

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 66
3 • 2021

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

март

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 10.03.2021.
Подписано в печать 25.03.2021. Формат
60 × 88¹/₈.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

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-rt.ru**
**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 3. 130–192.

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, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, 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*), В.Г. КОЛБ (*Минск*), 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*), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), 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 66

3 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

March

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, V.T. MOROZOVA, 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*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Гильмиярова Ф.Н., Гусьякова О.А., Константинов Д.Ю., Селезнева И.А., Бородин И.А., Колотьева Н.А., Константинова Е.А., Глуштенко В.С., Лебедева С.С., Темник Е.И., Ремизов В.В.*
Молекулярный профиль ротовой жидкости при новой коронавирусной инфекции 133
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Чанг В.Л., Короткова Е.А., Алферов А.А., Контрищиков М.М., Соколов Н.Ю., Карамышева Е.И., Огнерубов Н.А., Стилиди И.С.*
Прогностическая значимость растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком желудка 139

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Блиндарь В.Н., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н., Зубрихина Г.Н., Нестерова Ю.А., Давыдова Т.В., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Кононенко И.Б., Снеговой А.В.*
Роль интерлейкина-6 и гепсидина 25 в патогенезе анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными новообразованиями у онкологических больных до неoadьювантной химиотерапии. 147
- Гальцева И.В., Филипенко М.Л., Давыдова Ю.О., Лучкин А.В., Капранов Н.М., Кондратьева Ю.А., Субботин С.В., Храпов Е.А., Никифорова К.А., Фидарова З.Т., Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Михайлова Е.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.*
Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека 154

ИММУНОЛОГИЯ

- Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И.*
Дисрегуляторные процессы клеточного звена иммунной системы в динамике общевариабельной иммунной недостаточности. 160
- Кравченко Л.В.*
Дисбаланс факторов приобретенного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в зависимости от тяжести заболевания 166

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Каликова Л. Б., Бойко Е. Р.*
Определение адениновых нуклеотидов модифицированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 172

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Жеребятьева О.О., Махалова Г.О., Киргизова С.Б., Кшнясева С.К., Миронов А.Ю., Михайлова Е.А.*
Мукозальный иммунитет и микрофлора репродуктивного тракта гинекологических больных до и после иммуномодулирующей терапии 177

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Сычевская К.А., Рисинская Н.В., Кравченко С.К., Никулина Е.Е., Мисюрин А.Е., Магомедова А.У., Сударинов А.Б.*
Сложности определения нестабильности мононуклеотидных микросателлитных повторов (MSI) у больных В-клеточными лимфомами 181

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Ивойлов О.О., Кочетов А.Г.*
Метод анализа типовой структуры прямых затрат в себестоимости лабораторного теста 187

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

*Gilmiyarova F.N., Gusyakova O.A., Konstantinov D.Y., Selezneva I.A., Borodina I.A., Kolotyeva N.A., Konstan
Tlustenko V.S., Lebedeva S.S., Temnik E.I., Remizov V.V.*
Molecular profile of oral fluid in new coronavirus infection 133

*Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Chang V.L., Korotkova E.A., Alferov A.A., Kontorshchikov M.M., Sokolov
N.Yu., Karamysheva E.I., Ognerubov N.A., Stilidi I.S.*
Prognostic significance of soluble forms of immune checkpoint PD-1/PD-L1 receptor and ligand in
blood plasma of gastric cancer patients 139

HEMATOLOGY

*Blindar V.N., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N., Zubrikhina G.N., Nesterova Yu.A., Davydova T.V., Lyubimova N.V.,
Kushlinskii N.E., Kononenko I. B., Snegovoy A. V.*
The role of interleukin-6 and hepcidin 25 in the pathogenesis of anemic syndrome associated with
malignant neoplasms with breast cancer patients before neoadjuvant chemotherapy 147

*Galtseva I.V., Filipenko M.L., Davydova Yu.O., Luchkin A.V., Kapranov N.M., Kondratieva Yu.A., Subbotin
S.V., Khrapov E.A., Nikiforova K.A., Fidarova Z.T., Gaponova T.V., Mendeleeva L.P., Mikhailova E.A.,
Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.*
Comparison of polymerase chain reaction and flow cytometry for measuring telomere length of human leukocytes 154

MMUNOLOGY

Sizyakina L.P., Andreeva I.I. Danilova D.I.
Dysregulatory processes of the cellular link of the immune system in the dynamics of common variable immunodeficiency 160

Kravchenko L.V.
Imbalance of acquired immunity factors in newborns with cytomegaloviral infection depending on the severity of the disease . . 166

GENERAL CLINICAL METHODS

Kalikova L. B., Bojko E. R.
Determination of adenine nucleotides by the modified method of high-performance liquid chromatography 172

MICROBIOLOGY

Zherebyateva O. O. , Makhalova G. O. , Kirgizova S. B. , Kshnyaseva S. K., Mikhailova E. A., Mironov A. Yu.
Microflora and local immunity of the reproductive tract of gynecological patients before and after i
mmunomodulatory therapy 177

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

*Sychevskaya K.A., Risinskaya N.V., Kravchenko S.K., Nikulina E.E., Misyurina A.E.,
Magomedova A.U., Sudarikov A.B.*
Pitfalls in mononucleotide microsatellite repeats instability assessing (MSI) in the patients with B-cell lymphomas 181

ORGANIZATION OF LABORATORY SERVICE

Ivoylov O.O., Kochetov A.G.
A method for analyzing the typical structure of direct costs in the cost of a laboratory test 187

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Константинов Д.Ю., Селезнева И.А., Бородин И.А., Колотьева Н.А., Константинова Е.А., Тлустенко В.С., Лебедева С.С., Темник Е.И., Ремизов В.В.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРОФИЛЬ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Ротовая жидкость является альтернативным биологическим материалом, подтверждающим корреляционные взаимосвязи с параметрами крови при разнообразных патологических состояниях организма. В целях поиска неинвазивного подхода к стратификации пациентов при заболевании COVID-19 определены молекулярные биомаркеры ротовой жидкости у больных с коронавирусной инфекцией средней степени тяжести в сравнении с клинически здоровыми лицами. Показано, что протеомные, углеводные, макро- и микроэлементные профили ротовой жидкости при коронавирусной инфекции могут применяться для диагностики. Выявлены особенности белкового обмена: увеличение содержания общего белка, мочевины; повышение активности ферментов аспаратаминотрансферазы, гаммаглутамилтранспептидазы, креатинфосфокиназы, щелочной фосфатазы; изменения углеводного обмена, что выражается повышением уровней глюкозы и лактата, увеличением активности лактатдегидрогеназы, содержания натрия, хлоридов, кальция, магния, железа.

Ключевые слова: ротовая жидкость; COVID-19; метаболические параметры.

Для цитирования: Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Константинов Д.Ю., Селезнева И.А., Бородин И.А., Колотьева Н.А., Константинова Е.А., Тлустенко В.С., Лебедева С.С., Темник Е.И., Ремизов В.В. Молекулярный профиль ротовой жидкости при новой коронавирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 133-138. DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-133-138>

Gilmiyarova F.N., Gusyakova O.A., Konstantinov D.Y., Selezneva I.A., Borodina I.A., Kolotyeva N.A., Konstantinova E.A., Tlustenko V.S., Lebedeva S.S., Temnik E.I., Remizov V.V.

MOLECULAR PROFILE OF ORAL FLUID IN NEW CORONAVIRUS INFECTION

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

Oral fluid is an alternative biological material that confirms correlations with blood parameters in various pathological conditions of the body. In order to find a non-invasive approach to stratification of patients with COVID-19 disease, molecular biomarkers of the oral fluid have been determined in patients with moderate coronavirus infection in comparison with clinically healthy individuals. It has been shown that proteomic, carbohydrate, macro- and microelement profiles of the oral fluid in coronavirus infection can be used for diagnostics. The features of protein metabolism were revealed: an increase in the content of total protein, urea; increased activity of enzymes aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transpeptidase, creatine phosphokinase, alkaline phosphatase; changes in carbohydrate metabolism, which is expressed by an increase in glucose and lactate levels, an increase in lactate dehydrogenase activity, sodium, chloride, calcium, magnesium, iron content.

Key words: oral fluid; COVID-19; metabolic parameters.

For correspondence: Selezneva I.A., PhD, docent of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru

For citation: Gilmiyarova F.N., Gusyakova O.A., Konstantinov D.Y., Selezneva I.A., Borodina I.A., Kolotyeva N.A., Konstantinova E.A., Tlustenko V.S., Lebedeva S.S., Temnik E.I., Remizov V.V. Molecular profile of oral fluid in new coronavirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(3): 133-138 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-133-138>

Information about authors:

Gilmiyarova F.N., <http://orcid.org/0000-0001-5992-3609>;
Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>;
Konstantinov D.Y., <https://orcid.org/0000-0002-6177-8487>;
Selezneva I.A., <https://orcid.org/0000-0001-6647-5330>;
Borodina I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7115-6430>;
Kolotyeva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7583-6222>;
Konstantinova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6022-0983>;
Tlustenko V.S., <https://orcid.org/0000-0002-2756-5277>;
Lebedeva S.S., <https://orcid.org/0000-0001-8699-2562>;
Temnik E.I., <https://orcid.org/0000-0002-4283-1481>;
Remizov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-1004-5443>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 26.01.2021
Accepted 17.02.2021

Для корреспонденции: Селезнева Инна Александровна, канд. мед. наук, доц. каф. фундаментальной и клин. биохимии с лаб. диагностикой; e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru

Введение. В последние годы большую востребованность и информативность приобрели диагностические методы тестирования заболеваний с использованием ротовой жидкости – неинвазивной биологической матрицы, формирующей комплексную, многостороннюю и динамическую оценку патологического процесса на системном уровне [1 – 3]. Уникален молекулярный состав ротовой жидкости, содержащий широкий спектр белков и пептидов, нуклеиновых кислот, электролитов, ферментов, гормонов и других регуляторов [4]. Диагностика многих соматических заболеваний основана на присутствии в ротовой жидкости молекул, проникающих в неё из крови через гематосаливарный барьер, который обеспечивает избирательное поступление различных классов химических соединений путём диализа, диффузии, ультрафильтрации, осмоса, сорбции. При этом биологические индикаторы ротовой жидкости, показывающие надежные корреляционные взаимосвязи с гематологическими параметрами, отражающие как локальное состояние ротовой полости, так и отдельных систем организма, являются надежной платформой диагностики, создающей патогенетически обоснованный подход к лечению разнообразной соматической патологии.

В настоящее время поиск новых способов диагностики новой коронавирусной инфекции и внедрение их в практическое здравоохранение является актуальным. Основным методом диагностирования COVID-19 является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией для обнаружения SARS-CoV-2 [5]. При этом конкретная область, служащая мишенью для ПЦР, включает ген RdRP (РНК-зависимая РНК-полимераза), ген E (белок оболочки) или ген N (нуклеокапсид) [6,7]. Традиционным для данного исследования является взятие мазка-отпечатка слизистой оболочки полости носа и носоглотки. Однако, известно, что потенциальным источником патогенных вирусов может быть человеческая слюна [8]. Слюна является средой обитания, наряду с SARS-CoV-2, таких вирусов, как Эпштейна-Барра, простого герпеса, гепатита А, В и С, цитомегаловируса, папилломы человека, иммунодефицита человека, Чикунгунья, ЗИК и Эбола. Взаимодействие вирусов со слюной представляет собой сложный биологический процесс, в частности, происходит изменение таких биологических паттернов, как усиление агрегации и передачи информации [9]. Вместе с тем, такие биологически активные компоненты слюны, как протеины, богатые пролином, муцины MG1 и MG2 могут взаимодействовать с патогенами и оказывать множественное влияние на их биологическое поведение [10].

Ротовая жидкость, служащая хорошим резервуаром для патогенов, находящаяся как в полости рта, так и в слизистой оболочке нижних дыхательных путей и носоглотки, а также в инфицированных слюнных железах [11, 12], является, с одной стороны, потенциальным источником их распространения, а с другой – «молекулярным ключом», фундаментально отражающим спектр гематологических особенностей вирусной инфекции. Показано, что протеомные, углеводные и липидные профили сыворотки крови при коронавирусной инфекции могут применяться для диагностики тяжёлых случаев COVID-19 [13] и прогнозирования прогрессирования заболевания от более лёгкой до тяжёлой степени [14]. Наряду с этим оправдан поиск молекулярных индикаторов новой коронавирусной инфекции в ротовой жидкости, который позволит взглянуть на данную инфекцию

из глубины фундаментальных биохимических процессов, и, благодаря такому подходу, увидеть наиболее точные и ёмкие диагностические критерии, позволяющие максимально оптимизировать лечение и прогноз течения инфекции.

Цель работы – определить молекулярные биомаркеры ротовой жидкости для неинвазивного подхода к стратификации пациентов при заболевании COVID-19.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой и инфекционных болезней Самарского ГМУ Минздрава России. Контролем служили клинически здоровые – 89 человек (38% – мужчины и 62% – женщины, средний возраст $24 \pm 2,5$ года), и 92 человека (24% – мужчины и 76% – женщины, средний возраст $55,68 \pm 1,83$ лет), находящиеся на стационарном лечении в специализированном ковидном госпитале с диагнозом новая коронавирусная инфекция со среднетяжёлым течением болезни.

Диагноз COVID-19 был установлен на основании выявления РНК SARS-CoV-2 из клинических образцов (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) и данных анамнеза, осмотра, физикальных и рентгенологических исследований. Качественное выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени с применением коммерческого набора реактивов «РеалБест РНК SARS-CoV-2» (АО «Вектор-Бест», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Методом твердофазного иммуноферментного анализа у пациентов проводили качественное определение иммуноглобулинов класса М и G к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека с использованием наборов реагентов «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» и «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Клиническими критериями среднетяжёлого течения являлось частота дыхательных движений от 22/мин до 30/мин, сатурация SpO₂ от 95% до 93%, одышка при физической нагрузке, изменения в легких при компьютерной томографии (объем поражения: минимальный или средний; КТ 1-2).

Материалом для исследования являлась ротовая жидкость, собранная в стерильный пластиковый одноразовый контейнер. Перед сбором ротовой жидкости все участники исследования были ознакомлены с правилами подготовки и процедурой сбора ротовой жидкости [15].

Биохимические методы исследования ротовой жидкости проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400+» фирмы «Roche Diagnostics» (Япония) с помощью коммерческого набора реактивов фирмы «Roche Diagnostics» (Швейцария). Контроль качества при выполнении исследований осуществляли с использованием контрольной сыворотки двух уровней «Precinorm», «Precipat» фирмы «Roche Diagnostics» (Швейцария) с построением контрольных карт и применением критериев Вестгарда. Определяли содержание общего белка, мочевины, мочевой кислоты, глюкозы, лактата, железа, магния, кальция, фосфора, калия, натрия, хлоридов, активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, гаммаглутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета SPSS Statistics 21. Использованы стандартные методы описательной статистики. Были изучены формы распределения исследуемых показателей. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Использовался непараметрический U критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони в качестве альтернативы t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В соответствии с поставленной целью работы мы определили метаболический состав ротовой жидкости клинически здоровых лиц и пациентов с диагнозом новая коронавирусная инфекция, проанализировав показатели белкового, углеводного, минерального обменов.

В настоящее время протеемный анализ ротовой жидкости всё чаще применяется в качестве диагностики, мониторинга, профилактики разнообразных патологических процессов. В ротовой жидкости содержится более 2000 разнообразных белков, демонстрирующих самые разнообразные свойства и образующих её протеом [16]. Функции их многообразны: это обеспечение иммунологической ответной реакции за счет присутствия в слюне иммуноглобулинов, а также антимикробных пептидов – лизоцима, лактоферрина, сиалопероксидазы, гистатинов, дефензинов; защита и смазка тканей полости рта благодаря наличию муцинов; обеспечение начального этапа пищеварительного процесса и устранение потенциально вредных веществ, поступающих из пищи с помощью пролинбогатых белков.

