял отделить пациентов без осложнений (1-я группа) от пациентов с сепсисом и СШ (3-я и 4-я группы, соответственно), пациентов с ССВО (2-я группа) от пациентов с СШ (4-я группа).

С-реактивный белок. Для СРБ выявлены статистически значимые различия медиан уровней маркера с учетом типа опухоли для пациентов с сепсисом (3-я группа) и СШ (4-я группа). У пациентов с солидными опухолями при развитии сепсиса медиана СРБ составила 46,4 г/л, а у детей с онкогематологическими заболеваниями – 95,0 г/л ($p=0,001$). При развитии СШ у пациентов с солидными опухолями медиана маркера составила 46,8 г/л, против 148,7 г/л в группе детей с онкогемато-

логическими заболеваниями ($p=0,0000$). В связи с этим, целесообразно определять пороговые значения СРБ по отдельности для разных типов опухолей (рис. 3).

При разделении пациентов с солидными опухолями без осложнений (1-я группа) и с ССВО (2-я группа) определено пороговое значение СРБ равно 12,6 г/л (чувствительность 81,7% и специфичность 81,2%). Пороговое значение СРБ в сыворотке крови онкологических больных при сепсисе (18,3 г/л) и СШ (18,6 г/л) статистически значимо не различались, что не позволяет использовать данный биомаркер для дифференциальной диагностики сепсиса и СШ в группе пациентов с солидными опухолями. Таким образом, определение СРБ при солидных опухолях следует использовать только для демаркации пациентов без осложнений от больных с ССВО.

У пациентов с онкогематологическими заболеваниями при разделении групп пациентов с ССВО и сепсисом определено пороговое значение СРБ – 43,4 г/л (чувствительность 84,6% и специфичность 96,5%). Для отделения группы с ССВО от пациентов с СШ оптимальное пороговое значение СРБ составило 77,1 г/л (чувствительность 78,6% и специфичность 82,4%). Согласно

Пороговые значения биомаркеров сепсиса в исследуемых группах больных

| Показатели | Разделяемые группы | Пороговое значение | Чувствительность, % | Специфичность, % | Площадь под ROC-кривой (AUC) |
|--|--------------------------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------------------|
| Пресепсин, пг/мл | Отсутствие осложнений / ССВО | 202 | 75,6 | 89,5 | 0,859 |
| | Отсутствие осложнений / сепсис | 371 | 92,6 | 94,7 | 0,990 |
| | ССВО / сепсис | 604 | 84 | 89,1 | 0,920 |
| | Сепсис / септический шок | 1500 | 85,4 | 81,9 | 0,946 |
| Прокальцитонин, нг/мл | Отсутствие осложнений / ССВО | 0,23 | 70,7 | 76,5 | 0,814 |
| | Отсутствие осложнений / сепсис | 0,51 | 75,8 | 88,2 | 0,927 |
| | ССВО / сепсис | 0,51 | 75,8 | 67,9 | 0,769 |
| | Сепсис / септический шок | 3,9 | 77,1 | 77,9 | 0,811 |
| С-реактивный белок, г/л (среди всех нозологий) | Отсутствие осложнений / ССВО | 12,2 | 79,7 | 81,8 | 0,853 |
| | Отсутствие осложнений / сепсис | 27,5 | 77,7 | 90,9 | 0,939 |
| | ССВО / сепсис | 50,2 | 67 | 60,8 | 0,696 |
| С-реактивный белок, г/л (солидные опухоли) | Отсутствие осложнений / ССВО | 12,6 | 81,7 | 81,2 | 0,854 |
| С-реактивный белок, г/л (гематологические опухоли) | ССВО / Сепсис | 43,4 | 84,6 | 96,5 | 0,809 |
| | ССВО / Септический шок | 77,1 | 78,6 | 82,4 | 0,811 |

полученным нами данным, у пациентов с онкогематологическими заболеваниями определение СРБ возможно у больных с воспалительными и инфекционными осложнениями.

Сводные данные о пороговых значениях, полученных в ходе проведенного ROC-анализа ПСП, ПКТ и СРБ представлены в табл. 2.

Таким образом, нами проведен анализ уровней биохимических маркеров сепсиса в различных группах обследованных детей с онкологическими заболеваниями. Полученные результаты показали высокую диагностическую эффективность ПСП, что согласуется с данными ряда авторов. Проанализированы семь баз данных с общим числом 1281 пациент с сепсисом и 1389 пациентов без септических осложнений [20]. По данным авторов, показатель площади под ROC-кривой для ПСП составил 0,99 (0,98; 1,00) и был выше, чем аналогичный показатель для СРБ – 0,85 (0,82; 0,88), ПКТ – 0,91 (0,89; 0,94), а также комбинации ПКТ+СРБ – 0,96 (0,93; 0,97). Исследование, включившее 144 пациента с ССВО ($n=44$), сепсисом ($n=44$) и СШ ($n=56$), показало, что диагностическая ценность ПСП ($AUC=0,85$) при разделении пациентов с острой дыхательной недостаточностью, сопровождавшейся инфекционными осложнениями и в отсутствие таковых, была выше, чем у ПКТ ($AUC=0,79$), показателей шкал SAPS II ($AUC=0,72$) и SOFA ($AUC=0,78$), и совпадала с результатами комбинации ПСП и ПКТ ($AUC=0,84$) [21]. Анализ показателей 116 пациентов с сепсисом и СШ в первую неделю пребывания в ОРИТ выявил тенденцию к повышению уровней ПСП в зависимости от тяжести инфекционных осложнений [22]. Показано, что диагностическая ценность уровня ПСП ($AUC=0,80$) для диагностики СШ в

1-й день в ОРИТ была сопоставима с таковой для ПКТ ($AUC=0,83$). Чувствительность порогового значения для ПСП увеличивалась с 80,3 до 87,8%, а специфичность – с 78,5 до 81,4% при выборе более высокого порогового значения (с 399 до 600 пг/мл). Чувствительность ПСП (91,9%) в диагностике сепсиса была выше, чем у ПКТ (89,9%), ИЛ-6 (88,9%), бактериологических посевов крови (35,4%) [23]. ПСП оказался подходящим маркером для оценки тяжести и прогноза течения сепсиса. В исследовании ALBIOS анализ данных 100 пациентов с сепсисом и СШ показал, что медиана уровня ПСП=2269 (1171–4300) пг/мл при поступлении в ОРИТ была значительно выше в группе умерших пациентов, по сравнению с выжившими – ПСП=1184 (875–2113) пг/мл [24].

Нами определены медианные и пороговые значения для ПСП, ПКТ (в плазме) и СРБ (в сыворотке) крови для дифференциальной диагностики воспалительных и септических осложнений у детей с онкологическими заболеваниями. Для всех маркеров выявлено последовательное повышение их концентраций от группы без осложнений до группы СШ. Таким образом, диагностическая значимость ПСП оказалась выше, чем у ПКТ и СРБ, что позволяет использовать этот маркер для контроля инфекционных осложнений у детей с онкологическими заболеваниями.

Заключение. По результатам ROC-анализа выявлено преимущество ПСП перед ПКТ и СРБ при определении степени тяжести септических осложнений у детей с онкопатологией. Определены пороговые уровни ПСП, ПКТ, СРБ для дифференциации различной степени тяжести инфекционных осложнений с учетом комплексного противоопухолевого лечения. Необходимы дальнейшие исследования диагностической ценно-

сти маркеров сепсиса на большей выборке пациентов с различными нозологиями для уточнения оптимальных пороговых значений в группе детей с онкологическими заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Levy M.M., Dellinger R.P., Townsend S.R., Linde-Zwirble W.T., Marshall J.C. et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2010; 38(2):367-74.
2. Seymour C.W., Liu V.X., Iwashyna T.J., Brunkhorst F.M., Rea T.D. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315(8):762-74.
3. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D. et al. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315(8):801-10.
4. Bone R.C., Grodzin C.J., Balk R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of disease process. *Chest.* 1997; 112(1):235-43.
5. Angus D.C., Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(21):2062-3.
6. Van der Poll T., Opal S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(1):32-43.
7. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6):805-20.
8. Chan J.K., Roth J., Oppenheim J.J., Tracey K.J., Vogl T., Feldmann M. et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(8):2711-9.
9. Aneja R., Carcillo J. Differences between adult and pediatric septic shock. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77(10):986-92.
10. Atkinson A.J. Jr., Colburn W.A., DeGruttola V.G., DeMets D.L., Downing G.J. et al. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69(3):89-95.
11. Black S., Kushner I., Samols D. C-reactive Protein. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(47):48487-90.
12. Linscheid P., Seboek D., Nylen E.S., Langer I., Schlatter M., Becker K.L. et al. *In vitro* and *in vivo* calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology.* 2003; 144(12):5578-84.
13. Muller B., White J.C., Nylen E.S., Snider R.H., Becker K.L., Habener J.F. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(1):396-404.
14. Bas S., Gauthier B.R., Spenato U., Stingelin S., Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J. Immunol.* 2004; 172(7):4470-9.
15. Dziarski R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60(9):1793-1804.
16. Chenevier-Gobeaux C., Borderie D., Weiss N., Mallet-Coste T., Claessens Y.-E. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clin. Chim. Acta.* 2015; 450:97-103.
17. Urbonas V., Eidukaitė A., Tamulienė I. The predictive value of soluble biomarkers (CD14 subtype, interleukin-2 receptor, human leucocyte antigen-G) and procalcitonin in the detection of bacteremia and sepsis in pediatric oncology patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Cytokine.* 2013; 62(1):34-7.
18. Samraj R.S., Zingarelli B., Wong H.R. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock.* 2013; 40(5):358-65.
19. Guan J., Lin Z., Lue H. Dynamic change of procalcitonin, rather than concentration itself, is predictive of survival in septic shock patients when beyond 10 ng/ml. *Shock.* 2011; 36(6):570-4.
20. Ruan L., Chen G.Y., Liu Z., Zhao Y., Xu G.Y., Li S.F. et al. The combination of procalcitonin and C-reactive protein or presepsin alone improves the accuracy of diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis and systematic review. *Crit. Care.* 2018; 22(1):316.
21. Klouche K., Cristol J.P., Devin J., Gilles V., Kuster N. et al. Diagnostic and prognostic value of soluble CD14 subtype (Presepsin) for sepsis and community-acquired pneumonia in ICU patients. *Ann. Intensive Care.* 2016; 6(1):59.
22. Behnes M., Bertsch T., Lepiorz D., Lang S., Trinkmann F., Brueckmann M. et al. Diagnostic and prognostic utility of soluble CD14 subtype (presepsin) for severe sepsis and septic shock during the first week of intensive care treatment. *Crit. Care.* 2014; 18(5):507.
23. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A. et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18(6):891-7.
24. Masson S., Caironi P., Spanuth E., Thomae R., Panigada M., Sangiorgi G. et al. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit. Care.* 2014; 18(1): R6.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Конторщикова К.Н., Казарина Л.Н., Гулян У.Г., Пурсанова А.Е., Захарова А.Р., Конторщиков М.М., Гущина О.О.

МОНИТОРИНГ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ПРЕДРАКОВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ОРТОПЕДИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

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

Особую сложность в комплексной терапии и реабилитации больных с предраковыми заболеваниями слизистой оболочки рта составляет ортопедическое лечение. В связи с этим у пациентов с хроническими воспалительно-деструктивными повреждениями слизистой оболочки рта необходимо контролировать изменения в ротовой полости с учетом клинко-лабораторных данных. В качестве диагностического материала в стоматологических исследованиях чаще всего используется ротовая жидкость, состав и свойства которой отражают функциональные изменения организма. Однако, исследований, обосновывающих рациональное ортопедическое лечение у таких пациентов, крайне недостаточно: отсутствуют данные о влиянии ортопедических конструкций на первичный метаболизм в полости рта у больных с предраковыми заболеваниями. В связи с этим целью данной работы явилось изучение биохимических показателей ротовой жидкости у больных, использующих ортопедические конструкции, для выявления прогностических факторов предраковых состояний. В ротовой жидкости определяли уровни общего белка, общего холестерина, триглицеридов, лактата. Свободнорадикальное окисление оценивалось по интенсивности индуцированной биохемилуминесценции и по уровням продуктов перекисного окисления липидов. В ротовой жидкости у пациентов с предраком слизистой оболочки по сравнению с пациентами контрольной группы выявлена значимо более высокая интенсивность свободнорадикального окисления при соответствующем снижении антиоксидантной активности. Статистически значимо повышен уровень конечных продуктов перекисного окисления липидов - оснований Шиффа. Среди метаболитов ротовой жидкости имело место снижение уровней белка и повышение уровней холестерина и лактата. При этом установлена положительная корреляционная зависимость между показателями свободнорадикального окисления и лактата, свободнорадикального окисления и холестерина, но отрицательная с уровнями белка и триглицеридов. Что касается антиоксидантной системы защиты, имела место отрицательная корреляция между показателем $tg(-2\alpha)$ и уровнем лактата и положительная с уровнем триглицеридов, а также положительная корреляция между параметром Z и уровнем общего белка. Полученные изменения биохимических показателей ротовой жидкости можно использовать для подтверждения диагноза предрака слизистой оболочки рта у пациентов, имеющих ортопедические конструкции.

Ключевые слова: ротовая жидкость; ортопедические конструкции; предраковые заболевания; биохимический анализ.

Для цитирования: Конторщикова К.Н., Казарина Л.Н., Гулян У.Г., Пурсанова А.Е., Конторщиков М.М., Захарова А.Р., Гущина О.О. Мониторинг биохимических показателей ротовой жидкости у больных с предраковыми заболеваниями слизистой оболочки рта, использующих ортопедические конструкции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 19-23. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-19-23>

Для корреспонденции: Конторщикова Клавдия Николаевна, д-р биол. наук, проф., зав. каф. клин. лаб. диагностики; e-mail: kontkn@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 08.07.2021

Принята к печати 20.08.2021

Опубликовано 28.01.2022

Kontorshchikova K.N., Kazarina L.N., Gulyan U.G., Pursanova A.E., Kontorshchikov M.M., Zakharova A.R., Gushchina O.O.

MONITORING OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE ORAL FLUID IN PATIENTS WITH PRECANCEROUS OF THE ORAL MUCOSA USING ORTHOPEDIC STRUCTURES

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

Orthopedic treatment is of particular difficulty in the complex therapy and rehabilitation of patients with precancerous diseases of the oral mucosa. In this regard, in patients with chronic inflammatory and destructive lesions of the oral mucosa, it is necessary to control changes in the oral cavity, taking into account clinical and laboratory data. Oral fluid is most often used as a diagnostic material in dental research, the composition and properties of which reflect functional changes in the body. However, the studies that substantiate rational orthopedic treatment in such patients are extremely insufficient: there are no data on the effect of orthopedic structures on the primary metabolism in the oral cavity in patients with precancerous diseases. In this regard, the purpose of this work was to study the biochemical parameters of the oral fluid in patients using orthopedic structures to identify the prognostic factors of precancerous conditions. In the oral fluid, the levels of total protein, total cholesterol, triglycerides, and lactate were determined. Free radical oxidation was assessed by the intensity of induced bioluminescence and by the levels of lipid peroxidation products. In the oral fluid of patients with mucosal precancer compared with patients in the control group, a significantly higher intensity of free radical oxidation was revealed with a corresponding decrease in antioxidant activity. The level of the end products of lipid peroxidation - Schiff's bases - was statistically significantly increased. Among the metabolites of the oral fluid, there was a decrease in protein levels and an increase in cholesterol and lactate levels. At the same time, a positive correlation was established between the indicators of free radical oxidation and lactate, free radical oxidation and cholesterol, but negative with the levels of protein and triglycerides. Regarding the antioxidant system, there was a negative correlation between

the $tg(-2\alpha)$ value and the lactate level and positive with the triglyceride level, as well as a positive correlation between the Z parameter and the total protein level. The obtained changes in the biochemical parameters of the oral fluid can be used to confirm the diagnosis of precancer of the oral mucosa in patients with orthopedic structures.

Key words: oral fluid; orthopedic structures; precancerous diseases; biochemical analysis.

For citation: Kontorshchikova K.N., Kazarina L.N., Gulyan U.G., Pursanova A.E., Kontorshchikov M.M., Zakharova A.R., Gushchina O.O. Monitoring of biochemical parameters of the oral fluid in patients with recancerous of the oral mucosa. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 19-23 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-19-23>

For correspondence: Kontorshchikova Klavdiia Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, professor, Head of Department of Clinical Laboratory Diagnostics; e-mail: kontkn@mail.ru

Information about authors:

Kontorshchikova K.N., <https://orcid.org/0000-0001-8345-9359>;
Kazarina L.N., <https://orcid.org/0000-0001-5033-7945>;
Gulyan U.G., <https://orcid.org/0000-0002-8138-7950>;
Pursanova A.E., <https://orcid.org/0000-0002-4137-2834>;
Kontorshchikov M.M., <https://orcid.org/0000-0002-0262-5448>;
Zakharova A.R., <https://orcid.org/0000-0002-8802-7915>;
Gushchina O.O., <https://orcid.org/0000-0003-3826-3984>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 08.07.2021

Accepted 20.08.2021

Published 28.01.2022

Введение. В структуре предраковых заболеваний слизистой оболочки рта преобладают красный плоский лишай (эрозивная и гиперкератотическая форма) и лейкоплакия (эрозивно-язвенная и веррукозная форма), которые выявляются у 20-35% пациентов [1]. Ортопедические конструкции и материалы могут вызывать клинические симптомы непереносимости, а также служить триггерными факторами и приводить к обострению заболеваний слизистой оболочки рта [2]. У таких пациентов следует придерживаться особого подхода в выборе метода лечения, рациональных конструкций и материалов с учетом клинико-лабораторных данных [3]. В качестве диагностического материала в стоматологических исследованиях чаще всего используется ротовая жидкость. Однако, исследований, обосновывающих рациональное ортопедическое лечение у таких пациентов, крайне недостаточно: отсутствуют данные о влиянии ортопедических конструкций на обменные процессы в полости рта у больных с предраковыми заболеваниями.

Цель работы: изучение биохимических показателей ротовой жидкости у больных с предраковыми заболеваниями слизистой оболочки рта, имеющих ортопедические конструкции, для выявления прогностических факторов злокачественного перерождения.

Материал и методы. Работа проводилась на базе кафедры пропедевтической стоматологии и кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Обследованы 40 человек в возрасте от 49 до 69 лет. Основную группу составили 20 пациентов с предраковыми заболеваниями слизистой оболочки полости рта: 10 (50%) с эрозивно-язвенной формой плоского лишая и 10 (50%) – с веррукозной лейкоплакией. Все пациенты имели в ротовой полости ортопедические конструкции. В контрольную группу вошли 20 человек, использующих различные протезы, но без патологии слизистой оболочки рта.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013 г.) и одобрено этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждого пациента получено информированное согласие. Материалом для биохимических

анализов явилась ротовая жидкость, собранная пациентами в стерильный пластиковый одноразовый контейнер согласно правилам подготовки и процедуры сбора [4].

Оценка показателей свободнорадикального окисления ротовой жидкости проводилась методом индуцированной биохемиллюминесценции на приборе БХЛ-07 (ООО «Медозонс», Россия), сопряженным с компьютером IBMPC/AT в диалоговом режиме. Полученная хемиллюминограмма включала следующие параметры: I_{max} в милливольтгах (mV) – максимальная интенсивность свечения; S в милливольтгах (mV) – светосумма хемиллюминесценции за 30 секунд; Z (отн.ед.) – параметр, характеризующий интенсивность антиоксидантной системы защиты; $tg(-2\alpha)$ (отн.ед.) – показатель, характеризующий скорость восстановления антиоксидантной системы защиты [5]. Уровни продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов – ДК, триеновых конъюгатов – ТК, оснований Шиффа – ОШ) определяли в гептан-изопропанольных фракциях [6]. Результаты представляли в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.). Для количественного определения общего белка (г/л) биуретовым методом использовали набор реагентов «Общий белок -UTS» (ЗАО «А/О Юнимед», Россия). Определение концентрации общего холестерина (ХС) (в ммоль/л) ферментативным методом осуществляли с помощью набора реагентов «Холестерин-UTS» (ЗАО «А/О Юнимед», Россия); определение уровней триглицеридов (ТГ) (в ммоль/л) ферментативным методом с помощью набора реагентов «Триглицериды-UTS» (ЗАО «А/О Юнимед», Россия). Концентрацию лактата (в ммоль/л) измеряли ферментативным методом с использованием набора реагентов «Lactate FS» («DiaSys Diagnostic Systems GmbH», Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statplus 6, «AnalystSoft» 2018 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представляли в виде медианы (Me) и перцентилей (25%; 75%). Две выборки считали принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p \leq 0.05$. Проводили корреляционный анализ Spearman для непараметрических данных с расче-

том коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Результаты и обсуждение. В соответствии с поставленной целью определяли интенсивность свободнорадикального окисления в ротовой жидкости пациентов с предраковым состоянием по сравнению с пациентами контрольной группой.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, медианы параметра I тах были значимо выше по сравнению с контролем. Это свидетельствует о более высокой интенсивности свободнорадикального окисления в ротовой жидкости пациентов с предраковыми состояниями по сравнению с лицами контрольной группы, имеющими ортопедические конструкции, но без повреждений слизистой оболочки рта. В то же время медиана показателя хемилуминограммы tg (-2α) оказалась статистически значимо выше по сравнению с контролем. Чем больше величина этого показателя, тем ниже активность антиоксидантной системы.

Медиана уровней ОШ статистически значимо выше по сравнению с контролем (табл. 2), что свидетельствовало о накоплении в ротовой жидкости пациентов с предраковыми состояниями конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – ОШ – продуктов. Известно, что ОШ являются жесткими продуктами, которые повреждают мембраны клеток и могут явиться причиной злокачественного перерождения клеток. Повышение данных соединений в ротовой жидкости можно объяснить тем, что свободно-радикальные процессы, начавшиеся в тканях ротовой полости, возможно, вследствие повреждения их ортопедическими конструк-

циями, переходят и на биологические жидкости. Отсюда, происходящие в тканях слизистой оболочки реакции находят свое отражение в ротовой жидкости.

Как видно из данных табл. 3, у пациентов с предраковыми состояниями статистически значимо снижена медиана уровня общего белка в ротовой жидкости, тогда как медианы уровня холестерина и лактата статистически значимо выше по сравнению с контролем.

При проведении анализа корреляционных зависимостей в контрольной группе выявлена статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость между показателями I тах и уровнем белка ($r_s = -0,451$). Такую корреляцию можно объяснить тем, что основные антиоксиданты (в частности, ферменты) являются белками. Поэтому, чем ниже уровень белков, тем интенсивнее будет протекать свободнорадикальное окисление. Подтверждение этому является наличие положительной корреляции между показателями антиоксидантной защиты tg (-2α) и уровнем общего белка ($r_s = 0,447$). Отрицательная связь между уровнем ДК и уровнем ХС ($r_s = -0,489$) обусловлена тем, что ХС также обладает антиоксидантными свойствами. Чем меньше его уровень, тем выше уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов – ДК.

Корреляционные зависимости между показателями окислительного стресса и метаболитами ротовой жидкости пациентов с предраковыми состояниями изменялись по сравнению с контрольной группой. Появление положительной зависимости между I тах и уровнем лактата можно объяснить тем, что при злокачественном

Таблица 1

Показатели хемилуминограммы ротовой жидкости, Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)

| Показатели | Контрольная группа, n=20 | | Пациенты с предраковыми состояниями, n=20 | | U-критерий Манна-Уитни |
|------------------|--------------------------|-----------------|---|-----------------|------------------------|
| | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | |
| I тах, mV | 630 (553; 716) | 384 - 926 | 769 (623; 874) * | 471 - 1173 | 0,0209 |
| S, mV/30сек | 2472 (2083; 3393) | 1590 - 6423 | 2958 (2451; 3527) | 1808 - 6647 | 0,0761 |
| tg(-2α), отн.ед. | -270,0 (-303,0; 231,5) | -437,0 - -161,0 | -355,0 (-391,5; -275,0) * | -563,0 - -203,0 | 0,0022 |
| Z, отн.ед. | 4,059 (3,601; 4,767) | 3,117 - 7,809 | 3,796 (3,549; 4,183) | 3,274 - 6,491 | 0,1439 |

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * - статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p \leq 0,05$; n – число обследованных.

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов ротовой жидкости, Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)

| Показатели | Контрольная группа, n=20 | | Пациенты с предраковыми состояниями, n=20 | | U-критерий Манна-Уитни |
|----------------|---------------------------|------------------|---|------------------|------------------------|
| | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | |
| ДК, ед.опт.пл. | 0,2137 (0,1700; 0,2244) | 0,1412 - 0,2359 | 0,2103 (0,1871; 0,2334) | 0,1380 - 0,2614 | 0,1048 |
| ТК, ед.опт.пл. | 0,1240 (0,0951; 0,1735) | 0,0538 - 0,3995 | 0,1330 (0,1026; 0,1517) | 0,0607 - 0,4562 | 0,1543 |
| ОШ, отн.ед. | 11,8907 (5,8847; 17,4226) | 2,6883 - 25,8201 | 15,2499 (8,6722; 21,5110) * | 1,3936 - 48,5453 | 0,0391 |

Таблица 3

Биохимические показатели ротовой жидкости, Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)

| Показатели | Контрольная группа, n=20 | | Пациенты с предраковыми состояниями, n=20 | | U-критерий Манна-Уитни |
|---------------------------|--------------------------|-----------------|---|-----------------|------------------------|
| | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | Med (Q25; Q75) | Пределы; 95% ДИ | |
| Общий белок, г/л | 2,51 (2,07; 2,89) | 1,27 - 4,23 | 1,08 (0,60; 1,75) * | 0,16 - 2,83 | 0,0052 |
| Общий холестерин, ммоль/л | 0,08 (0,07; 0,13) | 0,05 - 0,24 | 0,12 (0,08; 0,18) * | 0,05 - 0,25 | 0,0343 |
| Триглицериды, ммоль/л | 0,05 (0,03; 0,09) | 0,02 - 0,20 | 0,06 (0,03; 0,09) | 0,02 - 0,10 | 0,1491 |
| Лактат, ммоль/л | 0,28 (0,25; 0,30) | 0,20 - 0,39 | 0,33 (0,23; 0,39) | 0,13 - 0,71 | 0,01257 |

Таблица 4

Корреляционные зависимости между показателями окислительно-го стресса и уровнями метаболитов ротовой жидкости пациентов с предраковыми состояниями

| Показатели окислительного стресса | Метаболиты | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Общий белок, г/л | Общий холестерин, ммоль/л | Триглицериды, ммоль/л | Молочная кислота, ммоль/л |
| Imax, mV | $r_s = 0,316$ $p = 0,025$ | $r_s = 0,468^*$ $p = 0,009$ | $r_s = -0,556^*$ $p = 0,008$ | $r_s = 0,541^*$ $p = 0,0085$ |
| S, мV/сек | $r_s = 0,643^*$ $p = 0,092$ | $r_s = 0,374$ $p = 0,042$ | $r_s = -0,408$ $p = 0,011$ | $r_s = 0,311$ $p = 0,023$ |
| Z, отн.ед. | $r_s = 0,530^*$ $p = 0,007$ | $r_s = 0,039$ $p = 0,038$ | $r_s = 0,009$ $p = 0,023$ | $r_s = -0,032$ $p = 0,011$ |
| tg(-2a), отн.ед. | $r_s = -0,082$ $p = 0,031$ | $r_s = -0,423$ $p = 0,031$ | $r_s = 0,523^*$ $p = 0,0091$ | $r_s = -0,578^*$ $p = 0,0091$ |
| ДК, ед.опт.пл. | $r_s = -0,169$ $p = 0,010$ | $r_s = -0,289$ $p = 0,019$ | $r_s = 0,357$ $p = 0,017$ | $r_s = -0,395$ $p = 0,0121$ |
| ТК, ед.опт.пл. | $r_s = -0,090$ $p = 0,0071$ | $r_s = -0,353$ $p = 0,023$ | $r_s = -0,352$ $p = 0,011$ | $r_s = -0,110$ $p = 0,034$ |
| ОШ, ед.опт.пл. | $r_s = -0,083$ $p = 0,010$ | $r_s = -0,374$ $p = 0,010$ | $r_s = -0,309$ $p = 0,012$ | $r_s = -0,146$ $p = 0,043$ |
| ОШ/(ДК+ТК), отн.ед. | $r_s = -0,019$ $p = 0,012$ | $r_s = -0,131$ $p = 0,012$ | $r_s = -0,173$ $p = 0,012$ | $r_s = -0,037$ $p = 0,041$ |

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена. Жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели.

перерождении тканей имеет место закисление внутренней среды клеток. Отрицательная корреляционная связь с уровнем ТГ ($r_s = -0,556$) обусловлена способностью ТГ к окислению: чем интенсивнее протекают реакции свободнорадикального окисления, тем быстрее окисляются ТГ. Повышение уровней холестерина по сравнению с контрольной группой можно объяснить, с одной стороны, повреждением мембран при свободнорадикальном окислении и поступлением ХС в ротовую жидкость, с другой, накоплением ХС в мембранах как субстрата, необходимого для деления злокачественно перерожденных клеток. Данный факт подтверждается наличием прямой корреляционной зависимости ($r_s = 0,468$) между показателем интенсивности свечения Imax и уровнем ХС. Одновременно обнаруживаются прямо противоположные по знаку корреляции между показателями антиоксидантной системы защиты и анализируемыми метаболитами ротовой жидкости. Так, установлено наличие положительной корреляции между показателем Z и уровнем общего белка ($r_s = 0,530$), между tg (-2a) и уровнем ТГ ($r_s = 0,523$), но отрицательная с уровнем лактата ($r_s = -0,578$).

В проведенном нами исследовании обнаружено снижение уровней общего белка в ротовой жидкости у пациентов с предраковыми состояниями по сравнению с пациентами, имеющими стоматологические протезы, но не имеющими повреждений слизистой оболочки ротовой полости. Известно, что для онкологических больных характерно ускорение процессов глюконеогенеза, что ведет к истощению белковых и жировых депо. Кроме того, имеет место, повышенный катаболизм белков организма. Имеются сведения об обнаружении и прогностическом значении индивидуальных белков, например, Glut-1 и Glut-3, лактоферрина [7, 8] и белковых маркеров, например, p53, Ki-67, bcl-2 [9–11] в ротовой жидкости пациентов с предраком красной каймы губ. В нашем исследовании у пациентов с предраковыми состояниями наблюдались изменения в уровнях липидов. При этом установлено значимое

снижение уровней триглицеридов, но повышение уровней холестерина по сравнению с контрольной группой. Источником ряда липидов в слюне являются мембраны секреторных везикул, фрагменты мембран бактериальных клеток. Значительная часть слюнных липидов находится в связанном состоянии с белками [12, 13]. Атипизм обмена липидов при злокачественном перерождении может быть связан с повышенной утилизацией жирных кислот и холестерина (опухоль как «ловушка липидов»), активацией синтеза липидных структур клеток, интенсификацией процессов липопероксидации. Основное значение липидов при злокачественном перерождении тканей – энергетическое и пластическое обеспечение усиленных анаболических процессов, реакций синтеза структур интенсивно делящихся опухолевых клеток. Ранее было показано увеличение содержания холестерина в опухолевых клетках и в нормальных тканях, окружающих опухоль [14].

