

Исмаилова А.А., Уралова Ш.А., Нигматова Л.М., Адылов Д.Г., Петрова Т.А., Набиева У.П., Авазова Т.А.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРИОГЛОБУЛИНОВ В УСЛОВИЯХ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Институт иммунологии Академии Наук Республики Узбекистан, 100060, Ташкент, Узбекистан

Предложен метод оценки криоглобулинов, связанных с IgM и с IgG, на основе выявления циркулирующих иммунных комплексов у практически здоровых лиц и больных циррозом печени. Показано, что у больных циррозом печени содержание криоглобулинов, связанных с IgM, возрастает почти в 2 раза, а связанных с IgG, более чем в 2,5 раза по сравнению со здоровыми лицами. Установлено, что у практически здоровых лиц криоглобулины также присутствуют в крови в незначительном количестве. Предложенный подход к определению криоглобулинов позволяет до минимума сократить время проведения исследования, а также расход реактивов.

Ключевые слова: криоглобулины; иммунологическая диагностика; циркулирующие иммунные комплексы.

Для цитирования: Исмаилова А.А., Уралова Ш.А., Нигматова Л.М., Адылов Д.Г., Петрова Т.А., Набиева У.П., Авазова Т.А. Оптимизация метода определения криоглобулинов в условиях клинико-диагностической лаборатории. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (1):50-52

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2017-62-1-50-52>.

Ismailova A.A., Uralova Sh.A., Nigmatova L.M., Adylov D.G. Petrova T.A., Nabieva U.P., Avazova T.A.

THE OPTIMIZATION OF TECHNIQUE OF DETECTION OF CRYO-GLOBULINS IN CONDITIONS OF CLINICAL DIAGNOSTIC LABORATORY

The institute of immunology of the Academy of sciences of the Republic of Uzbekistan, 100060 Tashkent, Uzbekistan

The technique is proposed to evaluate cryoglobulins associated with IgM and IgG on the basis of detection of immune complexes circulating in healthy individuals and patients with liver cirrhosis. It is demonstrated that in patients with liver cirrhosis content of cryoglobulins associated with IgM increases almost twice and those associated with IgG more than two and a half times as compared with healthy individuals. It is established that in healthy individuals cryoglobulins are also present in blood in small amount. The proposed approach to detection of cryoglobulins permits to minimize time of implementation of study and also discharge of reagents.

Key words: cryoglobulin; immune diagnostics; circulating immune complexes

For citation: Ismailova A.A., Uralova Sh.A., Nigmatova L.M., Adylov D.G. Petrova T.A., Nabieva U.P., Avazova T.A. The optimization of technique of detection of cryo-globulins in conditions of clinical diagnostic laboratory. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2017; 62 (1): 50-52. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-50-52

For correspondence: Ismailova A.A., doctor of medical sciences, deputy director on research activities. e-mail: immunocitokin@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study was supported by grant of the Republic of Uzbekistan (FA-F6-T054-The state committee for science and technology of the Republic of Uzbekistan)

Received 14.07.2016
Accepted 01.08.2016

Первое упоминание о криоглобулинах (КГ) принадлежит Wintrobe (1933), затем началось бурное изучение и разработка разных методов и подходов к определению КГ. Криоглобулины — показатель нарушения иммунных свойств организма, они обнаружены при многих заболеваниях: СКВ, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, васкулиты, вирусные гепатиты В и С, цирроз печени и др. [1, 2].

Известно, что перечисленные заболевания связаны с нарушениями в гуморальном звене иммунной системы и сопровождаются увеличением крупных (связанных с IgM) и мелких (связанных с IgG) циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). ЦИК — наиболее универсальные факторы воспалительного процесса, а также тканевого повреждения. Они играют существенную роль в развитии ряда тяжелых

хронических системных заболеваний человека [3]. Известно также, что к одному из типов ЦИК принадлежат белки, которые преципитируют на холоде, — криоглобулины. КГ при температурах ниже +37°C проявляют аномальную растворимость и способны образовывать криопреципитаты, один из компонентов которых может проявлять антительную активность, тогда как КГ формируют иммунные комплексы, играющие существенную роль в хронизации иммунокомплексных заболеваний [2].

Существует множество методов и подходов к определению КГ [4—7]. Однако методы, применяемые в исследовательских целях, не позволяют использовать их в условиях клинико-диагностических лабораторий ввиду отсутствия единого стандарта исследования. Так, существуют разные модификации метода: количественное и полуколичественное определение КГ, их визуальная оценка, в предлагаемых методах используются разные объемы сыворотки, предусматривается длительная инкубация сыворотки при +4°C (от 2 до 7 сут).

Для корреспонденции: Исмаилова Адолат Абдурахимовна, д-р мед. наук, зам. дир. по научной работе, e-mail: immunocitokin@rambler.ru

Таблица 1

Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови здоровых лиц и больных циррозом печени

Показатель, у.е.	Контрольная группа (n = 69)	Больные ЦП (n = 55)
3% ЦИК, связанные с IgG	24,3 ± 2,3	60,9 ± 6,9*
4% ЦИК, связанные с IgM	41,4 ± 3,8	99,7 ± 10,2*

* — достоверность различий ($p < 0,001$) относительно контрольной группы.