В ротовой жидкости пациентов с коронавирусной инфекцией наблюдается достоверное увеличение содержания общего белка (табл. 1) на 117% ($p=0,0002$) в отличие от клинически здоровых обследованных.

Анализ содержания низкомолекулярных азотсодержащих конечных продуктов белкового обмена в ротовой жидкости больных COVID-19 показал отчётливую тенденцию к снижению уровня мочевой кислоты (-36%). Выявлено повышение содержания мочевины на 30%, что указывает на активацию процессов катаболизма белков. Эти данные согласуются с повышением активности АсАТ, что свидетельствует об активации процессов трансаминирования. Нельзя исключить определённый вклад микробного сообщества полости рта. Следует также ожидать из-за высокой активности уреазы микроорганизмов рост бактериальной обсеменённости полости рта.

Известно, что источники происхождения белков слюны разнообразны, причём 90% белков и пептидов секретируются слюнными железами: богатые пролином пептиды, α -амилаза, цистатины, гистатин, муцины, секреторный IgA и карбоангидраза. Поскольку белковые и гликопротеиновые компоненты слюны играют важную роль в модуляции микробиоты полости рта и помогают в клиренсе патогенов [17], увеличение протеомного компонента ротовой жидкости в условиях коронавирусной инфекции может быть связано с пополнением его спектром белков с антимикробными и иммунологическими свойствами.

Кроме того, у пациентов с COVID-19 отмечается специфическая картина активности трансаминаз, являющихся объективными показателями белкового обмена, а также интенсивности цитолитических процессов (табл. 2). Так, наблюдается снижение активности фермента аланинаминотрансферазы на 16% по сравнению со здоровыми лицами, что отражает уменьшение интенсивности процессов трансаминирования, и, тем самым, способствует нарушению синтеза аминокислот и белков, входящих в состав слизистой оболочки тканей полости рта.

Однако, что касается активности ещё одного участника обмена белков – гаммаглутамилтранспептидазы, выявлено достоверное повышение активности фермента в ротовой жидкости у пациентов с COVID-19 на 162,5% ($p=0,0011$) в отличие от группы клинически здоровых. Это микросомальный фермент, обеспечивающий метаболизм глутатиона, главного антиоксиданта в организме, а также энзим, выступающий в роли катализатора реакций трансаминирования белков.

В ротовой жидкости выявлено повышение активности фермента аспаратаминотрансферазы на 70% по сравнению с клинически здоровыми лицами. Фермент АсАТ является митохондриальным катализатором, компонентом малат-аспартатной челночной системы, которая обеспечивает бесперебойность окислительных процессов в митохондриях, связанных с образованием энергии. Обнаруженное повышение активности данного фермента будет способствовать, по-видимому, усилению тканевого дыхания и процессов окислительного фосфорилирования, что в конечном итоге приведёт к увеличению образования энергии и, как закономерный итог, к компенсаторному повышению регенераторных процессов в тканях полости рта.

Обращает на себя внимание значимое повышение активности щелочной фосфатазы на 194% ($p<0,0001$)

Таблица 1

Характеристика показателей белкового метаболизма ротовой жидкости у клинически здоровых лиц и пациентов с COVID-19

Показатели		Здоровые лица	Пациенты с COVID-19	<i>p</i>
Общий белок, г/л	Me	0,41	0,89	0,0002
	Q1 – Q3	0,26 – 0,55	0,39 – 1,32	
	95% CI for median	0,33 – 0,48	0,58 – 1,20	
Мочевина, ммоль/л	Me	4,5	5,85	0,1674
	Q1 – Q3	3,38 – 5,63	3,00 – 9,00	
	95% CI for median	3,64 – 5,00	3,72 – 7,50	
Мочевая кислота, мкмоль/л	Me	83,1	52,9	0,5954
	Q1 – Q3	19,63 – 156,90	6,18 – 138,75	
	95% CI for median	38,24 – 113,51	14,02 – 121,19	

Примечание. Здесь и в табл. 2 – 5: Me – медиана, Q1 – Q3 – 1 и 3 квартиль, 95% CI for median – 95% доверительный интервал для медианы, *p* – уровень межгрупповой значимости; жирным шрифтом выделены достоверно значимые показатели.

Таблица 2

Характеристика активности ферментов ротовой жидкости у клинически здоровых лиц и пациентов с COVID-19

Показатели		Здоровые лица	Пациенты с COVID-19	<i>p</i>
АлАТ, Ед/л	Me	5,6	4,7	0,7008
	Q1 – Q3	3,18 – 14,30	2,4 – 23,5	
	95% CI for median	4,14 – 8,87	3,02 – 15,93	
АсАТ, Ед/л	Me	17,1	29,05	0,0676
	Q1 – Q3	7,4 – 44,2	10,5 – 96,9	
	95% CI for median	11,98 – 27,1	12,96 – 64,65	
КФК, Ед/л	Me	10,2	25,55	0,0005
	Q1 – Q3	6,88 – 15,73	13,0 – 51,5	
	95% CI for median	8,84 – 12,56	14,77 – 39,98	
ГГТП, Ед/л	Me	4,00	10,5	0,0011
	Q1 – Q3	2,6 – 6,1	3,8 – 19,5	
	95% CI for median	3,34 – 4,70	5,78 – 16,09	
Щелочная фосфатаза, Ед/л	Me	3,2	9,4	< 0,0001
	Q1 – Q3	1,78 – 5,03	4,7 – 20,6	
	95% CI for median	2,3 – 4,15	6,12 – 17,39	

Таблица 3

Характеристика показателей минерального обмена ротовой жидкости у здоровых лиц и пациентов с COVID-19

Показатели		Здоровые лица	Пациенты с COVID-19	<i>p</i>
Кальций, ммоль/л	Me	0,58	1,18	< 0,0001
	Q1 – Q3	0,46 – 0,74	0,93 – 1,59	
	95% CI for median	0,51 – 0,64	1,01 – 1,49	
Фосфор, ммоль/л	Me	4,46	4,27	0,5774
	Q1 – Q3	3,36 – 5,37	2,85 – 6,57	
	95% CI for median	3,82 – 4,86	3,84 – 5,66	
Магний, ммоль/л	Me	0,19	0,5	< 0,0001
	Q1 – Q3	0,15 – 0,26	0,42 – 0,72	
	95% CI for median	0,17 – 0,23	0,45 – 0,63	
Железо, мкмоль/л	Me	0,2	0,9	< 0,0001
	Q1 – Q3	0,00 – 0,7	0,6 – 1,5	
	95% CI for median	0,00 – 0,4	0,7 – 1,3	

в ротовой жидкости пациентов с COVID-19 по сравнению с данными клинически здоровых лиц. Щелочная фосфатаза слюны имеет основное значение в регуляции минерального обмена: выполняет свою традиционную функцию в полости рта – гидролиз органических фосфатов, а также выступает в роли инициатора кальцификации. Этот фермент способствует связыванию ионов кальция и фосфатов на поверхности эмали, образуя высокие концентрации последних, укрепляет устойчивость мицелл слюны и, тем самым, обеспечивает реминерализацию твёрдых тканей зубов. Факт увеличения активности щелочной фосфатазы отражает прогрессирующее нарушение структурной целостности тканей, способствующее поступлению мембран связанных и свободных фосфатов в биосреду ротовой полости. Кроме того, это служит показателем выраженного воспалительного процесса в мягких тканях ротовой полости в условиях нарушений проницаемости клеточных мембран, служащих источником фосфатаз. В сочетании с повышенной активностью АсАТ свидетельствует о глубоких структурных нарушениях в тканях слизистой оболочки и выходе молекулярного материала из эпителиоцитов ротовой полости. Это может служить отягощающим моментом и вносить вклад

в молекулярный дисбаланс метаболических процессов, протекающих в жидких биосредах организма, индуцируя сдвиги, способствующие генерализации воспалительного процесса.

Наряду с этим, у больных с COVID-19 отмечается увеличение перенасыщенности кальцием их ротовой жидкости на 103% ($p < 0,0001$) (табл.3).

Это может привести к деминерализации эмали, потере структурированности ротовой жидкости, разрушению её мицелл и потере связи минеральных компонентов слюны с белками, и, как итог, к прогрессированию воспалительно-деструктивных заболеваний полости рта во время коронавирусной инфекции.

Отражением подобных процессов в ротовой жидкости является увеличение содержания железа на 350% ($p < 0,0001$), что свидетельствует о кровоточивости дёсен, тем самым ухудшается гигиена полости рта, что, в свою очередь, приводит к росту в ней патогенной микрофлоры. Необходимо учитывать, что железо – мощный прооксидант, стимулятор свободно-радикального окисления, и повышение его уровня свидетельствует об усилении свободно-радикального окисления в тканях ротовой полости, слюнных железах, ротовой жидкости, протоковой слюне при антиоксидантной недостаточности организма.

Таблица 4

Характеристика показателей углеводного обмена ротовой жидкости у здоровых лиц и пациентов с COVID-19

Показатели		Здоровые лица	Пациенты с COVID-19	<i>p</i>
Глюкоза, ммоль/л	Me	0,02	0,025	0,6763
	Q1 – Q3	0,01 – 0,043	0,00 – 0,23	
	95% CI for median	0,02 – 0,03	0,0018 – 0,17	
ЛДГ, Ед/л	Me	26,25	367,0	< 0,0001
	Q1 – Q3	13,1 – 62,25	185,5 – 1124	
	95% CI for median	18,02 – 45,74	220,21 – 1015,38	
Лактат, ммоль/л	Me	0,02	0,14	0,2653
	Q1 – Q3	0,01 – 0,07	0,00 – 0,54	
	95% CI for median	0,02 – 0,03	0,0018 – 0,27	

Таблица 5

Характеристика содержания калия, натрия, хлоридов в ротовой жидкости у здоровых лиц и пациентов с COVID-19

Показатели		Здоровые лица	Пациенты с COVID-19	<i>p</i>
Калий, ммоль/л	Me	22,1	21,86	0,6619
	Q1 – Q3	17,94 – 25,06	13,5 – 27,28	
	95% CI for median	20,18 – 22,95	16,1 – 25,47	
Натрий, ммоль /л	Me	9,0	21,0	< 0,0001
	Q1 – Q3	7,0 – 12,0	10,0 – 28,5	
	95% CI for median	8,0 – 11,0	10,56 – 25,2	
Хлориды, ммоль/л	Me	21,0	37	< 0,0001
	Q1 – Q3	17,0 – 24,0	29,5 – 45,75	
	95% CI for median	19,0 – 22,0	31,95 – 43,1	

Возрастает содержание магния на 163% ($p < 0,0001$) в отличие от клинически здоровых лиц. Изменение градиента соотношения железо/магний в ротовой жидкости – свидетельство оксидативного стресса и возникновения сдвигов кислотно-основного равновесия в щелочную сторону, что усиливает элементный дисбаланс в смешанной слюне, формируя тем самым предрасположенность к иммунопатологическим состояниям.

Безусловно, подобные процессы возможны лишь при недостаточном снабжении инфицированных тканей кислородом, о чем свидетельствует пониженная сатурация у данных пациентов (SpO₂ от 95% до 93%). Анализируя активность лактатдегидрогеназы – цитозольного фермента, одного из участников обратимых реакций анаэробного окисления глюкозы, осуществляющего взаимопревращения пирувата в лактат, нами было обнаружено достоверное увеличение общей активности данного фермента в ротовой жидкости (табл. 4). Следует подчеркнуть, что в слюваобразцах пациентов активность данного фермента превышала активность в ротовой жидкости здоровых лиц практически в 15 раз ($p < 0,0001$). Можно предположить, что вследствие тропизма коронавируса к слюнным железам и мягким тканям полости рта подобный факт может указывать либо на мишень действия самого вируса, либо на результат воздействия вторичных продуктов повреждения, образующихся в процессе ответной реакции организма.

Кроме того, в происходящие нарушения механизмов общей и локальной резистентности организма вносят вклад ферменты микробного метаболизма полости рта. Так, в ротовой жидкости как здоровых лиц, так и пациентов с новой коронавирусной инфекцией содержится сопоставимое количество глюкозы, образующейся в результате гидролиза полисахаридов и гликопротеинов

в ротовой жидкости, и частично поступающей с секретами слюнных желез, отражая её содержание в плазме крови. Однако моносахара в ротовой жидкости пациентов в условиях высокой активности лактатдегидрогеназы быстро утилизируются микрофлорой ротовой полости и превращаются в органические кислоты, в частности, в лактат, о чём свидетельствует увеличение его содержания на 600% в ротовой жидкости больных с COVID-19. Это, в свою очередь, способствует очаговой деминерализации эмали и усугублению молекулярно-деструктивных изменений при ковидной инфекции.

Иллюстрацией подобных процессов является изменение проницаемости гематосаливарного барьера для таких элементов, как калий, натрий и хлор (табл. 5).

Известно, что Na⁺ и K⁺ поступают с секретом околоушных и подчелюстных слюнных желез. При изучении элементного состава ротовой жидкости в слюваобразцах клинически здоровых лиц обнаружено значительно меньше натрия, чем в ротовой жидкости пациентов. По-видимому, увеличение секреции натрия приводит к достоверному повышению его содержания в слюне на 133% ($p < 0,0001$). Это связано с процессами реабсорбции данного элемента в протоках слюнных желез и находится под контролем гипофиза и коры надпочечников. Интересно, что содержание калия в ротовой жидкости обследованных в обеих группах не изменяется, однако, как всегда, превышает уровень в плазме крови в 4-5 раз. В отличие от калия, уровень хлорид-анионов в ротовой жидкости, основным источником которых является околоушная слюнная железа, всегда остается ниже, чем в плазме крови. Увеличение количества хлоридов в слюваобразцах пациентов составило 76% ($p < 0,0001$). Подобное изменение хлорид-анионов происходит параллельно изменению концентрации натрия, по-видимому,

отражая сдвиги кислотно-щелочного состояния и осмотического давления в организме.

Заключение. Таким образом, полученные данные молекулярного профиля ротовой жидкости позволили проанализировать у больных новой коронавирусной инфекцией особенности белкового, углеводного и минерального обменов. Наиболее выраженные изменения обнаружены при определении активности ферментов: КФК, ГГТП, ЛДГ, щелочной фосфатазы, подтверждая постулат, что многочисленные биохимические процессы в организме, как физиологические, так и патологические, обеспечиваются функционированием ферментных систем в ротовой жидкости. Кроме того, обнаружены значимые изменения показателей минерального обмена, в частности, выраженные сдвиги в содержании железа в ротовой жидкости пациентов с COVID-19, свидетельствующие об антиоксидантной недостаточности организма. Данные метаболиты могут рассматриваться как в качестве неинвазивных индикаторов выявления риска развития деструктивно-воспалительных процессов в ротовой полости, так и использоваться в качестве молекулярных маркеров, сигнализирующих о прогрессировании ковидной инфекции. В целом, полученные данные подтверждают неоспоримый факт, что человеческая слюна, представляющая собой сложный, не до конца изученный биокolloид, может быть пригодной в качестве неинвазивной диагностической жидкости для клинического применения в качестве альтернативы использования сыворотки и плазмы крови [18].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-14, 16-18
см. REFERENCES)

8. Постнова М.В., Мулик Ю.А., Новочадов В.В., Мулик А.Б., Назаров Н.О., Фролов Д.М. Ротовая жидкость как объект функционального состояния человека. *Вестник Волгоградского государственного университета*. 2011; 1 (18): 246-52.
15. Гильмиярова Ф.Н., ред. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. Учебное пособие. М.: Известия; 2006.