У пациентов с предраковыми состояниями статистически значимо были повышены показатели хемилуминограммы, свидетельствующие об активном свободнорадикальном процессе, при одновременном снижении показателей антиоксидантной системы защиты. Итогом повышенной активации свободнорадикального окисления явилось значимое повышение уровней конечных продуктов ПОЛ – оснований Шиффа, что указывало на повреждение клеточных мембран слизистой оболочки ротовой полости и возможной провокации злокачественного перерождения тканей. Известно, что свободные радикалы индуцируют канцерогенез и принимают активное участие в процессе роста злокачественных новообразований [15]. В ряде исследований установлено повышение показателей хемилуминесценции ротовой жидкости и сыворотки крови у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки рта по сравнению с контрольной группой [16, 17]. Имеются сведения о накоплении вторичных продуктов перекисного окисления липидов у пациентов с предраковыми заболеваниями полости рта [18].

Выводы. Таким образом, в наших исследованиях по изучению биохимических показателей ротовой жидкости пациентов с предраковыми состояниями и пациентами контрольной группы, также использующих ортопедические конструкции, выявлены статистически значимые различия в повышении уровней холестерина и лактата при снижении уровней общего белка и триглицеридов. Одновременно отмечались существенные различия в показателях свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы защиты, свидетельствующие об активном свободнорадикальном процессе, протекающем в слизистой оболочке ротовой полости пациентов с предраковыми состояниями, по всей видимости, вызванными повреждениями неудачных ортопедических конструкций, по сравнению с контрольной группой.

Полученные нами результаты углубляют понимание механизма развития предракового состояния у пациентов с ортопедическими конструкциями в ротовой полости, и могут быть использованы для отбора новых диагностических и прогностических маркеров

ЛИТЕРАТУРА (п. 8 см. REFERENCES)

1. Пурсанова А.Е., Казарина Л.Н., Гулян У.Г., Серхель Е.В., Белозеров А.Е., Казарин А.С. Совершенствование диагностики и лечения предраковых заболеваний слизистой оболочки рта. *Вятский медицинский журнал*. 2019; 60-61: 22-4.

2. Городилова Е.А., Гилева О.С., Кошкин С.В., Халявина И.Н. Междисциплинарные подходы к комплексному лечению больных с распространенным красным плоским лишаем кожи и слизистой оболочки рта: роль протетического лечения. *Вятский медицинский вестник*. 2016; 4 (52): 20-6.
3. Загородняя Е. Б., Оскольский Г.И., Башаров А.Я., Щеглов А.В. Оценка клинической эффективности местной терапии у больных с хроническими воспалительно-деструктивными заболеваниями слизистой полости рта. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012;1: 84.
4. Гильмиярова Ф.Н. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. Учебное пособие. М.: Известия; 2006.
5. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. *Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов*. Горький: Волго-Вятское издательство; 1983.
6. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б. Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127-3.
7. Иванова О.В., Иванов В.М., Шейкин М.В. Клиническое значение лактоферрина слюны в индивидуальном прогнозировании осложнений при санации полости рта больных с местнораспространенным раком слизистой полости рта. *Вестник новых медицинских технологий*. 2014; 3: 82-4.
9. Леонтьева Е.С., Егоров М.А., Кузнецова Р.Г. Иммуногистохимические маркеры в диагностике предраковых поражений слизистой оболочки рта и красной каймы губ. *Практическая медицина*. 2012; 8 (64): 20-2.
10. Мухамеджанова Л.Р., Егоров М.А., Кулагин Р.Н., Нефёдов В.П. Клинико-морфологические параллели в диагностике заболеваний красной каймы губ. *Современное искусство медицины*. 2012; 5: 42-7.
11. Егоров М.А., Мухамеджанова Л.Р., Кулагин Р.Н., Кузнецова Р.Г. Информативность определения биомаркёров p53 и Ki-67 у пациентов с плоскоклеточным раком губы. *Практическая медицина*. 2013;1-2 (69): 36-9.
12. Данилова Л.А., Чайка Н.А. Биохимия полости рта: учебное пособие. СПб: СпецЛит; 2012.
13. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: БИНОМ; 2014.
14. Липиды и рак. Очерки липидологии онкологического процесса. Безуглов В.В., Коновалов С.С., ред. СПб: Прайм-ЕВРОЗНАК; 2009.
15. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободно-радикальные процессы в норме и при патологических состояниях: пособие для врачей. М.:РКНПК МЗ РФ; 2001.
16. Григорьева Т.М. Хемилюминесцентный анализ для скрининга уровня липидной перекисидации в слюне. *Университетская наука: взгляд в будущее*. 2018; 35(5): 37-40.
17. Герасимова Л.П., Чемикосова Т.С., Вильданов М.Н. Обоснование коррекции свободнорадикального окисления ротовой жидкости в лечении лейкоплакии слизистой оболочки рта. *Пародонтология*. 2016; 21(1): 64- 8.
18. Мякишева Ю.В., Колсанов А.В., Власов М.Ю., Соколов А.В. Неинвазивная диагностика состояния обменных процессов в организме: маркеры ротовой жидкости. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 5:14.
2. Gorodilova E.A., Gileva O.S., Koshkin S.V., Khalyavina I.N. Interdisciplinary approaches to the complex treatment of patients with common lichen planus of the skin and oral mucosa: the role of prosthetic treatment. *Iyatskiy meditsinskiy vestnik*. 2016; 4 (52): 20-6. (in Russian)
3. Zagorodnyaya E.B., Oskolsky G.I., Basharov A.Ya., Shcheglov A.V. Valuation of the clinical efficacy of local therapy in patients with chronic inflammatory and destructive diseases of the oral mucosa. *Dal'nevostochnyi meditsinskiy zhurnal*. 2012; 1: 84. (in Russian)
4. Gil'miyarova F.N. Analytical approaches to the study of indicators of metabolism in the oral fluid. Moscow: Izvestia; 2006. (in Russian)
5. Kuz'mina E.I., Nelyubin A.S., Shchennikova M.K. The use of induced chemiluminescence for the assessment of free radical reactions in biological substrates. *Mezhvuzovskiy sbornik biokhimii i biofiziki mikroorganizmov*. Gor'kiy: Volgo-Vyatskoe izdatel'stvo; 1983. (in Russian)
6. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 1: 127-31. (in Russian)
7. Ivanova O.V., Ivanov V.M., Sheikin M.V. The clinical significance of salivary lactoferrin in an individual program nosing of complications during oral cavity sanitation of patients with locally advanced cancer of the oral mucosa. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2014; 3: 82-4. (in Russian)
8. Boyakhchyan A.A., Shek D.L., Akhuba L.G. Prognostic importance of proteins glut-1 and glut-3 in neoplasias of oral cavity. *European journal of biomedical and life sciences*. 2016; 1: 20-5.
9. Leontyeva E.S., Egorov M.A., Kuznetsova R.G. Immunohistochemical markers in the diagnosis of precancerous lesions of the oral mucosa and the red border of the lips. *Prakticheskaya meditsina*. 2012; 8 (64): 20-2. (in Russian)
10. Mukhamedzhanova L.R., Egorov M.A., Kulagin R.N., Nefedov V.P. Clinical and morphological parallels in the diagnosis of diseases of the red border of the lips. *Sovremennoe iskusstvo meditsiny*. 2012; 5: 42-7. (in Russian)
11. Egorov M.A., Mukhamedzhanova L.R., Kulagin R.N., Nefedov V.P. Informative value of determining biomarkers p53 and Ki-67 in patients with squamous cell carcinoma of the lip. *Prakticheskaya meditsina*. 2013; 1-2 (69): 36-9. (in Russian)
12. Danilova L.A., Chaika N.A. Biochemistry of the oral cavity: textbook. allowance. St.Petersburg: SpetsLit; 2012. (in Russian)
13. Vavilova T.P., Yanushevich O.O., Ostrovskaya I.G. Saliva. Analytical opportunities and perspectives. Moscow: BINOM; 2014. (in Russian)
14. Lipids and cancer. Essays on lipidology of the oncological process [Lipidy i rak. Ocherki lipidologii onkologicheskogo protsesssa]. Bezuglov V.V., Konovalov S.S., eds. St.Petersburg: Praym-EVROZNAK; 2009. (in Russian)
15. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Belenkov Yu.N. Free radical processes in normal and pathological conditions: a guide for doctors. Moscow: RKNPK MZ RF; 2001. (in Russian)
16. Grigorieva T.M. Chemiluminescence assay for screening the level of lipid peroxidation in saliva. *Universitetskaya nauka: vzglyad v budushchee*. 2018; 35 (5): 37-40. (in Russian)
17. Gerasimova L. P., Chemikosova T. S., Vildanov M. N. Substantiation of correction of free radical oxidation of the oral fluid in the treatment of leukoplakia of the oral mucosa. *Parodontologiya*. 2016. 21(1): 64-8. (in Russian)
18. Myakisheva Yu.V., Kolsanov A.V., Vlasov M.Yu., Sokolov A.V. Non-invasive diagnostics of the state of metabolic processes in the body: oral fluid markers. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 5: 14. (in Russian)

REFERENCES

1. Pursanova A.E., Kazarina L.N., Gulyan U.G., Serhel E.V., Belozherov A.E., Kazarin A.S. Improving the diagnosis and treatment of precancerous diseases of the oral mucosa. *Iyatskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 60 - 61: 22- 4. (in Russian)

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Щербинина А.Е., Леонович С.В., Зуева Е.В., Гаранина В.Д., Гультяева Е.П., Ярославская Е.И., Калюжная Е.Н., Горбатенко Е.А., Капустина А.А., Гапон Л.И.

ОЦЕНКА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ SARS-COV-2-АССОЦИИРОВАННУЮ ПНЕВМОНИЮ

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 625026, Томск, Россия

Исследование особенностей и динамики эритроцитарных параметров общего анализа крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию, и анализ их ассоциации с отдельными маркерами сосудистой воспалительной реакции при разном объеме поражения легочной ткани может иметь большое клиническое значение. В исследование включены 106 пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию. Пациенты были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 51 пациент без ССЗ, во вторую группу – 55 пациентов с ССЗ. Пациентам в обеих группах проводилось исследование биообразца крови в момент госпитализации и в точке 3 месяца после выписки из стационара. Оценивали эритроцитарные параметры, из биомаркеров воспаления – концентрацию С-реактивного белка (СРБ), высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ) и гомоцистеина. Всем пациентам исходно была проведена компьютерная томография органов грудной клетки. Выявлено, что эритроцитарные показатели имели различия по ряду параметров: СОЭ, RDW-SD и RDW-CV, с превышением показателей во 2-й группе. Через 3 месяца после выписки из стационара у пациентов обеих групп значимо повысился уровень HCT, MCV, MCH и снизился уровень MCHC и RDW-CV ($p < 0,001$, соответственно для всех параметров). Концентрация СРБ максимальная на момент госпитализации во 2-й группе, через 3 месяца не достигла референсных значений. В группе с ССЗ уровень СРБ был ассоциирован с повышенными значениями вч-СРБ, гомоцистеина, что свидетельствует о наличии пролонгированного воспалительного сосудистого ответа. В обеих группах, разделенных по объему поражения легких, вошедших в ROC-анализ, коэффициенты $RDW-CV > 13,6$ и лимфоциты/СРБ $< 0,6$ увеличивают вероятность наличия поражения легочной ткани более 50% в 9,3 и 5,9 раз, соответственно. Таким образом, внимательное отношение к уже известным лабораторным параметрам позволяет расширить число индикаторов, влияющих на риск развития осложнений COVID-19, и дает возможность более раннего реагирования на сложную клиническую ситуацию у больных ССЗ.

Ключевые слова: COVID-19; эритроциты; RDW-CV - коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов; С-реактивный белок.

Для цитирования: Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Щербинина А.Е., Леонович С.В., Зуева Е.В., Гаранина В.Д., Гультяева Е.П., Ярославская Е.И., Калюжная Е.Н., Горбатенко Е.А., Капустина А.А., Гапон Л.И. Оценка эритроцитарных параметров общего анализа крови у пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 24-30. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-24-30>

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.09.2021

Принята к печати 01.10.2021

Опубликовано 28.01.2022

Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Shcherbinina A.E., Leonovich S.V., Zueva E.V., Garanina V.D., Gultiaeva E.P., Yaroslavskaya E.I., Kalyuzhnaya E.N., Gorbatenko E.A., Kapustina A.A., Gapon L.I.

ESTIMATION OF ERYTHROCYTE PARAMETERS OF GENERAL BLOOD ANALYSIS IN PATIENTS WITH SARS-COV-2- ASSOCIATED PNEUMONIA

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

The study of the features and dynamics of the erythrocyte parameters of general blood analysis in patients with cardiovascular diseases who underwent SARS-CoV-2 associated pneumonia is of great practical importance. That was a prospective study. The study included 106 patients with SARS-CoV-2-associated pneumonia. All patients were divided into 2 groups. The first group included 51 patients without CVD, the second group included 55 patients with CVD. Patients in both groups underwent laboratory examination of blood samples at the time of hospitalization and 3 months after discharge from the hospital. Parameters of the erythroid series of the general blood test were assessed. Among inflammatory biomarkers, we examined the concentration of C-reactive protein (CRP), high-sensitivity CRP (hs-CRP) and homocysteine. Initially all patients underwent computed tomography of the chest organs. Revealed what indicators of the erythroid series in the groups of patients with and without CVD had significant differences in a number of parameters: ESR; RDW-SD and RDW-CV with significant excess of parameters in group 2. Three months after discharge from the hospital, patients in both groups had a significant increase in HCT, MCV, MCH. There was detected decrease in both groups in MCHC, RDW-CV ($p < 0.001$ for all parameters), ESR level in group 2. At baseline, CRP exceeded reference values in both groups of patients, reaching maximum values in group 2. After 3 months CRP decreased significantly only in group 1. Increased CRP was

associated with elevated hs-CRP in 3 months after discharge and elevated homocysteine levels in both groups, indicating the persistence of prolonged inflammatory vascular reaction in patients after SARS-CoV-2 associated pneumonia, more pronounced in group 2 patients. RDW-CV over 13.6 and lymphocytes / CRP less than 0.6 increase the likelihood of having lung tissue damage over 50% by 9.3 and 5.9 times, respectively. Thus, the data obtained confirm that RDW-CV, the coefficient of variation of erythrocyte distribution width, associated with the parameters of inflammatory response and the lymphocytes / CRP is lung volume marker and of COVID-19 severity. Careful consideration of already known laboratory parameters allows us to expand the number of indicators influencing the risk of COVID-19 complications and enable an earlier response to a difficult situation.

Key words: COVID-19; erythrocyte; standard deviation and coefficient of variation of erythrocyte distribution width; C-reactive protein.

For citation: Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Shcherbinina A.E., Leonovich S.V., Zueva E.V., Garanina V.D., Gultiaeva E.P., Yaroslavskaya E.I., Kalyuzhnaya E.N., Gorbatenko E.A., Kapustina A.A., Gapon L.I. Estimation of erythrocyte parameters of general blood analysis in patients with SARS-CoV-2 -associated pneumonia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 24-30 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-24-30

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

Information about the authors:

Petelina T.I., <https://orcid.org/0000-0001-6251-4179>;
Musikhina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-8280-2028>;
Avdeeva K.S., <https://orcid.org/0000-0002-2134-4107>;
Shcherbinina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2056-2217>;
Leonovich S.V., <https://orcid.org/0000-0002-8562-6955>;
Zueva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6108-811X>;
Garanina V.D., <https://orcid.org/0000-0002-9232-5034>;
Gultiaeva E.P., <https://orcid.org/0000-0002-5061-9210>;
Yaroslavskaya E.I., <https://orcid.org/0000-0003-1436-8853>;
Kalyuzhnaya E.N., <https://orcid.org/0000-0003-4212-0433>;
Gorbatenko E.A., <https://orcid.org/0000-0003-3675-1503>;
Kapustina A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0587-0991>;
Gapon L.I., <https://orcid.org/0000-0002-3620-0659>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.09.2021

Accepted 01.10.2021

Published 28.01.2022

Введение. Актуальность проблемы нового инфекционного заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2, по своей значимости и социально-экономическим последствиям приобрела чрезвычайный характер во всем мире. SARS-CoV-2 связываются с функциональными рецепторами ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ-2), экспрессия которых установлена как в клетках крови, так и в сосудистой стенке, кардиомиоцитах, что частично объясняет патогенетическую основу возникновения и/или течения сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, артериальной гипертензии (АГ), ИБС, миокардитов, нарушения ритма сердца и др. [1].

По данным ряда исследований к гематологическим маркерам, определяющим группы риска среди пациентов с COVID-19, чаще относят и описывают клетки лейкоцитарного и тромбоцитарного ряда периферической крови. Но следует отметить, что эритроциты, не являясь преобладающей клеткой поражения при COVID-19, также способны оказать влияние на течение и прогноз заболевания [2].

В научных публикациях чаще отмечается, что значения клинических гематологических параметров, таких, как количество эритроцитов, гематокрит или средняя концентрация гемоглобина не меняются [3]. Однако, несмотря на то, что у пациентов с пневмонией, вызванной COVID-19, тяжелая анемия при госпитализации встречается редко, концентрация гемоглобина (Hb) имеет тенденцию к прогрессивному снижению в течение

болезни. Развивающаяся при этом гипоксия способна оказывать глубокое влияние на морфологию, реологию и выживаемость эритроцитов, внося свой вклад в сложный патогенез анемии COVID-19 [3 - 5].

Помимо этого, известно, что возбудитель COVID-19 способен напрямую инфицировать клетки-предшественники эритроцитов, влияя, таким образом, на количество эритроцитов, а также их функционирование [6]. Так, эритроциты, выделенные от больных COVID-19, характеризуются измененным состоянием белкового и углеводного обменов. Прежде всего, эритроциты больных имеют повышенное содержание гликолитических ферментов и продуктов окисления важных внутриклеточных белков: анкирина, спектрина-бета, а также AE1 (Band 3 anion transport protein), корректное функционирование которых необходимо для эффективного газообмена и стабилизации дезоксигемоглобина [7]. Следовательно, при нарушении его функции возможно изменение эффективности процессов газообмена, что проявляется в гипоксии, наблюдаемой как осложнение COVID-19.

Согласно опубликованным данным, в выборке пациентов с COVID-19 повышение уровня СОЭ ассоциировано с уровнем провоспалительных маркеров, TNF α , интерлейкина-6 и, характеризуя степень тяжести воспалительного процесса, связано с уровнем летальности. Интересно, что СОЭ может оставаться высоким на протяжении длительного времени после перенесенного COVID-19. Так, было показано, что уровень СОЭ был повышен на протяжении двух недель после перенесен-

ного COVID-19, взаимосвязан с пониженным уровнем гемоглобина, отражая долгосрочный характер изменения функции эритроцитарных параметров [8].

Из результатов другой экспериментальной работы следует заключить, что при COVID-19 возможно изменение морфологии эритроцитов в виде появления шистоцитов (фрагментированных эритроцитов) и макроцитов (эритроцитов с увеличенным объемом) [9].

В ряде исследований было зарегистрировано изменение ширины распределения эритроцитов (RDW) у пациентов с COVID-19. Отмечено, что увеличение RDW выше значения в 14,5% повышает риск смертности от COVID-19 на 31%. Авторы также установили, что пациенты с повышенным содержанием RDW имели увеличенный риск смертности (в 6,12 раз) в пределах 48 ч после определения положительных значений маркера [10]. Представленные результаты подтверждаются данными положительной корреляционной взаимосвязи повышения RDW со степенью тяжести течения COVID-19 и указывают на потенциальную возможность использования RDW, как крайне динамичного параметра в качестве прогностического маркера тяжести состояния пациента [11]. Авторы другой статьи указывают на потенциальную способность RDW выступать маркером успешности лечения COVID-19 [12].

Таким образом, приведенные результаты научных исследований свидетельствуют о том, что эритроцитарные параметры крови могут закономерно отражать характер течения COVID-19. Однако необходимо помнить и о том, что исходное наличие у пациента с COVID-19 сердечно-сосудистых заболеваний может вызывать изменения параметров крови еще до встречи с инфекцией [13].

Исходя из вышесказанного, видя актуальность оценки роли эритроцитарных параметров в течении заболевания COVID-19, мы определили цель данного исследования: изучить особенности и динамику изменений эритроцитарных параметров крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию, проследив их ассоциацию с отдельными маркерами сосудистой воспалительной реакции при разном объеме поражения легочной ткани.

Материал и методы. Исследование проспективное, соответствующее стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (протокол № 159 от 23.07.20 г.). Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов обследования в научных целях.

В данное исследование были включены 106 обследованных на данный момент пациентов из 380, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию. Исследование зарегистрировано в базе данных клинических исследований ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT04501822. Все пациенты были разделены на 2 группы. В 1-ю группу включили 51 пациента без сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), средний возраст 36,65±13,31 года. Во 2-ю группу вошли 55 пациентов с ССЗ, средний возраст 56,05±11,98 лет. Группы достоверно различались по возрасту, уровню САД, ДАД, ЧСС ($p < 0,001$, соответственно), ИМТ ($p < 0,015$), с более высокими показателями во

2-й группе. В 1-й группе объем поражения легких до 50% был выявлен у 71,7% пациентов, объем поражения легких более 50% – у 28,3% пациентов. Во 2-й группе объем поражения легких до 50% был у 54,7% пациентов, более 50% – у 45,3% пациентов.

Пациентам обеих исследуемых групп проводилось лабораторное исследование биообразца крови в момент госпитализации и в точке 3 месяца после выписки из стационара. Оценивали эритроцитарные параметры общего анализа крови (RBC – число эритроцитов, HGB – концентрация гемоглобина, HCT – гематокрит, MCV – средний объем эритроцита, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW-SD – стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов, RDW-CV – коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов), показатели определяли импедансным методом с технологиями проточной цитометрии на аппарате 5Diff анализатор «Mindrey BC 5800» (Китай); из биомаркеров воспаления исследовали концентрацию С-реактивного белка (СРБ) «Cobas integra plus 400» (Италия), высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ) иммуно-турбидиметрическим методом на полуавтоматическом анализаторе открытого типа «Clima MC-15» (Испания) и гомоцистеина на анализаторе «IMMULITE 2000» (Siemens Diagnostics, США). Всем пациентам исходно была проведена компьютерная томография органов грудной клетки. Разделив группы по объему поражения легочной ткани до 50% и более 50%, мы провели сравнительный анализ исследуемых биомаркеров.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 21. В зависимости от распределения при сравнении показателей в 2-х независимых группах использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. При нормальном распределении, данные представляли, как среднее М и стандартное отклонение (SD), при распределении, отличным от нормального, данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%-75%]. Для поиска параметров, связанных с объемом поражения легких, использовали логистический регрессионный анализ методом пошагового отбора с включением. Парным критерием Стьюдента или критерием Вилкоксона рассчитывали динамику между группами. Качество и эффективность модели оценивали ROC-анализом. Точки разделения показателей крови находили с помощью ROC-кривых. Результаты оценивались как статистически значимые при двухстороннем уровне $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе работы мы проанализировали эритроцитарные параметры в группах пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию, при отсутствии и с наличием сердечно-сосудистых заболеваний на исходном этапе и через 3 месяца после выписки из стационара (табл. 1).

Из представленных в табл. 1 данных видно, что эритроцитарные показатели в группах пациентов с отсутствием и с наличием сердечно-сосудистых заболеваний имеют различия по ряду параметров. Нами зарегистрирована значимая разница в показателях: СОЭ; стандартного отклонения ширины распределения эритроцитов (RDW-SD) и коэффициента вариации ширины распределения эритроцитов (RDW-CV), с превышением значений во 2-й группе.

RDW – это показатель, с помощью которого определяют наличие в крови разных по объему эритроцитов, то есть область их распределения и диапазон отличия больших и самых маленьких клеток. Оптимально значение коэффициента равно 13%. Повышение коэффициента свидетельствует о том, что клетки сильно различаются по объему и их срок жизни резко сокращен, снижение – о нарушении процесса кроветворения и наличии анемии. Процесс короткой жизни эритроцита приводит к нарастанию количества железа и билирубина в крови с вторичным нарушением функции печени и селезенки.

Через 3 месяца после выписки из стационара у пациентов обеих групп значимо повысился уровень НСТ, MCV, MCH, RDW-SD ($p < 0,001$ для всех групп, соответственно). Также в обеих группах снизился уровень MCHC, значение коэффициента RDW-CV ($p < 0,001$, соответственно) и уровень СОЭ - в 1-й группе на 13%, во 2-й группе на 51%.

Из маркеров воспалительной реакции в данной статье мы рассматривали только показатель концентрации

общего СРБ, высокочувствительного СРБ (вч-СРБ) и уровень гомоцистеина.

В настоящее время СРБ рассматривается как наиболее чувствительный «эталонный» лабораторный маркер системного воспаления, тканевого повреждения и инфекционной альтерации. Концентрация его в сыворотке крови у больных, как внебольничной, так и ковидной пневмонией, коррелирует с тяжестью заболевания. Параметры вч-СРБ и гомоцистеина являются самыми часто используемыми параметрами синдрома сосудистого воспалительного ответа, уровень которых является диагностическим в определении риска выявляемых сосудистых осложнений у пациентов с ССЗ [13].

СРБ измерялся у всех пациентов на исходной точке и в точке 3 мес после выписки из стационара. На исходном этапе показатель СРБ превышал референсные значения в обеих группах пациентов, достигая максимальных значений во 2-й группе – (11,20 [3,00-25,10] и 31,2 [8,7-67,6] мг/л, $p = 0,004$). Через 3 месяца после выписки показатель СРБ значимо снизился, но с сохранившимся повышен-

Таблица 1

Сравнительная характеристика эритроцитарных параметров в группах пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию, при отсутствии и наличии сердечно-сосудистых заболеваний

| Показатели | Период обследования | Группа без ССЗ (n=51) | Группа с ССЗ (n=55) | p |
|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| RBC, $10^{12}/л$ | Исходно | 4,79±0,48 | 4,69±0,50 | 0,273 |
| | Через 3 мес | 4,68±0,45 | 4,62±0,44 | 0,471 |
| | <i>p</i> | 0,007 | 0,211 | |
| HGB, г/л | Исходно | 134,60±16,80 | 135,90±15,90 | 0,699 |
| | Через 3 мес | 134,32±12,79 | 138,15±13,94 | 0,283 |
| | <i>p</i> | 0,434 | 0,480 | |
| HCT, % | Исходно | 39,90±4,40 | 40,30±4,30 | 0,652 |
| | Через 3 мес | 42,08±3,87 | 42,87±4,05 | 0,310 |
| | <i>p</i> | <0,001 | <0,001 | |
| MCV, фл | Исходно | 83,10 [79,06-86,70] | 85,00 [82,10-88,60] | 0,109 |
| | Через 3 мес | 92,00 [88,00-94,00] | 93,00 [90,00-96,00] | 0,021 |
| | <i>p</i> | <0,001 | <0,001 | |
| СОЭ, мм/ч | Исходно | 12,990±5,90 | 29,30±14,90 | 0,007 |
| | Через 3 мес | 11,38±6,55 | 14,44±8,73 | 0,047 |
| | <i>p</i> | 0,950 | 0,176 | |
| MCH, пг | Исходно | 28,45 [27,00-29,50] | 28,79 [27,80-30,05] | 0,074 |
| | Через 3 мес | 29,00 [28,00-30,00] | 30,00 [28,00-31,00] | 0,128 |
| | <i>p</i> | 0,001 | <0,001 | |
| MCHC, г/дл | Исходно | 33,50 [33,10-34,10] | 33,80 [33,20-34,30] | 0,152 |
| | Через 3 мес | 32,00 [31,00-33,00] | 32,00 [32,00-33,00] | 0,892 |
| | <i>p</i> | <0,001 | <0,001 | |
| RDW-SD, фл | Исходно | 39,40 [36,70-40,60] | 41,10 [38,80-44,50] | 0,002 |
| | Через 3 мес | 45,50 [43,20-47,60] | 47,30 [45,00-51,20] | <0,001 |
| | <i>p</i> | <0,001 | <0,001 | |
| RDW-CV, % | Исходно | 12,90 [12,40-13,30] | 13,30 [12,80-14,60] | 0,056 |
| | Через 3 мес | 12,10 [11,80-12,50] | 12,30 [12,00-13,70] | 0,018 |
| | <i>p</i> | <0,001 | <0,001 | |

Примечание. Здесь и в табл. 2: жирным шрифтом выделено: *p* - достоверность различий параметров по горизонтали между группами 1 и 2, по вертикали – внутри группы в динамике исходно и через 3 мес после выписки из стационара.

ным уровнем показателя во 2-й группе пациентов – (0,81 [0,33-2,28] и 1,93 [1,35-3,60] мг/л, $p < 0,001$). Выявленные изменения общего СРБ параллельно ассоциировались с повышенными значениями вч-СРБ, измеренного в точке 3 мес после выписки (1,53[0,61-3,71] и 2,14 [1,12-5,04] мг/л, $p = 0,084$), и повышенным уровнем гомоцистеина (16,28±6,49 и 17,59±7,10 мкмоль/л, $p = 0,431$) в обеих группах, что свидетельствует о сохранении у пациентов явлений пролонгированной системной и локальной воспалительной сосудистой реакции, более выраженной во 2-й группе пациентов, с имеющейся вероятностью отягощения сердечно-сосудистых проявлений у больных с ишемической болезнью сердца при наличии атеросклеротических бляшек в сосудистых бассейнах.

При разделении пациентов с ССЗ ($n = 55$) на группы с поражением легочной ткани до 50% и более 50%, несмотря на зарегистрированное значимое превышение уровня СРБ при поступлении, максимального СРБ (26,70 [9,2-47,9] и 42,80 [4,50-101,6] мг/л, $p = 0,163$) и сохраняющийся повышенный уровень вч-СРБ (2,04 [1,22-4,12] и 2,54 [1,02-6,42] мг/л, $p = 0,649$) через 3 мес после выписки из стационара в группе с объемом поражения легких более 50%, а также выявленные корреляционные взаимосвязи эритроцитарных параметров с воспалительными маркерами в группах с разным объемом поражения легочной ткани, нам не удалось среди изучаемых лабораторных па-

раметров выявить предикторы, определяющие объем поражения легочной ткани. На данном этапе мы связываем это с недостаточным количеством включенных в исследование пациентов. Поэтому, исключив фактор наличия ССЗ, мы проанализировали лабораторные параметры в общей группе пациентов ($n = 106$), разделив их на подгруппы с объемом поражения легких до 50% и более 50%.

Характеристика эритроцитарных параметров крови в зависимости от объема поражения легочной ткани в общей группе пациентов представлена в табл. 2.

Пациенты в представленных группах по клинико-демографическим параметрам значимо различались только по полу (мужчины 56,5% и 32,4%, соответственно группам, $p = 0,021$) и наличию ожирения (31,1% и 51,4%, соответственно группам, $p = 0,047$).