Таблица 2

Содержание криоглобулинов в сыворотке крови здоровых и больных циррозом печени

Показатели, у.е.	Контрольная группа (n = 69)	Больные ЦП (n = 55)
Криоглобулины, связанные с IgM	11,2 ± 1,7	20,4 ± 4,5*
Криоглобулины, связанные с IgG	12,2 ± 1,5	32,1 ± 5,6**

* — достоверность различий ($p < 0,05$) относительно контрольной группы; ** — достоверность различий ($p < 0,001$) относительно контрольной группы.

В связи с этим мы разработали новый подход к определению КГ, в основу которого положено определение крупных (связанных с IgM) и мелких (связанных с IgG) ЦИК, способных преципитировать при +4°C и полностью растворяться при +37°C.

Цель работы — оценить содержание криоглобулинов, связанных с IgM и IgG, с учетом циркулирующих крупных и мелких иммунных комплексов.

Материал и методы. Обследовано 57 практически здоровых и 55 больных с диагнозом «цирроз печени» в возрасте от 18 до 60 лет. Среди практически здоровых оказалось 6 (10,5%) мужчин и 51 (89,4%) женщины, средний возраст которых составил 36 ± 1,77. Среди больных с диагнозом «цирроз печени» — 24 (43,6%) мужчин и 32 (58,1%) женщины, средний возраст 44 ± 1,89 лет. Здоровый контингент отобран по следующим критериям: к этой группе относили практически здоровых людей, которые при медицинском осмотре не имели каких-либо отклонений в состоянии организма, не страдающих острыми и хроническими заболеваниями. Больных циррозом печени отбирали согласно классификации по Чайлд—Пью [8].

Взятие крови у пациентов проводили, используя стандартную процедуру забора крови в количестве не менее 2 мл. Стерильные пробирки и шприцы для взятия крови содержали в термостате при температуре +37°C. Сыворотку крови отделяли общепринятым методом. Кровь инкубировали в термостате при +37°C в течение одного часа, что позволило свести к минимуму потери КГ при ретракции сгустка и предотвратить связывание с компонентами комплемента.

В собранной сыворотке определяли крупные и мелкие ЦИК, используя при этом 3 и 4% раствор полиэтиленгликоля. Оптическую плотность (ОП) определяли при длине волны 450 на иммуноферментном анализаторе, что позволило использовать минимальное количество реактивов.

Основываясь на том, что КГ преципитируют при +4°C, оставшуюся сыворотку оставляли в холодильнике при +4°C на сутки, а затем определяли спектр ЦИК. Поскольку известно, что КГ полностью растворяются при +37°C, сыворотка (после холодильника) была проинкубирована в термостате при +37°C в течение часа, после чего определены крупные и мелкие ЦИК. О количестве КГ судили по разнице оптической плотности проб, инкубированных при +4°C и +37°C.

Результаты и обсуждение. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ

Microsoft Excel. Достоверность различий между группами оценивали по критерию t Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Поскольку разработанный нами подход выявления КГ основан на определении ЦИК, на начальном этапе исследований мы выявили содержание ЦИК у практически здоровых и больных ЦП. Данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что в группе больных с ЦП количество ЦИК более чем в 2 раза превышает нормативные значения, причем это касается как крупных, так и мелких ЦИК ($p < 0,001$ в обоих случаях).

Используя предложенный подход и проведение статистической обработки, мы определили крупные (связанные с IgM) и мелкие (связанные с IgG) криоглобулины в группе практически здоровых лиц и больных ЦП. Полученные результаты исследований представлены в табл. 2.

Как видно из представленных в таблице данных, после суточного выдерживания сыворотки при +4°C, а затем часовой инкубации в термостате при +37°C и проведения математического анализа получены значения, которые и определяли содержание КГ в сыворотке экспериментальных групп. Обнаружено, что в сыворотке крови здоровых лиц присутствуют криоглобулины, связанные с IgM, и криоглобулины, связанные с IgG, что соответствует и данным литературы, где авторы обнаружили содержание криоглобулинов в сыворотке крови здоровых лиц [9].

У больных с ЦП отмечали достоверное увеличение КГ в сыворотке крови. Так, содержание КГ, связанных с IgM, у пациентов с ЦП было почти 2 раза выше, чем у практически здоровых ($p < 0,05$), а связанные с IgG — почти в 3 раза превышали нормативные значения ($p < 0,001$).

У 16 больных ЦП (29% всех случаев) отмечали высокий уровень (выше среднего показателя по группе) криоглобулинов, связанных с IgM, у 20 больных (36,7% всех случаев) — высокий уровень криоглобулинов, связанных с IgG. У 14 пациентов этой группы (25,5% всех случаев) отмечали сочетанные высокие показатели обоих криоглобулинов.