REFERENCES

1. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dental Clinics of North America*. 2011; 55(1): 159-78.

2. Zhang C.Z., Cheng X.Q., Li J.Y., Zhang P., Yi P., Xu X. et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Oral Science*. 2016; 8: 133-7.
3. Roblegg E. Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019; 142: 133-41.
4. Baum B.J., Yates J.R., Srivastava S., Wong D.T.W., Melvin J.E. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Adv. Dent. Res*. 2011; 2: 360-8.
5. Centers for Disease Control and Prevention Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens from persons for coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2020.
6. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P. et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27: 325-8.
7. Sexton N.R., Smith E.C., Blanc H., Vignuzzi M., Peersen O.B., Denison M.R. Homology-based identification of a mutation in the coronavirus RNA-dependent RNA polymerase that confers resistance to multiple mutagens. *Journal of Virology*. 2016; 90: 7415-28.
8. Postnova M.V., Mulik Y.A., Novochadov V.V., Mulik A.B., Nazarov N.O., Frolov D.M. Oral fluid as an object of the functional state of a person. *Vestnik VSU*. 2011; 1 (18): 246-52. (in Russian)
9. Anschau V., Sanjuan R. Fibrinogen gamma chain promotes aggregation of vesicular stomatitis virus in saliva. *Viruses*. 2020; 12(3): 282-309.
10. De Almeida P., V., Gregio A. M., Machado M. A., de Lima A. A., Azevedo L.R. Saliva composition and functions: A comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2008; 9(3): 72-80.
11. Braz-Silva H.P., Pallos D., Giannecchini S., Kai-Wang To K. SARS-CoV-2: what can saliva tell us? *Oral Diseases*. 2020. doi:doi:10.1111/odi.13365.
12. Sapkota D., Thapa S.B., Hasséus B., Jensen J.L. Saliva testing for COVID-19? *British Dental Journal – Nature*. 2020; 228: 658-9.
13. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395: 507-13.
14. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Huet Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395: 497-506.
15. Gilmiyarova F.N., ed. Analytical approaches to the study of indicators of metabolism in the oral fluid. Moscow: Izvestiya; 2006. (in Russian)
16. Baran H., Kronsteiner C., Kepplinger B. Kynurenine Aminotransferases I, II and III Are Present in Saliva. *Neurosignals*. 2020; 28(1): 1-13.
17. Cross B. W., Ruhl S. Glycan recognition at the saliva – oral microbiome interface. *Cellular Immunology*. 2018; 333: 19-33.
18. Sarkar A., Xu F., Lee S. Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases - similarities and differences. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019; 273: 102034.

Поступила 26.01.21

Принята к печати 17.02.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Кушлинский Н.Е.^{1,4}, Герштейн Е.С.^{1,4}, Чанг В.Л.², Короткова Е.А.¹, Алферов А.А.^{1,4}, Конторщиков М.М.³, Соколов Н.Ю.¹, Карамышева Е.И.⁴, Огнерубов Н.А.², Стилиди И.С.¹

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²Медицинский институт ФГБОУ ВПО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина» Министерства науки и высшего образования РФ, 392000, Тамбов, Россия;

³Приволжский исследовательский медицинский университет, 603005, Нижний Новгород, Россия;

⁴Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

Представлен анализ отдаленных результатов лечения 101 первичного больного раком желудка в различных стадиях опухолевого процесса, прослеженных на протяжении от 1 до 41 месяца (медиана – 6,4 мес) от начала специфического лечения, с учетом уровней растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови. В качестве критерия прогноза использовали показатель общей выживаемости, оцененный методом Каплана-Майера, а также с помощью регрессионной многофакторной модели Кокса. Установлено, что при высоких уровнях sPD-L1 (≥ 35 пг/мл) в плазме крови общая выживаемость больных раком желудка статистически значимо ниже, чем при уровнях маркера менее 35 пг/мл ($p < 0,045$): 1-летняя общая выживаемость при высоких и низких показателях sPD-L1 составила соответственно 78 и 96%, 2-летняя – 52 и 78%, 3-летняя – 40 и 61%. Медиана выживаемости больных с высоким уровнем маркера составила 29 месяцев, с низким – не достигнута за весь период наблюдения. Эта закономерность проявляется не только в общей группе обследованных пациентов с I-IV стадиями, но и на ранних стадиях заболевания, хотя по данным многофакторного анализа sPD-L1 не является независимым прогностическим фактором. В то же время, показатели общей выживаемости больных раком желудка не зависят от исходных уровней sPD-1 в плазме крови. Таким образом, растворимый лиганд sPD-L1 является потенциально значимым фактором прогноза выживаемости больных раком желудка, а возможно, и показателем эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии, однако эти возможности требуют дальнейшего изучения и наблюдения за пациентами.

Ключевые слова: рак желудка; sPD-1; sPD-L1; прогноз.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Чанг В.Л., Короткова Е.А., Алферов А.А., Конторщиков М.М., Соколов Н.Ю., Карамышева Е.И., Огнерубов Н.А., Стилиди И.С. Прогностическая значимость растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком желудка. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 139-146. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-139-146>

Kushlinski N.E.^{1,4}, Gershtein E.S.^{1,4}, Chang V.L.², Korotkova E.A.¹, Alferov A.A.^{1,4}, Kontorshchikov M.M.¹, Sokolov N.Yu.¹, Karamysheva E.I.⁴, Ognerubov N.A.², Stilidi I.S.¹

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SOLUBLE FORMS OF IMMUNE CHECKPOINT PD-1/PD-L1 RECEPTOR AND LIGAND IN BLOOD PLASMA OF GASTRIC CANCER PATIENTS

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

²Medical Institute of G.R. Derzhavin Tambov State University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Tambov, 392000, Russia;

³Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

⁴A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127473, Russia

Analysis of long-term treatment results of 101 primary gastric cancer patients at various stages of the tumor process followed during 1 – 41 months (median – 6,4 months) from the onset of specific treatment are presented depending on the levels of soluble forms (s) of PD-1 receptor and its ligand PD-L1 in blood plasma. Overall survival assessed by Kaplan-Meier analysis and with the help of Cox multiparametric regression model was applied as the criterion of prognostic value. It was found that at high (≥ 35 pg/ml) sPD-L1 levels in blood plasma, the overall survival of patients with gastric cancer was statistically significantly lower than at the marker's levels below 35 pg/ml ($p < 0.045$): 1-year survival comprised 78 and 96%, 2-year – 52 and 78%; 3-year – 40 and 61% at high and low sPD-L1 respectively. Median survival of patients with high plasma sPD-L1 comprised 29 months, of those with low sPD-L1 was not achieved during the whole follow-up period. This trend was observed not only in the total group of stage I-IV gastric cancer patients, but also in patients at the early stages of the disease, though sPD-L1 did not show an independent prognostic value in multiparametric model. At the same time, the overall survival of patients with gastric cancer did not depend on the baseline levels sPD-1 in blood plasma. Thus, soluble ligand sPD-L1 can be considered as a potentially valuable factor for prognosis of gastric cancer patients' survival, and, probably, of anti-PD-1/PD-L1 treatment efficiency, but further studies and patients' monitoring are required to prove this statement.

Key words: gastric cancer; sPD-1, sPD-L1, prognosis.

For citation: Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Chang V.L., Korotkova E.A., Alferov A.A., Kontorshchikov M.M., Sokolov N.Yu., Karamysheva E.I., Ognerubov N.A., Stilidi I.S. Prognostic significance of soluble forms of immune checkpoint PD-1/PD-L1 receptor and ligand in blood plasma of gastric cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 139-146 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-139-146>

For correspondence: *Kushlinskii Nikolay Evgenievich*, Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Kushlinskii N.E., ORCID 0000-0002-3898-4127;
Gershtein E.S., ORCID 0000-0002-3321-801X;
Chang V.L., ORCID 0000-0003-3585-5693;
Korotkova E.A., ORCID 0000-0002-2509-5232;
Alferov A.A., ORCID 0000-0003-3585-5693;
Kontorshchikov M.M., ORCID 0000-0002-0262-5448;
Sokolov N.Yu., ORCID 0000-0002-0706-9575;
Karamysheva E.I., ORCID 0000-0001-8791-5358;
Ognerubov N.A., ORCID 0000-0003-4045-1247;
Stilidi I.S., ORCID 0000-0002-0493-1166.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.02.2021
Accepted 01.03.2021

Введение. Остается неоспоримым тот факт, что у онкологических больных нарушения молекулярно-биологических процессов, в том числе и связанных с подавлением противоопухолевого иммунитета, лежат в основе неограниченной клеточной пролиферации, инвазии и метастазирования. Одним из перспективных направлений исследований в клинической онкологии считается изучение молекулярных механизмов иммуносупрессивного эффекта злокачественных опухолей и возможностей его преодоления [1, 2]. Известно, что в регуляции противоопухолевого иммунитета у онкологических больных важную роль играют контрольные точки иммунитета, при этом опухолевые клетки используют различные пути подавления противоопухолевого иммунитета [3]. Одним из ключевых считают путь PD-1/PD-L1, который не только контролирует избыточную иммунную активацию в здоровом организме, но также используется опухолевыми клетками для уклонения от иммунного ответа [4, 5]. Основными компонентами сигнального пути PD-1/PD-L1 являются белок программируемой клеточной гибели PD-1 (programmed cell death protein 1) и два его лиганда PD-L1 и PD-L2. Из лигандов наиболее значим PD-L1, известный также как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1 типа (B7-H1), который принадлежит к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток и экспрессируется на их поверхности [6, 7].

Активация пути PD-1/PD-L1 может привести к усилению роста опухоли, включая толерантность, апоптоз и истощение T-клеток, а также повышение иммуносупрессии T-регуляторами, что позволяет клетке уйти от иммунного ответа. При этом большим достижением за последние два десятилетия считают разработку и клиническое применение ингибиторов контрольных точек иммунитета. В частности, моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1, предотвращающие их взаимодействие друг с другом и ингибирующие иммуносупрессивные эффекты опухолей, находят применение в терапии онкологических заболеваний: при меланоме [8], почечно-клеточной карциноме [1, 9], раке легкого [10], раке яичников [11]. В связи с этим, экспрессию PD-1 и/или PD-L1 в опухолях и ингибирующую опухоль лимфо-

цитах активно изучают иммуногистохимическими методами в качестве мишени и критерия чувствительности к анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапии [12].

Пристальный интерес исследователей привлекают растворимые формы рецептора (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), обнаруженные относительно недавно в периферической крови, в том числе, и у онкологических больных [13-21]. Происхождение sPD-1 и sPD-L1 точно не установлено. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что sPD-L1 образуется преимущественно в результате протеолитического отщепления внеклеточной части трансмембранного белка, тогда как sPD-1 – в результате альтернативного сплайсинга соответствующей мРНК. В экспериментальных исследованиях показана способность sPD-1 подавлять активность PD-1/PD-L1(2) пути, блокируя связывание находящегося на опухолевых клетках лиганда с мембранным рецептором T-лимфоцитов. sPD-L1 также способен снизить активность PD-1/PD-L1(2) пути, блокируя рецептор, но, по некоторым данным, может также стимулировать апоптоз T-лимфоцитов, аналогично мембранному белку, т.е. подавлять противоопухолевый иммунитет [6].

Уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке и плазме крови исследуют в качестве показателей чувствительности к анти-PD-1/PD-L1 терапии и мониторинга ее эффективности, а также как маркеры клинического течения и оценки общего прогноза заболевания у онкологических пациентов. Это направление исследований активно развивается в последние годы, в том числе у больных раком желудка [14, 21-23].

В проведенном нами ранее сравнительном иммуноферментном исследовании обнаружено, что уровень растворимого лиганда sPD-L1 в плазме крови общей группы больных раком желудка не отличается от показателей здоровых доноров, но статистически значимо возрастает по мере увеличения распространенности опухолевого процесса, при уменьшении степени дифференцировки аденокарциномы желудка и при перстневидноклеточном раке, характеризующемся высоко агрессивным течением [22]. Таким образом, повышение уровня данного маркера характерно для пациентов с прогностически

неблагоприятными клиническими и морфологическими показателями. Это также соответствует результатам нескольких исследований, продемонстрировавших снижение общей выживаемости больных раком желудка при высоких уровнях sPD-L1, циркулирующего в периферической крови [21, 24]. Мы установили также, что и при некоторых других типах опухолей (рак почки [18, 19a], рак яичников [15, 16], саркомы костей [20]) sPD-L1 связан с клинико-морфологическими особенностями заболевания.

В пилотном исследовании К.Андо и соавт. [23] показали, что уровень sPD-L1 в плазме крови может служить маркером эффективности анти-PD-1 терапии. В то же время, нами выявлено, что уровень рецептора sPD-1 в плазме крови больных раком желудка был статистически значимо ниже, чем в контроле и не зависел от основных клинико-морфологических характеристик заболевания: стадии опухолевого процесса, гистологического строения и степени дифференцировки опухоли [22]. Данных о прогностической значимости sPD-1 при раке желудка до настоящего времени не опубликовано.

Цель исследования: анализ прогностической значимости sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови первичных больных раком желудка.

Материал и методы. Проанализированы отдаленные результаты лечения 101 пациента с впервые выявленным раком желудка в различных стадиях заболевания в возрасте от 25 до 81 лет (66 мужчин, 35 женщин). Все пациенты обследованы и получали лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ и в Тамбовском областном онкологическом клиническом диспансере.

Клинико-рентгенологический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологического исследования опухоли и регионарных лимфоузлов согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). Опухоль поражала различные отделы желудка: у 46% пациентов локализовалась в теле, у 20% – в проксимальном, у 19% в дистальном отделе; тотальное поражение органа выявлено у 19% больных, и у 3% диагностирован кардиоэзофагеальный рак. У половины обследованных (51 наблюдение) обнаружена низкодифференцированная аденокарцинома, у 18 – умереннодифференцированная, у 9 – высокодифференцированная; у 21 выявлен перстневидноклеточный рак желудка и у 2 – недифференцированный рак. Пациенты были в различных стадиях опухолевого процесса: IA – 16, IB – 6, IIA – 8, IIB – 8, IIIA – 10, IIIB – 12, IIIC – 11, у 30 больных выявлена IV стадия. Больным выполнены различные варианты операций: проксимальная резекция желудка – 5, дистальная резекция желудка – 29, гастрэктомия – 50, паллиативная лапаротомия – 2, ревизионная лапароскопия – 15. Неoadъювантную полихимиотерапию получали 5 пациентов, адъювантную полихимиотерапию – 32; схемы полихимиотерапии: DCF – 1 (3,1%), FLOT – 3 (9,4%), FOLFOX – 3 (9,4%), XELOX – 24 (75%), капецитабин (в монорегиме) – 1 (3,1%) больной.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике (с ЭДТА) до начала лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа «Human PD-L1 Platinum ELISA» и «Human PD-1 ELISA kit» (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями про-

изводителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и SPSS 20. Общую выживаемость больных раком желудка рассчитывали методом Каплана-Майера с оценкой достоверности различий с помощью log-rank теста, а также с помощью регрессионной многофакторной модели Кокса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Пациенты прослежены на протяжении от 1 до 41 мес (медиана – 6,4 месяца). В качестве критерия использовали показатель общей выживаемости. За весь период наблюдения от основного диагноза умерли 20 больных, что составило 20% от общего числа обследованных пациентов. Продолжительность жизни умерших больных составила от 1 до 31 мес (медиана – 14,1 месяца). Еще два пациента умерли через несколько месяцев после операции не от основного онкологического заболевания: один от острого инфаркта миокарда, второй – от геморрагического инсульта головного мозга. Эти два пациента были исключены из общей группы при анализе показателей общей выживаемости больных раком желудка.