По представленным в табл. 2 данным видно, что на исходном этапе в группе с объемом поражения легких более 50% значимо повышенным был только коэффициент RDW-CV ($p = 0,005$), показатели HGB ($p = 0,044$), HCT ($p = 0,011$), лимфоциты/СРБ ($p = 0,003$) и MCH ($p = 0,043$) были значимо высокими в группе с поражением легких до 50%.

Через 3 месяца наблюдения в обеих группах пациентов односторонне и равнозначно изменились параметры: снизились RDW-CV и MCHC; зарегистрирована тенденция к снижению параметра COЭ; повысились

Таблица 2

Сравнительная характеристика эритроцитарных параметров в общей группе пациентов, перенесших SARS-CoV-2-ассоциированную пневмонию, в зависимости от объема поражения легочной ткани

| Показатели | Период обследования | Группа до 50% поражения легочной ткани ($n = 62$) | Группа более 50% поражения легочной ткани ($n = 44$) | p |
|------------------|---------------------|---|--|--------------|
| RBC, $10^{12}/л$ | Исходно | 4,77±0,51 | 4,65±0,46 | 0,206 |
| | Через 3 мес | 4,65±0,51 | 4,63±0,36 | 0,869 |
| | p | 0,003 | 0,886 | |
| HGB, г/л | Исходно | 138,59±13,11 | 128,69±19,30 | 0,004 |
| | Через 3 мес | 137,34±13,03 | 131,69±14,79 | 0,033 |
| | p | 0,136 | 0,133 | |
| LYM/СРБ | Исходно | 0,18 [0,07-2,11] | 0,06 [0,03-0,43] | 0,003 |
| | Через 3 мес | 1,45 [0,63-3,53] | 0,54 [0,30-1,74] | 0,010 |
| | p | 0,019 | <0,001 | |
| СОЭ, мм/ч | Исходно | 19,56±14,59 | 22,80±9,96 | 0,668 |
| | Через 3 мес | 12,38±9,84 | 15,22±10,63 | 0,084 |
| | p | 0,477 | 0,334 | |
| MCHC, г/дл | Исходно | 33,80 [33,30-34,20] | 33,60 [32,60-34,20] | 0,126 |
| | Через 3 мес | 32,00 [32,00-33,00] | 32,00 [31,00-33,00] | 0,248 |
| | p | <0,001 | <0,001 | |
| MCV, фл | Исходно | 85,25 [82,00-88,40] | 83,65 [78,95-86,60] | 0,128 |
| | Через 3 мес | 93,00 [90,00-96,00] | 91,00 [88,00-93,00] | 0,016 |
| | p | <0,001 | <0,001 | |
| RDW-SD, пг | Исходно | 39,8 [37,70-41,20] | 40,50 [38,8-42,90] | 0,088 |
| | Через 3 мес | 46,80 [44,20-49,60] | 45,6 [44,60-48,80] | 0,450 |
| | p | <0,001 | <0,001 | |
| RDW-CV, % | Исходно | 12,90 [12,30-13,30] | 13,60 [12,80-15,30] | 0,005 |
| | Через 3 мес | 12,30 [12,10-13,10] | 12,30 [12,00-13,70] | 0,280 |
| | p | <0,001 | <0,001 | |
| MCH, г/дл | Исходно | 28,84±2,23 | 27,45±3,65 | 0,043 |
| | Через 3 мес | 29,77±2,36 | 28,57±3,07 | 0,032 |
| | p | <0,001 | <0,001 | |

Примечание. Lym/CRP – коэффициент соотношения лимфоцитов к СРБ.

уровни MCV, MCH, RDW-SD; зарегистрировано значимое снижение показателя RBC в 1-й группе пациентов. Во 2-й группе с поражением объема легких более 50% зарегистрировано значимое повышение коэффициента лимфоциты/СРБ (LYM/СРБ) ($p < 0,001$), который, однако, остался достоверно ниже, чем в 1-й группе.

Для поиска независимых предикторов прогнозирования объема поражения легких у пациентов был использован метод бинарной логистической регрессии. Предварительно с помощью ROC-анализа были найдены пороговые значения исходных показателей, которые помогли представить переменные в бинарном виде и сделать их более удобными для определения вероятного объема поражения легких в клинической практике. Определены следующие пороговые значения, значимо разделяющие группы с разной степенью поражения объема легких: значения max СРБ более 18 мг/л (ОШ 2,78 (95% ДИ 1,161-6,66), $p=0,020$); HGB менее 132 г/л (ОШ 2,95 (95% ДИ 1,25-6,96), $p=0,012$); МСНС менее 33 г/дл (ОШ 3,96 (95% ДИ 1,27-12,29), $p=0,014$); RDW-CV более 13,6 (ОШ 8,30 (95% ДИ 2,73-25,20), $p < 0,001$); LYM/СРБ менее 0,6 (ОШ 5,71 (95% ДИ 1,20-16,35), $p=0,001$). Эти показатели, а также RDW-SD и MCH были взяты в модель логистической регрессии в качестве независимых предикторов. В результате анализа с объемом поражения лёгких ассоциированы показатели коэффициентов RDW-CV и LYM/СРБ при поступлении в стационар. Результаты логистического регрессионного анализа отражены в табл. 3 и на рисунке.

Значения RDW-CV более 13,6 и LYM/СРБ менее 0,6 увеличивают вероятность наличия поражения легочной ткани более 50% в 9,3 и 5,9 раз, соответственно. Чувствительность и специфичность модели составили 74,4% и 86,7%. Площадь под кривой (AUC) составила 0,84; $p < 0,001$.

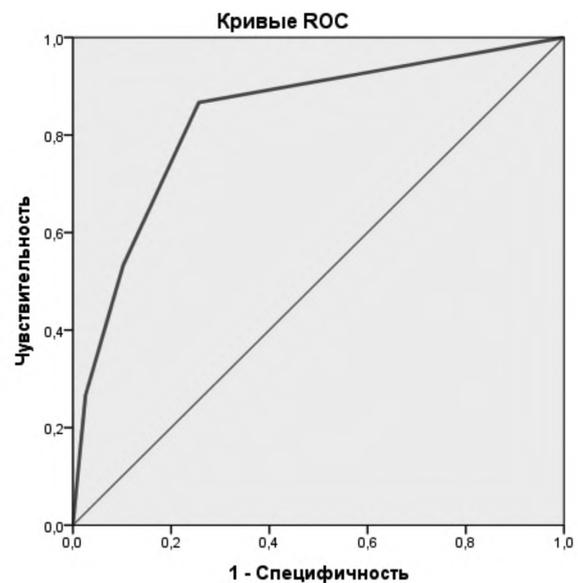
Обсуждение. Сложность состояния, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, связана с непредсказуемым клиническим течением заболевания, которое может быстро развиваться, вызывая тяжелые и смертельные осложнения. Выявление эффективных лабораторных биомаркеров, подчас уже известных, способных классифицировать пациентов по риску осложнений и эффективности терапии, может облегчить поиск предикторов и маркеров в развитии и течении полиорганной патологии у пациентов с тяжелыми осложнениями COVID-19.

Из опубликованных научных материалов известно, что эритроциты при COVID-19 определяют тяжесть гипоксемии и анемии у пациентов с пневмонией, при этом могут изменяться параметры количества эритроцитов, уровня гемоглобина, объема эритроцитов [11, 12]. По отдельным данным к критериям риска серьезных осложнений COVID-19 был отнесен показатель RDW-CV. Этот показатель позволял отслеживать процесс ухудшения или улучшения состояния пациентов,

однако причина ассоциации тяжести состояния пациентов и параметра RDW пока до конца не изучена [10]. Проводимое нами исследование дало возможность оценить отдельные аспекты данного вопроса. Мы провели исследование эритроцитарных параметров исходно и в динамике через 3 мес после выписки из стационара, включая изучение их ассоциации с маркерами воспалительной реакции и объемом поражения легких в группах пациентов с наличием и отсутствием ССЗ, и в общей группе пациентов с разным объемом поражения легких.

В данном исследовании участвовали пациенты, выписанные из моногоспиталя с перенесенной SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией.

По данным нашего исследования, в группе с ССЗ исходно большинство эритроцитарных параметров находилось в пределах референсных значений. Нами была зарегистрирована разница только в показателях СОЭ, RDW-SD и RDW-CV с достоверным превышением их значений в сравнении с группой без ССЗ. Через 3 месяца у пациентов обеих групп значимо однонаправленно повысились уровни HGB, HCT, MCH, и снизился уровень МСНС и RDW-CV. Наши данные согласуются с данными других работ, где уровни отдельных параметров, в частности, гемоглобина, гематокрита и МСНС имели подобную динамику, что свидетельствует о долгосрочном характере нарушения функции эритроцитарных параметров при COVID-19 [3, 4, 8, 14].



Данные ROC-анализа при оценке модели прогнозирования объема поражения легких.

Таблица 3

Результаты логистического регрессионного анализа

| Предикторы | В-коэффициент корреляции | Стандартная ошибка | Статистика Вальда | p | ОШ | 95% ДИ для ОШ | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|-------|-------|----------------|-----------------|
| | | | | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| RDW-CV при поступлении | 2,227 | 0,730 | 9,312 | 0,002 | 9,275 | 2,218 | 38,783 |
| LYM/СРБ при поступлении | 1,768 | 0,688 | 6,599 | 0,010 | 5,857 | 1,520 | 22,561 |
| Константа | -3,202 | 1,082 | 8,757 | 0,003 | 0,041 | | |

Примечание. ОШ – отношение шансов.

Значения RDW-CV и уровень СОЭ в группе больных с ССЗ четко ассоциировались с параметрами СРБ, вч-СРБ и гомоцистеина, что может свидетельствовать о взаимосвязи эритроцитарных показателей со степенью выраженности системного и локального сосудистого воспалительного процесса, демонстрируя наличие потенциала для развития сосудистых осложнений у пациентов с ССЗ. Неразрывная связь СРБ с параметрами лейкоцитарного ряда периферической крови – лимфоцитами - закономерно выделила в общей группе больных COVID-19 сниженный коэффициент их отношения, который вместе с RDW-CV приобрели статус маркеров поражения легочной ткани и степени тяжести заболевания с ассоциированной пневмонией. По данным ROC-анализа, коэффициенты RDW-CV > 13,6 и LYM/СРБ < 0,6 увеличивают вероятность наличия поражения легочной ткани более 50% в 9,3 и 5,9 раз, соответственно.

Естественно, причин для развития дегенеративных изменений эритроцитов в рамках COVID-19 намного больше. К ним могут относиться: нарушение созревания клеток в костном мозге; нарушение структурно-функционального состояния эритроцитарных мембран при изменении липидного и белкового обмена; изменение средней концентрации гемоглобина с увеличением среднего объема эритроцитов; повышение показателя деформируемости эритроцитов, что сопровождается снижением их пассажа через капиллярное русло, обуславливая усугубление нарушения кислородтранспортной функции крови и перфузии тканей с риском образования конгломератов не только в капиллярах, но и в более крупных сосудах, определяя тяжесть легочных и сердечно-сосудистых осложнений COVID-19 в условиях цитокинового дисбаланса; вторичное поражение функции внутренних органов в условиях тяжелого течения инфекционного процесса и ряд других [15 - 18]. Исследования по выявлению причин долгосрочного характера нарушения функции клеток периферической крови при COVID-19 активно продолжаются.

Заключение. Идентификация эффективных лабораторных биомаркеров, способных классифицировать пациентов на основе риска развития серьезных осложнений, является важным моментом для обеспечения своевременно начатой терапии пациентов. Углубленное исследование и внимательное отношение к уже известным лабораторным параметрам, в частности, эритроцитарным, может позволить расширить число индикаторов, влияющих на вероятный риск развития осложнений COVID-19, и дать возможность более раннего реагирования при сложных клинических ситуациях.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-16 см. REFERENCES)

17. Бурячковская Л.И., Мелькумянц А.М., Ломакин Н.В., Антонова О.А., Ермишкин В.В. Повреждение сосудистого эндотелия и эритроцитов у больных COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469–76. DOI: 10.26442/20751753.2021.6.200939.
18. Карякин Н.Н., Костина О.В., Галова Е.А., Поповичева А.Н., Соснина Л.Н., Преснякова В.М. и др. Нарушения реологических свойств эритроцитов у пациентов с COVID-19. *Медицинский альманах*. 2020;3:64-9.

REFERENCES

1. Clerkin K.J., Fried J.A., Raikhelkar J., Sayer G., Griffin J.M., Masoumi A. et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2020; 141 (20): 1648-55.
2. Ansovini R., Compagnucci L. The Hypothetical Role of Erythrocytes in COVID-19: Immediate Clinical Therapy. *Journal of Bio-*

- medical and Environmental Sciences*. 2020 Jul 02; 1(3): 048-050. DOI: 10.37871/jels1119, Article ID: JELS1119.
3. Lu G., Wang J. Dynamic changes in routine blood parameters of a severe COVID-19 case. *Clinica Chimica Acta*. 2020 Sep; 508: 98-102. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.034. Epub 2020 May 13. PMID: 32405079; PMCID: PMC7217800.
4. Berzuini A., Bianco C., Migliorini A.C., Maggioni M., Valenti L., Prati D. Red blood cell morphology in patients with COVID-19-related anaemia. *Blood Transfususion*. 2021 Jan.; 19(1): 34-6. DOI: 10.2450/2020.0242-20. Epub 2020 Sep 18. PMID: 32955421; PMCID: PMC7850925.
5. Renoux C., Fort R., Nader E., Boisson C., Joly P., Stauffer E. et al. Impact of COVID-19 on red blood cell rheology. *British Journal of Haematology*. 2021 Feb; 192 (4): e108-e111. DOI: 10.1111/bjh.17306. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33410504.
6. Huerga Encabo H., Grey W., Garcia-Albornoz M., Wood H. Human Erythroid Progenitors Are Directly Infected by SARS-CoV-2: Implications for Emerging Erythropoiesis in Severe COVID-19 Patients. *Stem Cell Reports*. 2021 Mar 9; 16 (3): 428-36. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.02.001. Epub 2021 Feb 5. PMID: 33581053; PMCID: PMC7862909.
7. Djakpo D.K., Wang Z., Zhang R., Chen X., Chen J.P., Antoine MMLK. Blood routine test in mild and common 2019 coronavirus (COVID-19) patients. *Bioscience Reports*. 2020 Aug 28; 40 (8): BSR20200817. DOI: 10.1042/BSR20200817. PMID: 32725148; PMCID: PMC7414516.
8. Thomas T., Stefanoni D., Dzieciatkowska M., Issaian A., Nemkov N., Hill R.C. et al. Evidence of Structural Protein Damage and Membrane Lipid Remodeling in Red Blood Cells from COVID-19 Patients. *Journal of Proteome Research*. 2020 19 (11), 4455-69. DOI:10.1021/acs.jproteome.0c00606.
9. Ji P., Zhu J., Zhong Z., Li H., Pang J., Li B. et al. Association of elevated inflammatory markers and severe COVID-19: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Nov 20; 99 (47): e23315. DOI: 10.1097/MD.00000000000023315. PMID: 33217868; PMCID: PMC7676531.
10. Seddigh-Shamsi M., Nabavi Mahali S., Mozdourian M., Allahyari A., Saeeadian N., Emadzade M. et al. Investigation of hematological parameters related to the severity of COVID-19 disease in Mashhad, Iran. *Immunopathologia Persa*. 2021; 7 (2): e19. DOI:10.34172/ipp.2021.19.
11. Foy B.H., Carlson J.C., Reinertsen E., Padros IValles R., Pallares Lopez R., Palangues-Tost E. et al. Association of Red Blood Cell Distribution Width With Mortality Risk in Hospitalized Adults With SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Netw. Open*. 2020 Sep. 1; 3 (9): e2022058. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.22058. PMID: 32965501; PMCID: PMC7512057.
12. Pan Y., Ye G., Zeng X., Liu G., Zeng X., Jiang X. et al. Can routine laboratory tests discriminate SARS-CoV-2-infected pneumonia from other causes of community-acquired pneumonia? *Clinical and Translation Medicine*. 2020 Jan; 10 (1): 161-8. DOI: 10.1002/ctm2.23. PMID: 32508038; PMCID: PMC7274074.
13. Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Kuznetsov V.A., Gorbatenko E.A., Emeneva I.V. Specific parameters of lipid spectrum and markers of vascular inflammation in patients with stable angina and significant coronary artery stenosis with or without diabetes mellitus type 2. A prospective follow-up after angioplasty. *Integrative Obesity and Diabetes*. 2017; 3 (2): 1-8.
14. Khakwani M., Horgan C., Ewing J. COVID-19-associated oxidative damage to red blood cells. *British Journal of Haematology*. 2021 May; 193 (3): 481. DOI: 10.1111/bjh.17317. Epub 2021 Jan. 11. PMID: 33427300; PMCID: PMC8013448.
15. Lam L.M., Murphy S.J., Kuri-Cervantes L., Weisman A.R. et al. Erythrocytes Reveal Complement Activation in Patients with COVID-19. *MedRxiv [Preprint]*. 2020 May 22:2020.05.20.20104398. DOI: 10.1101/2020.05.20.20104398. PMID: 32511554; PMCID: PMC7274235.
16. Ghahramani S., Tabrizi R., Lankarani K.B. Laboratory features of severe vs. non-severe COVID-19 patients in Asian populations: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Medical Research*. 2020 Aug 3; 25 (1): 30. DOI: 10.1186/s40001-020-00432-3. PMID: 32746929; PMCID: PMC7396942.
17. Buryachkovskaya L.I., Melkumyants A.M., Lomakin N.V., Antonova O.A., Ermishkin V.V. Damage to the vascular endothelium and erythrocytes in patients with COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469-76. DOI: 10.26442 / 20751753.2021.6.200939. (in Russian)
18. Karyakin N.N., Kostina O.V., Galova Ye.A., Popovicheva A.N., Sosnina L.N., Presnyakova V.M. et al. Rheological disorders of erythrocytes in patients with COVID-19. *Meditsinskiy al'manakh*. 2020; 3: 64-9. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Старкова М.В., Славнова Е.Н., Зикиряходжаев А.Д.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ИММУНОЦИТОХИМИИ В ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ В СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПРИ РАННЕМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

Цель исследования – показать возможности флюоресцентной иммуноцитохимии при срочном интраоперационном исследовании сторожевых лимфатических узлов при раннем раке молочной железы. Авторами проанализированы данные состояния лимфатических узлов у 94 больных, прооперированных по поводу раннего рака молочной железы с декабря 2016 г. по январь 2018 г. в отделении реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи МНИОИ им. П.А. Герцена. В результате использования радиофармпрепарата «Технефит^{99m}Tc» во время операции выделяли сторожевые лимфатические узлы (ЛУ), состояние которых оценивали методом срочного цитологического исследования. В сложных для диагностики случаях применяли флюоресцентную иммуноцитохимию, что позволило избежать гипо- и гипердиагностики у 30 больных с диагнозом раннего рака молочной железы. Чувствительность срочного цитологического метода исследования отпечатка сторожевых ЛУ составила 83,3%, специфичность – 100%, эффективность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 83,3%, а отрицательного результата – 100%. Таким образом, диагностическая точность срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла составила 94%.

Ключевые слова: сторожевые лимфатические узлы; срочное интраоперационное цитологическое исследование; флюоресцентная иммуноцитохимия.

Для цитирования: Старкова М.В., Славнова Е.Н., Зикиряходжаев А.Д. Применение флюоресцентной иммуноцитохимии в интраоперационной диагностике метастазов в сторожевых лимфатических узлах при раннем раке молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 31-36. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-31-36>

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния онкоцитологии; e-mail: slawnowaelena@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 09.09.2021

Принята к печати 17.11.2021

Опубликовано 28.01.2022

Starkova M.V., Slavnova E.N., Zikiryakhodzhaev A.D.

APPLICATION OF FLUORESCENT IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN INTRAOPERATIVE DIAGNOSTICS OF METASTASES IN SENTINEL LYMPH NODES IN EARLY BREAST CANCER

Moscow Scientific Research Institute of Oncology named by P.A. Herzen –branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of Russia, 125284, Moscow, Russia

The aim of the study was to show the possibilities of fluorescent immunocytochemistry in urgent intraoperative examination of sentinel lymph nodes in patients with early breast cancer. The authors analyzed the data on the state of the lymph nodes in 94 patients with early breast cancer who had been operated on since December 2016 to January 2018 in the Department of reconstructive plastic surgery of the breast and skin of the P.A. Herzen Moscow Oncological Institute. As a result of the use of the «Tekhnefit^{99m}Tc» radiopharmaceutical during the operation, sentinel lymph nodes were isolated, the state of which was assessed by the method of urgent intraoperative cytology. In difficult-to-diagnose cases, fluorescent immunocytochemistry was used, which made it possible to avoid hypo- and overdiagnosis in 30 patients with early breast cancer. The sensitivity of the urgent cytological method for examining the sentinel lymph nodes smears was 83.3%, the specificity – 100%, the efficiency – 83%, the predictive value of a positive result – 83.3%, and the predictive value of a negative result – 100%. Thus, the diagnostic accuracy of urgent cytological examination of the sentinel lymph node was 94%.

Key words: sentinel lymph nodes; urgent intraoperative cytological examination; fluorescent immunocytochemistry.

For citation: Starkova M.V., Slavnova E.N., Zikiryakhodzhaev A.D. Application of fluorescent immunocytochemistry in intraoperative diagnostics of metastases in sentinel lymph nodes in early breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 31-36 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-31-36>

For correspondence: Slavnova E. N., Doctor of Medicine, PhD, Leading Researcher; e-mail: slawnowaelena@yandex.ru

Information about authors:

Starkova M.V., <https://orcid.org/0000-0003-4141-8414>;
Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Zikiryakhodzhaev A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7141-2502>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 09.09.2021
Accepted 17.11.2021
Published 28.01.2022

Введение. Цитологический метод достаточно давно применяется в интраоперационной диагностике с целью верификации метастазов в лимфатических узлах [1]. Срочное интраоперационное цитологическое исследование лимфатических узлов (ЛУ) во многом определяет выбор рационального объема и характера оперативного вмешательства [1,2].

В настоящее время на предоперационном этапе под контролем компьютерной и ультразвуковой диагностики можно получить тонкоигольные аспирационные биоптаты из опухолей, но не всегда возможно адекватно оценить состояние лимфатического коллектора. В современной хирургии имеется две основные тенденции: 1 – проведение расширенной лимфаденэктомии; 2 – сохранение лимфатического коллектора с удалением и исследованием сторожевых ЛУ, что диктует важность точной оценки состояния лимфатического коллектора [3, 4]. Таким образом, показания к расширенной лимфаденэктомии и удалению сторожевых ЛУ определяется состоянием лимфатического барьера, которое адекватно оценить визуально не всегда представляется возможным.

Отсутствие метастазов в сторожевых ЛУ при раннем раке молочной железы позволяет применять органосохраняющее лечение с щадящей тактикой в отношении лимфатического коллектора.

Предоперационная объективная оценка состояния зон регионарного метастазирования не всегда возможна. В лимфатических узлах, макроскопически не подозрительных по метастатическому поражению при микроскопическом исследовании, в 30% выявляются метастазы, и в таком же проценте наблюдений в увеличенных плотных ЛУ метастазы не выявляются. Полученные данные определяют необходимость интраоперационного морфологического изучения лимфатического барьера. Гистологическое исследование небольшого количества ЛУ может привести к неадекватной оценке распространенности опухолевого процесса, исследование большого числа ЛУ требует значительной затраты времени, что в интраоперационных условиях не выполнимо. При рутинном гистологическом исследовании ЛУ ошибка может достигать 25%. Эту ситуацию можно преодолеть, используя многоступенчатые срезы и иммуногистохимию, но на это уходит много времени и этот метод сложно применить в условиях срочного интраоперационного исследования [5-13]. Срочное интраоперационное цитологическое исследование ЛУ является альтернативой гистологическому методу и требует гораздо меньших затрат времени и средств [14, 15,]. Но при цитологическом исследовании возможны ошибки, которые носят характер гипо- и гипердиагностики. Возможны сложности цитологической диагностики по единичным опухолевым клеткам. Объективная оценка метастатического поражения лимфатических узлов возможна с помощью иммуноцитохимического исследования (ИЦХИ), Однако иммунопероксидазное ИЦХИ проводится

в плановом порядке и занимает по времени 2.5–3 часа. В отделении онкоцитологии МНИОИ им. П.А.Герцена разработана технология и получен патент на интраоперационную флюоресцентную иммуноцитохимическую диагностику метастатического поражения лимфатических узлов, позволяющая интраоперационно, в течение 20 мин объективно оценить характер поражения лимфатических узлов [16–18].

В настоящее время биопсия сигнальных ЛУ при раке молочной железы в зарубежных странах входит в критерии современных рекомендаций, таких, как NCCN, ASCO, ESMO и др. [19–21]. В Российской Федерации, согласно протоколу клинической апробации «Метод биопсии сигнальных (сторожевых) лимфатических узлов у больных операбельными (ранними) стадиями рака молочной железы cT1-2N0M0 как компонент органосохраняющего или функционально щадящего лечения», утвержденному Минздравом России 19.11.16 г., можно использовать в качестве клинических испытаний радиоизотопный коллоид Технефит ^{99m}Tc. В качестве срочной интраоперационной диагностики сторожевых ЛУ используют, в основном, гистологическое исследование.

Цель исследования – показать возможности флюоресцентной иммуноцитохимии при срочном интраоперационном исследовании сторожевых лимфатических узлов при раке молочной железы.

Материал и методы. С декабря 2016 г. по январь 2018 г. в отделении реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи МНИОИ им. П.А.Герцена были проведены клинические исследования для диагностики состояния ЛУ у 94 больных с диагнозом раннего рака молочной железы. Идентификацию сторожевого ЛУ проводили в три этапа:

1. предоперационная визуализация сторожевого ЛУ с использованием радиоизотопного коллоида;
2. интраоперационная детекция сторожевого ЛУ с использованием портативного гамма-датчика;
3. срочное интраоперационное исследование сторожевого ЛУ.

Для предоперационной визуализации сторожевого ЛУ использовали радиоизотопный препарат «Технефит^{99m}Tc» производства фирмы «Диамед» (Россия) (регистрационный номер: ЛС-00002365 от 28.09.2011 г.).

Для визуализации сторожевого ЛУ за 1,5–2 ч до предполагаемого хирургического вмешательства больным вводили 1 мл радиофармпрепарата (РФП). Введение выполняли периареолярно, со стороны квадранта, соответствующего проекции опухоли, внутрикжно и подкожно, предварительно обработав зону инъекции раствором антисептика.

Через 25-30 минут после введения препарата всем больным проводили сцинтиграфию в режиме однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и в режиме совмещенной однофотонной

эмиссионной компьютерной томографии, совмещенной с рентгеновской компьютерной томографией (ОФЭКТ-КТ). Для исследования использовали однофотонный компьютерный томограф, совмещенный с рентгеновской компьютерной томографией Discovery NM/CT 670 (General Electric, США).

Полученные в ходе исследования данные сцинтинограммы позволяли определить зону интенсивного накопления РФП в месте введения, «дорожку» от первичного очага до сторожевого лимфатического узла и очаги накопления препарата, соответствующие количеству и локализации выявленных сторожевых лимфатических узлов.

Интраоперационную детекцию сторожевого лимфатического узла проводили с помощью портативного гамма-детектора Gamma Finder® II (W.O.M World of Medicine AG., Германия).

В условиях операционной с помощью гамма-детектора выполняли оценку локализации лимфатического узла и показателей интенсивности накопления РФП. После этого выполняли выделение и удаление сторожевого лимфатического узла с помощью электрокоагуляции.

После удаления сторожевой ЛУ направляли в цитологическое отделение для проведения срочного цитологического исследования.

Срочное цитологическое исследование включало в себя три этапа: выполнение разреза лимфатического узла, взятие соскоба и микроскопическое заключение. В случае небольшого размера сторожевого лимфатического узла ≤ 5 мм выполняли разрез лимфатического узла в одной плоскости, в случае более крупного размера лимфатического узла ≥ 5 мм – в 2–3 параллельных плоскостях.

Далее брали соскобы с поверхностей плоскостей всех срезов сторожевого лимфатического узла с последующей окраской азуро-эозиновыми смесями с использованием набора для быстрого окрашивания Лейкодиф 200. Изучение материала проводили с помощью микроскопа LEICA DMLS 2 (Германия). В случаях, вызывавших затруднение в постановке диагноза, проводили дополнительное исследование – флуоресцентное ИЦХИ. С целью выявления опухолевых клеток применяли эпителиальный антиген Ber-EP4 FITC. Данный антиген представляет молекулу адгезии эпителиальных клеток и состоит из двух гликопротеинов молекулярной массой 34 и 39 кД, которые находятся преимущественно на поверхности клеточной мембраны почти всех эпителиальных клеток, за исключением некоторых видов плоского эпителия, гепатоцитов, проксимальных отделов эпителия почечных канальцев, желудочных париетальных и миоэпителиальных клеток. Элементы лимфатического узла Ber-EP4-отрицательны. Ber-EP4 является маркером клеток эпителиальной природы, его экспрессия отмечается в клетках широкого спектра новообразований эпителиального происхождения, включая мелкоклеточный, недифференцированный рак и нейроэндокринные опухоли. Для флуоресцентного ИЦХИ использовали жидкостные препараты, приготовленные с помощью центрифуги Cytospin 3. Это позволило получить монослой клеток, сконцентрировать клеточные элементы на ограниченном участке, обеспечило сохранность клеточных структур, снизило содержание в препарате фоновых элементов, сэкономить дорогостоящие реактивы.

Материалом для проведения флуоресцентного ИЦХИ служили клеточные суспензии, полученные при соскобах с ЛУ.

1. Клеточный материал, полученный при соскобе с ЛУ, помещали в специальную питательную среду накопления, находящуюся в микропробирке (800 мкл), для получения клеточной суспензии.

2. Хорошо перемешанную клеточную суспензию вносили по 100 мкл на дно каждой пробирки, добавляли 5 мкл моноклонального антитела Ber EP4 FITC и перемешивали 5с на вортексе.

3. Контроль качества проводили окрашиванием двух цитоспиновых препаратов методом срочной интраоперационной цитологической окраски. При наличии в мазках достаточного количества клеточного материала (200–300 клеток), проводили флуоресцентное ИЦХИ оставшихся неокрашенных цитопрепаратов.

4. Материал инкубировали 30 мин в темноте в холодильнике (2–8°C). В процессе инкубации происходила реакция взаимодействия поверхностных антигенов со специфическим антителом Ber-EP4 FITC, меченным соответствующим флуорохромным красителем с образованием комплексов антиген + антитело.

5. Затем взвесь клеток распределяли по 50-100 мкл в контейнеры центрифуги Cytospin 3 и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут.

6. Полученные препараты окрашивали ядерным флуоресцентным красителем Dapi.

7. Затем осуществляли микроскопию полученных препаратов.

При добавлении к клеточной суспензии моноклональных антител Ber-EP4 FITC, конъюгированных с флуорохромами, происходило связывание их с поверхностными антигенами клеток, возбуждение флуоресценции и последующая ее регистрация при длине волны 488 нм (в спектре Green). Последующую диагностику проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). Реакцию оценивали качественно. Мембранное окрашивание наблюдали при проведении реакции с эпителиальным антигеном Ber-EP4 FITC. При оценке результатов ИЦХИ принимали во внимание интенсивность и полноту окрашивания. При наличии в исследуемом материале опухолевых клеток при микроскопической визуализации отмечали мембранную экспрессию маркера на клетках рака молочной железы, представленную ярким зеленым окрашиванием по периферии клеток (рис. 1, а, б).