Заключение. Разработанный нами подход к определению криоглобулинов в сыворотке крови объективен, не требует большой затраты времени и реактивов. Использование предлагаемого метода позволит определять содержание криоглобулинов в сыворотке крови больных в любой клинико-диагностической лаборатории, а также при проведении скрининговых исследований и в научных целях.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Республики Узбекистан (ФА-Ф6-Т054 — Государственным комитетом науки и технологии РУз).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—7 см. REFERENCES)

1. Дунаева Н.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Сысоев К.А., Алексеева Н.П., Лапин С.В. и др. Распространенность и факторы риска развития криоглобулинемии, ассоциированной с хроническим гепатитом С. *Медицинская иммунология*. 2007; 9(6): 575—80.
2. Константинова Н.А. *Криоглобулины и патология*. М.: Медицина; 1999.
3. Константинова Н.А., Кирсанов А.Ю. Оценка криоглобулинов в сыворотке крови с учетом циркулирующих иммунных комплексов. *Лабораторное дело*. 1989; (11): 62—5.
4. Неустроева Ю.А. Оптимизация полуколичественного метода выявления криоглобулинов в условиях клинико-диагностической лаборатории. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; (1): 37—41.
5. Тихомиров А.А. Криоглобулины и их клиническое значение. *Терапевтический архив*. 1977; 49: 144—7.

8. Классификация цирроза печени. Симптомы и лечение декомпенсированного цирроза печени. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>.
9. Диагностика и лечение системных васкулитов. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>.

REFERENCES

1. Dunaeva N.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Sysoev K.A., Alekseeva N.P., Lapin S.V. et al. Prevalence and risk factors for cryoglobulinemia associated with chronic hepatitis C. *Meditinskaya immunologiya*. 2007; 9(6): 575—80. (in Russian)
2. Konstantinova N.A. *Cryoglobulins and Pathology* [Krioglobuliny i patologiya]. Moscow: Meditsina; 1999. (in Russian)
3. Konstantinova N.A., Kirsanov A.Yu. Evaluation of serum cryoglobulins subject circulating immune complexes. *Laboratornoe delo*. 1989; (11): 62—5. (in Russian)
4. Neustroeva Yu.A. Optimization of semi-quantitative method of detection of cryoglobulins in a clinical diagnostic laboratory. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; (1): 37—41. (in Russian)
5. Tikhomirov A.A. Cryoglobulins and their clinical significance. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1977; 49: 144—7. (in Russian)
6. Hilgard P., Treichel U., Dries V., Dienes H.P., Gerken G. Cryoglobulin-associated uptake of hepatitis C virus into human hepatocytes. *Hepato-gastroenterology*. 2005; 52(65): 1534—40.
7. Hwang S.J., Chu C.W., Huang D.F., Lan K.H., Chang F.Y., Lee S.D. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens*. 2002; 59(1): 31—7.
8. The classification of cirrhosis. The symptoms and treatment of decompensated cirrhosis. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>. (in Russian)
9. Diagnosis and treatment of systemic vasculitis. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>. (in Russian)

Поступила 14.07.16

Принята к печати 01.08.16

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-078.33

Дон Е.С.¹, Тарасов А.В.², Эпштейн О.И.¹, Тарасов С.А.²

БИОМАРКЕРЫ В МЕДИЦИНЕ: ПОИСК, ВЫБОР, ИЗУЧЕНИЕ И ВАЛИДАЦИЯ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва;

²ООО «НПФ Материя Медика Холдинг», 129272, Москва

Поскольку сфера применения биомаркеров с каждым годом расширяется и уже включает в себя использование их в качестве индикатора наличия или отсутствия заболевания, ответа на терапию, эффективности лекарственного средства или доклинической модели диагностического параметра и даже участника процесса поиска механизма действия лекарственных препаратов, значимость изучения биомаркеров нельзя переоценить. Данная работа посвящена систематизации и структурированию существующей информации о биомаркерах, начиная с первичного скрининга и заканчивая валидацией выбранной молекулы или характеристики.

Ключевые слова: биомаркер; диагностика.

Для цитирования: Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 52-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

Don E.S.¹, Tarasov A.V.², Epshtein O.I.¹, Tarasov S.A.²

THE BIOMARKERS IN MEDICINE: SEARCH, CHOICE, STUDY AND VALIDATION

¹The research institute of general pathology and pathophysiology, 125315 Moscow, Russia

²The "NPF Materia Medica Holding", 129272 Moscow, Russia

The sphere of application of biomarkers is expanding every year and already comprises their using as indicator of presence or absence of disease, response to therapy, efficiency of medications or pre-clinical model of diagnostic parameter and even participant of process of search of mechanism of effect of medications. Hence, it is impossible to overestimate significance of studying of biomarkers. The article is dedicated to systematization and structuring of present information concerning biomarkers, starting from primary screening and completing with validation of chosen molecule or characteristic.

Key words: biomarker; diagnostics.

For citation: Don E.S., Tarasov A.V., Epshtein O.I., Tarasov S.A. The biomarkers in medicine: search, choice, study and validation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 52-59. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

For correspondence: Don E.S., senior researcher of the laboratory of physiologically active substances. e-mail: don_es@mail.ru

Для корреспонденции: Дон Елена Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: don_es@mail.ru