Выбор пороговых значений для оценки влияния уровней sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови на общую выживаемость проводили на основании данных о содержании этих белков в плазме крови больных раком желудка, опубликованных нами ранее [22]. На первом этапе анализа в качестве таковых рассматривали показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей в общей группе пациентов. Для sPD-L1 они составили 24,6; 10,1 и 71,9 пг/мл; для sPD-1 – 11,8; 7,61 и 19,7 пг/мл соответственно. Статистически значимых различий общей выживаемости при данных пороговых уровнях выявлено не было.

Для растворимой формы лиганда sPD-L1 удалось подобрать пороговый уровень – 35 пг/мл, при котором наблюдается статистически значимое различие общей выживаемости в общей группе больных. В подгруппу с высоким уровнем маркера (≥ 35 пг/мл) попали 39 пациентов, с низким (< 35 пг/мл) – 60 пациентов. Показатели общей выживаемости больных раком желудка с учетом уровня sPD-L1 в плазме крови представлены на рис. 1.

Общая выживаемость пациентов с высоким уровнем маркера была статистически значимо ниже, чем у пациентов с низким содержанием sPD-L1 в плазме крови ($p < 0,045$). Эта закономерность прослеживалась на протяжении 3-летнего срока наблюдения. Так, 1-летняя общая выживаемость при высоких и низких показателях sPD-L1 составила соответственно 78 и 96%; 2-летняя – 52 и 78%; 3-летняя – 40 и 61%. При этом медиана выживаемости больных с высоким уровнем маркера составила 29 мес, с низким – не достигнута за весь период наблюдения.

Для растворимого рецептора sPD-1 не удалось подобрать пороговый уровень, позволяющий статистически значимо разделить пациентов на группы с благоприятным и неблагоприятным прогнозом. Наибольшие различия (преимущественно в период от 1 до 2 лет наблюдения) отмечены при использовании в качестве порогового значения медианы уровня маркера, равной 11,8 пг/

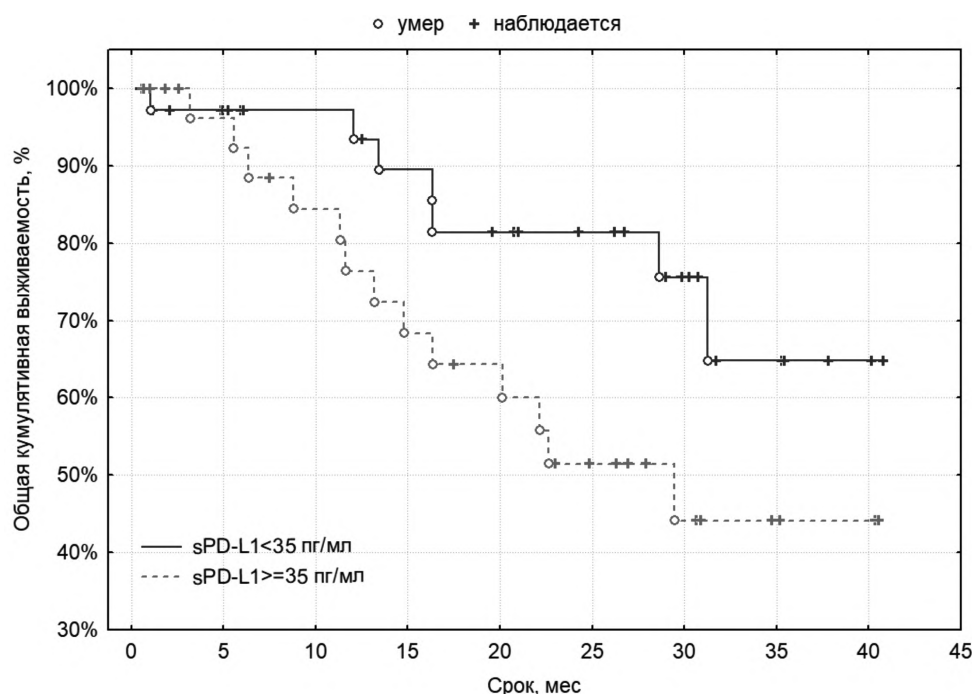


Рис. 1. Общая выживаемость больных раком желудка с учетом уровней sPD-L1 в плазме крови.

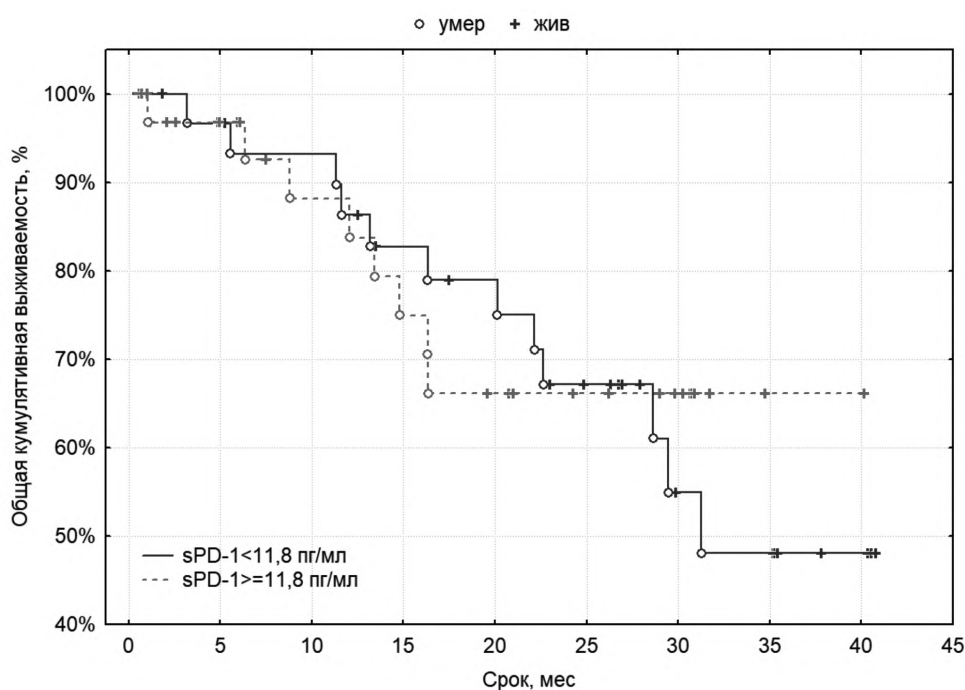


Рис. 2. Общая выживаемость больных раком желудка с учетом уровней sPD-1 в плазме крови.

мл (рис. 2; $p=0,76$). В группы с высоким ($\geq 11,8$ пг/мл) и низкими ($< 11,8$ пг/мл) показателями вошли соответственно 50 и 49 пациентов (рис. 2).

Наибольшие различия (15%) отмечены через 17-20 мес наблюдения: 76-80% у больных с низким и 65% у больных с высоким уровнем маркера. После 29 месяцев наблюдения выживаемость пациентов с высоким уровнем маркера не меняется, а у больных с уровнем sPD-1 $< 11,8$ пг/мл начинает снижаться, и их 3-летняя выживаемость составляет 47%, медиана выживаемости – 31 месяц.

Ранее нами было показано, что уровень sPD-L1 в плазме крови больных раком желудка статистически значимо возрастает по мере увеличения распространенности опухолевого процесса, в первую очередь, стадии заболевания (с 10,1 пг/мл при IA до 71,6 пг/мл при IIIС) [22]. В связи с этим представлялось важным оценить, сохраняется ли прогностическое значение показателя sPD-L1 на начальных (I-II) стадиях рака желудка, или оно связано с преобладанием больных с распространенным процессом в подгруппе с высоким уровнем маркера.

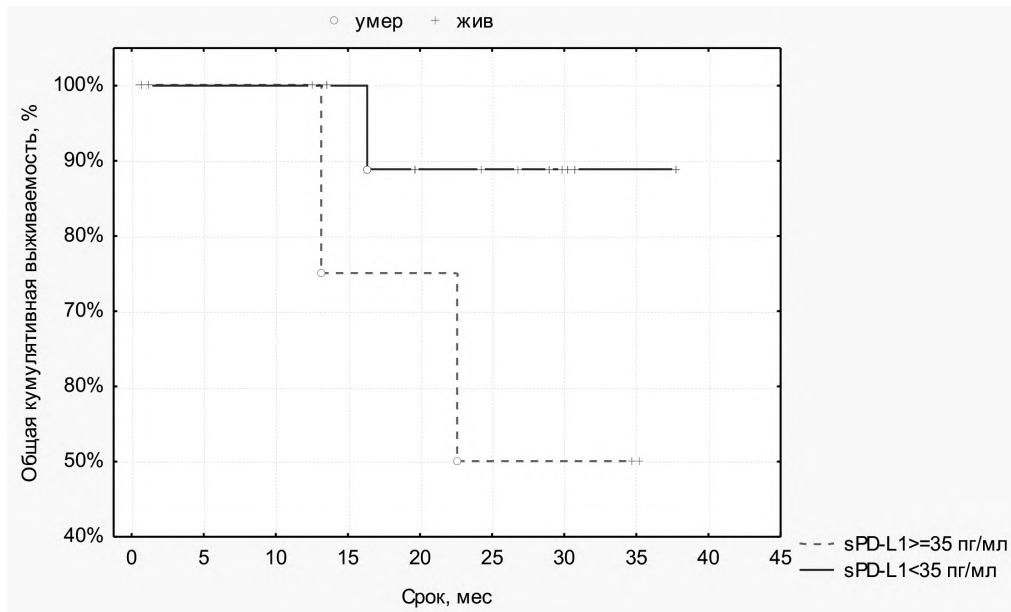


Рис. 3. Общая выживаемость больных раком желудка с I-II стадиями с учетом уровней sPD-L1 в плазме крови.

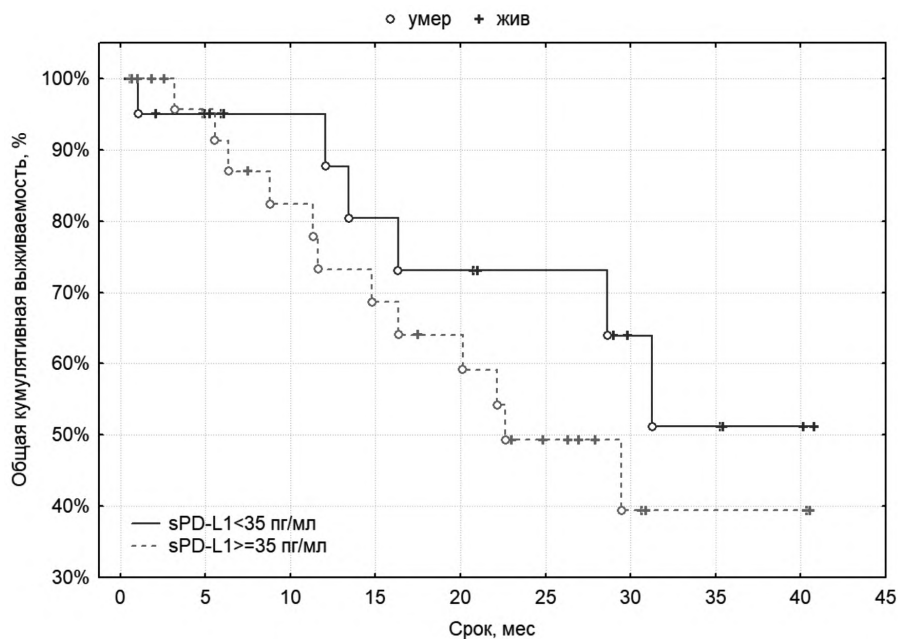


Рис. 4. Общая выживаемость больных раком желудка с III-IV стадиями с учетом уровней sPD-L1 в плазме крови.

При использовании выбранного ранее порогового значения sPD-L1 равного 35 пг/мл в подгруппу с высоким уровнем маркера (≥ 35 пг/мл) вошли 9, а в подгруппу с низким уровнем (< 35 пг/мл) – 27 больных с I-II стадиями. За весь период наблюдения умерли 3 больных с I-II стадиями. Как и в общей группе, общая выживаемость больных с I-II стадиями рака желудка и высоким уровнем sPD-L1 в плазме крови была ниже, чем у больных с низкими показателями маркера, но различие не достигало уровня статистической значимости (рис. 3; $p=0,109$).

Тенденция к ухудшению общей выживаемости при высоких показателях sPD-L1 в плазме крови проявилась и у больных с распространенными III-IV стадиями рака

желудка: 3-летняя общая выживаемость составила 38% и 51% соответственно, но различие также не достигало уровня статистической значимости (рис. 4; $p=0,3$).

Для растворимого рецептора sPD-1 отмечена парадоксальная тенденция к улучшению общей выживаемости больных с I-II стадиями при высоком ($\geq 11,8$ пг/мл) уровне маркера: все пациенты (21) были живы в течение всего срока наблюдения, тогда как 3-летняя общая выживаемость 18 больных с sPD-1 $< 11,8$ пг/мл составила 68% (рис. 5; $p=0,095$).

По данным регрессионного многофакторного анализа, включавшего основные клинико-морфологические факторы: стадию заболевания, показатели распространенности по системе TNM, гистологическое строение,

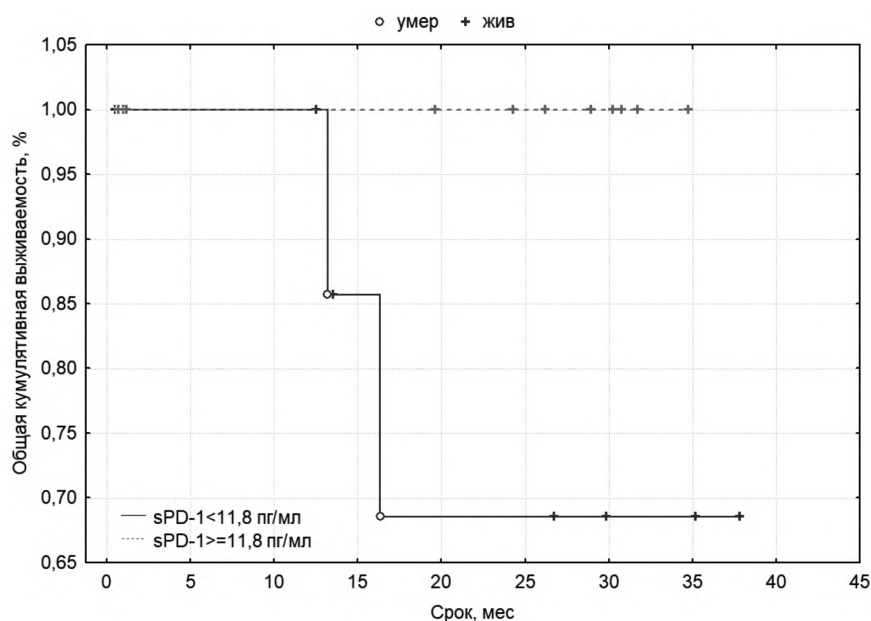


Рис. 5. Общая выживаемость больных раком желудка с I-II стадиями с учетом уровней sPD-1 в плазме крови.