Нами отмечены некоторые особенности экспрессии эпителиального маркера Ber-EP4 FITC, выявляемые при флуоресцентной микроскопии. Характерной особенностью является хорошо выраженная четкая мембранная реакция в виде секреторных вакуолей, которые располагались на поверхности клетки, иногда в виде своеобразного кружева. Наблюдали также отрыв цитоплазмы в виде секреторных вакуолей. Такой характер экспрессии характерен для клеток аденогенного рака. Наличие таких клеток не вызывало сомнений в их эпителиальной природе. Для предотвращения гипердиагностики метастазов рака в ЛУ учитывали, что макрофагальные элементы, присутствующие в лимфатических узлах, захватывают частицы красителя и выглядят как светящиеся включения в цитоплазме (рис.2, а, б). Срочное гистологическое исследование не проводили.

Результаты. Оценка эффективности метода биопсии сторожевого ЛУ с использованием срочного цитологического исследования была проанализирована в группе 94 больных с диагнозом рака молочной железы.

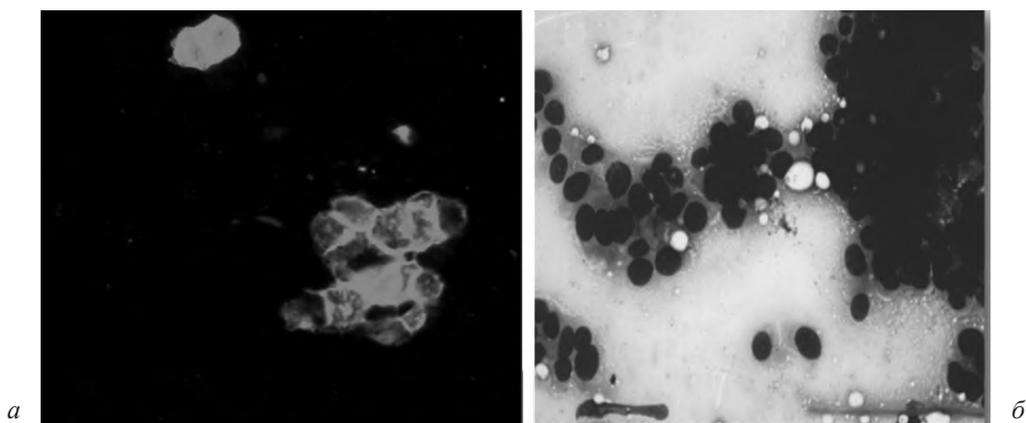


Рис. 1. Макрометастаз в сторожевой лимфатический узел.
a – ИЦХИ с VerEp4FITC; *б* – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х40.

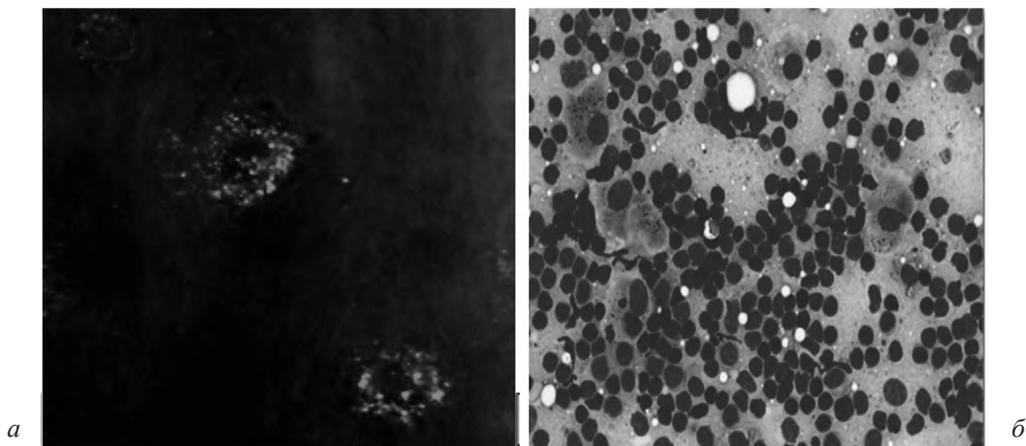


Рис. 2. Гиперплазированный лимфатический узел с синус-гистиоцитозом.
a – ИЦХИ с VerEp4FITC; *б* – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х40.

Наиболее часто у 68 больных из 94 (72,3%) при биопсии выявляли один сторожевой ЛУ, два сторожевых ЛУ обнаружено у 17 (18,1%) больных и только у 9 (9,6%) больных были диагностированы три сторожевых ЛУ.

При срочном цитологическом исследовании метастатическое поражение выделенного сторожевого ЛУ было выявлено в 25 (26,6%) наблюдениях, в то время как при плановом гистологическом исследовании – в 30 (32%). У 5 (5,3%) больных при срочном исследовании не удалось выявить метастатическое поражение сторожевого ЛУ. Таким образом, ошибка цитологического исследования составила 16,1% от всех выявленных случаев метастатического поражения сторожевого ЛУ. У 30 больных применяли флуоресцентное ИЦХИ, с помощью которого у 15 больных с сомнительной цитологической картиной удалось установить метастазы рака молочной железы и избежать гиподиагностики, а у остальных 15 больных отвергнуть наличие метастазов. Трудности возникали при микрометастазах (рис. 3, *a*, *б*), когда опухолевых клеток в цитологическом препарате было мало, при метастазе дольчатого рака молочной железы, когда опухолевые клетки имели небольшие размеры, сравнимые с лимфоцитами и располагались разрозненно. При выраженном синус-гистиоцитозе гистиоцитарные элементы могут ошибочно быть приняты за опухолевые клетки.

Именно в этих случаях необходимо флуоресцентное ИЦХИ. Анализ чувствительности, специфичности, точности и прогностической ценности метода срочного цитологического исследования был проведен на основе оценки положительных и отрицательных результатов срочного цитологического и планового гистологического исследования сторожевого ЛУ. В 64 (68%) из 94 (100%) случаев при срочном цитологическом исследовании отпечатков с разрезов сторожевого ЛУ метастазы не были выявлены, что расценивалось как истинно отрицательный результат. В 25 (26,6%) из 94 клинических наблюдений обнаружены злокачественные клетки, что соответствовало истинно положительному результату. В 5 (5,3%) из 94 случаев случаях при срочном исследовании злокачественные клетки не определялись, однако, при проведении планового гистологического исследования были выявлены метастазы, что расценивалось как ложноотрицательный результат срочного цитологического исследования. Ни одного случая ложноположительного результата срочного цитологического исследования зафиксировано не было, что явилось результатом применения флуоресцентного ИЦХИ в сложных для цитологической диагностики наблюдениях (см. таблицу).

Основываясь на полученных данных анализа, чувствительность срочного цитологического метода ис-

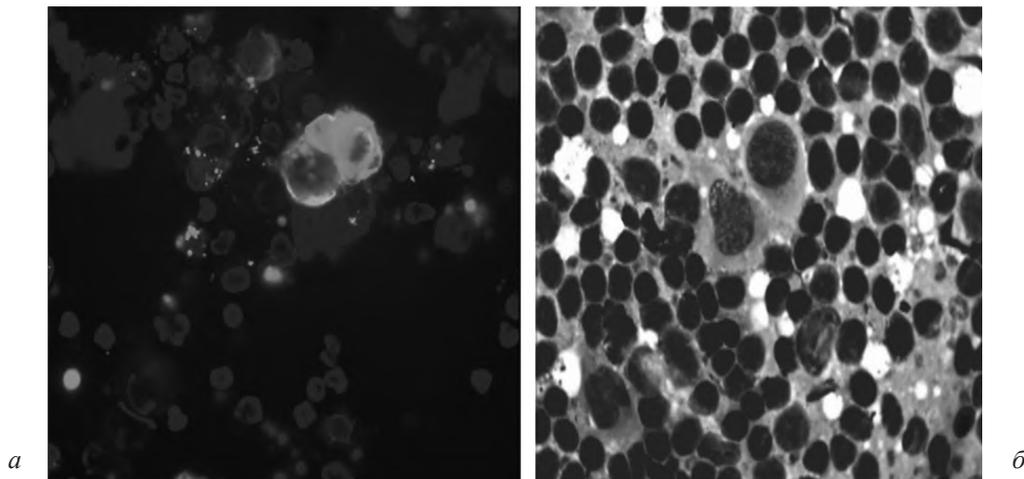


Рис. 3. Микрометастаз рака молочной железы в сторожевой лимфатический узел.
 а – ИЦХИ с VerEp4FITC; б – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х63.

Анализ чувствительности и специфичности срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла

| Показатели | | Плановое гистологическое исследование сигнальных ЛУ | | Общее число |
|---|----------------|---|----------------|-------------|
| | | с метастазами | без метастазов | |
| Срочное цитологическое исследование сигнальных ЛУ | С метастазами | ИП - 25 | ЛП - 0 | 25 |
| | Без метастазов | ЛО-5 | ИО-64 | 69 |
| | Всего | 30 | 64 | 94 |

Примечание. ЛП – ложноположительный результат, ИП – истинно положительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат, ИО – истинно отрицательный результат.

следования отпечатка сигнального ЛУ составила 83,3%, специфичность – 100%, эффективность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 83,3%, а прогностическая ценность отрицательного результата – 100%. Таким образом, диагностическая точность срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла была равна 94%. При оценке дополнительно удаленных лимфатических узлов после выполненной регионарной лимфодиссекции у 7 (7,4%) из 94 больных было выявлено поражение сторожевого ЛУ в комбинации с поражением дополнительно выделенных ЛУ, а у 6 (6,4%) из 94 (100%) больных было выявлено изолированное метастатическое поражение дополнительно выделенных несторожевых ЛУ.

Заключение. Срочное цитологическое исследование с точностью до 94% позволяет оценить статус сторожевого лимфатического узла. Показатели исследования во многом зависят от техники диссекции и взятия цитологического материала. В трудных случаях диагностики, таких как микрометастазы с наличием лишь единичных опухолевых клеток в цитологическом мазке, метастазы долькового рака, когда опухолевые клетки трудно отличить от лимфоидных элементов, выраженный синус гистиоцитоз, необходимо применять флуоресцентное ИЦХИ, позволяющее в течение 20 мин объективно оценить цитологическую картину. Флуоресцентное ИЦХИ позволяет избежать гипо- и гипердиагностики в интраоперационной цитологической оценке поражения сторожевых ЛУ при раннем раке молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-13, 19-21 см. REFERENCES)

1. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Мельникова В.Ю., Ермолаева А.Г., Борисова О.В. Срочная интраоперационная морфологическая диагностика в онкологии. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 18 (1-2): 33-4.
2. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н. Современная цитологическая диагностика онкологических поражений лимфатических узлов. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 18(1-2): 32-3.
3. Волченко Н.Н., Гладунова З.Д., Славнова Е.Н., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю. Возможности цитологического метода в выявлении метастатического поражения лимфатических узлов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 62(12): 39-43.
4. Волченко Н.Н., Гладунова З.Д., Славнова Е.Н., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю. Цитологический метод в выявлении метастатического поражения лимфатических узлов. *Российский онкологический журнал*. 2010; 3: 9-12.
14. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю., Петров А.Н., Славнова Е.Н. Срочная интраоперационная морфологическая диагностика в онкологии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2015; 4(4): 5-11.
15. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Мельникова В.Ю., Ермолаева А.Г., Глухова Ю.К., Славнова Е.Н. Срочная морфологическая диагностика в онкологии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2020; 9(1): 5-13.
16. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Борисова О.В. Интраоперационная флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика распространенного опухолевого процесса (медицинская технология). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена; 2012.
17. Славнова Е.Н., Волченко Н.Н. Срочная флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика метастатического поражения лимфатических узлов. Патент РФ №2582275; 2016.

ЦИТОЛОГИЯ

18. Старкова М.В., Зирияходжаев А.Д., Грушина Т.И., Суркова В.С., Славнова Е.Н., Леонтьев А.В. Диагностическая значимость биопсии сторожевого лимфатического узла у больных ранним раком молочной железы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2019; 8(6) 422-7.

REFERENCES

- Volchenko N.N., Slavnova E.N., Mel'nikova V.Yu., Ermolaeva A.G., Borisova O.V. Urgent intraoperative morphological diagnostics in oncology. *Novosti klinicheskoy tsytologii Rossii*. 2014; 18 (1-2): 33-4. (in Russian)
- Volchenko N.N., Slavnova E.N. Modern cytological diagnosis of oncological lesions of the lymph nodes. *Novosti klinicheskoy tsytologii Rossii*. 2014; 18(1-2): 32-3. (in Russian)
- Volchenko N.N., Gladunova Z.D., Slavnova E.N., Ermolaeva A.G., Mel'nikova V.Yu. Possibilities of the cytological method in identifying metastatic lesions of the lymph nodes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 62(12): 39-43. (in Russian)
- Volchenko N.N., Gladunova Z.D., Slavnova E.N., Ermolaeva A.G., Mel'nikova V.Yu. Cytological method in identifying metastatic lesions of the lymph nodes. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2010; 3: 9-12. (in Russian)
- Johnston E.I., Beach R.A., Waldrop S.M., Lawson D., Cohen C. Rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of sentinel lymph nodes for metastatic breast carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2006; 14(1): 57-62.
- Celebioglu F., Sylvan M., Perbeck L., Bergkvist L., Frisell J. Intraoperative sentinel lymph node examination by frozen section, immunohistochemistry and imprint cytology during breast surgery — a prospective study. *Eur. J. Cancer*. 2006; 42(5): 617-20.
- Safai A., Razeghi A., Monabati A., Azarpira N., Talei A. Comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and cytokeratin immunostaining for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2012; 55(2):183-6.
- Francz M., Egervari K., Szollosi Z. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison of frozen sections, imprint cytology and immunocytochemistry. *Cytopathology*. 2010; 22(1):36-42.
- Sharma Upender, Harsh Mohan, Uma Handa AKA. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma by imprint cytology, frozen section and rapid immunohistochemistry. *Diagn. Cytopathol.* 2009; 37(12):871-5.
- Mori M, Tada K, Ikenaga M, Miyagi Y, Nishimura S, Takahashi K, Makita M, Iwase T, Kasumi F, Koizumi M. Frozen section is superior to imprint cytology for the intra-operative assessment of sentinel lymph node metastasis in stage I breast cancer patients. *World J. Surg. Oncol.* 2006; 4:26.
- Lumachi F, Marino F, Zanella S, Chiara GB, Basso SM. Touch imprint cytology and frozen-section analysis for intraoperative evaluation of sentinel nodes in early breast cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32(8):3523-6.
- Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, Ames FC, Feig BW, Ross MI, Singletary E, Hunt KK, Bedrosian I. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer*. 2009;115(7):1555-62.
- Petropoulou T, Kapoula A, Mastoraki A, Politi A, SpanidouKarvouni E, Psychogios I, Vassiliou I, Arkadopoulos N. Imprint cytology versus frozen section analysis for intraoperative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Breast Cancer: (Dove Med Press)*. 2017; 9:325-30.
- Volchenko N.N., Borisova O.V., Ermolaeva A.G., Melnikova V.Yu., Petrov A.N., Slavnova E.N. Urgent intraoperative morphological diagnostics in oncology. *Onkologiya. Zhurnal im.P.A.Gertsena*. 2015; 4(4): 5-11. (in Russian)
- Volchenko N.N., Borisova O.V., Melnikova V.Yu., Ermolaeva A.G., Glukhova Yu.K., Slavnova E.N. Urgent morphological diagnostics in oncology. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A.Gertsena*. 2020; 9(1): 5-13. (in Russian)
- Volchenko N.N., Slavnova E.N., Borisova O.V. Intraoperative fluorescent immunocytochemical diagnostics of a widespread tumor process (medical technology) [Intraoperatsionnaya fluorestsentnaya immunotsytokhimicheskaya diagnostika rasprostranennogo opukholevogo protsessa (meditsinskaya tekhnologiya)]. Moscow: MNIOI im. P.A.Gertsena; 2012. (in Russian)
- Slavnova E.N., Volchenko N.N. Urgent fluorescent immunocytochemical diagnosis of metastatic lesions of the lymph nodes. Patent RF № 2582275; 2016. (in Russian)
- Starkova M.V., Zikiryakhodzaev A.D., Grushina T.I., Surkova V.S., Slavnova E.N., Leontiev A.V. Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in patients with early breast cancer. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A.Gertsena*. 2019; 8(6) 422-7. (in Russian)
- Giammarile F., Alazraki N., Aarsvold J.N., Audisio R.A., Glass E., Grant S.F. et al. The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2013; 40(12):1932-47.
- Lyman G.H., Somerfield M.R., Giuliano A.E. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: 2016 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update summary. *J. Oncol. Pract.* 2017;13(3):196-8.
- Lyman G.H., Giuliano A.E., Somerfield M.R., Benson A.B. 3rd, Bor-durka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS3rd, Edge SB, Galper S, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(30):7703-20.

ИММУНОЛОГИЯ

© МУРКАМИЛОВ И.Т., 2022

Муркамилов И.Т.^{1,2}

ДВУНАПРАВЛЕННОЕ ВЛИЯНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И СНИЖЕНИЯ СКОРОСТИ КЛУБОЧКОВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

¹Кыргызская государственная медицинская академия имени И.К. Ахунбаева, 720020, город Бишкек, Кыргызстан;

²ГОУ ВПО Кыргызско-Российский славянский университет, 720000, город Бишкек, Кыргызстан

Цель исследования – оценить взаимосвязь между цитокиновым профилем, С-реактивным белком (СРБ), фибриногеном крови и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) у больных хронической болезнью почек. В исследовании приняли участие лица (n=816) с хронической болезнью почек (ХБП) с 1-й по 5-ю стадиями заболевания, в возрасте от 20 до 76 лет. Соотношение мужчин и женщин составило 48% и 52%, соответственно. Всем обследованным лицам проведено комплексное клиничко-лабораторное исследование с оценкой концентрации интерлейкинов (IL, IL-10, IL-6, TNFα) и белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок, фибриноген) крови. Категории ХБП оценивали по значению СКФ, которая рассчитывалась по формуле CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). У лиц с ХБП достоверно высокие концентрации IL-10 и IL-6 отмечались на 3б стадии заболевания. Величина систолического артериального давления, медиана содержания TNFα, фибриногена крови и число лиц с высоким значением СРБ были существенно выше на 4-й стадии ХБП. Статистически значимая корреляционная взаимосвязь выявлялась между показателем расчетной СКФ с уровнем IL-6, СРБ, фибриногена крови на 2-й стадии заболевания и концентрацией IL-10 на 3б стадии и TNFα на 4-й стадии ХБП. На начальной стадии ХБП отмечается достоверная взаимосвязь между снижением расчетной СКФ и увеличением уровня IL-6, IL-10, TNFα, а также ростом СРБ и фибриногена крови, которая становится выраженной на 3б и 4-й стадиях ХБП.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек; скорость клубочковой фильтрации; цитокины; интерлейкин-10; интерлейкин-6; фактор некроза опухоли альфа; С-реактивный белок; фибриноген.

Для цитирования: Муркамилов И.Т. Двухнаправленное влияние маркеров воспаления и снижения скорости клубочковой фильтрации при хронической болезни почек. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 37-42.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-37-42>

Для корреспонденции: Муркамилов Илхом Торобекович, канд. мед. наук, доц. каф. факультетской терапии; e-mail: murkamilov.i@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.07.2021

Принята к печати 22.09.2021

Опубликовано 28.01.2022

Murkamilov I.T.^{1,2}

THE BI-DIRECTIONAL EFFECT OF MARKERS OF INFLAMMATION AND A DECREASE IN GLOMERULAR FILTRATION RATE IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

¹Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Akhunbaev, 720020, Bishkek, Kyrgyzstan;

²Kyrgyz-Russian slavic university, 720000, Bishkek, Kyrgyzstan

The aim of the study was to analyze and evaluate the relationship between the cytokine profile, C-reactive blood protein, fibrinogen, and glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. The study involved individuals (n = 816) with chronic kidney disease (CKD) from the 1st to 5th stage of the disease, aged 20 to 76 years. The male to female ratio was 48% and 52%, respectively. All examined individuals underwent a comprehensive clinical and laboratory study evaluating the concentration of interleukins (IL, IL-10, IL-6, TNF-α) and acute phase inflammation proteins (C-reactive protein, fibrinogen) in the blood. CKD categories were evaluated by glomerular filtration rate (GFR), which was calculated using the CKD-EPI formula (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). In individuals with CKD, significantly high concentrations of IL-10 and IL-6 were observed at stage 3b of the disease. Systolic blood pressure, median TNF-α, blood fibrinogen, and the number of individuals with high CRP were significant at stage 4 of CKD. A statistically significant correlation was found between the estimated GFR with the level of IL-6, CRP, blood fibrinogen at the 2nd stage of the disease and the concentration of IL-10 at 3b and TNF-α at the 4th stage of CKD. At the initial stage of CKD, there is a significant relationship between a decrease in estimated GFR and an increase in the level of IL-6, IL-10, TNF-α, as well as an increase in CRP and blood fibrinogen, which becomes pronounced at stages 3b and 4 of CKD.

Key words: chronic kidney disease; glomerular filtration rate; cytokines; interleukin-10; interleukin-6; tumor necrosis factor alpha; C-reactive protein; fibrinogen.

For citation: Murkamilov I.T. The bi-directional effect of markers of inflammation and a decrease in glomerular filtration rate in chronic kidney disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 37-42 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-37-42>

For correspondence: *Murkamilov I. T.*, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Faculty Therapy, e-mail: murkamilov.i@mail.ru

Information about author:

Murkamilov I. T., <https://orcid.org/0000-0001-8513-9279>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 22.07.2021

Accepted 22.09.2021

Published 28.01.2022

Введение. ХБП представляет собой синдром, в основе которого лежат механизмы формирования нефросклероза [1]. ХБП почти всегда протекает бессимптомно на ранних стадиях. В общей популяции у каждого десятого взрослого человека и каждого четвертого пациента с сердечно-сосудистой патологией выявляются признаки дисфункции почек [2]. Диагностика ХБП устанавливается на основании лабораторных маркеров повреждения почек, подтвержденных по времени с интервалом более трех месяцев. Согласно рекомендациям Научного общества нефрологов России, такой промежуток необходим для подтверждения снижения уровня СКФ менее 60 мл/мин в том случае, если СКФ ниже 60 мл/мин выступает в роли единственного маркера ХБП [3]. С другой стороны, трехмесячное ограничение в качестве временного параметра определения ХБП было выбрано, потому что в данные сроки острые варианты развития дисфункции почек, как правило, завершаются выздоровлением или приводят к клинико-морфологическим признакам хронического течения почечного процесса. Результаты проведенных одномоментных, эпидемиологических исследований показали, что распространенность ХБП в мире увеличивается, и сопоставима с такими социально значимыми заболеваниями, как гипертоническая болезнь (ГБ), ишемическая болезнь сердца (ИБС) и сахарный диабет (СД) 2-го типа [4, 5]. В основе современной концепции прогрессирования почечных заболеваний, независимо от их этиологии, лежат универсальные, неспецифические механизмы, конечным результатом действия которых считают нефросклероз [6, 7]. Стоит отметить, что специфические патогенетические механизмы, обусловленные непосредственно характером заболевания, определяют его течение лишь в начальной стадии, тогда как, по мере замедления СКФ, инициируется каскад гемодинамических, метаболических и клеточно-молекулярных процессов, завершающихся формированием фиброза в почках [8]. В структуре группы факторов, действие которых на разных стадиях ХБП инициирует и/или поддерживает прогрессирование воспаления, особая роль отводится изменениям экспрессии медиаторов клеточного и структурного повреждения [8]. Такими являются цитокины, факторы роста, макромолекулы и т.д. [9]. В результате многосторонних исследований установлено, что важным фактором персистенции воспалительного процесса при ХБП является гиперпродукция различных цитокинов и СРБ [10]. В некоторых исследованиях отмечено, что усиленный синтез цитокинов в клубочках приводит к увеличению внутриклеточного матрикса и снижению уровня почечной фильтрации [11].

Цель исследования – оценить взаимосвязь между цитокиновым профилем, С-реактивным белком, фибриногеном крови и скоростью клубочковой фильтрации у больных хронической болезнью почек.

Материал и методы. Обследованы 392 мужчин (средний возраст $53,1 \pm 14,6$ лет) и 424 женщин (средний возраст $54,6 \pm 13,8$ лет) с ХБП. В качестве критериев ХБП принимали значение протеинурии, гематурии и/или снижение СКФ менее 60 мл/мин в течение трех и более месяцев. Протокол нашего исследования одобрен локальным этическим комитетом. Все обследованные лица давали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Клиническая часть настоящего исследования включала подсчет частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), измерение систолического и диастолического артериального давления. Всем участникам наряду с клиническим обследованием проводились исследования концентрации интерлейкина (IL)- 10, IL-6, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), С-реактивного белка (СРБ), фибриногена и креатинина крови. Концентрацию цитокинов (IL-10, IL-6 и TNF α) в плазме крови обследуемых определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя соответствующие наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Количественная оценка содержания СРБ в биохимическом анализе крови проводили не ранее чем через 2 нед после исчезновения симптомов любого острого заболевания или обострения хронического воспалительного процесса. Тяжесть ХБП оценивали по показателю СКФ, расчет которого выполнялся по формуле СКД-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [12]. На момент обследования у 73,2% ($n=598$) больных ХБП ассоциировалась с коморбидными состояниями: у 47,1% ($n=385$) пациентов имелась ГБ, у 24,6% ($n=201$) – стабильные формы ИБС, у 18,2% ($n=149$) – сахарный диабет (СД), у 6,7% ($n=55$) – цереброваскулярные болезни (ЦВБ), у 8% ($n=66$) – хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), у 2,9% ($n=24$) – бронхиальная астма (БА) и у 2,4% ($n=20$) – мочекаменная болезнь (МКБ). У 169 (20,7%) включенных в данное исследование больных имелись первичные заболевания почек, такие как, хронические гломерулонефриты и тубуло-интерстициальные нефриты. Больные, находящиеся на программном гемодиализе, лица с трансплантированной почкой и онкологическими заболеваниями являлись критерием исключения из исследования. Полученные результаты заносились в электронную таблицу Microsoft Excel и обрабатывались с использованием специальной программы STATISTIKA 10.0. Анализировались средние выборочные значения, их сравнение проводилось с использованием непараметрических методов Манна-Уитни U-Test. Числовые значения в статье представлены как медиана и межквартильный размах, а также среднее значение \pm стандартное его отклонение. Для выявления и оценки взаимосвязи между исследуемыми показателями цитокинового профиля, концентрациями СРБ, фибриногена и СКФ использовался коэффициент ранговой

корреляции Спирмана. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Согласно международным рекомендациям в общеврачебной практике используется 5-ти стадийная классификация ХБП. В нашем исследовании, количество лиц с ХБП 1-й стадии, т.е. с оптимальной СКФ, выявлены у 502 больных (61,5% случаев). Численность лиц с 3а и 3б подстадиями ХБП была схожей (табл.1). Среди больных с 1-й стадией ХБП число лиц женского пола было несколько выше. У 185 (22,6%) участников исследования в момент обследования уже имелись признаки хронической почечной недостаточности. Вместе с тем, у 7,2% больных требовалось проведение почечной заместительной терапии (табл. 1).

Как показано в табл. 2, средний возраст у больных 3б стадией ХБП был достоверно выше по сравнению с пациентами 5-й стадии ХБП. Средние значения уровней систолического артериального давления (АД) были существенно выше у лиц с 4-й стадией ХБП по сравнению с 1,2 и 3а подстадиями заболевания. Тогда, как величина диастолического АД во всех стадиях ХБП была меньше или равной 90 мм рт. ст., и достоверно не отличалась (табл. 2).

Анализ концентрации против-(IL-10), провоспалительных (IL-6) цитокинов и фибриногена продемонстрировал, что их медиана и межквартильные значения были сравнительно выше на 3б стадии ХБП (табл. 3). Содержание TNF α плазмы, фибриногена крови (медиана) и число обследованных больных существенно выросли на 4-й стадии ХБП.

При оценке взаимосвязи между показателями расчетной СКФ и параметрами цитокинового профиля, белков острофазового воспаления крови с помощью расчета коэффициента корреляции были получены следующие данные (табл. 4). На 2-й стадии ХБП между рас-

четной СКФ и концентрацией IL-6 ($r = -0,292$; $p < 0,05$), СРБ ($r = -0,294$; $p < 0,05$) и фибриногеном крови ($r = -0,217$; $p < 0,05$) существует отрицательная взаимосвязь. Схожая корреляционная взаимосвязь отмечалась между расчетной СКФ и концентрацией TNF α ($r = -0,347$; $p < 0,05$) на 4-й стадии ХБП. Статистически значимые взаимосвязи между величиной расчетной СКФ и содержанием IL-10 регистрировались у больных 3б стадии ХБП.

Обсуждение. Предлагаемая статья является продолжением ранее начатой работы по исследованию цитокинового механизма прогрессирования ХБП [13,14]. Важным шагом в понимании механизмов ускорения нефросклероза служит изучение клеточно-молекулярных аспектов развития болезни, которые представляют собой местные почечные проявления патологических механизмов воспаления и фиброза. В свою очередь, они являются следствием локального баланса между эндокринными, паракринными и аутокринными факторами, регулирующими пролиферацию и синтетическую функцию фибробластов [15, 16-18]. Клеточные механизмы повреждения тубулоинтерстициальной ткани почек представлены участием лимфоцитов, макрофагов, системной комплемента и цитокинов [19]. Термин «цитокин» впервые был предложен исследователем – биохимиком S. Cohen и соавт. в 1974 г. [20]. Цитокины представляют собой пептидные информационные молекулы, имеющие молекулярную массу 30 кДа, они продуцируются лимфоцитами, макрофагами, гранулоцитами, ретикулярными фибробластами, эндотелиальными клетками [21, 22]. При ренальной дисфункции в клубочках и интерстициальной ткани почек увеличивается количество моноцитов и макрофагов [23]. Следовательно, число данных клеток увеличивается по мере развития гломерулярного и тубулоинтерстициального фиброза [24]. Очевидно, что воспалительные реакции

Таблица 1

Клинико-демографические показатели обследованных больных с ХБП

| Стадии ХБП СКФ, мл/мин/1,73м ² | Всего, n=816 | Женщины/Мужчины | Креатинин сыворотки крови, мкмоль/л Me (IQR) | Расчетная СКФ, мл/мин Me (IQR) |
|--|--------------|-----------------|---|-----------------------------------|
| C1 (>90) | 502 (61,5%) | 289/213 | 68,1 (58,8;78,9) | 102,0 (96,0;110,0) |
| C2 (60-89) | 129 (16,0%) | 50/79 | 92,0 (76,1;103,6) | 74,5 (66,0;81,0) |
| C3а (45-59) | 42 (5,1%) | 21/21 | 117,2 (98,8;136,0) | 50,0 (46,0;54,0) |
| C3б (30-44) | 46 (5,6%) | 22/24 | 147,0 (128,7;177,0) | 37,0 (31,4;42,0) |
| C4 (15-29) | 38 (4,6%) | 15/23 | 253,5 (214,9;308,0) | 21,0 (17,0;28,0) |
| C5 (<15) | 59 (7,2%) | 27/32 | 507,3 (417,3;703,7) | 9,0 (7,0;11,0) |

Примечание. Здесь и в табл.3: Me – медиана; IQR – межквартильный интервал.