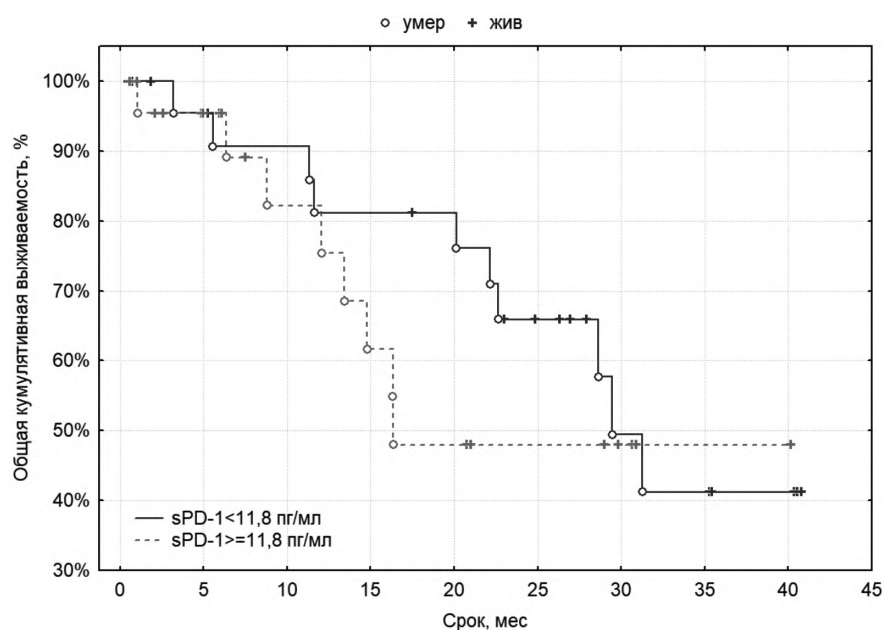


Рис. 6. Общая выживаемость больных раком желудка с III-IV стадиями с учетом уровней sPD-1 в плазме крови.

степень дифференцировки и локализацию опухоли, а также уровни sPD-L1 и sPD-1 в плазме крови, независимым фактором прогноза рака желудка оказался только критерий распространенности первичной опухоли T системы TNM ($p=0,0006$).

В целом, на основании результатов данного исследования и проведенного нами ранее [22] анализа взаимосвязи уровней растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка, можно констатировать, что именно sPD-L1, но не sPD-1, является потенциально значимым фактором, связанным и прогнозом клинического течения заболевания. Неблагоприятным следует считать прогноз общей выживаемости больных раком желудка при концентрациях sPD-L1 в плазме кро-

ви, превышающих 35 пг/мл. Эта закономерность проявляется не только в общей группе обследованных больных раком желудка с I-IV стадиями опухолевого процесса, но и в начальных I-II стадиях заболевания, хотя по данным многофакторного анализа sPD-L1 не является независимым прогностическим фактором. Полученные результаты согласуются с результатами T.Shigemori и соавт. [21], показавшими, что больные раком желудка с высоким уровнем маркера имели худшие показатели выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости.

Взаимосвязь sPD-L1 с прогнозом выживаемости больных раком желудка, возможно, объясняется тем, что этот маркер обнаружен на поверхности различных клеточных линий с мембранно-связанными формами mPD-1/PD-L1,

при этом генерировать sPD-L1 могут не только опухолевые клетки, но и опухолевое микроокружение, включая неопухолевые и иммунные клетки [26, 27]. Высокий уровень mPD-L1 имеют активированные Т-клетки и миелоидные клетки, но выделение sPD-L1 – способность популяции миелоидных клеток. Можно предположить также, что растворимый лиганд, также как его мембранная форма, блокирует PD-1 на поверхности лимфоцитов, подавляя противоопухолевый иммунитет.

Наиболее актуальным и перспективным, на наш взгляд, является вопрос о возможности использования уровней sPD-L1 и/или sPD-1 для оценки эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии или предсказания чувствительности к такому лечению. Больные раком желудка, вошедшие в данное исследование, иммунотерапию не получали, однако иммунотерапевтические агенты, которые могут усилить иммунный ответ или уменьшить иммуносупрессию, в настоящее время крайне актуальны для лечения злокачественных опухолей.

Растворимые формы sPD-1 и sPD-L1 обнаружены в плазме крови онкологических больных относительно недавно, и их клиническая значимость в прогнозе эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии почти не изучена. В то же время, у больных немелкоклеточным раком легкого отмечено изменение концентрации sPD-1 в крови после начала введения эрлотиниба, при этом, у больных с повышенным уровнем sPD-1 во время терапии эрлотинибом отмечено удлинение показателей выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости [27]. K. Ando и соавт. [23] для оценки функции и клинического значения sPD-L1 определяли уровень маркера у больных раком желудка после проведения анти-PD-1 терапии и показали, что уровень sPD-L1 до начала лечения не был связан с общей выживаемостью пациентов. Однако авторы отметили уменьшение концентрации маркера в плазме крови, которое статистически значимо коррелировало с регрессией опухоли у пациентов после 4 циклов лечения.

Таким образом, результаты настоящего исследования в совокупности с данными литературы позволяют предполагать, что растворимый лиганд sPD-L1 является потенциально значимым фактором прогноза выживаемости больных раком желудка, а возможно, и показателем эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии, однако эти возможности требуют дальнейшего изучения и наблюдения за пациентами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-14, 17,18, 21, 23-27
см. REFERENCES)

1. Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Морозов А.А., Герштейн Е.С., Кадагидзе З.Г., Матвеев В.Б. Современные подходы к иммунотерапии рака почки. *Онкоурология*. 2018; 14(2): 54-67.
2. Набережнов Д.С., Морозов А.А., Фридман М.В., Алферов А.А., Базаев В.В., Кушлинский Н.Е. Система PD-1/PD-L1 при иммунотерапии рака почки. Часть 1. Сигнальный путь PD-1/PD-L1, его роль в иммунной системе и иммунотерапии. *Медицинский алфавит*. 2018; 2(29): 22-31.
3. Кадагидзе З.Г., Чертова А.И., Заботина Т.Н., Хуламханова М.М., Кушлинский Н.Е. CTLA-4, PD-1/PD-L1 негативные регуляторы Т-клеточного иммунитета в терапии рака яичников. *Онкогинекология*. 2019; 2(30): 4-15.

15. Герштейн Е.С., Уткин О.Д., Горячева И.О., Хуламханова М.М., Петрикова Н.А., Виноградов И.И., Алферов А.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников. *Альманах клинической медицины*. 2018; 46(7): 690-8.
16. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Уткин Д.О., Петрикова Н.А., Кушлинский Д.Н., Шабанов М.А., Хуламханова М.М., Ашрафян Л.А., Стилиди И.С. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции. *Акушерство и гинекология*. 2020; 6: 80-8.
19. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Казанцева И.А., Базаев В.В., Матвеев В.Б. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019; 15(1):15-22.
20. Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Булычева И.В., Тимофеев Ю.С., Короткова Е.А., Хван О.Т., Кузьмин Ю.Б., Кузнецов И.Н., Бондарев А.В., Щупак М.Ю., Соколов Н.Ю., Ефимова М.М., Герштейн Е.С., Сушенцов Е.А., Алиев М.Д., Мусаев Э.Р. Сравнительный анализ уровней растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 669-75.
22. Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Чанг В.Л., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Соколов Н.Ю., Поликарпова С.Б., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 347-52.

REFERENCES

1. Kushlinskii N.E., Fridman M.V., Morozov A.A., Gershtein E.S., Kadagidze Z.G., Matveev V.B. Modern approaches to the immunotherapy of kidney cancer. *Onkourologiya*. 2018; 14 (2): 54-67. (in Russian)
2. Naberezhnov D.S., Morozov A.A., Fridman M.V., Alferov A.A., Bazaev V.V., Kushlinskii N.E. Система PD-1/PD-L1 system in the immunotherapy of kidney cancer Part 1. PD-1/PD-L1 signaling pathway, its role in immune system and immunotherapy. *Meditsinskiy alfavit*. 2018; 2(29): 22-31. (in Russian)
3. Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N., Khulamkhanova M.M., Kushlinskii N.E. CTLA-4, PD-1/PD-L1 negative regulators of T-cell immunity in the therapy of ovarian cancer. *Onkoginekologiya*. 2019; 2(30): 4-15. (in Russian)
4. Hamanishi J., Konishi I. Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal – a new treatment strategy for cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2014; 41(9):1071–6.
5. Mahoney K.M., Freeman G.J., McDermott D.F. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin. Ther.* 2015; 37(4):764–82.
6. Youngnak P., Kozono Y., Kozono H., Iwai H., Otsuki N., Jin H. et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 307(3):672–7.
7. Xing Y.F., Zhang Z.L., Shi M.H., Ma Y., Chen Y.J. The level of soluble programmed death-1 in peripheral blood of patients with lung cancer and its clinical implications. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2012; 35(2):102–6.
8. Yun S., Vincelette N.D., Green M.R., Wahner Hendrickson A.E., Abraham I. Targeting immune checkpoints in unresectable metastatic cutaneous melanoma: a systematic review and metaanalysis of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 agents trials. *Cancer Med*. 2016; 5(7):1481-91.
9. Massari F., Santoni M., Ciccarese C., Santini D., Alfieri S., Martignoni G. et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treat. Rev.* 2015; 41(2):114-21.
10. Sacher A.G., Gandhi L. Biomarkers for the Clinical Use of PD1/PD-L1 Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 2016; 2(9):1217-22.

11. Inayama Y., Hamanishi J., Matsumura N., Murakami R., Abiko K., Yamaguchi K. et al. Antitumor Effect of Nivolumab on Subsequent Chemotherapy for Platinum Resistant Ovarian Cancer. *Oncologist*. 2018; 23(11):1382-4.
12. Yuasa T., Masuda H., Yamamoto S., Numao N., Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int. J. Clin. Oncol*. 2017; 22(4):629-34.
13. Ding Y., Sun C., Li J., Hu L., Li M., Liu J., Pu L., Xiong S. The Prognostic Significance of Soluble Programmed Death Ligand 1 Expression in Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scand. J. Immunol*. 2017; 86(5):361-7.
14. Zhu X., Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(57):97671-82.
15. Gershtein E.S., Utkin O.D., Goriacheva I.O., Khulamkhanova M.M., Petrikova N.A., Vinogradov I.I., Alferov A.A., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. Soluble forms of immune checkpoint receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in plasma of patients with ovarian neoplasms. *Almanakh klinicheskoy meditsiny*. 2018; 46(7): 690-8. (in Russian)
16. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Utkin D.O., Petrikova N.A., Kushlinskii D.N., Shabanov M.A., Khulamkhanova M.M., Ashrafian L.A., Stilidi I.S. Signaling pathway components of immune checkpoint PD-1/PD-L1 in blood plasma of patients with ovarian cancer and benign ovarian tumors: clinical and morphological correlations. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2020; 6:80-8. (in Russian)
17. Wei W., Xu B., Wang Y., Wu C., Jiang J., Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(3):e9617.
18. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Morozov A.A., Goryacheva I.O., Filipenko M.L., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Bazaev V.V., Kazantseva I.A. Soluble Ligand of the Immune Checkpoint Receptor (sPD-L1) in Blood Serum of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2019a; 166(3):353-7.
19. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryacheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Kazantseva I.A., Bazaev V.V., Matveev V.B. Soluble forms of the immune check-point receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and pathologic correlations. *Onkourologiya*. 2019; 15(1):15-22. (in Russian)
20. Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Boulytcheva I.V., Timofeev Yu.S., Korotkova E.A., Khvan O.T., Kuzmin Yu.B., Kuznetsov I.N., Bondarev A.V., Shchupak M.Yu., Sokolov N.Yu., Efimova M.M., Gershtein E.S., Sushentsov E.A., Aliev M.D., Musaev E.R. Comparative analysis of the levels of soluble forms of receptor and ligand of the immunity control point PD-1 / PD-L1 in the blood serum of patients with typical bone osteosarcoma and chondrosarcoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 669-75. (in Russian)
21. Shigemori T., Toiyama Y., Okugawa Y., Yamamoto A., Yin C., Narumi A. et al. Soluble PDL1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression. *Ann. Surg. Oncol*. 2019; 26(3):876-83.
22. Gershtein E.S., Ognerubov N.A., Chang V.L., Delektorskaya V.V., Korotkova E.A., Sokolov N.Yu., Polikarpova S.B., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. The content of the soluble forms PD-1 and PD-L1 in blood serum of patients with gastric cancer and their relationship with clinical and morphological characteristics of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (6): 347-52. (in Russian)
23. Ando K., Hamada K., Watanabe M., Ohkuma R., Shida M., Onoue R. et al. Plasma Levels of Soluble PD-L1 Correlate With Tumor Regression in Patients With Lung and Gastric Cancer Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *Anticancer Res*. 2019; 39(9):5195–5201.
24. Takahashi N., Iwasa S., Sasaki Y., Shoji H., Honma Y., Takashima A. et al. Serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 as a prognostic factor on the first-line treatment of metastatic or recurrent gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2016; 142(8):1727-38.
25. Shi M.H., Xing Y.F., Zhang Z.L., Huang J.A., Chen Y.J. Effect of soluble PD-L1 released by lung cancer cells in regulating the function of T lymphocytes. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013; 35(2):85–8.
26. Nagato T., Ohkuri T., Ohara K., Hirata Y., Kishibe K., Komabayashi Y. et al. Programmed deathligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother*. 2017; 66(7):877–90.
27. Sorensen S.F., Demuth C., Weber B., Sorensen B.S., Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*. 2016; 100:77–84.

Поступила 01.02.2021

Принята к печати 01.03.2021

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Блиндарь В.Н., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н., Зубрихина Г.Н., Нестерова Ю.А., Давыдова Т.В., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Кононенко И.Б., Снеговой А.В.

РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 И ГЕПСИДИНА-25 В ПАТОГЕНЕЗЕ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА, АССОЦИИРОВАННОГО СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

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

Исследование интерлейкина-6 (ИЛ-6), гепсидина 25 (ГП-25) проведено у 22 пациенток, больных раком молочной железы до неoadьювантной химиотерапии и у 27 здоровых женщин контрольной группы. У пациенток с РМЖ выявлена значительная экспрессия белка ГП-25, по сравнению с контролем. Показатели были высокими как у пациенток с анемическим синдромом (АС), так и без него ($p < 0,01$). Латентный дефицит железа, АС, ЖДА и функциональный дефицит железа (ФДЖ) чаще выявлялись у пациенток с III стадией заболевания. Отмечено значительное различие по параметрам ГП-25 и ИЛ-6, показатели были выше у пациенток с III стадией ($p < 0,01$). Не выявлено тесной корреляционной связи между ИЛ-6, ГП-25 и другими острофазными белками (ФР, СРБ) на начальных этапах формирования АС. Напротив, отмечалась положительная корреляционная связь у пациенток с ЖДА и ФДЖ между ИЛ-6 и всеми острофазными белками (ГП-25, ФР, СРБ). Однако небольшое число наблюдений не позволяют сделать однозначное заключение о роли экспрессии ИЛ-6 и ГП-25 в развитии АС онкологических больных РМЖ и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: онкологические больные; анемия; интерлейкин-6; гепсидин-25; ферритин; растворимые рецепторы трансферрина; С-реактивный белок.

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н., Зубрихина Г.Н., Нестерова Ю.А., Давыдова Т.В., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Кононенко И.Б., Снеговой А.В. Роль интерлейкина-6 и гепсидина 25 в патогенезе анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными новообразованиями у онкологических больных до неoadьювантной химиотерапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 147-153.
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153>

Blindar V.N., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N., Zubrikhina G.N., Nesterova Yu.A., Davydova T.V., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Kononenko I. B., Snegovoy A.V.

THE ROLE OF INTERLEUKIN-6 AND HEPcidIN-25 IN THE PATHOGENESIS OF ANEMIC SYNDROME ASSOCIATED WITH MALIGNANT NEOPLASMA IN ONCOLOGIC PATIENTS WITH BREAST CANCER BEFORE NEOADYUVANT CHEMOTERAPY

FSBI «National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhin» Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow, Russia

A study of interleukin-6 (IL-6), hepcidin-25 (GP-25) was conducted in 22 patients with breast cancer before neoadjuvant chemotherapy and in 27 healthy women in the control group. Significant expression of the GP-25 protein was revealed in breast cancer patients, compared to control. The rates were high both in patients with anemic syndrome (AS) and without it ($p < 0.01$). Latent iron deficiency, AS, IDA and functional iron deficiency (FJ) were more often detected in patients with stage III disease. A significant difference in the parameters of GP-25 and IL-6 was noted, the indicators were higher in patients with stage III ($p < 0.01$). No close correlation was found between IL-6, GP-25 and other acute-phase proteins (FR, CRP) at the initial stages of AS formation. On the contrary, a positive correlation was observed in patients with IDA and FJ between IL-6 and all acute-phase proteins (GP-25, FR, CRP). However, a small number of observations do not allow an unambiguous conclusion about the role of IL-6 and GP-25 expression in the development of AS in cancer patients with breast cancer and requires further study.