Таблица 2

Клиническая характеристика обследованных больных с ХБП (M \pm SD)

| Стадии ХБП СКФ, мл/мин/1,73м ² | Возраст, годы | ЧСС, уд/мин | Систолическое АД, мм рт. ст. | Диастолическое АД, мм рт. ст. |
|--|------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|
| C1 (>90) | 57,0 \pm 14,5 | 81 \pm 14 | 134 \pm 21 | 86 \pm 11 |
| C2 (60-89) | 59,0 \pm 14,5 | 82 \pm 16 | 135 \pm 20 | 88 \pm 15 |
| C3а (45-59) | 59,5 \pm 14,4 | 74 \pm 15 | 134 \pm 16 | 85 \pm 8 |
| C3б (30-44) | 60,8 \pm 10,4* | 75 \pm 14 | 148 \pm 28 | 86 \pm 12 |
| C4 (15-29) | 52,3 \pm 12,4 | 82 \pm 9 | 150 \pm 30** | 88 \pm 16 |
| C5 (<15) | 51,3 \pm 12,4 | 83 \pm 17 | 145 \pm 18 | 90 \pm 15 |

Примечание. * – $p < 0,05$ между 3б и 5-й стадией ХБП; ** – $p < 0,05$ между 1, 2, 3а и 4-й стадией ХБП; M – среднее значение; SD – стандартное отклонение.

с участием моноцитов и макрофагов играют важную роль в прогрессировании ХБП вне зависимости от происхождения. Полагается, что наряду с другими воспалительными цитокинами IL-6 являются биомаркерами прогрессирования ренальной дисфункции при первичных и вторичных нефропатиях [12]. В частности, при первичных нефропатиях наблюдается значительное повышение экспрессии воспалительных цитокинов в клубочках и тубулоинтерстициальной ткани почек, коррелирующее со степенью макрофагальной инфильтрации и снижением СКФ [21–23, 25].

Цитокины активны в очень малых концентрациях, а их биологический эффект на клетки реализуется через взаимодействие со специфическим рецептором, локализованным на клеточной цитоплазматической мембране. Образование и секреция цитокинов происходит кратковременно и строго регулируется. Спектр биологической активности провоспалительных цитокинов, таких, как IL-6 и TNF α , в значительной степени перекрываются, то есть, один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более, чем одним цитокином [26,27]. В клинической практике определение их концентрации в плазме крови даёт информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток, о тяжести воспалительного процесса и его переходе на системный уровень, а также о прогнозе заболевания [28,29].

В проведенном нами исследовании установлено, что медиана концентрации IL-6 и TNF α были достоверно выше на 3б и 4-й стадиях ХБП (см. табл.3). Уровень IL-10, как противовоспалительного цитокина, повышен

в плазме крови также у больных с ХБП на 3б стадии. Следует отметить, что активация системного воспаления повышается при прогрессировании ХБП и способствует процессам атерогенеза [30]. В исследовании A. Rescio-Mayoral и соавт. [31] была продемонстрирована корреляция между маркерами атеросклероза и степенью воспаления у больных ХБП на разных стадиях. В нашем исследовании установлена тесная взаимосвязь IL-6, IL-10 и TNF α с расчетной СКФ на 3б, 2-й и 4-й стадиях ХБП (см. табл. 4). Корреляции указанных цитокинов с почечной функцией согласуются с данными о роли увеличения цитокинов в формировании фиброза в почках [32]. В более ранних исследованиях было показано, что активация процессов воспаления и эндотелиальная дисфункция происходят параллельно со снижением СКФ. При этом более высокие значения уровня СРБ коррелировали с более быстрыми темпами развития почечной дисфункции [33]. Нами также было установлено, что у больных с ХБП наблюдалась отрицательная корреляционная связь между увеличением содержания СРБ, фибриногена крови и торможением СКФ на 2-й стадии заболевания (см. табл. 4). В макрофагах и моноцитах СРБ увеличивается высвобождение провоспалительных цитокинов, стимулирует адгезию моноцитов. В некоторых исследованиях доказано, что активация процессов воспаления и увеличение цитокинов происходит, начиная с 3-й стадии ХБП [34, 35]. В работе В.И. Коненкова и соавт. [36] отмечено, что цитокиновый профиль плазмы крови у больных СД 2-го типа характеризуется повышением концентрации воспалительных цитокинов, в частности

Таблица 3

Концентрация цитокинового профиля и белков острофазового воспаления у больных ХБП

| Стадии ХБП СКФ, мл/мин/1,73м ² | IL-10, пг/мл Me (IQR) | IL-6, пг/мл Me (IQR) | TNF α , пг/мл Me (IQR) | СРБ, >5мг/л Me (IQR) | Фибриноген, г/л Me (IQR) |
|--|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| C1 (>90) | 3,571 (1,079;8,412) | 1,638 (0,802;3,226) | 1,180 (0,500;2,744) | 121 (24,1%) | 3,20 (2,70;4,15) |
| C2 (60-89) | 4,036 (0,773;11,842) | 2,525 (1,240;5,098) | 1,017 (0,415;2,571) | 36 (27,9%) | 3,30 (2,60;4,16) |
| C3а (45-59) | 3,571 (1,010;7,194) | 2,326 (0,964;5,665) | 1,311 (0,385;4,655) | 15 (35,7%) | 3,90 (3,20;5,20) |
| C3б (30-44) | 6,122* (1,195;16,250) | 2,626*** (1,203;4,981) | 1,311 (0,385;4,655) | 14 (30,4%) | 4,55 (3,60;5,40) |
| C4 (15-29) | 5,395 (1,282;14,943) | 2,455 (1,846;5,128) | 2,763** (0,732;4,615) | 17** (44,7%) | 5,10** (3,80;6,70) |
| C5 (<15) | 3,915 (1,453;8,333) | 2,340 (0,881;4,909) | 1,304 (0,545;3,193) | 11 (18,6%) | 3,99 (3,50;5,10) |

Примечание. * – $p < 0,05$ между 1-й и 3б стадией ХБП; ** – $p < 0,05$ между 1-й и 4-й стадией ХБП; *** – $p < 0,05$ между 1-й и 3б стадией ХБП.

Таблица 4

Характеристика корреляционной связи показателей цитокинового профиля и белков острой фазы с расчетной СКФ

| Категория СКФ | Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин (СКД-EPI) | | | | |
|------------------------------|---|-------------|----------------------|--------------|-----------------|
| | IL-10, пг/мл | IL-6, пг/мл | TNF α , пг/мл | СРБ, >5 мг/л | Фибриноген, г/л |
| C1, высокая или оптимальная | 0,123 | 0,182 | 0,086 | 0,067 | 0,016 |
| C2, незначительно снижена | 0,073 | -0,292* | 0,012 | -0,294* | -0,217* |
| C3а, умеренно снижена | 0,206 | 0,394 | 0,173 | 0,251 | 0,140 |
| C3б, существенно снижена | -0,216* | 0,090 | 0,114 | 0,008 | 0,162 |
| C4, резко снижена | 0,120 | 0,053 | -0,347* | 0,237 | 0,239 |
| C5, почечная недостаточность | 0,150 | 0,050 | 0,194 | 0,197 | 0,094 |

Примечание. * – $p < 0,05$.

IL-6. Повышение содержания IL-6 у больных с ХБП при наличии ХПН было показано в ранее опубликованной нами работе [13]. В настоящее время отрицательное влияние провоспалительных цитокинов на развитие и прогрессирование ХБП объясняется индукцией апоптоза и некроза почечных клеток, нарушением кровотока в сосудах клубочков, связанных с дисбалансом медиаторов с вазоконстрикторными или вазодилатирующими свойствами, увеличением продукции клетками мезангия хемоаттрактантов для нейтрофилов и макрофагов, что, в конечном итоге, способствует воспалительной инфильтрации клубочков [37–39]. Стимуляция пролиферации клеток мезангия клубочков и увеличение продукции молекул межклеточной адгезии и экстрацеллюлярного матрикса сопровождаются истончением базальной мембраны клубочков и увеличением экскреции альбумина с мочой. Кроме того, повышенное образование реактивных форм кислорода в мезангиальных клетках, увеличение секреции веществ, обладающих прокоагулянтными свойствами, а также мезангиальных и эндотелиальных клеток приводит к увеличению реабсорбции натрия и жидкости в проксимальных канальцах [41].

Выводы. В ходе исследования было выявлено, что на начальной стадии ХБП отмечается достоверная взаимосвязь между снижением расчетной СКФ и увеличением уровня IL-6, IL-10, TNF α , а также ростом СРБ и фибриногена крови. Статистически значимое нарастание цитокинового дисбаланса и белков острофазового воспаления наблюдались на 3б и 4-й стадиях ХБП. Таким образом, запуск процесса воспаления с участием цитокинов, а также СРБ и фибриногена, способствует прогрессированию почечной дисфункции, а сам процесс замедления СКФ поддерживает воспалительный компонент основного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4-12, 15, 17, 19-35, 37-40
см. REFERENCES)

2. Мухин Н.А., Балкаров И.М., Моисеев С.В., Фомин В.В., Лебедева М.В., Краснова Е. А. Хронические прогрессирующие нефропатии и образ жизни современного человека. *Терапевтический архив*. 2004;76 (9):1-9.
3. Моисеев В.С., Мухин Н.А., Смирнов А.В., Кобалава Ж.Д., Бобкова И.Н., Виллевалде С.В. и др. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардио-нефропротекции. *Российский кардиологический журнал*. 2014; (8):7-37.
13. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В., Муркамилова Ж.А., Сабиров И.С., Райимжанов З.Р. и др. Провоспалительные цитокины у больных с хронической болезнью почек: в фокусе интерлейкин-6. *Архив внутренней медицины*. 2019; 9(6): 428-33.
14. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В. Гендерные особенности кардиоренальных взаимоотношений и цитокинового статуса у больных хронической болезнью почек. *Клиническая нефрология*. 2019; 2:20-6.
16. Игнатова М.С. О хронических болезнях почек и тубулоинтерстициальных нефропатиях. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2008; 87(3):128.
18. Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Молекулярные механизмы интерстициального фиброза при прогрессирующей болезни почек (обзор литературы). *Нефрология и диализ*. 2006; 1:26–35.
36. Коненков В.И., Смольникова М. В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов. *Медицинская иммунология*. 2003; 5 (1-2):11-28.
41. Пчелин И.Ю., Шишкин А.Н., Лаптева О.А. Роль системного и локального воспаления в развитии диабетической нефропатии.

Нефрология. 2011;15(4):21-6.

REFERENCES

1. Burton J.O., Goldsmith D.J., Ruddock N., Shroff R., Wan M. Renal association commentary on the KDIGO (2017) clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of CKD-MBD. *BMC nephrology*. 2018; 19 (1):240.
2. Mukhin N.A., Balkarov I.M., Moiseev S.V., Fomin V.V., Lebedeva M.V., Krasnova E.A. Chronic progressive nephropathies and modern lifestyle. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2004;76 (9):1-9. (in Russian)
3. Moiseev V.C., Mukhin N.A., Smirnov A.V., Kobalava J.D., Bobkova I.N., Villeval de S.V. et al. Cardiovascular risk and chronic kidney disease: cardio-nephroprotection strategies. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2014; (8):7-37. (in Russian)
4. Ji A., Pan C., Wang H., Jin Z., Lee J. H., Wu Q. et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Chronic Kidney Disease in an Elderly Population from Eastern China. *International journal of environmental research and public health*. 2019; 16 (22):4383.
5. Duan J., Wang C., Liu D., Qiao Y., Pan S., Jiang D. et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey. *Scientific reports*. 2019; 9 (1):1-11.
6. Rowland J., Akbarov A., Eales J., Xu X., Dormer J.P., Guo H. et al. Uncovering genetic mechanisms of kidney aging through transcriptomics, genomics, and epigenomics. *Kidney international*. 2019; 95(3):624-35.
7. Meyrier A. Nephrosclerosis: a term in quest of a disease. *Nephron*. 2015;129 (4):276-82.
8. Gigante A., Giannakakis K., Di Mario F., Barbano B., Rosato E., Pofi R. et al. BMI, nephroangiosclerosis and glomerulonephritis: Is there any meeting point? *Nephrology*. 2018; 23 (11):991-6.
9. Agharazii M., St-Louis R., Gautier-Bastien A., Ung R.V., Mokus S., Larivière R. et al. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. *American journal of hypertension*. 2015; 28(6):746-55.
10. Xu G., Luo K., Liu H., Huang T., Fang X., & Tu W. The progress of inflammation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Renal failure*. 2015; 37 (1):45-9.
11. Amdur R.L., Feldman H.I., Gupta J., Yang W., Kanetsky P., Shlipak M., et al. Inflammation and progression of CKD: the CRIC study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. 2016; 11 (9):1546-56.
12. Levey A.S., Stevens L.A., Schmid C.H., Zhang Y.L., Castro A.F., Feldman H.I. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150 (9): 604–12.
13. Murkamiлов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В., Муркамилова З.А., Сабиров И.С., Райимжанов З.Р. et al. Pro-inflammatory cytokines in patients with chronic kidney disease: interleukin-6 in focus. *Archiv vnutrenney meditsiny*. 2019; 9(6): 428-33. (in Russian)
14. Murkamiлов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В. Gender features of cardiorenal relationships and cytokine status in patients with chronic kidney disease. *Klinicheskaya nefrologiya*. 2019; 2: 20-6. (in Russian)
15. Isbel N.M., Nikolic-Paterson D.J., Hill P.A., Dowling J., Atkins R.C. Local macrophage proliferation correlates with increased renal M-CSF expression in human glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2001; 16 (8):1638-47.
16. Ignatova M.S. About chronic kidney diseases and tubulointerstitial nephropathies. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2008; 87 (3):128.
17. Levey A.S. Chronic Kidney Disease as a Global Public Health Problem: Approaches and Initiatives. *Kidney Int*. 2007; 72: 247–59.
18. Chebotareva N.V., Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V. Molecular mechanisms of interstitial fibrosis in progressive kidney diseases (literature Review). *Nefrologiya i Dializ*. 2006; 1:26-35. (in Russian)
19. Eddy A.A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric Nephrology*. 2000; 15: 290–301.
20. Cohen S., Bigazzi P.E., Yoshida T. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cellular Immunology*. 1974; 12(1):150-9.
21. Weiskirchen R., Weiskirchen S., Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Molecular aspects of medicine*. 2019; 65:2-15.

IMMUNOLOGY

22. Lv W., Booz G.W., Wang Y., Fan F., Roman R.J. Inflammation and renal fibrosis: recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur. J. Pharmacol.* 2018; 820: 65-76.
23. Lan H.Y, Yang N., Nikolic-Paterson D.J, Yu X.Q, Mu W., Isbel N.M. et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2000; 57:499-509.
24. Nagase R., Kajitani N., Shikata K., Ogawa D., Kodera R., Okada S. et al. Phenotypic change of macrophages in the progression of diabetic nephropathy; sialoadhesin-positive activated macrophages are increased in diabetic kidney. *Clin. Exp. Nephrol.* 2012; 16(5):739-48.
25. Lv S.S., Liu G., Wang J.P., Wang W.W., Cheng J., Sun A.L. et al. Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting macrophage infiltration. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17(2):275-82.
26. Hagenstein J., Melderis S., Nosko A., Warkotsch M.T., Richter J.V., Ramcke T. et al. A Novel Role for IL-6 Receptor Classic Signaling: Induction of RORyt+ Foxp3+ Tregs with Enhanced Suppressive Capacity. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2019; 30(8):1439-53.
27. Kambayana G., Pulcheria M., Widiana I. G. R. Correlation between serum interleukin-6 with glomerular filtration rate in systemic lupus erythematosus. *Jurnal Penyakit Dalam Udayana.* 2019; 3(1):22-5.
28. Pecoits-Filho R., Heimbürger O., Barany P., Suliman M., Fehrman-Ekholm I., Lindholm B. et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 41:1212-8.
29. Dalla Vestra M., Mussap M., Gallina P., Bruseghin M., Cernigoi A.M., Saller A. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16 (Suppl. 1):S78- S82.
30. Oguntola O., Hassan M., Duarte R., Dix-Peek T., Dickens C., Moodley K. et al. SUN-270 Atherosclerotic vascular disease and inflammation in CKD patients in south Africa. *Kidney International Reports.* 2019; 4:S1-S437.
31. Recio-Mayoral A., Banerjee D., Streather C., Kaski J.C. Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease – a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients. *Atherosclerosis.* 2011; 216 (2):446-51.
32. Lawson J., Elliott J., Wheeler-Jones C., Syme H., & Jepson R. Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: known mediators and mechanisms of injury. *The Veterinary Journal.* 2015; 203 (1):18-26.
33. He J., Xu Y., Koya D., & Kanasaki K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clinical and experimental nephrology.* 2013; 17(4):488-97.
34. Nadra I., Mason J.M., Philippidis P. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ. Res.* 2005; 96:1248-56.
35. Liu B.C., Tang T.T., Lv L.L., & Lan H.Y. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney international.* 2018; 93 (3):568-79.
36. Konenkov V. I., Smol'nikova M. V. Structural bases and functional significance of allelic polymorphism of human cytokine genes and their receptors. *Meditinskaya immunologiya.* 2003; 5 (1)-2:11-28. (in Russian)
37. Rops A.L., Jansen E., van der Schaaf A., Pieterse E., Rother N., Hofstra J. S. et al. Interleukin-6 is essential for glomerular immunoglobulin A deposition and the development of renal pathology in Cd37-deficient mice. *Kidney international.* 2018; 93 (6):1356-66.
38. Barr E.L., Barzi F., Hughes J.T., Jerums G., Hoy W.E., O'Dea K. et al. High baseline levels of tumor necrosis factor receptor 1 are associated with progression of kidney disease in indigenous australians with diabetes: the eGFR follow-up study. *Diabetes care.* 2018; 41(4):739-47.
39. Mihai S., Codrici E., Popescu I.D., Enciu A.M., Rusu E. et al. Inflammation-Related Patterns in the Clinical Staging and Severity Assessment of Chronic Kidney Disease. *Disease markers.* 2019; 2019: 1814304-304.
40. Durlacher-Betzer K., Hassan A., Levi R., Axelrod J., Silver J., & Naveh-Many T. Interleukin-6 contributes to the increase in fibroblast growth factor 23 expression in acute and chronic kidney disease. *Kidney international.* 2018; 94 (2):315-25.
41. Pchelina I.Y., Shishkin A.N., Lapteva O.A. The role of systemic and local inflammation in diabetic nephropathy. *Nefrologiya (St. Petersburg).* 2011; 15(4):21-6. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Фейзханова Г.У.¹, Волошин С.А.¹, Новиков А.А.², Александрова Е.Н.², Смолдовская О.В.¹, Рубина А.Ю.¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА И БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ НА БИОЧИПАХ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, Россия;

² ГБУЗ Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова ДЗМ, 111123, Москва, Россия

Одним из биомаркеров, имеющим наибольшее клиническое значение при ревматоидном артрите (РА), является ревматоидный фактор (IgM РФ). Ревматоидный фактор имеет недостаточную чувствительность и специфичность, поэтому для повышения диагностической информативности теста в качестве сопутствующих биомаркеров используются белки острой фазы. С помощью биологических микрочипов проведено измерение IgM РФ, С-реактивного белка (СРБ) и белка сывороточного амилоидного белка А (САА) у пациентов с РА (n=60), анкилозирующим спондилитом (АС) (n=55), системной красной волчанкой (СКВ) (n=20) и здоровых доноров (ЗД) (n=9). Показано, что медианы концентраций IgM РФ значительно выше ($p<0,01$) у пациентов с РА по сравнению с пациентами, страдающими другими исследованными заболеваниями, и здоровыми донорами. СРБ и САА также были значимо повышены ($p<0,05$) у пациентов с РА и АС по сравнению с СКВ и ЗД.

Показано, что комплексное определение трех биомаркеров при дифференциации больных РА с группой сравнения обладает большей диагностической чувствительностью, чем изолированное определение IgM РФ, при этом наибольший вклад в улучшение диагностических характеристик панели биомаркеров вносит добавление САА: использование модели логистической регрессии на основе IgM РФ и САА позволяет увеличить диагностическую чувствительность анализа с 58,3% до 65 %.

Таким образом, разработанный на основе микрочипов метод может быть использован для обнаружения и выяснения диагностических характеристик биомаркеров РА, однако для дальнейшего использования требуется валидация полученных результатов на расширенной выборке.

Ключевые слова: ревматоидный фактор; СРБ; сывороточный амилоид А; биочипы.

Для цитирования: Фейзханова Г.У., Волошин С.А., Новиков А.А., Александрова Е.Н., Смолдовская О.В., Рубина А.Ю. Определение ревматоидного фактора и белков острой фазы воспаления на биочипах у пациентов с ревматоидным артритом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (1): 43-47. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-43-47>

Для корреспонденции: Фейзханова Гузель Усмановна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. биологических микрочипов; e-mail: gouzele@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение 19-15-00283).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.10.2021

Принята к печати 25.11.2021

Опубликовано 28.01.2022

Feyzkhanova G.U.¹, Voloshin S.A.¹, Novikov A.A.², Aleksandrova E.N.², Smoldovskaya O.V.¹, Rubina A.Yu.¹

ANALYSIS OF RHEUMATOID FACTOR AND ACUTE PHASE PROTEINS USING MICROARRAYS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

¹ FSBI Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia;

² SBIHC Moscow Clinical Scientific Center n.a. A.S. Loginov, 111123, Moscow, Russia

One of the biomarkers of biggest clinical importance in rheumatoid arthritis (RA) is rheumatoid factor (IgM RF). The rheumatoid factor has insufficient sensitivity and specificity, therefore, to increase the diagnostic information of the test, acute phase proteins were used as concomitant biomarkers. Using biological microchips, we measured IgM RF, C-reactive protein (CRP) and Serum amyloid protein A (SAA) in patients with RA (n = 60), ankylosing spondylitis (AS) (n=55), systemic lupus erythematosus (SLE) (n=20) and healthy donors (HD) (n=9). It was shown that the medians of IgM RF concentrations are significantly higher ($p<0.01$) in patients with RA compared to patients suffering from other diseases and healthy donors. CRP and SAA were also significantly increased ($p<0.05$) in patients with RA and AS compared with SLE and HD. It has been shown that the complex determination of three biomarkers in differentiating RA patients with the comparison group had a higher diagnostic sensitivity than the isolated determination of IgM RF, while the addition of SAA makes the greatest contribution to improving the diagnostic characteristics of the biomarker panel: the use of a logistic regression model based on IgM RF and SAA allowed to increase the diagnostic sensitivity of the analysis from 58.3% to 65%.

Thus, the developed microarray-based method can be used to detect and elucidate the diagnostic characteristics of RA biomarkers; however, further use requires validation of the obtained results on an expanded sampling.

Key words: rheumatoid factor; C-reactive protein; Serum amyloid A; microarrays.

For citation: Feyzkhanova G.U., Voloshin S.A., Novikov A.A., Aleksandrova E.N., Smoldovskaya O.V., Rubina A.Yu. Analysis of rheumatoid factor and acute phase proteins using microarrays in patients with rheumatoid arthritis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 43-47 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-43-47>

For correspondence: Feyzkhanova G.U., PhD, junior researcher in the Laboratory of biological biochips; e-mail: gouzele@mail.ru

Information about authors:

Feyzkhanova G.U., <https://orcid.org/0000-0001-6706-4488>;
Voloshin S., <https://orcid.org/0000-0003-1536-562X>;
Novikov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2738-2956>;
Aleksandrova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-4074-5907>;
Smoldovskaya O.V., <https://orcid.org/0000-0002-9947-4446>;
Rubina A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6120-7780>.

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

Acknowledgment. *The study was financed by the Russian Science Foundation (project no. 19-15-00283).*

Received 07.10.2021

Accepted 25.11.2021

Published 28.01.2022

Введение. Ревматоидный артрит (РА) является аутоиммунным ревматическим заболеванием, характеризующимся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным поражением внутренних органов. Диагностика данного заболевания является сложной задачей в связи с недостаточной специфичностью клинических признаков и низкой чувствительностью клинико-лабораторных критериев. Среди биомаркеров, ассоциирующихся с РА и входящих в диагностические критерии (ACR/EULAR 2010 г.) этого заболевания, наибольшее клиническое значение имеют аутоантитела: ревматоидный фактор класса IgM (IgM РФ), антитела к циклическому цитруллинированному пептиду и острофазовые показатели: СОЭ, С-реактивный белок (СРБ) [1–4].

IgM РФ – аутоантитела IgM класса, реагирующие с Fc-фрагментом IgG [5,6]. Наиболее аналитически точным методом измерения сывороточной концентрации IgM РФ является нефелометрия [7]. Однако использование в реальной клинической практике иммунотурбидиметрии, иммуноферментного анализа и латекс-агглютинации приводит к существенной вариабельности получаемых результатов [8–11]. Так диагностическая чувствительность измерения IgM РФ при РА, по данным разных авторов, может колебаться от 40% до 80% [12]. Кроме этого, повышенный уровень IgM РФ может присутствовать и при других заболеваниях - остеоартрозе, системной красной волчанке, синдроме Шенгрена, гепатите С и онкологических заболеваниях [13,14].

Повышению диагностической информативности теста может способствовать одновременное определение IgM РФ вместе с провоспалительными белками – СРБ и сывороточным амилоидным белком А (САА) [15]. СРБ является наиболее чувствительным и стандартизованным маркером воспаления, инфекции и тканевого повреждения [16], также существуют данные, что благодаря своим провоспалительным и протромботическим свойствам он может играть роль в развитии костной резорбции при РА [17]. Уровень САА также повышается при заболеваниях, связанных с хроническим воспалением (болезнь Альцгеймера, онкологические заболевания, диабет и др.) [18,19]. Повышенный уровень САА при нормальном уровне СРБ часто наблюдается при средней активности ревматоидных заболеваний [20,21]. Исходя из этого, одновременное определение IgM РФ, СРБ и САА при диагностике РА может обладать большей эффективностью чем обычный однопараметрический тест.

Ранее был разработан биочип, позволяющий определять провоспалительные белки в культуральной среде [22]. Разработанный метод был адаптирован для измерения в сыворотке крови СРБ, САА и РФ.

Целью работы являлась оценка диагностического значения комплексного определения IgM РФ, СРБ и

САА в сыворотке крови больных РА с использованием биочипа.

Материал и методы. Исследовали образцы сыворотки крови у 60 пациентов с ревматоидным артритом (РА), у 55 пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС), у 20 пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и у 9 здоровых доноров (ЗД) (табл. 1). Образцы были предоставлены ГБУЗ Московским клиническим научным центром (МКНЦ) имени А.С. Логинова ДЗМ. Исследование одобрено локальным этическим комитетом МКНЦ. У 15 пациентов с РА было определено число припухших и число болезненных суставов (ЧПС, ЧБС).

Изготовление сконструированных биочипов (подготовку стеклянных подложек, изготовление смеси гелевых мономеров, процессы полимеризации и блокировки биочипов) проводили по методикам, описанным ранее [22].

На сконструированных биочипах проводили анализ по методике, адаптированной из предыдущих работ [22]. На первой стадии проводили инкубацию биочипов с анализируемыми образцами или калибровочными пробами в течение 2 ч при 37°C для IgM РФ, 1 ч при 37°C для СРБ, 30 мин при 22°C для САА. После этого отмывали биочипы 20 мин в ФСБ с содержанием Tween-20 (отмывочный буфер). Затем инкубировали биочипы с проявляющими антителами (конъюгатами антител с флуоресцентной меткой Су5 для IgM РФ) в течение 1 ч при 37°C. После промежуточной отмывки в указанном выше буфере биочипы инкубировали с флуоресцентно-меченым (Су5) стрептавидином и проводили завершающую отмывку (30 мин).

Биочипы после отмывки анализировали на биочип-анализаторе с лазерным возбуждением с использованием программного обеспечения ImageAssay [22]. После получения флуоресцентных изображений по калибровочным кривым рассчитывали концентрацию определяемых белков в исследуемых образцах.

Сравнение уровней биомаркеров в группах пациентов проводили методом Манна-Уитни ($p < 0,05$), оценку диагностической эффективности проводили методом ROC-анализа. ROC-анализ, логистическую и линейную регрессии, расчёт доверительных интервалов и построение диаграмм сравнения проводили с помощью программы MedCalc 20.010.

Результаты и обсуждение. Разработанный метод на основе биочипов был адаптирован из предыдущих работ [22]. Было подобрано оптимальное время инкубации с образцом для получения наибольшего динамического диапазона и большей чувствительности. Характеристики разработанного метода для каждого биомаркера приведены в табл. 2. Воспроизводимость анализа находилась в пределах 15% для всех биомаркеров; диапазон

Таблица 1

Характеристика обследованных больных

| Показатели | Категории пациентов (по заболеваниям) | | | |
|--|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| | РА | АС | СКВ | ЗД |
| | (n=60) | (n=55) | (n=20) | (n=9) |
| Средний возраст (минимум-максимум), годы | 58 (20–88) | 42 (18–65) | 28 (17–34) | 50 (20–65) |
| Женщины/мужчины | 50/10 | 20/35 | 18/2 | 8/1 |
| DAS28/BASDAI/SLEDAI2k* | 6 (3.2–7.86) | 6 (1.2–9) | 14 (2–31) | - |
| Средний индекс (минимум-максимум) | | | | |
| Активность: | | | | |
| низкая | - | 8 | - | - |
| умеренная | 24 | - | - | - |
| высокая | 36 | 47 | - | - |
| Стадия: | | | | |
| развернутая | 39 | - | - | - |
| поздняя | 21 | - | - | - |

Примечание. * – DAS28 (Disease Activity Score-28)–индекс активности ревматоидного артрита, BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)–индекс активности анкилозирующего спондилита, SLEDAI2k (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000)–индекс активности системной красной волчанки. n – число пациентов.

Таблица 2

Характеристики метода определения IgM РФ, СРБ, САА на биологических микрочипах

| Биомаркер | Диапазон определения | Аналитическая чувствительность |
|-----------|----------------------|--------------------------------|
| IgM РФ | 10-1000 МЕ/мл | 2 МЕ/мл |
| СРБ | 1-100 мкг/мл | 0,5 мкг/мл |
| САА | 1-100 мкг/мл | 0,1 мкг/мл |

линейности совпадал с диапазоном определения.

В исследуемую выборку входили пациенты с РА, АС, СКВ и здоровые доноры. Результаты концентрации IgM РФ, СРБ и САА, определенные на биочипах для всех образцов, представлены на пузырьковой диаграмме (рис. 1).

По результатам анализа была выявлена слабая корреляция между СРБ и САА – 0,327 ($p < 0,001$) среди всех образцов. Среди пациентов с РА и АС корреляции этих маркеров сохранялась, в отличие от СКВ и ЗД, где корреляция отсутствовала. В работе М. Кокобун и соавт. [23] также наблюдали, что концентрации СРБ и САА, белков острой фазы, коррелировали (коэффициент корреляции 0,789, $p < 0,01$) для пациентов с РА, и не коррелировали в образцах здоровых доноров.

Концентрация СРБ также коррелировала с ЧПС (коэффициент корреляции Спирмана 0,589, $p = 0,0209$). В работе К. Shimada и соавт. [24] была исследована зависимость концентраций СРБ и скорости оседания эритроцитов от количества и размеров припухших суставов. В нашем исследовании при построении линейной регрессии между концентрацией СРБ и ЧПС уравнение имело следующий вид: $СРБ (мг/мл) = 5,66 + 5,22 \times ЧПС$ (95% ДИ для наклона регрессии: от -0,07 до 10,51). При этом наклон регрес-

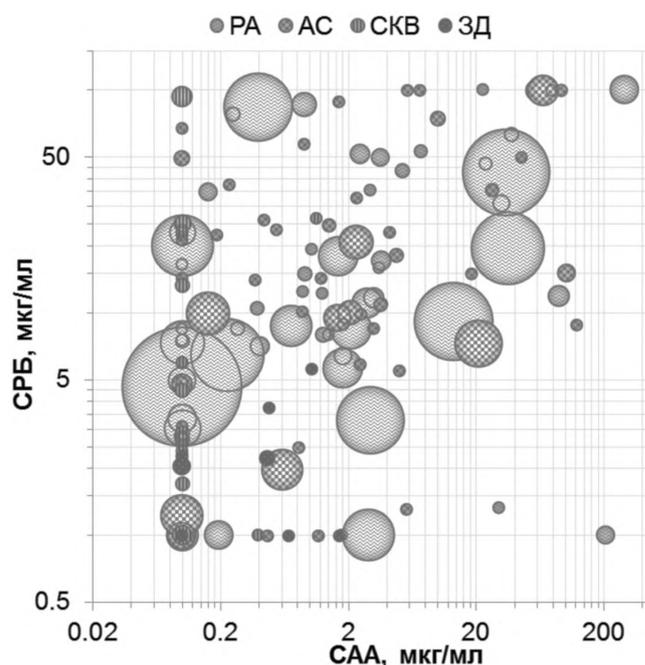


Рис. 1. Пузырьковая диаграмма определенных с помощью биочипа концентраций IgM РФ, СРБ и САА в образцах крови пациентов с РА, АС, СКВ и здоровых доноров. По оси абсцисс – уровни САА, по оси ординат – уровни СРБ, площади пузырьков соответствуют уровням IgM РФ. Значения ниже или выше динамического диапазона рассчитаны методом экстраполяции.

сии (скорость нарастания СРБ в зависимости от увеличения ЧПС) совпадает с наклоном, приведенным в [11] для малых суставов (5,6 с 95% ДИ от 3,5 до 7,7).

Медианы концентраций IgM РФ значительно различались у пациентов с РА по сравнению с пациентами, страдающими другими исследованными заболеваниями, и здоровыми донорами (рис. 2, а). Диапазон концентраций для здоровых доноров составил 10-23 МЕ/мл. СРБ и САА также значительно отличались у пациентов с РА и АС по сравнению с СКВ и ЗД (рис. 2, б, в).

Диагностическую эффективность выявления РА определяли методом ROC-анализа, причем в группу сравнения вошли пациенты с СКВ, АС и здоровые доноры. В индивидуальном ROC-анализе IgM РФ показывает хорошую специфичность при низкой чувствительности, а СРБ, наоборот, относительно хорошую чувствительность при низкой специфичности (рис. 2, г, табл. 3). САА определяет РА с одинаково относительно низкими чувствительностью и специфичностью, хотя точность анализа при этом соответствует точности СРБ. Специфичность выявления РА с использованием РФ, определенного на биочипах (85%), сравнима со специфичностью выявления РА при определении РФ другими методами на похожей выборке (86%) [12,25]. Чувствительность и специфичность САА может значительно варьировать в зависимости от выборки. Так, для разных выборок пациентов с РА, в работе Х. Yuan и соавт. [26] чувствительность анализа САА различалась от 52% до 96% по сравнению с здоровыми донорами, что согласуется с полученными в нашем исследовании данными (чувствительность 62%) (табл. 3).

При оптимальном критерии в ROC-анализе для IgM РФ (23,36 МЕ/мл, см. табл. 3) 58% пациентов с РА были

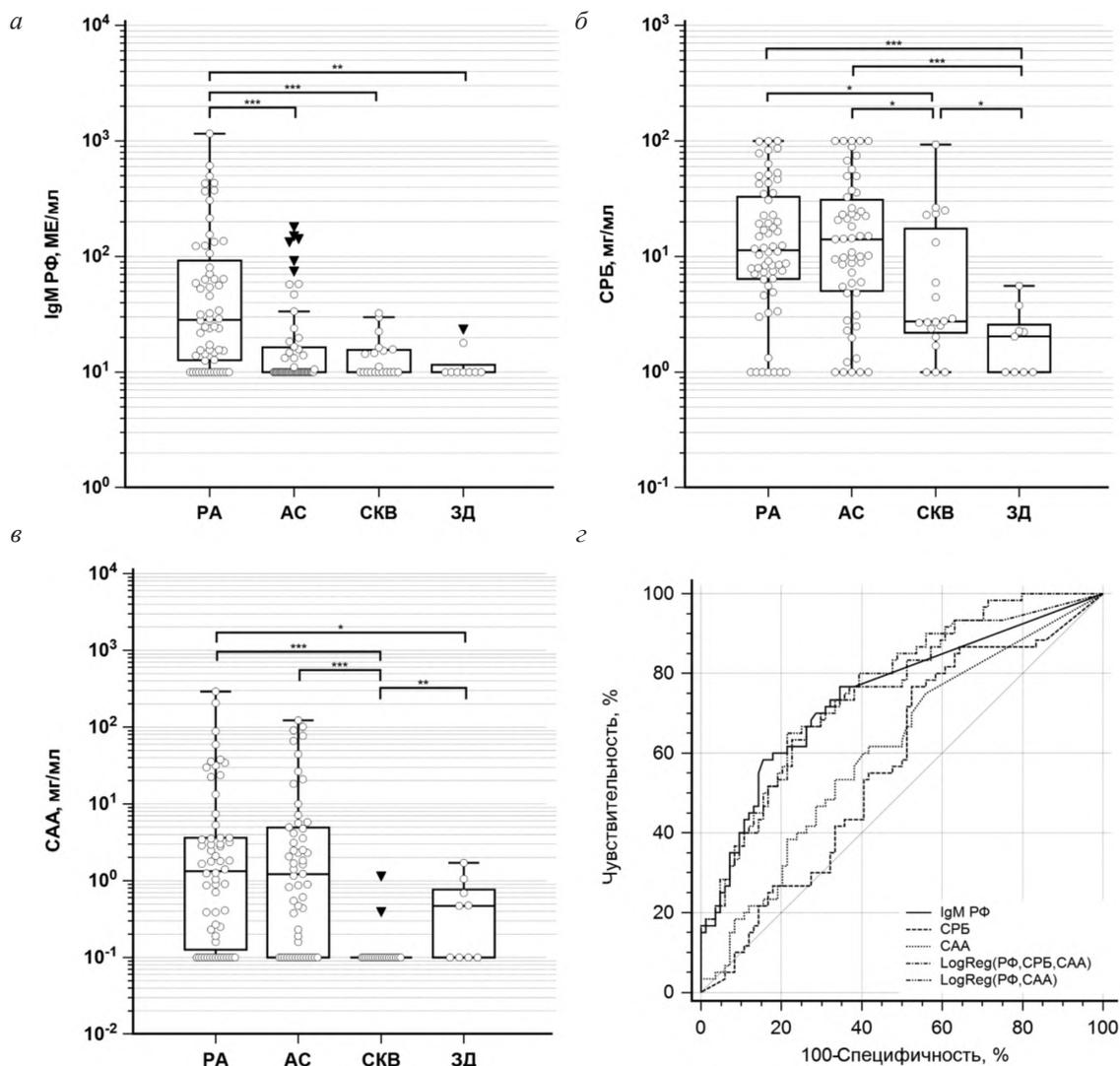


Рис. 2. Диаграммы («ящик с усами») сравнения биомаркеров у пациентов с РА, АС, СКВ и здоровых доноров. а – IgM РФ, б – СРБ, в – САА, г – сравнение ROC-кривых при дифференцировании пациентов с РА и контрольной группы для определения индивидуально биомаркеров IgM РФ, СРБ, САА, а также при построении моделей логистической регрессии (LogReg), включающих три (IgM РФ, СРБ, САА) и два (IgM РФ, САА) биомаркера.

* – уровень значимости $p < 0,05$; ** – уровень значимости $p < 0,01$; *** – уровень значимости $p < 0,001$.

Таблица 3

Диагностические характеристики IgM РФ, СРБ, САА (в скобках приведены 95% ДИ)

| Биомаркер | Se, % | Sp, % | Acc, % | AUC | Оптимальный критерий |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| IgM РФ | 58,3 (44,9–70,9) | 84,5 (75,0–91,5) | 73,6 (65,6–80,6) | 0,748 (0,66–0,817) | 23,36 МЕ/мл |
| СРБ | 76,7 (64,0–86,6) | 47,6 (36,6–58,8) | 59,7 (51,2–67,8) | 0,576 (0,491–0,657) | 5,99 мг/мл |
| САА | 61,7 (48,2–73,9) | 58,3 (47,1–69,0) | 59,0 (50,5–67,1) | 0,611 (0,526–0,691) | 0,69 мг/мл |
| LogReg (IgM РФ, СРБ, САА) | 63,3 (49,9–75,4) | 77,4 (67,0–85,8) | 70,1 (62,0–77,5) | 0,756 (0,677–0,823) | 0,36* |
| LogReg (IgM РФ, САА) | 65,0 (51,6–76,9) | 78,6 (68,3–86,8) | 71,5 (63,4–78,7) | 0,760 (0,682–0,827) | 0,34* |

Примечание. Se, % – чувствительность, или доля истинно-положительных случаев; Sp, % – специфичность, или доля истинно-отрицательных случаев; Acc, % – точность, или доля правильно определенных случаев; AUC – площадь под ROC-кривой; LogReg – комбинация работы трех/двух биомаркеров на основе модели логистической регрессии.
 * – критерии для предсказанной вероятности.

серопозитивными, а 42% серонегативными. При этом во всех серонегативных случаях хотя бы один из дополнительных биомаркеров (СРБ или САА) был повышен. Если учитывать оптимальные критерии ROC-анализа для всех трех биомаркеров, то хотя бы один из биомаркеров был повышен у 100% пациентов с РА, у 85% с АС, у 35% СКВ и 33% здоровых лиц, в то время как повышение всех трех маркеров одновременно встречалось у 27% пациентов с РА и 11% с АС.

На основе полученных значений концентраций трех биомаркеров была построена модель логистической регрессии (см. табл. 3). Использование такой обработки данных повышает чувствительность метода, но снижает специфичность по сравнению с использованием уровня IgM РФ в качестве единственного диагностического критерия. При этом наибольший вклад в комбинацию трех биомаркеров вносят РФ и САА, т.е. при построении модели логистической регрессии на основе этих двух маркеров диагностическая чувствительность и специфичность оказались не хуже аналогичных параметров у модели на основе трех биомаркеров.

Заключение. Таким образом, с помощью биологических микрочипов было проведено сравнение диагностических показателей определения IgM РФ, СРБ и САА при ревматоидном артрите. При добавлении в комбинацию к стандартному биомаркеру IgM РФ, наибольший вклад в улучшение диагностических показателей вносит белок острой фазы САА. Определение одновременно IgM РФ и САА в сыворотке крови позволяет повысить чувствительность анализа по сравнению с определением только IgM РФ.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-21, 23-26 см. REFERENCES)

22. Волошин С.А., Фейзханова Г.У., Савватеева Е.Н., Смолдовская О.В., Рубина А.Ю. Мультиплексный метод определения биомаркеров воспаления в культуральной среде. *Молекулярная биология*. 2020; 54(6):1046–56.

REFERENCES

1. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham C.O. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheumatol*. 2010; 62(9):2569–81.
2. Nakken B., Papp G., Bosnes V., Zeher M., Nagy G., Szodoray P. Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives. *Immunol. Lett*. 2017; 189:13–8.
3. Shelef M.A. New Relationships for Old Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019; 71(9):1396–9.
4. Petrovská N., Prajzlerová K., Vencovský J., Šenolt L., Filková M. The pre-clinical phase of rheumatoid arthritis: From risk factors to prevention of arthritis. *Autoimmun. Rev*. 2021; 20(5):102797.
5. Renaudineau Y., Jamin C., Saroux A., Youinou P. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity*. 2005; 38(1):11–6.
6. Maibom-Thomsen S.L., Trier N.H., Holm B.E., Hansen K.B., Rasmussen M.I., Chailyan A. et al. Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PLoS One*. 2019; 14(6):1–28.
7. Rönnelid J., Turesson C., Kastbom A. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis – Laboratory and Clinical Perspectives. *Front. Immunol*. 2021; 12:1.

8. Falkenburg W.J.J., Von Richthofen H.J., Koers J., Weykamp C., Schreurs M.W.J., Bakker-Jonges L.E. et al. Clinically relevant discrepancies between different rheumatoid factor assays. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2018; 56(10):1749–58.
9. Bas S., Perneger T.V., Kunzle E., Vischer T.L. Comparative study of different enzyme immunoassays for measurement of IgM and IgA rheumatoid factors. *Ann. Rheum. Dis*. 2002; 61(6):505–10.
10. Gehin J.E., Klaasen R.A., Norli E.S., Warren D.J., Syversen S.W., Goll G.L. et al. Rheumatoid factor and falsely elevated results in commercial immunoassays: data from an early arthritis cohort. *Rheumatol. Int*. 2021; 41(9):1657–65.
11. Ameratunga R., Musaad S., Sugrue C., Kyle C. Rheumatoid factor measurement-continuing problems 70 years after discovery. *Clin. Rheumatol*. 2011; 30(9):1215–20.
12. Nielsen S.F., Bojesen S.E., Schnohr P., Nordestgaard B.G. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: A prospective cohort study. *BMJ*. 2012; 345(7878):1–9.
13. Dörner T., Egerer K., Feist E., Burmester G.R. Rheumatoid factor revisited. *Curr. Opin. Rheumatol*. 2004; 16(3):246–53.
14. Ugolini A., Nuti M. Rheumatoid factor: A novel determiner in cancer history. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(4):1–9.
15. Saxena A., Cronstein B.N. Acute Phase Reactants and the Concept of Inflammation. In: *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Elsevier; 2013: 818-829.e4.
16. Vogt B., Führrohr B., Müller R., Sheriff A. CRP and the disposal of dying cells: Consequences for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2007; 40(4):295–8.
17. Kim K.W., Kim B.M., Moon H.W., Lee S.H., Kim H.R. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2015; 17(1):1–12.
18. Targońska-Stepniak B., Majdan M. Serum Amyloid A as a Marker of Persistent Inflammation and an Indicator of Cardiovascular and Renal Involvement in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:1–7.
19. Zhang Y., Zhang J., Sheng H., Li H., Wang R. Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Adv. Clin. Chem*. 2019; 90:25–80.
20. Sorić Hosman I., Kos I., Lamot L. Serum Amyloid A in Inflammatory Rheumatic Diseases: A Compendious Review of a Renowned Biomarker. *Front. Immunol*. 2021; 11:1–27.
21. Shen C., Sun X.G., Liu N., Mu Y., Hong C.C., Wei W. et al. Increased serum amyloid A and its association with autoantibodies, acute phase reactants and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Rep*. 2015; 11(2):1528–34.
22. Voloshin S.A., Feyzkhanova G.U., Savvatееva E.N., Smoldovskaya O.V., Rubina A.Yu. Microarray for quantitative determination of inflammatory biomarkers in a culture medium. *Молекулярная биология*. 2020; 54(6):919–28. (in Russian)
23. Kokubun M., Imafuku Y., Okada M., Ohguchi Y., Ashikawa T., Yamada T. et al. Serum amyloid A (SAA) concentration varies among rheumatoid arthritis patients estimated by SAA/CRP ratio. *Clin. Chim. Acta*. 2005; 360(1–2):97–102.
24. Shimada K., Komiya A., Yokogawa N., Nishino J., Sugii S., Tohma S. Impact of the size and number of swollen joints on serum C-reactive protein level and erythrocyte sedimentation rate in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study in Japan. *Clin. Rheumatol*. 2017; 36(2):427–31.
25. Greiner A., Plischke H., Kellner H., Gruber R. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann. NY Acad. Sci*. 2005; 1050:295–303.
26. Yuan X., Cui S., Liu Y., Song T.J. Analysis of serum rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis in Han, Tibetan and Hui nationalities in Qinghai. *Int. Immunopharmacol*. 2020; 83(29):106380.

Смирнова Д.Н.¹, Богачева Н.В.^{1,2}, Петров С.Б.², Тунева Н.А.²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ CAGA-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ *HELICOBACTER PYLORI* МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ В РАЗЛИЧНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

¹ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», 610000, г. Киров, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 610998, г. Киров, Россия

Выполнен сравнительный анализ выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами. Использованы штаммы *H. pylori*, выделенные от лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Иммунохроматографический метод реализован с помощью разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* в различном биологическом материале. Определение гена патогенности cagA *H. pylori* осуществлено с использованием тест-системы «Хеликопол СА» («Литех», Россия). Оценку сопоставимости результатов выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* проводили, используя статистические методы: Монте-Карло, расчет критерия хи-квадрат (χ^2) и коэффициентов τ -b Кендалла и d Сомера. Статистический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0.». Показано отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между результатами выявления CagA-положительных штаммов молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами, что свидетельствует о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты при идентификации высокопатогенных штаммов *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; иммунохроматографическая тест-система; ПЦР-анализ; хеликобактериоз; статистический анализ.

Для цитирования: Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Петров С.Б., Тунева Н.А. Сравнительная оценка результатов выявления CagA-положительных штаммов *Helicobacter pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами в различном биологическом материале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 48-52.
DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-48-52

Для корреспонденции: Смирнова Дарья Николаевна, аспирант каф. микробиологии; e-mail: cards1993@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.05.2021

Принята к печати 23.06.2021

Опубликовано 28.01.2022

Smirnova D.N.¹, Bogacheva N.V.^{1,2}, Petrov S.B.², Tuneva N.A.²

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE RESULTS OF DETECTION OF CAGA-POSITIVE STRAINS OF *HELICOBACTER PYLORI* BY MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHODS IN DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIALS

¹Vyatka State University, 610000, Kirov, Russia;

²Kirov State Medical University, 610998, Kirov, Russia

A comparative analysis of the detection of CagA-positive strains of *H. pylori* by immunochromatographic and molecular genetic methods was carried out. We used *H. pylori* strains isolated from individuals with diseases of the gastrointestinal tract. The immunochromatographic method was implemented using a developed experimental model of an immunochromatographic test system for detecting the *H. pylori* CagA protein in various biological materials. Determination of the pathogenicity gene cagA of *H. pylori* was carried out using the «Helikopol SA» test system («Litekh», Russia). The assessment of the comparability of the results of detecting CagA-positive strains of *H. pylori* was carried out using statistical methods: Monte-Carlo, calculation of the chi-square test (χ^2) and Kendall's τ -b and Somer's d coefficients. Statistical analysis was performed using the software packages «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0», «WinBUGS 1.4.0.» The study showed the absence of a statistically significant difference and the presence of a direct strong correlation between the results of detecting CagA-positive strains by molecular genetic and immunochromatographic methods, which indicates that these methods provide similar results in identifying highly pathogenic strains of *H. pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*; immunochromatographic test system; PCR analysis; helicobacteriosis; statistical analysis.

For citation: Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Petrov S.B., Tuneva N.A. Comparative assessment of the results of detection of CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* by molecular-genetic and immunochromatographic methods in different biological materials. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 48-52 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-48-52

For correspondence: Smirnova D.N., postgraduate student of the Department of Microbiology; e-mail: cards1993@mail.ru

Information about authors:

Smirnova D.N., <https://orcid.org/0000-0002-0090-1891>;

Bogacheva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7021-6232>;

Petrov S.B., <https://orcid.org/0000-0002-2592-4432>;

Tuneva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7021-6232>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.05.2021

Accepted 23.06.2021

Published 28.01.2022

Введение. Хеликобактериоз является одной из наиболее распространённых инфекций в мире. По данным литературы, от 60% до 90% населения во всем мире инфицированы этим микроорганизмом [1].

К числу заболеваний, этиологическим агентом которых являются *H. pylori*, относятся хронический гастрит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и желудка, MALT-лимфома, рак желудка [2].

Диагностика хеликобактериоза базируется на широком спектре методов, к числу которых относятся морфологический, бактериологический, иммунологический, биохимический, молекулярно-генетический методы [3]. Разнообразен материал, подлежащий анализу на *H. pylori* – биоптаты слизистой оболочки желудка, желудочная слизь, выдыхаемый воздух, слюна, кровь, кал [4].

Появляются новые методы диагностики хеликобактериоза. Одним из них является иммунохроматографический (ИХ) анализ, позволяющий не только определить наличие инфекционного агента в пробе, но и провести дифференциацию штаммов по патогенности – определить наличие специфического антигена. Наиболее выраженные патологические процессы, связанные с повышенным риском опухолевой трансформации, вызывают штаммы *H. pylori*, вырабатывающие цитотоксин CagA. Данный цитокин приводит к нарушению целостности эпителия слизистой оболочки желудка, к индукции неконтролируемой пролиферации лимфоидных и эпителиальных клеток и стимуляции секреции противовоспалительных цитокинов [5]. Определение факта инфицированности пациента таким штаммом позволяет назначить антибактериальную терапию и предотвратить развитие осложнений, к числу которых относится рак желудка.

Провести дифференциальную диагностику штаммов *H. pylori* по патогенности возможно молекулярно-генетическим методом с использованием ПЦР, выявив ген *cagA*, и ИХ методом, выявив белок CagA. На российском рынке отсутствуют подобные ИХ тест-системы.

Данную проблему мы решили, разработав экспериментальный образец ИХ тест-системы для выявления белка патогенности CagA *H. pylori* [6,7].

Цель исследования – провести анализ сопоставимости результатов выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим методом и с помощью разработанного экспериментального образца ИХ тест-системы.

Материал и методы. Работа выполнена на базе кафедры микробиологии Вятского государственного университета» (г. Киров).

Для исследования использовали культуры *H. pylori*, выделенные из биоптатов слизистой оболочки желудка, материала зубодесневых карманов и кала добровольцев с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Добровольцы, участвующие в исследовании, дали информированное согласие на обследование. Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой согласно требованиям Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.).

Взятие биологического материала из зубодесневых карманов добровольцев осуществляли с помощью стерильных зубочисток с ватными концами. Перед забором материала каждый доброволец полоскал полость рта раствором фурацилина. Материал отбирали из зубодесневых карманов маляров и резцов, затем его ресуспендировали в 1,0 мл 0,9 % растворе хлорида натрия.

Биопсийный материал слизистой желудка помещали в предварительно пронумерованные пробирки типа эппендорф с транспортной средой («БиолоТ», Россия) и доставляли в лабораторию. Перед посевом материал гомогенизировали, растирая в стерильной ступке с 1,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Кал отбирали в стерильные баночки для сбора анализов. Перед посевом 200 мг материала гомогенизировали в 1,8 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Взвеси давали отстояться при комнатной температуре 10-15 мин, затем 0,1 мл суспензии переносили в следующую пробирку с 9,9 мл физиологического раствора, получая рабочее разведение материала.

Биологический материал, подготовленный вышеописанным образом, по 0,1 мл засеивали на селективную питательную среду – колумбийский кровяной агар с 5% эритроцитами барана («ЭкоЛаб», Россия), амфотерицином и ванкомицином Б с целью получения чистых культур *H. pylori*. Чашки Петри с засеянным материалом инкубировали в анаэробном состоянии с газогенераторными пакетами «GAS PAK 150» («Becton Dickinson», США) для обеспечения микроаэрофильных условий (5,0% O₂, 5,0-10,0% CO₂, 85,0-90,0% N₂) при температуре 37°С в течение 3 суток. Идентификацию *H. pylori* проводили на третьи сутки по характерным морфологическим критериям – образованию на плотной питательной среде непрозрачных, выпуклых колоний размером 0,5-2 мм, похожих на капли росы, при сплошном росте колонии сливаются в гляцевую плёнку [8].

Принадлежность культур к *H. pylori* подтверждали бактериологическим, биохимическим, молекулярно-генетическим методами.

Микроскопию мазков, окрашенных по Граму, осуществляли на микроскопе «Микмед» (Россия). Для биохимической идентификации использовали уреазный, оксидазный «Oxi-тест» («Erba LACHEMA», Чехия) и каталазный тесты. Для молекулярно-генетической идентификации штаммов – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *H. pylori* в режиме реального времени («ДНК-технологии», Россия). Определение генов патогенности *H. pylori* осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем «Хеликопол СА» (на наличие гена *cagA*) («Литех», Россия).

ИХ идентификацию выделенных штаммов осуществляли с использованием коммерческих ИХ тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» (Россия), «NovaMed» (Израиль), и с помощью разработанного экспериментального образца ИХ тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* [6, 7].

Перед тестированием культуру смывали с питательной среды, определяли общую концентрацию вырос-

шей культуры при помощи стандарта мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ (ОСО 42-28-85П), после чего доводили до концентрации $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³, используя буфер разгона (0,01 М Трис-буфере с 0,1% Tween 20, рН 7,5).

Использовано оборудование: центрифуга лабораторная «Avanti J-E» («Beckman Coulter», США); центрифуга-вортекс «Микроспин» («Biosan», Латвия); весы электронные аналитические «Adventurer» («ОНАУС», США); ламинарный шкаф II класса биологической защиты «БВВп-01» («Lamsystems», Германия); термостат «ТСО-1/80 СПУ» (Россия); термостат твёрдотельный программируемый «Гном ТТ-1» («ДНК-технологии», Россия); амплификатор для проведения ПЦР-анализа 4-х канальный П4-ПЦР-01 «Терцик» («ДНК-технологии», Россия); камера для электрофореза горизонтальная «Mini-Sub Gell GT» («BioRad», США); амплификатор для Real-time ПЦР «ДТ-322» («ДНК-технологии», Россия); трансиллюминатор «ЕСХ-15 М» («Vilber Lourmat», Франция).

Статистическая обработка полученных данных включала описание и анализ учетных признаков. Качественные учетные данные представлены в виде абсолютных (N) и относительных величин (P, %). Оценка статистической значимости различий между результатами выявления *CagA*-положительных штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и ИХ методом выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой на непрерывность Йетса [9]. В случаях ограничения применения критерия χ^2 использовался точный критерий Фишера [10]. Критическим уровнем статистической значимости различий (*p*) установлено значение $p < 0,05$. Верификация статистической значимости различий выборочных качественных данных выполнена путём сопоставления их 95% доверительных интервалов. Расчет 95% доверительных интервалов выполнен методом Монте-Карло (с помощью программы «WinBUGS 1.4.0.») [9]. Оценка корреляционной зависимости (плотности связи) выборочных качественных данных выполнена с помощью критерия τ -b Кендалла и критерия d Сомера [10]. Стати-

стический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0.».

Результаты и обсуждение. На первом этапе, с целью отбора серопозитивных добровольцев провели тестирование сывороток крови на наличие антител к белку *CagA H. pylori* с помощью коммерческого набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия).

По результатам скрининга выбрали 50 серопозитивных лиц, у которых выявлены антитела к белку *CagA H. pylori*. Данным добровольцам предложено пройти фиброгастроскопию для проведения биопсии слизистой желудка в клиниках г. Кирова. У них на исследование взяты кал и материал из зубодесневых карманов. Отобранный биологический материал доставляли в лабораторию и высевали на селективную питательную среду – колумбийский кровяной агар с антибиотиками с целью выделения чистой культуры.

На втором этапе провели бактериологическое исследование культур, выделенных из биопсийного материала слизистой желудка, кала, материала зубодесневых карманов пациентов, на принадлежность их к *H. pylori*. Из 50 серопозитивных добровольцев отобрали 40 человек, у которых чистая культура *H. pylori* выделена из всех видов биологического материала. В исследовании приняли участие 23 женщины и 17 мужчин, средний возраст добровольцев составил 40 ± 5 лет.

На следующем этапе работы культуры, выделенные из трех видов биологического материала, тестировали молекулярно-генетическим методом с помощью тест-системы «Хеликопол СА» на наличие гена *cagA* и ИХ методом с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы на наличие белка *CagA H. pylori*.

Сравнительный анализ частоты выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *cagA* молекулярно-генетическим, белка *CagA* ИХ методами в зависимости от вида исследуемого материала. представлен на рисунке.



Сравнительный анализ выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *cagA* молекулярно-генетическим, белка *CagA* ИХ методами в зависимости от вида исследуемого материала.

Положительные результаты молекулярно-генетического и ИХ анализа на CagA⁺ штаммы

| Молекулярно-генетический анализ | | ИХ анализ | | χ^2 | p* |
|---------------------------------|------|-----------|------|----------|------|
| n | P, % | n | P, % | | |
| 9 | 25,0 | 7 | 19,4 | 0,08 | 0,78 |

Примечание. n – количество выделенных CagA⁺ штаммов; P – частота встречаемости положительных результатов выявления CagA⁺ штаммов; χ^2 – критерий хи-квадрат Пирсона. Здесь и в табл.2: p – уровень статистической значимости между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и ИХ методами; p* – критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение p<0,05.

Таблица 2

95% доверительные интервалы частот положительных результатов анализа на выявление CagA⁺ штаммов

| Молекулярно-генетический анализ | ИХ анализ | p* |
|---------------------------------|--------------|-------|
| P, % (CI95%) | P, % (CI95%) | |
| 13,88-41,23 | 9,91-35,09 | >0,05 |

Примечание. CI95% – 95% доверительный интервал.

Таблица 3

Связь между результатами выявления CagA⁺ штаммов, полученными молекулярно-генетическим и ИХ методами

| Статистический критерий | Оценка плотности связи между результатами выявления CagA ⁺ штаммов при использовании | |
|-------------------------|---|------------|
| | Молекулярно-генетического анализа | ИХ анализа |
| τ -b Кендалла | 0,85* | |
| d Сомера | 0,93* | 0,77* |

Примечание. * – Значение критерия входит в диапазон от 0,70 до 1,00, что свидетельствует о высокой плотности связи между методами.

Установлено, что *H. pylori* выявлен у серопозитивных добровольцев, не принимавших раньше антихеликобактерную терапию, бактериологическим методом в биопсийном материале слизистой желудка в 90,0% случаев, в кале – в 35,0%, в материале из зубодесневых карманов – в 52,5% случаев; молекулярно-генетическим – в 25,0%, в 26,7% и в 34,8% случаев, соответственно.