Key words: cancer patients; anemia; interleukin-6; hepcidin-25; ferritin; soluble transferrin receptors; C-reactive protein.

For citation. Blindar V.N., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N., Zubrikhina G.N., Nesterova Yu.A., Davydova T.V., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Kononenko I. B., Snegovoy A.V. The role of interleukin-6 and hepcidin 25 in the pathogenesis of anemic syndrome associated with malignant neoplasms with breast cancer patients before neoadjuvant chemotherapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66(3): 147-153 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153>

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

Information about authors:

Blindar V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>;
Dobrovolskaya M.M., <https://orcid.org/0000-0002-8889-5384>;
Khagazheeva M.N., <https://orcid.org/0000-0002-3744-6802>;

Zubrikhina G.N., <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>;
Nesterova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-5420-9120>;
Davydova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-5769-3114>;
Lyubimova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;
Kononenko I. B., <https://orcid.org/0000-0002-7142-2986>;
Snegovoy A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 01.08.2020
Accepted 01.09.2020

Введение. Известно, что интерлейкин-6 (ИЛ-6) является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления. ИЛ-6 – гликопротеид с молекулярной массой 19-24 кДа. В 1985 г. многофункциональный цитокин ИЛ-6 был впервые идентифицирован как секретлируемый Т-клетками фактор, вызывающий конечную дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие антитела [1]. В настоящее время установлено, что ИЛ-6 синтезируется как нормальными, так и опухолевыми клетками. Из литературных источников известно, что ИЛ-6 может продуцироваться опухолевыми клетками различного гистогенеза. Несколько исследований показывают, что оцениваемый ИЛ-6 связан со многими типами опухолей, такими, как рак молочной железы (РМЖ), колоректальный рак, рак легких, рак яичников и лимфомы [8-12]. Ряд авторов считают, что показатели ИЛ-6 коррелируют с агрессивным ростом опухоли и ответом на терапию при многих типах рака [13-16]. Показана возможность использования ИЛ-6 в качестве маркера агрессивности течения рака яичников. ИЛ-6 может способствовать канцерогенезу через несколько механизмов, включая апоптоз, выживание, пролиферацию, ангиогенез, инвазивность, метастазирование и метаболизм опухолевых клеток [17,18]. Образующие противоопухолевые антитела блокируют антигены опухолевых клеток и рецепторы Т-киллеров, защищая опухолевую клетку от разрушения. Одной из основных функций ИЛ-6 является стимуляция синтеза ДНК, что приводит к активации процессов пролиферации в опухоли [19]. Ряд авторов сообщили в своем исследовании, что в подавляющем большинстве случаев опухолевая прогрессия у пациенток РМЖ сопровождается увеличением уровня ИЛ-6. Есть предположение, что при РМЖ ИЛ-6 стимулирует экспрессию эстрогенов и, соответственно, усиливает пролиферацию опухолевых клеток [20]. И это подтверждается тем, что в подавляющем большинстве случаев опухолевая прогрессия при РМЖ сопровождается увеличением сывороточного уровня ИЛ-6 [19,20]. Пациенты с высоким уровнем ИЛ-6 обычно ассоциируются с плохим прогнозом и более короткой выживаемостью, в то время как более низкий уровень ИЛ-6 связан с лучшим ответом на терапию [21, 22].

Кроме того, значительная продукция ИЛ-6 индуцирует экспрессию гепатоцитами железорегуляторного гормона гепсидина (ГП-25). ГП-25, в свою очередь, может способствовать развитию железодефицитного эритропоэза (ЖДЭ) у онкологических больных.

ГП-25, пептидный гормон, синтезируемый преимущественно печенью, являющийся главным регулятором потребления железа и поддержания гомеостаза железа в организме. Кодированный геном НАМР в хромосоме

19 ГП-25 синтезируется как пропептид, состоящий из 84 аминокислот [23]. В кровотоке ГП-25 секретируется в виде биоактивного пептидного гормона, состоящего из 25 аминокислот [14, 24-26]. Данный гормон был впервые обнаружен и описан в 2001 г. как антибактериальный пептид (Hepcidin Antimicrobial Peptide), способный повреждать мембрану бактерий. Впоследствии установлено, что ГП-25 является отрицательным регулятором абсорбции железа в кишечнике и его мобилизации из депо, тем самым выполняя свою основную биологическую функцию – снижение уровня железа в кровеносном русле [23-26]. ГП-25 индуцирует деградацию ферропортина, основного клеточного транспортера железа. Избыток ГП-25 блокирует экспорт железа из клеток, таких как макрофаги и энтероциты. ГП-25 также негативно регулируется эритропоэтическими сигналами. В настоящее время считают, что предшественники эритроцитов продуцируют эритроферрон (ERFE) в ответ на эритропоэтин (ЭПО). ERFE затем выступает посредником снижения уровня ГП-25 в гепатоцитах через неизвестные пути. Другие факторы могут также контролировать экспрессию ГП-25 в печени, такие, как гормоны, факторы роста, гепарины и ЭПО. Параллельно с тем, что уровень ГП-25 контролируется ЭПО, низкие концентрации кислорода также приводят к уменьшению синтеза ГП-25. Известно, что в условиях низкого уровня кислорода стимулируется продукция эритроцитов, что приводит к повышенному спросу на железо [27]. Следует отметить, что у онкологических больных источником ГП-25 могут быть сами опухолевые клетки. Повышенная экспрессия ГП-25 в периферической крови при злокачественных новообразованиях сопровождается увеличением локальной мРНК. В свою очередь, ГП-25 предотвращает экспорт железа посредством деградации ферропортина и увеличивает пул железа в опухолевых клетках, помогая им выживать и размножаться [28].

Анемический синдром (АС) онкологических больных – это сложный симптомокомплекс. В процессе развития опухолевого процесса АС претерпевает различные модификации, связанные с дисбалансом провоспалительных цитокинов. Считают, что в результате гиперэкспрессии ГП-25, под воздействием ИЛ-6, блокируется основной клеточный транспортер железа ферропортин. Железо не поступает к эритроцитам костного мозга, развивается сначала ЖДА, затем железодефицитный эритропоэз (ЖДЭ) и, далее, функциональный дефицит железа (ФДЖ). Важно дифференцировать различные варианты АС, так как лечение принципиально отличается. Терапевтическое воздействие на ИЛ-6 и ГП-25 – многообещающий метод для коррекции патологической экспрессии этих белков. Существует несколько

ко подходов увеличить или уменьшить эффекты ИЛ-6 и ГП-25 *in vitro* и *in vivo*. Основываясь на этих подходах, разрабатывается ряд препаратов, способных влиять на уровень ИЛ-6 и ГП-25.

В настоящее время считают, что одним из наиболее перспективных будущих направлений для применения модуляторов ГП-25, может быть терапия онкологических заболеваний. Хотя роль ГП-25 в стимуляции роста раковых клеток все еще изучается, однако, как обсуждалось ранее, экспрессия ГП-25 при ряде онкологических заболеваний, в частности, у пациенток РМЖ повышена [29]. Использование антагонистов ГП-25 для снижения деградации ферропортина в опухолевых клетках, увеличивает отток железа и потенциально уменьшает рост опухоли, что, возможно, является новым направлением применения модуляторов ГП-25. Понимание причин дисрегуляции ГП-25 в опухолевых клетках может оказаться плодотворным для решения этой проблемы. Например, некоторые авторы считают, что, если идентифицировать новые, специфичные для рака пути регуляции ГП-25, антагонисты ГП-25, которые специфически блокируют этот путь, могут оказаться наиболее полезными в качестве противоопухолевых агентов [29].

Целью работы явилось комплексное исследование метаболизма железа на основе современных методов феррокинетики для прогнозирования развития АС, раннего его выявления и адекватной коррекции АС у онкологических больных до неoadъювантной химиотерапии.

Материал и методы. В исследование включены 22 пациентки с РМЖ, поступивших на лечение в клинику НМИЦ в 2018-2019 гг. Возраст от 31 до 89 (61,5±5,7) лет. II-я стадия выявлена у 7 человек, III-я – у 15 больных, из них IIIc – у 3-х. Контрольную группу составили 27 практически здоровых женщин соответствующего возраста. Расширенный клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе фирмы «Sysmex» (Япония), в том числе исследовали среднее содержание гемоглобина в ретикулоците (RET-HE) и число фрагментов эритроцитов (FRG). В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание эндогенного эритропоэтина (ЭПО) с использованием наборов фирмы «Biomerica» (США), ГП-25 с наборами Peninsula Laboratories International, Inc. (США). Для исключения аутоиммунной гемолитической анемии выполнялась прямая проба Кумбса, на основе гелевых технологий (прямой антиглобулиновый тест). Определение свободного гемоглобина (СГем) в плазме крови было проведено гемиглобинцианидным методом. Результаты оценивались на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometr. Подсчитывали лейкоцитарную формулу и проводили детальный анализ морфологии эритроцитов. Число гипохромных (НУРО) эритроцитов определяли на анализаторе Advia-120 (США). Исследование биохимических показателей обмена железа проводилось в сыворотке крови больных на автоматическом анализаторе Cobas c501 фирмы «Roche» (Швейцария). Определение железа (Ж) проводилось колориметрическим методом при помощи набора реактивов Iron Gen.2. Уровни ферритина (ФР), трансферрина (ТРФ) и растворимых рецепторов трансферрина (рРТФ) были получены иммунотурбидиметрическими методами с латексным усилением на основе специфических антисывороток при использовании тест-систем Tina-quant Ferritin Gen 4, Tina-quant Transferrin ver.2 и Tina-quant Soluble Transferrin Receptor, соответствен-

но. Определение ИЛ-6 проводили в сыворотке крови при использовании тест-системы Elecsys IL-6 на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e601 фирмы «Roche» (Швейцария). С-реактивный белок (СРБ) исследовали иммунотурбидиметрическим методом с латексным усилением на основе специфических антисывороток с использованием тест-системы C-Reactive Protein Gen.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов MS-EXCEL BIOSTAT Version 4.03. Для оценки достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента, а при непараметрическом распределении – с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Проведенные исследования выполнялись в соответствии с принципами Хельсинской Декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

Результаты и обсуждение. В литературных данных было показано, что на экспериментальных моделях и у добровольцев внутривенное введение ИЛ-6 сопровождается повышением продукции ГП-25 с последующим развитием гипоферремии и железодефицитного эритропоэза, а при длительном воздействии провоспалительных цитокинов развивается анемия хронического заболевания (АХЗ) [30]. ГП-25, в свою очередь, как мы писали ранее, блокирует поступление железа из макрофагов к эритрокарицитам костного мозга (см. рисунок), на фоне АХЗ развивается ФДЖ. Функциональным дефицитом железа называют ситуацию, когда, несмотря на достаточные его запасы, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом. В периферической крови появляются эритроциты с низким объемом и гипохромией. Такая же морфологическая картина отмечается при ЖДА, поэтому необходим дифференциально-диагностический критерий выявления АС с функциональным дефицитом железа. По предварительным данным, это может быть метод определения ГП-25 в комплексе с ИЛ-6 [31].

На основе исследования периферической крови 27 здоровых доноров (женщин) разработаны собственные, референсные значения для ИЛ-6 и ГП-25. Все основные показатели красной крови в этой группе были в пределах нормы (табл.1). Число RET колебалось от 0,8 до 1,8%, в абсолютных цифрах составляло $42,6 \pm 3,5 \times 10^9/\text{л}$ с разбросом показателей $31,5$ — $87,2 \times 10^9/\text{л}$. Содержание ИЛ-6 в плазме здоровых составило в среднем по группе $2,0 \pm 0,3$ пг/мл с колебаниями от 0 до 4,1 пг/мл, медиана — 1,5 пг/мл. Концентрация ГП-25 составила $4,3 \pm 0,7$ нг/мл с колебаниями от 0,5 до 7,5 нг/мл, медиана — 5,6 нг/мл. Уровень ЭПО находился в пределах нормальных колебаний (2,8-32,4 МЕ/мл).

При анализе параметров клинического анализа крови больных были выделены 2 группы пациенток: 1-я группа с нормальными показателями красной крови ($n = 15$; 68,2%), 2-я – с АС ($n = 7$; 31,8 %). Концентрация НГВ в 1-й группе составила в среднем ($137 \pm 1,9$) г/л при диапазоне 127 – 151 г/л, медиана=136 г/л. Несмотря на отсутствие АС у больных этой группы, на фоне нормальных показателей гемограммы, у значительной части пациенток в этой группе ($n=6$; 27,2%) выявили относительно низкое содержание ФР (менее 20,6 нг/мл), а показатели рРТФ (более 3,8 мкг/мл), НУРО (более 1,8 %) превышали верхнюю границу нормы. Концентрация ГП-25 была больше 25 нг/мл, что не исключало началь-

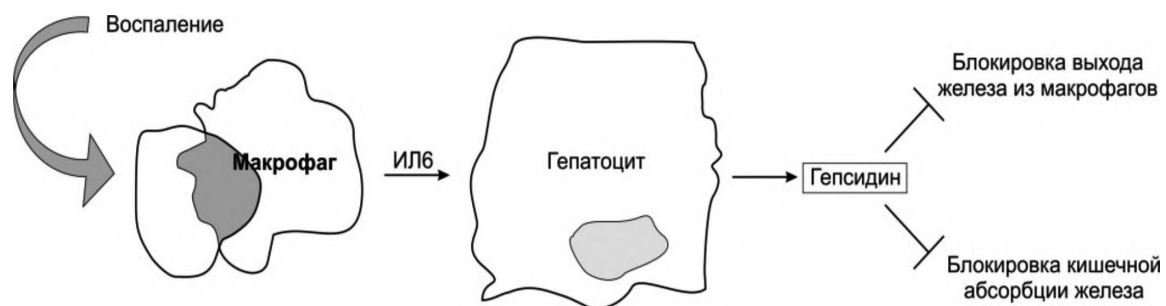


Рис. 1. Регуляция продукции гепсидина при воспалении.
(Nemeth E., Rivera S., Gabajan V. et al. *IL6 mediates hypo-ferramia inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. J. Clin. Inv.* 2004; 113(9): 1271-1276).

Таблица 1

Основные показатели красной крови больных с раком молочной железы до неoadьювантной химиотерапии (X±m)

Группы	Показатели					
	RBC, x10 ¹² /л	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	RET-HE, пг
Контроль, женщины (n = 27)	4,6±0,06	139±2,2	39,6±1,8	85,6±1,6	30,2±2,1	30,9±1,7
Больные РМЖ без АС (n = 15)	4,7±0,05	137±1,9	40,3±0,6	82,6±1,6	29,5±0,3	32,3±0,4
Больные РМЖ с АС (n = 7)	4,3±0,09	111±3,1*	34,6±0,7	80,2±2,7	25,7±1,2*	26,6±2,1*

Примечание. Здесь и в табл. 5: RBC—эритроциты; HGB—гемоглобин; HCT—гематокрит; MCV—объем; MCH—среднее содержание гемоглобина в эритроците; RET-HE—среднее содержание гемоглобина в ретикулоците. Здесь и в табл. 2–7: * – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы (p < 0,05).