Методом ИХ анализа выявили, что белок CagA *H. pylori* выявлен в биологическом материале добровольцев, при тестировании биопсийного материала в 19,4% случаев, при тестировании кала – в 20,0% случаев, при тестировании материала зубодесневых карманов – в 13,0%.

В табл. 1 представлена частота положительных результатов взаимосвязи между молекулярно-генетическим и ИХ методами по выявлению CagA⁺ штаммов в материале, выделенном из слизистой оболочки желудка.

Из данных табл. 1 следует, что между результатами выявления CagA⁺ штаммов молекулярно-генетическим и ИХ методом в исследуемой выборке отсутствуют статистически значимые различия.

Результат оценки статистической значимости различия между данными молекулярно-генетического и ИХ анализа верифицируется сопоставлением 95% доверительных интервалов частот положительных случаев выявления CagA⁺ штаммов с помощью обоих методов (табл. 2).

Наблюдается перекрытие 95% доверительных интервалов частот случаев выявления CagA⁺ штаммов молекулярно-генетическим и ИХ методами, что подтверждает отсутствие статистически значимого различия между результатами этих видов анализа.

Количественная оценка плотности связи между результатами выявления CagA⁺ штаммов методами молекулярно-генетического и ИХ анализа представлена в табл. 3.

Согласно критериям τ -b Кендалла и d Сомера, между результатами молекулярно-генетического анализа и данными, полученными при использовании разработанного экспериментального образца, в основе которого заложен ИХ анализ, существует прямая, сильная связь (корреляционная зависимость). По результатам молекулярно-генетического анализа можно с высокой долей вероятности прогнозировать результат, полученный с помощью ИХ анализа, и наоборот.

Заключение. Отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между данными молекулярно-генетического и ИХ анализа, свидетельствуют о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori*, а ИХ метод анализа может быть использован для выявления высокопатогенных штаммов данного микроорганизма, секретирующих белок CagA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербаков П.Л., Хомерики С.Г., Машарова А.А., Бордин Д.С. и др. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; 2: 3-7.
2. Шкитин В.А., Шпирна А.И. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2002; 4 (2): 128-45.
3. Хомерики С.Г., Касьяненко В.И. Лабораторная диагностика инфекции *Helicobacter pylori*. СПб: АМА; 2011.
4. Исаков В.А., Лапина Т.Л., Щербаков П.Л., Кудрявцева Л.В. Рекомендации по диагностике *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью и методам их лечения. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 1998; 1: 105-7.

IMMUNOLOGY

5. Климович А.В. Создание иммунохимических реагентов для выявления CagA-антигена *Helicobacter pylori* и антител против него. Дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2010.
6. Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Дармов И.В. Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (4): 242-6.
7. Богачева Н.В., Дармов И.В., Смирнова Д.Н. Иммунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori*. Патент РФ № 2642588; 2018.
8. Андриюков Б.Г., Лукьянчук А.Ф., Сурина О.О., Пекарская В.М. Современные методы лабораторной диагностики *H. pylori*. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 1:37-43.
9. Халафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований. М.: Издательство ЛКИ; 2008.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
3. Khomeriki S.G., Kas'yanenko V.I. Laboratory diagnostics of *Helicobacter pylori* infection. St. Petersburg: AMA; 2011. (in Russian)
4. Isakov V.A., Lapina T.L., Shcherbakov P.L., Kudryavtseva L.V. Recommendations for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease and methods of their treatment. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 1998; 1: 105-7. (in Russian)
5. Klimovich A.V. Creation of immunochemical reagents for the detection of *Helicobacter pylori* CagA antigen and antibodies against it. Diss. St.Petersburg; 2010. (in Russian)
6. Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V. Development of an experimental sample of an immunochromatographic test system for detecting the pathogenicity protein CagA *Helicobacter pylori*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63 (4): 242-6. (in Russian)
7. Bogacheva N.V., Darmov I.V., Smirnova D.N. Immunochromatographic test system for the detection of pathogenic strains of *Helicobacter pylori*. Патент РФ № 2642588; 2018. (in Russian)
8. Andryukov B.G., Luk'yanchuk A.F., Surina O.O., Pekarskaya V.M. Modern methods of laboratory diagnosis of *H. pylori*. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2014; 1: 37-43.
9. Khalafyan A.A. Modern statistical methods of medical research. Moscow: Izdatel'stvo LKI; 2008. (in Russian)
10. Glants S. Biomedical statistics. Moscow: Praktika; 1999. (in Russian)

REFERENCES

1. Lazebnik L.B., Vasil'ev Yu.V., Shcherbakov P.L., Homeriki S.G., Masharova A.A., Bordin D.S. et al. *Helicobacter pylori*: prevalence, diagnosis, treatment. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2010; 2: 3-7. (in Russian)
2. Shkitin V.A., Shpirna A.I. The role of *Helicobacter pylori* in human pathology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2002; 4 (2): 128-45. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Иванов М.Э., Фурсова Н.К., Потапов В.Д.

СУПЕРСЕМЕЙСТВА ЭФФЛЮКСНЫХ НАСОСОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279, г. Оболensk, Россия

*Существенный рост числа антибиотикорезистентных микроорганизмов, отмечаемый в последние годы, является проблемой здравоохранения во всем мире. Одним из молекулярных механизмов формирования устойчивости к антимикробным препаратам (АМП) у бактерий является наличие у них эффлюксных насосов. Приведен анализ экспериментальных работ, связанных с исследованием эффлюксных насосов у клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, одного из представителей госпитальных патогенов группы ESKAPE. Обзор предназначен для специалистов, разрабатывающих новые виды лекарственных средств против антибиотикорезистентных штаммов, научным сотрудникам, изучающим механизмы устойчивости бактерий к АМП, тяжелым металлам, биоцидам и иным противомикробным факторам.*

Ключевые слова: эффлюксные насосы; транспортёры; MFS; MATE; ABC; SMR; PACE; RND; *Pseudomonas aeruginosa*; резистентность.

Для цитирования: Иванов М.Э., Фурсова Н.К., Потапов В.Д. Суперсемейства эффлюксных насосов *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 53-58. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-53-58>

Для корреспонденции: Иванов Михаил Эдуардович, стажер-исследователь отдела подготовки и усовершенствования специалистов; e-mail: neokarda@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 01.07.2021

Принята к печати 19.10.2021

Опубликовано 28.01.2022

Ivanov M.E., Fursova N.K., Potapov V.D.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA EFFLUX PUMP SUPERFAMILY (REVIEW OF LITERATURE)

Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» 142279, Obolensk, Russia

*The significant increase in the number of antibiotic-resistant microorganisms observed in recent years is a public health problem worldwide. One of the molecular mechanisms for the formation of antimicrobial resistance in bacteria is the presence of efflux pumps. The review presents an analysis of experimental studies related to the study of efflux pumps in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, one of the representatives of hospital pathogens of the ESKAPE group. This review is intended for specialists developing new types of drugs against antibiotic-resistant strains, as well as researchers studying the mechanisms of bacterial resistance to antibiotics, heavy metals, biocides and other antimicrobial factors.*

Key words: efflux pumps; conveyors; MFS; MATE; ABC; SMR; PACE; RND; *Pseudomonas aeruginosa*; resistance.

For citation: Ivanov M.E., Fursova N.K., Potapov V.D. *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump superfamily (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 53-58. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-53-58>

For correspondence: *Ivanov Mikhail Eduardovich*, intern-researcher of the Department of training and improvement of specialists; e-mail: neokarda@mail.ru

Information about authors:

Ivanov M.E., <https://orcid.org/0000-0002-5010-3919>;

Fursova N.K., <https://orcid.org/0000-0001-6053-2621>;

Potapov V.D., <https://orcid.org/0000-0002-5336-8234>.

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

Acknowledgement. *The study was done within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.*

Received 01.07.2021

Accepted 19.10.2021

Published 28.01.2022

Согласно данным Европейского центра по предотвращению и контролю заболеваний (*European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*), в 2018 г. в мире около 700 тыс. человек умерли от инфекций, вызванных штаммами бактерий, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП) [1]. В докладе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2021 г. отмечается, что неадекватное использование АМП в медицинских учреждениях, нарушение санитарных правил может привести к тому, что пациенты становятся резервуаром антибиотикорезистентных штаммов с повышенной вирулентностью [2]. К 2021 г. увеличению численности подобных штаммов способствовал неконтролируемый приём АМП пациентами во время пандемии COVID-19 [3].

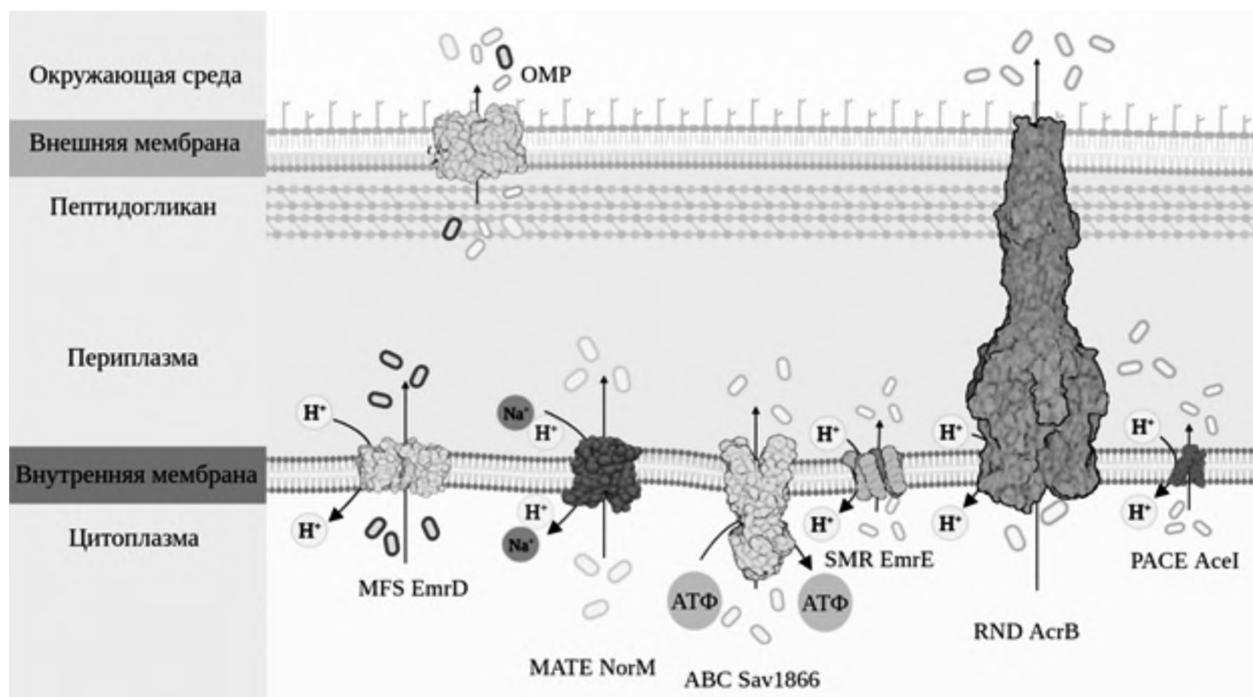
Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* относятся к числу наиболее частых возбудителей внутрибольничных инфекций. Ими обусловлено около 16% случаев внутрибольничных пневмоний [4], 12% инфекций мочевыводящих путей, 10% случаев инфекций кровотока и 8% инфекций хирургических ран [5]. *P. aeruginosa* являются возбудителями гнойно-септических инфекций у пациентов ожоговых стационаров [6], где средняя частота их встречаемости составляет приблизительно 40% от общего числа возбудителей. За 2019 г. число внутрибольничных заражений госпитальными штаммами, устойчивыми к АМП резерва, составило 6700 человек, из них число смертей – 440. Доля заражений, вызванных штаммами *P. aeruginosa*, составила приблизительно 7% от общего числа инфекций [7].

Трудности, возникающие при лечении инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, обусловлены высоким адаптивным

потенциалом бактерий данного вида. Повышенная устойчивость к АМП у *P. aeruginosa* обеспечивается возможностью быстро регулировать метаболизм с помощью широкого спектра эпигенетических факторов. На 6,3-6,9 млн. пар нуклеотидов генома *P. aeruginosa*, регуляторные элементы составляют 8,4%, что выше, чем данный показатель у других прокариотических организмов. Для сравнения, у *Escherichia coli* он составляет 5,8%, у *Bacillus subtilis* – 5,3% [8]. Подобная организация генома обеспечивает бактериям *P. aeruginosa* возможность быстрой адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, в том числе – к наличию в окружающей среде антимикробных веществ. *P. aeruginosa* способны существенно повышать свою устойчивость к АМП с помощью активации эффлюксных насосов [9]. Эти мембранные структуры осуществляют эффективную избирательную транспортировку молекул лекарственных препаратов из бактериальной цитоплазмы в периплазму или во внешнюю среду.

Общепринятый подход в классификации бактериальных эффлюксных насосов основан на оценке следующих параметров: (1) источника энергии; (2) механизма транспорта субстрата; (3) размера и типа транспортируемых молекул [10]. На рисунке приведены шесть суперсемейств эффлюксных насосов [57]. Представители всех этих суперсемейств описаны у *P. aeruginosa*, которые являются идеальным модельным объектом для их изучения. Рассмотрим характеристики перечисленных суперсемейств и наличие их типичных представителей у *P. aeruginosa*.

Основное суперсемейство бактериальных мембранных транспортёров – MFS (Major Facilitator Superfamily). В суперсемейство MFS входят тысячи



Схематическое изображение эффлюксных насосов *P. aeruginosa*.

OMP – Outer Membrane Protein, белок внешней мембраны; АТФ – аденозин трифосфат; MFS – Major Facilitator Superfamily, основное суперсемейство бактериальных мембранных транспортёров; MATE – Multidrug and Toxic Compound Extrusion, суперсемейство экстрюзии лекарственных и токсичных соединений; ABC Sav – ATP-Binding Cassette, суперсемейство АТФ-связывающих бактериальных кассетных транспортеров; SMR EmrE – Small Multidrug Resistance, суперсемейство малых транспортеров лекарственной устойчивости; RND AcrB - Resistance-Nodulation-Division, суперсемейство бактериальных связывающе-транспортирующих протеинов; PACE AceI – Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux, протеобактериальная антимикробная эффлюксная структура.

бактериальных белков-транспортёров, которые имеют общее филогенетическое происхождение, схожие аминокислотные последовательности, совпадающие особенности вторичной и третичной структуры. MFS включает 74 семейства. Каждый эффлюксный насос этого семейства состоит из 12 трансмембранных α -спиралей, соединённых гидрофильными петлями [11]. Движение молекул из бактериальной клетки в периплазму осуществляется за счёт энергии протонного градиента [12]. Ген *tetA(C)*, один из представителей MFS, у *P. aeruginosa* кодирует белок, вызывающий устойчивость к тетрациклину [13]. У *P. aeruginosa* присутствует ген *tetA(R)* этого же суперсемейства, кодирующий белок, транспортирующий триамфеникол через внутреннюю мембрану [14].

Суперсемейство экстррузии лекарственных и токсичных соединений – MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion). Суперсемейство MATE включает более 1000 различных белков-транспортёров, которые делятся на три семейства. Белки эффлюксных насосов MATE обычно состоят из 400-700 аминокислотных остатков, причём большинство из них находится в диапазоне 400-550. Они осуществляют транспорт молекул лекарств из цитоплазмы бактерий с помощью межмембранного градиента Na^+ и H^+ (в отличие от эффлюксных насосов суперсемейства MFS). В белках суперсемейства MATE не выявлено очевидной консервативной последовательности, они имеют только 40% гомологию аминокислотного состава внутри этого суперсемейства [15]. Данные геномного анализа бактерий *P. aeruginosa* показали, что экспрессия гена *PA1361*, кодирующего белок MATE PmpM, делает их более устойчивыми к акрифлавину, бензалкония хлориду, бромистому этидию, тетрафенилфосфония хлориду. Этот белок является уникальным для этого суперсемейства, так как, несмотря на филогенетическую принадлежность к MATE, он работает только за счёт протонного градиента, не используя ионы натрия для транспорта субстратных молекул между клеточной и наружной мембраной [16].

Суперсемейство АТФ-связывающих бактериальных кассетных транспортеров – ABC (ATP-Binding Cassette). Представители суперсемейства бактериальных транспортеров ABC состоят из ряда субъединиц, одна часть которых осуществляет межмембранный транспорт, другая встраивает молекулу транспортёра в мембрану бактериальной клетки. Микробные насосы ABC выделяются в отдельное суперсемейство, на основании сходства в организации доменов АТФ-связывающих участков. Для перемещения молекул лекарств через мембрану данные белки используют энергию гидролиза АТФ, что позволяет отнести их к группе первично-активных транспортёров. Филогенетический анализ генов ABC-транспортёров показал, что разные группы семейств внутри суперсемейства эволюционировали независимо друг от друга [17]. Некоторые бактериальные эффлюксные насосы данного суперсемейства могут выполнять репарацию ДНК и регулировать экспрессию бактериальных генов, что обычно несвойственно белкам-транспортёрам [18]. Эффлюксные насосы этого суперсемейства PA4456, PvdRT-OpmQ, PA2812 (CsmA), pdvB, PA1874-1877, активные у *P. aeruginosa*, обеспечивают устойчивость бактерий к ципрофлоксацину, гентамицину, тетрациклину, тобрамицину, пивердин-металлическим комплексам, конъюгатам сидерофор-монобактамов [19–21].

Суперсемейство малых транспортеров лекарственной устойчивости – SMR (Small Multidrug Resistance). Суперсемейство малых лекарственных транспортеров SMR представляет собой группу белков внутренней мембраны бактерий, состоящих из 100-140 аминокислотных остатков, включает три семейства: малые многокомпонентные насосы (SMP), парные малые многокомпонентные насосы (PSMR) и супрессоры мутаций GroEL (SUG). Филогенетические исследования суперсемейства SMR выявили высокую частоту горизонтального переноса генов и быструю дивергенцию их последовательностей, что привело к повышению разнообразия внутри данного суперсемейства [22]. Эффлюксные насосы SMR, как и представители суперсемейства MFS, осуществляют транспорт веществ из цитоплазмы бактерий за счёт протонного градиента, но в отдельную группу их выделяют из-за их небольших размеров. Одной из характерных особенностей белков данного суперсемейства является зависимость выведения субстратов от текущего энергетического состояния клетки. Перемещение одновалентных липофильных молекул через мембрану бактерий требует участия электрогенных ионных насосов, в то время как транспорт двухвалентных липофильных катионов происходит без их участия. Это объясняет вариабельность устойчивости к лекарствам у бактерий, несущих во внутренних мембранах белки SMR [23]. У *P. aeruginosa* белки этого суперсемейства (EmrE, QacE, QacF) способны осуществлять выведение аминогликозидов, бромистого этидия, четвертичных аммониевых соединений [24].

Суперсемейство бактериальных связывающе-транспортирующих протеинов – RND (Resistance-Nodulation-Division). Суперсемейство протеинов RND встречается как у грамотрицательных бактерий, так и, в виде исключения, может присутствовать у грамположительных бактерий, архей и даже эукариот. Оно включает в себя семь семейств, каждое из которых участвует в поддержании гомеостаза клетки и в удалении лекарственных и токсичных соединений.

Микробные белки RND являются самыми крупными среди эффлюксных насосов. Каждый из них представляет собой трёхкомпонентную молекулярную систему. Первый компонент – белковая молекула, обеспечивающая движение молекул лекарства внутри структуры эффлюксного насоса за счёт протонного градиента между цитоплазмой и периплазмой (MexD, MexB, MexY, MexF). Второй компонент является белком, включающим RND в наружную мембрану бактерий (OprM, OprJ, OprN, OMF), третий компонент встраивает RND в периплазму бактерий (MexA, MPF, MexC, MexF). Структура их молекул позволяет белкам находиться одновременно на наружной и на цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий. Подобная особенность даёт возможность этим насосам экспортировать лекарственные субстраты не в периплазматическое пространство, а во внешнюю среду, что обеспечивает значительное преимущество для выживания бактерий в селективных условиях [25].

Движение субстрата внутри белковой структуры бактериального эффлюксного насоса RND происходит за счёт постоянной конформационной перестройки этих молекул, включающей в себя последовательную работу лигандов. Значительная длина эффлюксного насоса позволяет вместить внутри себя большое количество молекул выводимых субстратов [26]. Белки этого супер-

Субстраты эффлюксных насосов суперсемейства RND у *P. aeruginosa*

| Эффлюксный насос | Субстраты | Ссылки на источники |
|------------------|---|---------------------|
| MexAB-OprM | Аминогликозиды, бета-лактамы антибиотики, CHIR-090 (ингибитор LpxC), хлорамфеникол, колистин, карбапенемы, цефулин, кристаллический фиолетовый, бромистый этидий, фторхинолоны, хинолоны, эндолизины, макролиды, новобиоцин, ряд органических растворителей, пацедамицин, ингибиторы кворума, натрия додецилсульфат, тетрациклин, тиолактомицин, триметоприм, триклозан, масло чайного дерева | [28-33] |
| MexXY-OprM A/B/D | Акрифлавин, аминогликозиды, цефтобинол, бромистый этидий, цефепим, фторхинолоны, LBM415 (ингибитор пептидной деформиллазы), макролиды, тетрациклины и тигециклин | [34-37] |
| MexCD-OprJ | Азитромицин, цефтобинол, CHIR-090, хлорамфеникол, колистин, хлоргексидин, цефепим, фторхинолоны, ингибиторы топоизомеразы, органические растворители, пацедамицин, соли четвертичного аммония, хинолоны, тетрациклины, тигециклин и триклозан | [38-41] |
| MexEF-OprN | CHIR-090, хлорамфеникол, диамины, фторхинолоны, 4-гидрокси-2-гептилхинолин, тетрациклин, триметоприм, триклозан | [42, 43] |
| MexGHI-OprM D | Акрифлавин, бромистый этидий, фторхинолоны, тетрациклин, тетрафенилфосфониум хлорид, хинолоны, Va^{2+} | [44-46] |
| MexJK-OprM | Эритромицин, тетрациклин | [47, 48] |
| MexJK-OprH | Триклозан | [47, 48] |
| MexMN-OprM | Хлорамфеникол, тиолактомицин, тетрафенилфосфониум хлорид, родамин 6G | [49] |
| MexPQ-OprE | Макролиды, хинолоны, тетрафенилфосфоний хлорид | [50] |
| MexVW-OprM | Акрифлавин, хлорамфеникол, бромистый этидий, эритромицин, фторхинолоны, хинолоны, тетрациклин | [51] |
| MuxABC-OprM B | Азтреонам, колистин, макролиды, новобиоцин, тетрациклин | [52] |
| TriABC-OprH | Триклозан | [53] |
| Czc-CBA/-S/-R | Cd^{2+} , Zn^{2+} | [54, 55] |

семейства кодируются не отдельными генами, а бактериальными оперонами [27]. Эффлюксные белки этого суперсемейства, описанные у *P. aeruginosa*, приведены в таблице.

Насосы суперсемейства RND у *P. aeruginosa* выводят значительно больше бактерицидных веществ, чем эффлюксные насосы остальных суперсемейств. Данное свойство этих мембранных белков-транспортёров обеспечивает высокий уровень лекарственной устойчивости *P. aeruginosa*. Эффлюксный насос MexAB-OprM способен выводить из клеток бактерий молекулы-ингибиторы кворума, тем самым увеличивая взаимодействие между бактериями в биоплёнках.

Протеобактериальная антимикробная эффлюксная структура – PACE (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux). Представители бактериального эффлюксного суперсемейства PACE являются транспортными мембранными белками, которые определяют устойчивость микроорганизмов к ряду низкомолекулярных биоцидов. Анализ экспериментальных работ позволяет сделать предположение о функционировании белков-транспортёров в олигомерной форме. Исследования показали, что данный тип эффлюксных насосов увеличивает резистентность *P. aeruginosa* к хлоргексидину [56].

Заключение. *P. aeruginosa* является патогеном, обладающим одной из самых сложно организованных систем защиты бактериальных клеток от токсичных для них молекул, включающей множество различных эффлюксных насосов. Эти структуры обеспечивают *P. aeruginosa* возможность быстро адаптироваться к воздействию новых АМП. Сложная молекулярная организация эффлюксных насосов обеспечивает их большое функциональное разнообразие. Представители суперсемейств MFS, SMR, RND и MATE используют протонный градиент между цитоплазмой и периплазмой бактериальной клетки для транспортировки субстрата. У MATE дополнительный

механизм транспорта лекарств идёт за счёт градиента ионов Na^+ . Белки суперсемейства ABC способны осуществлять перенос субстрата за счёт энергии АТФ. Из вышеперечисленных суперсемейств особую роль в устойчивости *P. aeruginosa* к АМП играют эффлюксные насосы суперсемейства RND, выводящие молекулы субстратов из цитоплазмы сразу во внешнюю среду.

В будущем эффективные методы лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, будут связаны с комбинированной терапией, учитывающей молекулярные механизмы лекарственной устойчивости. Представляется актуальной задачей разработка тест-систем для оценки наличия и экспрессии генетических детерминант эффлюксных насосов у клинических штаммов *P. aeruginosa*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019. Stockholm, November 2019. ISBN 978-92-9498-387-9.
2. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report [Электронный ресурс] // World Health Organization: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336> дата обращения: 10.08.2021).
3. Preventing the COVID-19 pandemic from causing an antibiotic resistance catastrophe [Electronic resource]. World Health Organization: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/news/news/2020/11/preventing-the-covid-19-pandemic-from-causing-an-antibiotic-resistance-catastrophe> (access date: 10.08.2021).
4. Alonso B., Fernández-Barat L., Di Domenico E.G., Marín M., Cercenado E., Merino I. et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infect.* 2020; 20(1): 909. DOI: 10.1186/s12879-020-05534-1.
5. What is *Pseudomonas aeruginosa*? [Electronic resource]. EHA Consulting Group: Public Health Consulting, Epidemiology, & Food Safety Consultants. <https://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa/> (access date 26.04.2021).

6. Manuel R., Gonzalez, Betty F., Leonardo L., Paris J., Lee A. A., Wassim R., Yok-Ai Q., Karl P. Effect of Human Burn Wound Exudate on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *ASM Journals/ mSphere*. 27 April 2016; 1 (2). DOI: 10.1128/mSphere.00111-15.
7. Antibiotic resistance threats in the United States. [Электронный ресурс] U.S. Department of Agriculture. (access date 26.04.2021).
8. Stover C.K., Pham X.Q., Olson M.V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000; 406:959. DOI: 10.1038/35023079.
9. Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb. Ecol.* 2014; 68: 1–12. DOI: 10.1007/s00248-013-0297-x.
10. Saier M.H. Jr. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64(2): 354–411. DOI: 10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000.
11. Vamsee S.R., Maksim A.S., Rostislav C., Eric I.S., Milton H., Saier M.H. Jr. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS Journal*. 28 March 2012; 35: 2022. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x.
12. Sanath K., Manjusha L., Ammini P., Manisha O., Nicholas W., Varela M.F. Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 266. DOI: 10.3390/microorganisms8020266.
13. Punyawee D., Naphat S., Matthew B.A., Nisanart C., Paiboon V., Skorn M. Over-Expression of Hypochlorite Inducible Major Facilitator Superfamily (MFS) Pumps Reduces Antimicrobial Drug Susceptibility by Increasing the Production of MexXY Mediated by ArmZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2021; 11: 3376. DOI: 10.3389/fmicb.2020.592153.
14. Céline C., Dominique J., Elisabeth B., Gian M.R., Benoit C., Sylvie N. Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence of high interand intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* 2010; 12(3): 716–29. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02115.x.
15. Hiroshi O., Miki H., Takuya M., Masato O., Yoshinori M. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27 (11): 587–93. DOI: 10.1016/j.tips.2006.09.001.
16. Gui-Xin H., Teruo K., Takehiko M., Yuji M., Tohru M., Tomofusa T. An H⁺-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a Member of the MATE Family of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(1): 262–5. DOI: 10.1128/JB.186.1.262-265.2004.
17. Amy L.D., Elie D., Cedric O., Jue C. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008 Jun; 72(2): 317–64. DOI: 10.1128/MMBR.00031-07.
18. Li Z., Thien-Fah M. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *ACS Omega*. 2008; 190(13): 4447–52. DOI: 10.1128/JB.01655-07.
19. Lin C., Kangmin D. A PhoPQ-Regulated ABC Transporter System Exports Tetracycline in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016; 60 (5): 3016–24. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.02986-15.
20. Andrew P.T., Jared L.C., McPherson J.C., David P.N. Potentiation of Antibacterial Activity of the MB-1 Siderophore-Monobactam Conjugate Using an Efflux Pump Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59 (4): 2439–42. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.04172-14.
21. Mélissa H., Armelle B., Françoise H., Pascale R., Anne B., Isabelle J.S. The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 2012; 14(7): 1696–1708. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02674.x.
22. Denise C.B., Kenton L.R., Raymond J.T. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. September 2008; 1778(9): 1814–38. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.08.015.
23. Li X.Z., Keith P., Hiroshi N. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(1): 27–33. DOI: 10.1128/AAC.47.1.27-33.2003.
24. Jae H.J., Kyeong S.S., Lee W.J., Eun J.P., Son S.Y. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-β-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiology*. 04 February 2010; 47: 753–9. DOI: 10.1007/s12275-008-0272-2.
25. Nakashima R., Sakurai K., Yamasaki S., Nishino K., Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multi-site drug-binding pocket. *Nature*. 2011; 480: 565–569. DOI: https://doi.org/10.1038/nature10641.
26. Anes J., McCusker M.P., Séamus F., Marta M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 587. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587.
27. Li X.Z., Nikaido H., Poole K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39: 1948–53. DOI: 10.1128/aac.39.9.1948.
28. Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 3322–37. DOI: 10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000.
29. Poole K., Tetro K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D.E., Bianco N. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 2021–8. DOI: 10.1128/AAC.40.9.2021.
30. Cao L., Srikumar R., Poole K. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720–PA3719. *Mol. Microbiol.* 2004; 53:1423–36. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04210.x.
31. Caughlan E.R., Jones A.K., Delucia A.M., Woods A.L., Lili X., Bing M., Barnes S.W., Walker J.R., Sprague E.R., Xia Y., Dean C.R. Mechanisms decreasing in vitro susceptibility to the LpxC inhibitor CHIR-090 in the Gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 17–27. DOI: 10.1128/AAC.05417-11.
32. Muller J.F., Stevens A.M., Craig J., Love N.G. Transcriptome analysis reveals that multidrug efflux genes are upregulated to protect *Pseudomonas aeruginosa* from pentachlorophenol stress. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 4550–8. DOI: 10.1128/AEM.00169-07.
33. Aires J.R., Köhler T., Nikaido H., Plésiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 2624–8. DOI: 10.1128/AAC.43.11.2624.
34. Mine T., Morita Y., Kataoka A., Mizushima T., Tsuchiya T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:415–7. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.43.2.415.
35. Murata T., Gotoh N., Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 217:57–63. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11456.x.
36. Baum E.Z., Crespo-Carbone S.M., Morrow B.J., Davies T.A., Foleño B.D., He W., Queenan A.M., Bush K. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:2785–90. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.00018-09.
37. Morita Y., Gilmour C., Metcalf D., Poole K. Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for mexXY multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2009; 191:4966–75. DOI: https://doi.org/10.1128/JB.00073-09.
38. Poole K., Gotoh N., Tsujimoto H., Zhao Q., Wada A., Yamasaki T., Neshat S., Yamagishi J., Li X.Z., Nishino T. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2000; 21:713–24.
39. Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 3322–37. DOI: 10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000.

MICROBIOLOGY

- timicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:3322–37. DOI: 10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000.
40. Zhang L., Li X.Z., Poole K. Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48:549–52. DOI: https://doi.org/10.1093/jac/48.4.549.
41. Fraud S., Campigotto A.J., Chen Z., Poole K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:4478–82. DOI: 10.1128/AAC.01072-08.
42. Köhler T., Michea-Hamzehpour M., Henze U., Gotoh N., Curty L.K., Pechère J.C. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 1997; 23:345–54. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x.
43. Wang D., Seeve C., Pierson L.S., Pierson E.A. Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics.* 2013; 14:618. DOI: 10.1186/1471-2164-14-618.
44. Aendeckerk S., Diggle S.P., Song Z., Hoiby N., Cornelis P., Williams P., Camara M. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology.* 2005; 151:1113–25. DOI: 10.1099/mic.0.27631-0.
45. Palma M., Zurita J., Ferreras J.A., Worgall S., Larone D.H., Shi L., Campagne F., Luis E.N. Quadri. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect. Immun.* 2005; 73:2958–66. DOI: 10.1128/IAI.73.5.2958-2966.2005.
46. Lars E.P., Dietrich, Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D.K. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2006; 61:1308–21. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x.
47. Chuanchuen R., Narasaki C.T., Schweizer H.P. The Mex J.K. efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* 2002; 184:5036–44. DOI: 10.1128/JB.184.18.5036-5044.2002.
48. Chuanchuen R., Gaynor J.B., Karkhoff-Schweizer R., Schweizer H.P. Molecular characterization of MexL. The transcriptional repressor of the mexJK multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:1844–51. DOI: 10.1128/AAC.49.5.1844-1851.2005.
49. Mima T., Sekiya H., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol.* 2005; 49:999–1002. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x.
50. Li Y., Mima T., Komori Y., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 52:572–5. DOI: 10.1093/jac/dkg390.
51. Chiang W.C., Pamp S.J., Nilsson M., Givskov M., Tolker-Nielsen T. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2019; 10: 913. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00929.x.
52. Yang L., Chen L., Shen L., Surette M., Duan K. Inactivation of MuxABC-OpmB transporter system in *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased ampicillin and carbenicillin resistance and decreased virulence. *J. Microbiol.* 2011; 49:107–14.
53. Mima T., Kohira N., Li Y., Sekiya H., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T. Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2009 Nov; 155(Pt 11):3509-17. DOI: 10.1099/mic.0.031260-0.
54. Mima T., Joshi S., Gomez-Escalada M., Schweizer HP. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* 2007 Nov; 189(21): 7600–9. DOI: 10.1128/JB.00850-07.
55. Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas J., Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:8761–8. DOI: 10.1074/jbc.M312080200.
56. Hassan K.A., Liu Q., Elbourne L.D.H., Ahmad I., Sharples D., Naidu V., Chan C.L., Li L., Harborne S.P.D., Pokhrel A., Postis V.L.G., Goldman A., Henderson P.J.F., Paulsen I.T. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Research in Microbiology.* 2018; 169 (7–8): 450-4. DOI: 10.1016/j.resmic.2018.01.001.
57. Tegos G.P., Haynes M., Strouse J.J., Khan M.M.T., Bologa C.G., Oprea T.I., Sklar L.A. Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Curr. Pharm. Des.* 2011; 17(13): 1291–1302. DOI: 10.2174/138161211795703726.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ольховский И.А.^{1,2}, Горбенко А.С.^{1,2}, Комаровский Ю.Ю.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Васильева Д.И.³, Епифанова О.С.⁴, Ходов Д.А.⁴, Рудакова С.А.⁵, Рудаков Н.В.⁵, Оскорбин И.П.⁶, Филипенко М.Л.⁶

МОДИФИКАЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОГО ТЕСТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА

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

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

³Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, 660041, Красноярск, Россия;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» Роспотребнадзора, 660100, Красноярск, Россия;

⁵ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия;

⁶Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, Россия

*Ранняя диагностика клещевого боррелиоза определяет показания для этиотропной терапии, а выявление боррелий в присосавшемся клеще служит обоснованием проведения антибиотикопрофилактики. Для определения возбудителя боррелиоза наиболее широко используются методы ПЦР, что требует особых условий организации работы лабораторий, использование дорогостоящего оборудования. Процедура выделения ДНК бактерий и последующая амплификация занимает несколько часов рабочего времени. Описаны методы детекции боррелий в изотермической реакции LAMP, что позволяет существенно ускорить диагностику, не требует сложного оборудования и высокой квалификации персонала. LAMP в ряде случаев позволяет выполнять анализ без предварительной экстракции нуклеиновых кислот. Цель работы: разработка модифицированного теста изотермической детекции ДНК возбудителей боррелиоза для ускоренного получения результата с возможностью исключения стадии экстракции нуклеиновых кислот. Использованы 40 образцов ДНК боррелий и 11 клещей *Ixodes persulcatus*. С целью сокращения времени детекции боррелий описанную ранее методику LAMP модифицировали введением дополнительных петлевых праймеров. Оценку количества копий в позитивном образце плазмидной ДНК боррелий определяли с помощью цифровой ПЦР. Результаты реакции LAMP сравнивали с результатами коммерческого теста ПЦР-РВ. Дополнительное использование петлевых праймеров примерно вдвое сократило время детекции ДНК боррелий, не оказывая влияния на сравнительную диагностическую эффективность. Предел аналитической чувствительности модифицированного метода LAMP равен 21 молекуле добавленного в реакцию плазмидного стандарта. В сравнительном тестировании с помощью ПЦР-РВ чувствительность метода LAMP составила 90%, специфичность 100%. Впервые продемонстрирована возможность детекции боррелий в клещах без этапа экстракции ДНК. Разработан модифицированный изотермический метод детекции возбудителей клещевого боррелиоза, позволяющий выполнять анализ в течение 20-30 минут, в том числе в клещах без предварительной экстракции ДНК.*

Ключевые слова: ПЦР-РВ, LAMP, клещевые боррелиозы.

Для цитирования: Ольховский И.А., Горбенко А.С., Комаровский Ю.Ю., Столяр М.А., Васильева Д.И., Епифанова О.С., Ходов Д.А., Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л. Модификация изотермического теста выявления ДНК возбудителей клещевого боррелиоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1):59-64. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-59-64>

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Умник» ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» в рамках проекта «Разработка набора реагентов для экспресс-диагностики клещевых боррелиозов с помощью реакции LAMP» с дополнительным привлечением гранта Ассоциации «Федерации лабораторной медицины» и поддержки МИП ООО «Формула гена». ОИП и ФМЛ выполняли исследование в рамках проекта, осуществляемого за средства федерального бюджета, «Поиск, дизайн и валидация новых белков как фармакологических мишеней и инструментов для генетических технологий» № 121031300056-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.07.2021

Принята к печати 25.08.2021

Опубликовано 28.01.2022

Olkhovskiy I. A.^{1,2}, Gorbenko A.S.^{1,2}, Komarovskiy Yu. Yu.^{1,2}, Stolyar M.A.^{1,2}, Vasil'eva D.I.³, Epifanova O.S.⁴, Khodov D. A.⁴, Rudakova S.A.⁵, Rudakov N.V.⁵, Oskorbin I.P.⁶, Filipenko M.L.⁶

MODIFICATION OF ISOTHERMAL TEST FOR DETECTING DNA OF PATHOGENS OF TICK-BORNE BORRELIOSIS

¹Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

²Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

³Institute of Fundamental Biology and Biotechnology of Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia;

⁴Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing of Center for Hygiene and Epidemiology, 660100, Krasnoyarsk, Russia;

⁵Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing of Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

⁶Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

Early diagnosis of tick-borne borreliosis determines the indications for etiotropic therapy, and the detection of borrelia in a tick that has bitten you serves as the basis for antibiotic prophylaxis. To determine the causative agent of borreliosis, PCR methods are most widely used, which requires special conditions for organizing the work of laboratories and the use of expensive equipment. In addition, the procedure for isolating bacterial DNA and subsequent amplification takes several hours of working time. At the same time, methods for detecting borrelia in the isothermal LAMP-reaction are described, which makes it possible to significantly speed up the diagnosis, does not require complex equipment and highly qualified personnel. It is also known that LAMP in some cases allows analysis without prior extraction of nucleic acids. The purpose was a development of a modified test for isothermal detection of DNA of borreliosis pathogens for an accelerated result and the possibility of excluding the stage of nucleic acid extraction. We used 40 samples of Borrelia DNA and 11 Ixodes persulcatus ticks. To shorten the detection time for Borrelia, the previously described LAMP method was modified by the introduction of additional loop primers. The copy number of the positive DNA sample of the borrelia plasmid was estimated using digital PCR. The results of the LAMP reaction were compared with those of the commercial PRC-RT test.

The additional use of loop primers approximately halved the detection time for Borrelia DNA without affecting the comparative diagnostic efficiency. The analytical sensitivity limit of the modified LAMP method was 4 copies/μl or 21 molecules of the plasmid standard added to the reaction. In comparative testing with RT-PCR, the sensitivity of the LAMP method is 90%, and the specificity is 100%. The possibility of detecting borrelia in ticks without the stage of DNA extraction has been demonstrated for the first time. A modified isothermal method for the detection of pathogens of tick-borne borreliosis has been developed, which allows analysis within 20-30 minutes, including in ticks without preliminary DNA extraction.

Key words: PCR-RT; LAMP; tick-borne borelioses.

For citation: Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Komarovskiy Yu. Yu., Stolyar M.A., Vasil'eva D.I., Epifanova O.S., Khodov D.A., Rudakova S.A., Rudakov N.V., Oskorbin I.P., Filipenko M.L. Modification of isothermal test for detecting DNA of pathogens of tick-borne borreliosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 59-64 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-59-64>

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

Information about authors:

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

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

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

Komarovskiy Yu. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-0569-5502>.

Acknowledgment. *The work was carried out with the financial support of the Federal State Budgetary Institution «Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere» within the framework of the project «Development of a set of reagents for the rapid diagnosis of tick-borne borreliosis using the LAMP reaction» with the involvement of a grant from the Association «Federation of Laboratory Medicine» and the support of LLC «Formula Gena». OIP and FML carried out the research within the framework of the project «Search, design and validation of new proteins as pharmacological targets and tools for genetic technologies» No. 121031300056-8, implemented at the expense of the federal budget.*

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

Received 02.07.2021

Accepted 25.08.2021

Published 28.01.2022

Введение. Вызываемая спирохетами *Borrelia burgdorferi* зоонозная клещевая инфекция (болезнь Лайма или иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ)), передающаяся человеку при присасывании клещей рода *Ixodes* – наиболее распространенное трансмиссивное инфекционное заболевание людей, проживающих в умеренном климатическом поясе северного полушария [1, 2]. В России ИКБ находится на 2-м месте по заболеваемости среди природно-очаговых и зооантропонозных инфекций, опережая заболеваемость клещевым энцефалитом

в 4,5 раза [3, 4]. Клинические проявления заболевания включают как локальное поражение кожи в месте присасывания клеща, так и характерные для спирохетозов отсроченные системные поражения разных органов. Согласно клинической классификации, выделяют период инкубации и дальнейшего развития по 3-м стадиям: локализованная, диссеминированная, поздняя. Симптомы инфекции могут проявляться как через несколько дней, так и через несколько месяцев после инфицирования. Хотя выявление боррелий в присосавшемся клеще не

всегда приводит к развитию клинической картины заболевания, информация о факте контакта с возбудителем ИКБ необходима для своевременного превентивного использования антибактериальных препаратов и дальнейшего контроля иммунного ответа.

Для верификации ИКБ в клинико-диагностических лабораториях в настоящее время используется два основных подхода: опосредованный, основанный на выявлении антител к антигенам боррелий и методы прямой детекции специфических антигенов или нуклеиновых кислот возбудителя инфекции. В последнем случае широко используются методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Хотя перечисленные методы чувствительны и специфичны, они имеют свои недостатки, связанные с повышенными требованиями к организации лабораторий, риском взаимной контаминации проб и длительностью выполнения анализов, высокой стоимостью оборудования. Совершенствование прямых молекулярно-генетических методов выявления боррелий признается наиболее перспективным направлением [5]. Один из таких многообещающих методов – изотермальная петлевая амплификации нуклеиновых кислот (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), разработанная японским учёным Цугунори Нотоми [6]. Отсутствие термочиклирования, характерного для классической ПЦР, нивелирует необходимость сложного дорогостоящего оборудования, что делает метод экономически целесообразным и доступным в «полевых условиях». Поскольку LAMP менее чувствительна к ингибиторам используемых ферментов, возможна детекция ДНК боррелий, минуя стадию её экстракции [7, 8].

Использование LAMP с применением олигонуклеотидов, комплементарных гену 16S rRNA, для выявления *Borrelia burgdorferi s.l.* в клещах *Dermacentor sp.*, *Haemaphysalis sp.*, *Rhipicephalus sp.*, *Voophilus sp.* описано китайскими коллегами [9]. Известно о разработке метода LAMP, основанного на праймерах к гену флагеллина (fla), для детекции ДНК *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana* в пробах сыворотки крови пациентов [10]. Сведения о возможности использования LAMP для выявления ДНК возбудителей ИКБ в таёжных клещах *Ixodes persulcatus* в доступной литературе отсутствуют. Тест на наличие боррелий в клещах, снятых с пострадавших от их присасывания пациентов, в «полевых условиях» является основанием для своевременного назначения эффективной превентивной терапии ИКБ.

Цель работы – разработка модифицированного теста изотермической детекции ДНК возбудителей боррелиоза для ускоренного получения результата с возможностью исключения стадии экстракции нуклеиновых кислот.

Материал и методы. Для отработки методики использовано 4 изолята боррелий (*B. garinii* – № 502, *B. garinii* – № 309, *B. afzelii* – 620, *B. afzelii* – 620), генотипированных с помощью секвенирования 16S rDNA, из коллекции микроорганизмов ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций», 36 образцов ДНК боррелий из коллекции лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае», 11 образцов клещей *Ixodes persulcatus*, сбор которых проводился в сезон 2019 г. на лесных и лесостепных участках Красноярска и его окрестностей.

Для конструирования положительного контрольного образца ДНК проводили амплификацию ДНК фрагмента

гена fla размером 189 п.н. с помощью олигонуклеотидных праймеров F3 5'-GCTGTTGAGCTCCTTCTTG-3' и B3 5'-CACCAGCGTCACTTTCAG-3' на матрице ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* Полученный амплифицированный фрагмент клонировали с помощью набора для клонирования «Quick-TA kit» (Евроген, Россия), затем трансформировали полученной смесью клетки *E. coli* с последующим отбором клонов, несущих рекомбинантные плазмиды. Нуклеотидную последовательность отобранного клона подтверждали секвенированием по Сенгеру. Для дальнейшей работы полученную рекомбинантную плазмиду линеаризовали путём инкубации с рестриктазой MroXI (СибЭнзим, Россия). Концентрацию ДНК в полученном позитивном контрольном образце определяли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad; США) согласно инструкциям производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую плазмидную ДНК (около 10³ копий на 20 мкл, оценка на основе спектрофотометрического анализа при длине волны 260 нм), 1× ПЦР-смесь (Bio-Rad; США), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и зонд: Bla-F 5'-CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC-3', Bla-R 5'-AGGACCGAAGGAGCTAACCG-3' и Bla-P HEX-CGGTCCCAACGATCAAGGCGAG-BHQ1. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель переносили в соответствующие лунки картриджа DG8, помещали все в генератор капель. 40 мкл полученных микрокапель переносили в 96-луночный ПЦР-планшет, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Амплификацию проводили согласно следующей программе: 96°C – 10 мин и далее 45 циклов 96°C – 15 с, 58°C – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98°C, скорость нагрева планшета для всех шагов равна 2 °C/с. Микрокапли подвергали считыванию с помощью проточного анализатора капель, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Для детекции ДНК использован набор «РеалБест Экстракция 100» (Вектор-Бест, Россия). Для выполнения реакции LAMP использованы олигонуклеотиды, описанные ранее [10] с дополнительным включением оригинальных последовательностей петлевых праймеров (LF и LB), разработанных с применением интернет-сервиса PrimerExplorer V5. Синтез олигонуклеотидов выполнялся в ООО «ДНК-Синтез», Россия.

Для постановки LAMP готовили реакционную смесь объёмом 25 мкл, включающую 0,8 М бетаин, 6 мМ MgSO₄, 1X изотермический буфер (New England Biolabs, Англия), 1,4 мМ dNTP, 0,2 мкл 1X EvaGreen (НПО «Синтол», Россия), 8 ед. Bst 2.0 полимеразы (New England Biolabs, Англия), 0,2 мМ праймеров F3 и B3, 1,6 мМ праймеров FIP и VIP, 0,4 мМ праймеров LF и LB, 5 мкл ДНК. Анализ проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad) при постоянной температуре 63° С. Результаты тестирования выражали в минутах до появления стабильного флуоресцентного сигнала.

LAMP без использования этапа выделения ДНК проводили следующим образом: клеща помещали в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую добавляли готовую для LAMP реакционную смесь в объёме 50 мкл. Стеклоклинной ступкой проводили его тщательное перетирание в течение 2-х мин 25 мкл полученного гомогената использовали для постановки LAMP. Параллельно проводили сравнение с результатами реакции в ПЦР-ПВ. Для

этого оставшийся объём гомогената растертых клещей однократно отмывался 0,9% раствором NaCl от реакционной смеси и далее выделяли ДНК и выполняли ПЦР-РВ коммерческим набором по стандартному протоколу производителя.

Классический анализ ПЦР-РВ выполняли с использованием набора «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./РНК ВКЭ» (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ результатов осуществляли с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Результаты представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона (Q25%-Q75%). Использовали методы описательной статистики, корреляционного анализа и ROC-анализа.

Результаты. Влияние дополнительных петлевых праймеров на время детекции положительных образцов. Для оценки влияния петлевых праймеров на ход реакции проведено тестирование стандартного положительного образца в 3-х повторях с использованием двух реакционных смесей: первая приготовлена с добавлением всех шести олигонуклеотидов, вторая соответствовала описанию в статье [10] и не имела в своем составе двух петлевых праймеров. Результаты эксперимента изображены на рис. 1.

Добавление в реакционную смесь петлевых олигонуклеотидов сократило время реакции на 15 минут. Флуоресцентные сигналы отрицательных образцов наблюдались не ранее, чем через 60 мин, как при использовании исходной методики, так и модифицированной, что свидетельствует о достаточной специфичности теста.

Оценка предела аналитической чувствительности модифицированной реакции LAMP. Разведённые аликвоты разработанного стандартного плазмидного образца протестированы с использованием LAMP. Результаты реакции показаны в табл. 1.

Максимальное разведение, при котором происходит детекция флуоресцентного сигнала, составляет 4 копий/мкл или 21 молекула добавленной в реакцию плазмидной ДНК, что сравнимо с данными о пределе чувствительности метода, описанного в статье [10].

Сравнение диагностической эффективности модифицированного метода LAMP и коммерческого

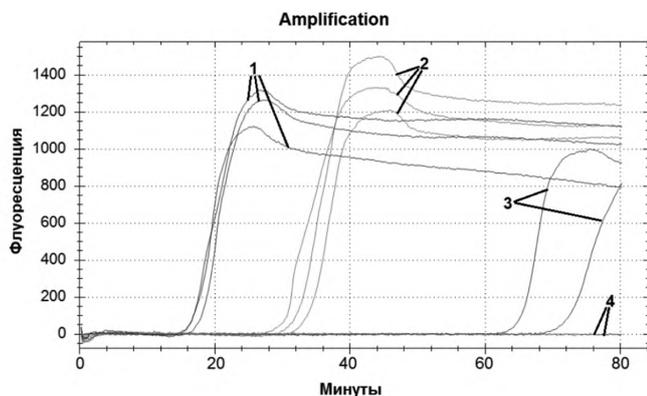


Рис. 1. Кривые флуоресценции положительных и отрицательных образцов ДНК на боррелиоз. 1 – положительные образцы на смеси с 6-ю праймерами, 2 – положительные образцы на смеси с 4-мя праймерами, 3 – отрицательные образцы на смеси с 6-ю праймерами, 4 – отрицательные образцы на смеси с 4-мя праймерами.

метода ПЦР-РВ. Для сравнения чувствительности разработанного теста в качестве референсного метода использовали классическую ПЦР-РВ. В качестве матрицы использовали равное количество (по 5 мкл) ДНК, выделенной из клещей. Результаты реакций, в которых выявлена ДНК боррелий, представлены в табл. 2.

Из 20 положительных проб, выявленных с помощью ПЦР-РВ, в реакции LAMP оказались положительными 18. Расчётная чувствительность разработанного теста составила 90%, специфичность составила 100% (95% доверительный интервал (95% ДИ) = 0,82-0,99, $p < 0,0001$, AUC=0,950) (рис. 2). При этом оба не совпадающих образца имели пороговые циклы ПЦР больше 32, что свидетельствует, вероятно, о низкой концентрации ДНК боррелий в пробе. Все 16 отрицательных образцов в ПЦР-РВ совпали и в LAMP.

Постановка реакции LAMP без выделения ДНК. Для проверки возможности использования LAMP для детекции боррелиоза без этапа выделения ДНК, исполь-

Таблица 1

Время детекции положительного результата в последовательно разведенных аликвотах плазмидной ДНК боррелий

| Количество копий плазмидной ДНК в пробе | Количество измерений (из них положительные) | Время детекции положительного результата, мин (Me; Q25-Q75%) |
|---|---|--|
| 2078 | 10 (10) | 16,5; 16,1-18,6 |
| 208 | 21 (21) | 19,4; 19,2-20,2 |
| 21 | 26 (26) | 22,0; 20,6-22,4 |
| 2 | 7 (2) | 32,0 |

Таблица 2

Сравнение результатов тестирования положительных образцов в реакции LAMP и ПЦР-РВ

| Образец | ПЦР (5 мкл ДНК), Ct | LAMP (5 мкл ДНК), мин |
|---------------|---------------------|-----------------------|
| КЛ8221 | 34,0 | Н/Д |
| КЛ8151 | 32,5 | 15 |
| КЛ8168 | 32,3 | 23 |
| КЛ8212 | 32,2 | 14 |
| КЛ8249 | 32,1 | Н/Д |
| КЛ8186 | 31,8 | 19 |
| КЛ3952 | 31,6 | 13 |
| КЛ8124 | 31,2 | 23 |
| КЛ8239 | 30,6 | 13 |
| КЛ8200 | 30,0 | 16 |
| КЛ8139 | 29,9 | 13 |
| КЛ3903 | 29,4 | 14 |
| КЛ3857 | 29,0 | 12 |
| КЛ8170 | 28,7 | 15 |
| КЛ8197 | 28,4 | 13 |
| КЛ8251 | 26,7 | 16 |
| КЛ8259 | 26,7 | 11 |
| КЛ8290 | 25,9 | 11 |
| КЛ8303 | 24,8 | 12 |
| КЛ3938 | 21,8 | 11 |

Примечание. Здесь и в табл. 3: Н/Д – сигнал флуоресценции не детектировался. Жирным шрифтом выделены образцы с отличными друг от друга результатами тестирования на обоих методах.

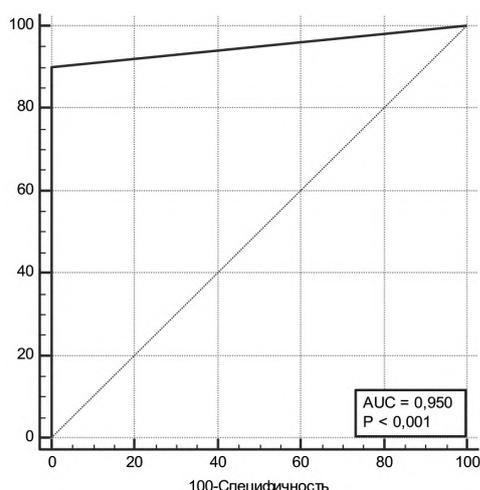


Рис. 2. ROC-кривая, построенная по результатам детекции ДНК боррелий с помощью LAMP в сравнении с ПЦР-РВ.

зовали в качестве образцов растертых клещей при их непосредственном помещении в реакционную смесь для проведения LAMP. Полученные результаты представлены в табл. 3. Из 11 исследованных клещей, в четырёх обнаружена ДНК возбудителя ИКБ, при этом результаты в LAMP и ПЦР-РВ полностью совпали. Это свидетельствует об устойчивой работе LAMP даже в присутствии сложных биологических смесей, потенциально содержащих большое количество ингибирующих ферментативные реакции соединений.

Обсуждение. Актуальность разработки экспресс-методов детекции ДНК возбудителей клещевых инфекций не вызывает сомнений в связи с необходимостью принятия мер экстренной индивидуальной профилактики при присасывании инфицированных клещей или для оперативного проведения дифференциального диагноза при поступлении пациентов с симптомами нейроинфекции. Технологии изотермической амплификации представляются идеальным решением данных проблем ввиду достаточно быстрого получения результата с возможностью его визуальной оценки в полевых условиях, отсутствия необходимости использования дорогостоящего и громоздкого оборудования для амплификации нуклеиновых кислот. Дополнительное преимущество имеют варианты технологических решений прямой детекции ДНК без необходимости специальной предварительной процедуры ее выделения.

Авторы методики LAMP [9] использовали в работе клещей рода *Ixodes* китайского ареала обитания, однако, представители вида *Ixodes persulcatus* ими не включены в исследование, что оставляет открытым вопрос однозначного переноса полученных авторами результатов на виды, обитающие в таёжных регионах Сибири.

В основе дизайна олигонуклеотидных праймеров в нашей разработке мы использовали описанные в статье последовательности [10]. Хотя метод этих авторов не апробирован на клещах, но он показал свою высокую эффективность на образцах крови пациентов. Наше решение позволяет надеяться, что разработанная модификация будет равно эффективна при детекции ДНК возбудителей ИКБ как в клещах, так и в биологических образцах пациентов. С целью повышения специфичности метода и получения более быстрого результата реак-

Таблица 3

Сравнение результатов LAMP без предварительного выделения ДНК и результатов параллельной ПЦР-РВ

| Образец (клещ) | ПЦР, Ct | LAMP, мин |
|----------------|---------|-----------|
| КЛ23 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ24 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ25 | 29,1 | 29 |
| КЛ26 | 26,2 | 45 |
| КЛ27 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ28 | 30 | 27 |
| КЛ29 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ30 | 33,4 | 33 |
| КЛ31 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ32 | Н/Д | Н/Д |
| КЛ33 | Н/Д | Н/Д |

ции мы добавили к описанным праймерам оригинально сконструированные последовательности дополнительных петлевых праймеров (LB, FB). Внедрение этих праймеров сократило время получения флуоресцентного сигнала от положительных образцов (см. рис. 1), при этом модификация не сказалась на чувствительности или специфичности метода. Использование разработанной модификации метода при тестировании коллекционных образцов ДНК продемонстрировало приемлемую сопоставимость с результатами их тестирования на коммерческом наборе для ПЦР-РВ.

При использовании теста для детекции боррелий в клещах, где они выявляются даже визуально в световом микроскопе, предел аналитической чувствительности не так важен, как в случае анализа в биологических жидкостях пациента. Для целей настоящей разработки использования диагностического теста в полевых условиях более важным является время выполнения исследования и его специфичность. Достигнутые значения этих показателей вполне приемлемы и позволяют надеяться на реализацию метода на базе портативных устройств.

Важным результатом работы является демонстрация возможности использования разработанного метода для выявления инфекционного агента в клещах без предварительного этапа выделения ДНК, что значительно уменьшает время выполнения теста и делает его более удобным для использования в полевых условиях.

В настоящей работе исследована небольшая выборка клещей и выявление положительных результатов LAMP в клещах требует больше времени, чем при тестировании плазмидных стандартных образцов. Мы не получили пока окончательных данных о диагностической эффективности метода при исследовании образцов биологического материала пациентов. Требуется дальнейшей разработки технология визуальной детекции результата LAMP, приемлемой для использования в «полевых» условиях. Указанные задачи будут решаться в период очередного эпидемического сезона.

Выводы:

1. Разработан модифицированный изотермический метод детекции ДНК возбудителей ИКБ из преобладающих на территории России клещей *Ixodes persulcatus*, позволяющий ускорить получение результата тестирования.
2. Предел аналитической чувствительности метода LAMP, оцениваемый по стандартной рекомбинантной

плазмиде, составил составляет 21 молекулу в пробе или 4 копии/мкл.

3. При тестировании коллекционных проб ранее выделенной из клещей ДНК, совпадение результатов с ПЦР-РВ положительных образцов составило 90% (18 из 20 проб), а отрицательных 100% (16 из 16 проб).

4. Впервые продемонстрирована возможность детекции ДНК боррелий методом LAMP в клещах без выполнение предварительной процедуры выделения ДНК.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–10 см. REFERENCES)

1. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). Санкт-Петербург: Фолиант; 2000.
2. Оберт А.С., Дроздов В.Н., Рудакова С.А. Иксодовые клещевые боррелиозы: Нозогеографические и медико-экологические аспекты. Новосибирск: Наука; 2001.
3. Рудакова С.А., Пеневская Н.А., Рудаков Н.В., Пакскина Н.Д., Савельев Д.А., Блох А.И. Интенсивность и тенденции развития эпидемического процесса иксодовых клещевых боррелиозов в Российской Федерации в 2002–2018 гг. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (2):22-9.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. Доступно по ссылке: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933.

REFERENCES

1. Lobzin Yu.V., Uskov A.N., Kozlov S.S. Lyme borreliosis (Ixodic tick-borne borrelioses). St. Petersburg: Foliant; 2000. (in Russian)
2. Obert A.S., Drozdov V.N., Rudakova S.A. Ixodic tick-borne borrelioses: Geographical and medical-ecological aspects. Novosibirsk: Nauka; 2001. (in Russian)

3. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Pakschina N.D., Savel'ev D.A., Blokh A.I. Intensity and trends in development of epidemic process of ixodes tick-borne borrelioses in the Russian Federation in 2002-2018 and forecast for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; (2):22-9. (in Russian)
4. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2020. Available from: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933 (In Russian)
5. Schutzer S.E., Body B.A., Boyle J., Branson B.M., Dattwyler R.J., Fikrig E. et al. Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2019; 68(6):1052-7.
6. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Ushikubo H. Principle of LAMP method – a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*. 2004;54(1):107-12. DOI: 10.2222/jsv.54.107.
8. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007; 70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008.
9. Yang J., Guan G., Niu Q., Liu Z., Li Y., Liu J. et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks. *Transbound Emerg. Dis*. 2013; 60(3):238-44. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01335.x.
10. Zhang L.L., Hou X.X., Geng Z., Lou Y.L., Wan K.L., Hao Q. Combination of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Nested PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Human Serum Samples. *Biomed. Environ. Sci*. 2015; 28(4):312-5. DOI: 10.3967/bes2015.044.