Таблица 2

Основные показатели острофазных белков у онкологических больных РМЖ до неoadьювантной химиотерапии (X±m)

Группы	Показатели			
	ФР, нг/мл	ГП25, нг/мл	ИЛ-6, пг/мл	СРБ, мг/л
Контроль, женщины (n = 27)	57,7±8,2	4,3±0,7	1,5±0,3	2,9±2,1
Больные РМЖ без АС (n = 15)	61±16,9	16,3±3,1*	2,3±0,4	2,4±0,9
Больные РМЖ с АС (n = 7)	87±59,0	11,6±4,9*	3,6±1,1	5,7±3,2

ной или латентной стадии ЖДА и причиной этого могла быть высокая экспрессия ГП-25. Среднее значение ГП-25 в 1-й группе было статистически значимо выше нормальных показателей контроля (p < 0,01).

Следует отметить, что показатели ИЛ-6 в 1-й группе слабо коррелировали (см. табл. 3) с другими маркерами воспаления (ГП-2, ФР, СРБ), особенно с ГП-25. Основные показатели метаболизма железа (см. табл. 4) существенно не отличались от группы контроля.

АС выявлен у 7 пациенток (см. табл. 1 – 4). За основу лабораторной диагностики АС были взяты критерии Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). По данным ВОЗ считаются, например, у женщин АС, когда гемоглобин менее 120 г/л, гематокрит менее 36%.

По степени тяжести различают анемию:

- легкие (гемоглобин более 95 г/л) (I степень);
- умеренные (гемоглобин 80-94 г/л) (II степень);
- выраженные (гемоглобин 79-65 г/л) (III степень);
- тяжелые (гемоглобин менее 65 г/л) (IV степень).

Детальный анализ лабораторных данных показал, что анемия у них была в основном легкой (I) (n=5) и умеренной (II) (n=2) степени. Среднее значение HGB в группе составило 111±3,0 г/л с колебаниями показателей от 92 до 119 г/л. Как видно из табл. 1, 4 основные показатели красной крови у пациенток с АС были ниже, чем в контроле и у пациенток без АС, особенно значе-

ния HGB, HCT, MCH, Ж., RET-HE (p < 0,05). В настоящее время RET-HE считается «золотым стандартом» для диагностики железодефицитного эритропоэза. У пациенток с АС этот показатель в среднем по группе был низким (26,6±2,0) пг и достоверно (p < 0,05) отличался от нормальных значений, в норме RET-HE колебался от 28 до 35 пг (30,9±1,7 пг). Напротив, показатели рРТФ, НУРО и FRG у пациенток с АС значительно (p < 0,01) превышали норму. Следует отметить, что и у пациенток с АС, как и без него, в среднем по группе отмечена высокая экспрессия ГП-25 (см. табл. 2), однако показатели колебались в широких пределах, встречались как очень низкие, так и высокие значения. Другие острофазные белки (ФР, ИЛ-6, СРБ) существенно не отличались от группы контроля, но среди них выявлены единичные случаи с высокой концентрацией этих белков. Отмечена тесная корреляционная связь между ИЛ-6 и ГП-25, ФР, в меньшей степени, с СРБ (см. табл. 3).

Прямая проба Кумбса была отрицательной у всех пациенток, как с АС, так и без него. Анализ показателей свободного гемоглобина не выявил значительных отклонений от нормальных колебаний контрольной группы (0,09-0,4) г/л.

АС делят по морфологическому признаку в зависимости от объема эритроцитов (MCV) и среднего содержания в них гемоглобина (MCH). У 4-х (57,1%) паци-

енток был выявлен АС с микроцитарным (MCV<80 fl), гипохромными (MCH<28pg) эритроцитами и ретикулоцитами (RET-HE<27 pg), что характерно для ЖДА. Об этом свидетельствовали и низкие показатели Ж, ФР, ГП-25, ИЛ-6 и высокая концентрация ТРФ, рРТФ. Следует подчеркнуть, что у одной из четырёх (14,3%) пациенток эритроциты были нормоцитарные, гипохромные, показатели Ж, ФР, ИЛ-6, RET-HE были такие же, как и у пациенток с ЖДА. Но экспрессия ГП-25 оказалась выше 25 нг/мл, что превышало норму, более чем в 6 раз. Можно было бы предположить, что причиной развития начальной стадии ЖДА у этой пациентки является высокая экспрессия ГП-25. Но единичные наблюдения не позволяют сделать однозначные выводы. Классический ФДЖ диагностирован у 2-х пациенток (28,5%) с III с стадией. В отличие от ЖДА, у них выявили высокую концентрацию ИЛ-6 (более 11 пг/мл), ГП-25 (более 25 нг/мл), СРБ (более 22 мг/л). Показатели ФР составили 90,9 нг/мл в первом случае и 463,8 нг/мл в другом.

Известно, что провоспалительные цитокины ухудшают производство ЭПО, пролиферацию и дифференцировку эритроидных предшественников и сокращают выживание циркулирующих эритроцитов, что может

способствовать развитию АС. Большое значение для дифференциальной диагностики АС имеет определение ЭПО в плазме крови. ЭПО является ключевым регулятором эритропоэза. Неадекватно низкая продукция ЭПО по отношению к степени АС – характерная особенность АХЗ и в меньшей степени – ЖДА [32,33]. В нашем исследовании, продукция ЭПО не была оптимальной для большинства пациентов с АС. Среди больных с АС повышение ЭПО более 100 МЕ/мл отмечено только у 1-й пациентки с ЖДА. У 6 (85,7%) больных ЭПО колебался от 3,5 до 17,3 МЕ/мл (26±15,3) МЕ, медиана=8,2 МЕ/мл, т.е. был неадекватным степени тяжести АС. Более низкая продукция ЭПО отмечалась у 2-х человек с ФДЖ, в меньшей степени – у пациенток с ЖДА.

Был проведен анализ частоты (табл. 5-8) встречаемости различных типов АС в зависимости от стадии заболевания. Анализ показателей красной крови выявил более низкие показатели HGB, RET-HE у пациенток с III стадией по сравнению с группой пациенток со II стадией заболевания, но достоверного различия не получено ($p>0,05$). АС, ЛДЖ и ЖДА чаще выявлялись у пациенток с III стадией. Отмечено значительное различие по параметрам HYP0, FRG, ГП-25, ИЛ-6, показатели были выше у пациенток с III стадией заболевания ($p<0,01$) и ФДЖ встречался там же.

Лечение АС, ассоциированного со злокачественными новообразованиями, представляет сложную задачу. Достижения в понимании патофизиологии АС позволили определить основные подходы к ее терапии: лечение основного заболевания, использование агентов, усиливающих эритропоэз (рекомбинантные эритропоэтины), и доступность железа. Недавно в клинической практике [34] появился новый препарат для внутривенного введения – железа карбоксимальтозат (феринжект), показавший высокую эффективность, как в комбинации

Таблица 3

Корреляционная зависимость ИЛ-6 между другими острофазными белками у пациенток РМЖ

Коэффициенты корреляции	Группы пациенток	
	без АС	с АС
r (ГП-25)	-0,008	0,62
r (ФР)	0,33	0,82
r (СРБ)	0,22	0,46

Примечание. r – коэффициент корреляции.

Таблица 4

Основные показатели метаболизма железа у онкологических больных РМЖ до неoadьювантной химиотерапии (X±m)

Группы	Показатели					
	Железо, мкмоль/л	ТФР, мг/дл	рРТФ, мкг/мл	ЭПО, МЕ/мл	НУРО, %	FRG, %
Контроль, женщины (n=27)	15,6±1,7	246,3±11,6	3,2±0,08	15,4±2,7	0,5±0,01	0,2±0,04
Больные РМЖ без АС (n=15)	17,4±2,1	282,6±9,7	3,5±0,26	20,4±7,1	0,5±0,03	0,5±0,2
Больные РМЖ с АС (n=7)	11,2±1,9*	292,3±21*	7,2±1,8*	26±15,3	3,7±1,2*	1,3±0,7*

Примечание. Здесь и в табл. 7: ТРФ — трансферрин; рРТФ — растворимые рецепторы трансферрина; ЭПО — эритропоэтин; НУРО — эритроциты со сниженным содержанием гемоглобина в эритроците; FRG — фрагменты разрушенных эритроцитов.

Таблица 5

Основные показатели красной крови больных с раком молочной железы до неoadьювантной химиотерапии в зависимости от стадии заболевания (X±m)

Группы	Показатели					
	RBC, $\times 10^{12}/л$	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	RET-HE
II стадия (n = 7)	4,5±0,09	133±3,7	38,6±1,1	85,5±1,3	29,2±0,5	31,9±0,6
III стадия (n = 15)	4,6±0,06	127±0,4	38,5±0,9	84,1±1,6	27,9±0,8	29,9±4,2

Таблица 6

Основные показатели острофазных белков и эритропоэтина у больных РМЖ до неoadьювантной химиотерапии в зависимости от стадии заболевания (X±m)

Группы	Показатели				
	ФР, нг/мл	ГП25, нг/мл	ИЛ-6, пг/мл	СРБ, мг/л	ЭПО, МЕ/мл
II стадия (n = 7)	47,2±15,9	9,3±2,5	1,5±0,2	0,8±0,2	28,3±11,3
III стадия (n = 15)	79±31,3	17±2,9*	4,7±0,8*	3,9±1,3	19,7±9,3

Основные показатели метаболизма железа у онкологических больных РМЖ до неoadьювантной химиотерапии в зависимости от стадии заболевания ($X \pm m$)

Группы	Показатели					
	Железо, мкмоль/л	ТФР, мг/дл	pРТФ, мкг/мл	ЭПО, мЕ/мл	НУРО, %	FRG, %
II стадия (n = 7)	16,6±4,1	289,3±16,6	3,2±0,2	28,3±11,3	1,0±0,01	0,1±0,02
III стадия (n = 15)	14,8±1,4	284,1±11	5,4±1	19,7±7,3	1,7±0,3*	0,6±0,2*

Частота встречаемости различных типов АС у пациентов РМЖ до неoadьювантной химиотерапии в зависимости от стадии заболевания

Группы	Без АС	ЛДЖ	АС	АС-ЖДА	АС-ФДЖ
II стадия (n = 7)	5 (71,5%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	0
III стадия (n = 15)	10 (66,6%)	5 (33,3%)	6 (40%)	4 (26,6%)	2 (13,3%)

Примечание. ЛДЖ – латентный дефицит железа.

с ЭПО, так и в монорегиме. Считают, что феррингект обладает хорошей переносимостью и минимальным риском развития аллергических реакций. Однако, стратегию будущего связывают с применением антагонистов ГП-25 с целью преодоления задержки железа в ретикулоэндотелиальной системе, гормонов или цитокинов, способных эффективно стимулировать эритропоэз при хроническом воспалении. При АС, часто устойчивой к терапии ЭПО, подавление ГП-25 может привести к выходу депонированного в макрофагах Ж (Fe) и, соответственно, нормализации уровня НГВ. В настоящее время проводится изучение новых лекарственных средств, мишенью которых являются основные патогенетические звенья АС, в частности цитокины, корректоры ветви ИЛ-6 – гепсидин – ферропортин. Такое воздействие рекомбинантным ГП-25 на кроветворение показано в эксперименте [35]. Полученные в эксперименте антитела к рецептору интерлейкина-6 способствовали снижению выработки ГП-25 и нормализации кроветворения [36]. Однако большая часть разработок находится в стадии экспериментальных исследований, другие – на разных стадиях клинических исследований [35, 36]. Новые стратегии в патогенетической терапии больных с анемией при хронических болезнях и опухолях связаны с применением антигепсидиновых препаратов, представленных антителами к гормону, ингибиторами и блокаторами его экспрессии, включая эритроферрон, гормон эритробластов [35-37].

Выводы

У 27,2% (n=6) онкологических больных РМЖ без АС отмечено снижение запаса железа (ФР ниже 20 нг/мл), который сопровождался значительной экспрессией белка ГП-25, что не исключало латентной стадии ЖДА. Отмечена слабая корреляционная связь ($r = -0,008$) между ИЛ-6 и ГП-25, а это значит, что причиной гиперэкспрессии ГП-25, кроме ИЛ-6, могут быть другие источники.

У 31,8% (n=7) онкологических больных РМЖ еще до противоопухолевого лечения выявлен АС.

АС был в основном с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов и ретикулоцитов. Чаще (71,4%) выявлялась ЖДА с низкими показателями Ж, ФР, ГП-25, ИЛ-6, СРБ и высокой концентрацией ТРФ, НУРО, pРТФ. ИЛ-6 тесно коррелировал ($r > 0,60$) с другими маркерами воспаления (ГП-25, ФР), в меньшей степени с СРБ ($r = 0,46$).

У 2-х (28,6 %) пациенток с IIIc стадией заболевания РМЖ диагностирован АС с ФДЖ, в отличие от ЖДА, у них выявили высокую концентрацию ИЛ-6, ГП-25, СРБ и ФР.

ЛДЖ, АС и ЖДА чаще выявлялись у пациенток с III стадией заболевания РМЖ. Отмечено значительное различие по параметрам ГП-25 и ИЛ-6, показатели были выше у пациенток с III стадией заболевания и ФДЖ встречался там же.

Более низкая продукция ЭПО отмечалась у пациенток с АС и ФДЖ, в меньшей степени у пациенток с ЖДА.

Таким образом, у онкологических больных РМЖ до неoadьювантной химиотерапии выявлена значительная экспрессия белка ГП-25. Показатели были высокими как у пациенток с АС, так и без него. Не отмечено корреляционной связи между ИЛ-6, ГП-25 и другими острофазными белками (ФР, СРБ) на начальных этапах формирования АС, при латентном дефиците железа. Напротив, выявлена тесная корреляционная связь при развитии АС (ЖДА и ФДЖ) между ИЛ-6 и всеми острофазными белками (ГП-25, ФР, СРБ). Однако небольшое число наблюдений не позволяет сделать однозначное заключение о роли ИЛ-6 и ГП-25 в развитии АС онкологических больных РМЖ и требует дальнейшего изучения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА (пп 1- 3, 6-12,14, 15, 16, 17, 18-20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,33,35, 36 см. R E F E R E N C E S)

- Тупицын Н.Н. В кн.: Иммуногистохимическая диагностика опухолей человека. Руководство для врачей-морфологов. Петров С.В., Киясов А.А., ред. Казань: Дом печати; 1998; 138-53.
- Алехнович Л.И. Характеристика биохимических маркеров метаболизма костной ткани. *Рецепт*. 2009; 2: 17-25.
- Мазуренко Н.Н., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-генетические маркеры немелкоклеточного рака легкого. *Молекулярная медицина*. 2014; 4: 4-13.
- Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм промоторного региона генов IL-4, IL-6 в IL-10 у пациенток с раком молочной железы. *Медицинская иммунология*. 2009;11 (1): 21-8.
- Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н, Матвеева И.И. Новая концепция диагностики анемии с нарушением метаболизма железа. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2015-2016; 4-1 (26): 77-85.

34. Снеговой А.В., Ларионова В.Б., Манзюк Л.В., Кононенко И.Б. Анемии в онкологии: возможности поддерживающей терапии. *Клиническая онкогематология*. 2016; 3(9): 326-35.
37. Сахин В.Т., Кремнева Н.В., Гордиенко А.В., Крюков Е.В., Рукавицын О.А. Эритроферрон: современные представления о значении в регуляции обмена железа. *Клиническая онкогематология*. 2017; 10 (1): 25-8.

REFERENCES

1. Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K.H., Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1985; 82: 5490-4.
2. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014; 6 (10): a06295.
3. Kang S., Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity Cell Press*. 2019; 50 (4): 1007-23.
4. Tupitsyn N.N. Immunohistochemical diagnosis of human tumors [Immunogistokhimicheskaya diagnostika opukholey cheloveka. *Rukovodstvo dlya vrachey-morfologov*]. Petrov S.V., Kiyasov A.A., eds. Kazan': Dom pechati;1998; 138-53. (in Russian)
5. Alekhovich L.I. Characterization of biochemical markers of bone tissue metabolism. *Retsept*. 2009; 2: 17-25. (in Russian)
6. Ibricevic-Balic, L. Dilemma: Correlation Between Serum Level of Hepsidin and IL-6 Anemic Myeloma Patients. *Med. Arch*. 2016; 70 (6): 429—32.
7. Kan Zhai, Yong Yang, Zhi-Gang Gao, Jie Ding. Interleukin-6-174G>C gene promoter polymorphism and prognosis in patients with cancer. *Oncotarget*. 2017; 8 (27): 44490-7.
8. Miura T., Mitsunaga S., Ikeda M., Shimizu S., Ohno I., Takahashi H. et al. Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. *Pancreas*. 2015; 44(5): 756-63.
9. Chang C.H, Hsiao C.F, Yeh Y.M, Chang G.C, Tsai Y.H, Chen Y.M. et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int. J. Cancer*. 2013; 132 (9): 1977-85.
10. Altundag O., Altundag K., Gunduz E. Interleukin-6 and C-reactive protein in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol*. 2005; 23: 1044.
11. Wei L.H, Kuo M.L, Chen C.A, Chou C.H, Lai K.B, Lee C.N. et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGFdependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003; 22: 1517-27.
12. Singh U, Shevra CR, Singh S, Singh N, Kumar S, Rai M. Interleukin-6 and interleukin-4 levels in multiple myeloma and correlation of interleukin-6 with β 2 microglobulin and serum creatinine. *Clin. Cancer Investig. J*. 2015; 4: 211—5.
13. Mazurenko N.N., Kushlinskiy N.E. Molecular genetic markers of non-small cell lung cancer. *Molekulyarnaya meditsina*. 2014; 4: 4-13. (in Russian)
14. Chen M.F, Chen P.T, Lu M.S, Lin P.Y, Chen W.C, Lee K.D. IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mol. Cancer*. 2013; 12: 26.
15. Dethlefsen C., Højfeldt G., Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 2013; 138 (3): 657-64.
16. Waldner M.J, Foersch S, Neurath M.F. Interleukin-6—a key regulator of colorectal cancer development. *Int. J. Biol. Sci*. 2012; 8 (9): 1248-53.
17. Dobrzycka B., Mackowiak-Matejczyk B., Terlikowska K.M., Kulesza-Bronczyk B., Kinalski M., Terlikowski S.J. Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur. Cytokine Netw*. 2013 Jul-Sep; 24 (3): 106-13.
18. Macciò A., Madeddu C. The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications – a review. *J. Mol. Med*. 2013; 91: 1355-68.
19. Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Kolomeichuk M.Y., Kononov V.I., Garbukov E.Y., Staheeva M.N. Polymorphism of the promoter region of the IL-4, IL-6 b IL-10 genes in patients with breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11 (1): 21-8. (in Russian)
20. Purohit A., Newman P.S., Reed M.J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer *Breast Cancer Res*. 2002; 4: 65-9.
21. Shibayama O., Yoshiuchi K., Inagaki M., Matsuoka Y., Yoshikawa E., Sugawara Y. et al. Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer Med*. 2014; 3 (3): 702-9.
22. Guo Y., Xu F., Lu T., Duan Z., Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat. Rev*. 2012; 38 (7): 904-10.
23. Krause A, Neitz S, Magert H.J, Schulz A., Forssmann W. G, Schulz-Knappe P., Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS. Lett* 2000; 480 (2–3): 147-50.
24. Park C.H, Valore E.V, Wearing A.J., Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem*. 2001; 276 (11): 7806—7810.
25. Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P. Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem*. 2001; 276 (11): 7811-9.
26. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*. 2001; 98 (15): 8780-5.
27. Haase V.H. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 2010; 299 (1): 1-13.
28. Tesfay L., Clausen K.A., Kim J.W., Hegde P., Wang X., Miller L.D. et al. Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancer Res*. 2015; 75: 2254-63.
29. Torti S.V., Torti F.M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat. Rev. Cancer*. 2013; 13(5): 342-55.
30. Sasu B.J., Cooke, K. S., Arvedson T.L., Plewa C., Ellison A.R., Sheng J. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood*. 2010; 115 (17): 3616-24.
31. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Michael Vaughn, Adriana Donovan, Diane McVey Ward et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306 (5704): 2090-3.
32. Blinder V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I. A new concept for diagnosing anemia with impaired iron metabolism. *Vestnik Rossiyskogo onkologicheskogo tsentra im. N.N. Blokhina*. 2015-2016; 26 (4-1): 77-85. (in Russian)
33. Schrijvers D., de Samblanx H., Roila F. Erythropoiesis-stimulating agents the treatment of anemia in cancer patients: ESMO Clinical Practice for use. *Annals. Oncology*. 2010; 21: 244-7.
34. Snegovoy A.V., Larionova V.B., Manzyuk L.V., Kononenko I.B. Anemia in oncology: the possibilities of maintenance therapy. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2016; 3(9): 326-35. (in Russian)
35. Sasu B. J., Cooke, K. S., Arvedson, T. L., Plewa C., Ellison, A. R., Sheng J. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood*. 2010; 115 (17): 3616-24.
36. Saroj Vadhan-Raj, Rafat Abonour, Jonathan W. Goldman, David A. Smith, Christopher A. Slapak, Robert L. et al. A first-in-human phase 1 study of a hepcidin monoclonal antibody, LY2787106, in cancer-associated anemia. *Journal of Hematology Oncology*. 2017; 10: 73 1-12.
37. Sakhin V.T., Kremneva N.V., Gordienko A.V., Kryukov E.V., Rukavitsyn O.A. Erythroferon: current ideas about the importance in the regulation of iron metabolism. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2017; 10 (1): 25-8. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Гальцева И.В.¹, Филипенко М.Л.², Давыдова Ю.О.¹, Лучкин А.В.¹, Капранов Н.М.¹, Кондратьева Ю.А.¹, Субботин С.В.², Храпов Е.А.², Никифорова К.А.¹, Фидарова З.Т.¹, Гапонова Т.В.¹, Менделеева Л.П.¹, Михайлова Е.А.¹, Паровичникова Е.Н.¹, Савченко В.Г.¹

СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;
²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН», 630090, Новосибирск, Россия

Определение длины теломер может проводиться методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяя получить абсолютную длину теломер (АДТ), выраженную в количестве пар нуклеотидов, и с помощью проточной цитометрии, которая может оценить только относительный показатель длины теломер. Целью исследования было сопоставить результаты двух методов и разработать точный и надежный способ перевода относительной длины теломер в абсолютную. Материалом для исследования служила периферическая кровь от 21 донора. Измерение длины теломер лейкоцитов методом проточной цитометрии проводили с помощью коммерческого набора Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания) на двух проточных цитометрах CytoFLEX (Beckman Coulter, KHP) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США), получая молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ). Для измерения длины теломер методом ПЦР в режиме реального времени получали калибраторы с известным числом теломерных повторов. Проводили две количественных ПЦР: одну – для теломерных повторов, другую – для определения количества геном-эквивалентов ДНК, трижды для каждого образца, что позволяло рассчитать АДТ. Обнаружена сильная прямая связь между МЭФ, полученными при анализе проб на BD FACSCanto II и CytoFLEX ($r = 0,97$). При корреляционном анализе результатов ПЦР и проточной цитометрии была обнаружена значимая взаимосвязь между АДТ и МЭФ. Мы рассчитали уравнения регрессии АДТ от МЭФ для CytoFLEX – $y = 0,0043x$ ($r = 0,84$) и для BD FACSCanto II – $y = 0,0051x$ ($r = 0,82$). Проведенный корреляционный анализ показал высокую сопоставимость результатов определения длины теломер двумя методами. Полученные уравнения регрессии позволяют перевести результаты проточной цитометрии в абсолютные показатели, позволяя сравнивать результаты разных исследовательских групп и применять этот метод в клинических исследованиях.

Ключевые слова: теломеры; проточная цитометрия; полимеразная цепная реакция в реальном времени; лейкоциты.

Для цитирования: Гальцева И.В., Филипенко М.Л., Давыдова Ю.О., Лучкин А.В., Капранов Н.М., Кондратьева Ю.А., Субботин С.В., Храпов Е.А., Никифорова К.А., Фидарова З.Т., Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Михайлова Е.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (3): 154-159. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-154-159>

Galtseva I.V.¹, Filipenko M.L.², Davydova Yu.O.¹, Luchkin A.V.¹, Kapranov N.M.¹, Kondratieva Yu.A.¹, Subbotin S.V.², Khrapov E.A.², Nikiforova K.A.¹, Fidarova Z.T.¹, Gaponova T.V.¹, Mendeleeva L.P.¹, Mikhailova E.A.¹, Parovichnikova E.N.¹, Savchenko V.G.¹

COMPARISON OF POLYMERASE CHAIN REACTION AND FLOW CYTOMETRY FOR MEASURING TELOMERE LENGTH OF HUMAN LEUKOCYTES

¹National Research Center for hematology, 125167, Moscow, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, 630090, Novosibirsk, Russia

Telomere length can be measured by polymerase chain reaction (PCR), allowing to obtain the absolute length of telomeres (ALT) in base pair, and by flow cytometry, which can only estimate the relative telomere length. The aim of the study was to compare the results of the two methods and to develop an accurate and reliable way of converting the relative telomere length to absolute. The peripheral blood from 21 donors was analyzed. Measurement of leukocyte telomere length by flow cytometry was carried out using a commercial Telomere PNA Kit / FITC (Dako, Denmark) with two CytoFLEX flow cytometers (Beckman Coulter, China) and BD FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), obtaining the molecular equivalent of fluorescence (MEF). To measure telomere length by real-time PCR, calibrators with a known number of telomeric repeats were prepared. Two quantitative PCRs were carried out: one for telomeric repeats, the other for determining the number of genome-equivalents of DNA, three times for each sample, which made it possible to calculate ALT. A strong direct relationship was found between the MEF obtained with BD FACSCanto II and CytoFLEX ($r = 0.97$). Analysis of PCR and flow cytometry results showed a significant correlation between ALT and MEF. We calculated the regression equations of ALT and MEF for CytoFLEX – $y = 0.0043x$ ($r = 0.84$) and for BD FACSCanto II – $y = 0.0051x$ ($r = 0.82$). Correlation analysis showed a high comparability of telomere lengths measured by two methods. The obtained regression equations allow converting the results of flow cytometry into absolute values, allowing the comparison of the results of different research groups and the use of this method in clinical trials.

Key words: telomere; flow cytometry; real-time polymerase chain reaction; leukocytes.

For citation: Galtseva I.V., Filipenko M.L., Davydova Yu.O., Luchkin A.V., Kapranov N.M., Kondratieva Yu.A., Subbotin S.V., Khrapov E.A., Nikiforova K.A., Fidarova Z.T., Gaponova T.V., Mendeleeva L.P., Mikhailova E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Comparison of polymerase chain reaction and flow cytometry for measuring telomere length of human leukocytes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (3): 154-159 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-154-159>

Для корреспонденции: Давыдова Юлия Олеговна, врач клин. лаб. диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

Information about authors:

Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;
Filipenko M.L., <http://orcid.org/0000-0002-8950-5368>;
Davydova Yu.O., <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>;
Luchkin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4400-4711>;
Kapranov N.M., <http://orcid.org/0000-0002-6512-910X>;
Kondratieva Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-9274-8029>;
Subbotin S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2945-8886>;
Khrapov E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0991-5349>;
Nikiforova K.A., <http://orcid.org/0000-0002-4119-7175>;
Fidarova Z.T., <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>;
Gaponova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-9684-5045>;
Mendeleeva L.P., <http://orcid.org/0000-0002-4966-8146>;
Mikhailova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-2449-2682>;
Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>;
Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

For correspondence: *Davydova Yu.O.*, Physician (clinical and laboratory diagnostics), Scientific and Clinical Laboratory for Immunophenotyping of Blood and Bone Marrow Cells; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 26.02.2021
Accepted 06.03.2021

Введение. Теломерами называют концевые участки хромосом, которые состоят из tandemных нуклеотидных повторов (TTAGGG), соединенных с белками [1,2]. Теломеры выполняют несколько функций. Во-первых, они препятствуют деградации и слиянию хромосом, поддерживая тем самым целостность генома клетки. Во-вторых, участвуют в прикреплении хромосом к элементам ядерного матрикса, сохраняя внутреннюю упорядоченность клеточного ядра. И в-третьих, решают проблему недорепликации концевых участков ДНК, которая возникает в S-фазе клеточного цикла. В процессе удваивания (репликации) ДНК участвует фермент ДНК-полимеразы, которая синтезирует дочернюю комплементарную цепь только в одном направлении (5'→3') [3]. Кроме того, этот фермент не способен инициировать синтез ДНК de novo, а начинает присоединение нуклеотидов к специальному РНК-праймеру, или РНК-затравке, с ее 3'-конца, которая синтезируется другим ферментом – РНК-полимеразой. После окончания синтеза дочерней цепи, РНК-праймер удаляется с 5'-конца и пробел остается незаполненным, поэтому после каждого деления клетки происходит укорочение хромосом, в среднем, на 50-60 нуклеотидов [4]. Но так как это укорочение происходит за счет потерь теломерных повторов, количества которых хватает на несколько десятков делений, не происходит потери важной генетической информации, поэтому теломеры являются критически важными в поддержании и жизнеспособности клетки [5]. Помимо механизма укорочения теломер, в клетке есть и механизм восстановления их длины, который обеспечивается специальным ферментом – теломеразой, постоянная активность которой выявлена преимущественно в стволовых недифференцированных клетках. В специализированных клетках теломераза не активна, поэтому после ограниченного числа делений наступает апоптоз [6–9].

Укорочение теломер в клетках крови наблюдается при некоторых заболеваниях, в частности, при врожденном дискератозе, апластической анемии, циррозе печени, идиопатическом легочном фиброзе [10–12]. Большое количество исследований посвящено изучению роли теломер в канцерогенезе. Предполагается, что значительное укорочение длины теломер приводит к геномной нестабильности и

образованию хромосомных поломок, которые нередко обнаруживаются как при различных онкогематологических заболеваниях, так и солидных новообразованиях [13–16].

Несмотря на несомненную актуальность исследования, стандартизованный лабораторный метод определения длины теломер к настоящему моменту отсутствует. Золотым стандартом по данным литературы признается анализ концевых рестрикционных фрагментов с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Однако этот метод достаточно трудоемкий, отсутствуют стандартные протоколы, воспроизводимость – низкая, присутствует субъективность анализа, а так же необходимость использования радиоактивных меток сильно ограничивает применение этого метода [17,18]. Более подходящими для рутинной практики могут быть полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени и проточная цитометрия – flow-FISH, (объединение проточной цитометрии (flow cytometry) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)) [19–22].

В ряде исследований показаны достоинства метода flow-FISH, такие как высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость и возможность определения длины теломер в целевых популяциях клеток без предварительного сортирования [17]. Однако flow-FISH не может определить длину теломер в абсолютном выражении, то есть в килобазах (кб) – тысячах парах нуклеотидов. Этот метод позволяет определить относительную длину теломер (ОДТ), то есть относительно некоторого контроля, в роли которого обычно выступают клеточная линия 1301, клетки бычьего или мышинного тимуса или костного мозга мышей [23,24]. Применение разных контролей делает невозможным сопоставление результатов разных исследований.

Определение длины теломер с помощью ПЦР в режиме реального времени имеет свои преимущества, такие как простота выполнения, возможность проведения исследования образца даже с низким количеством ДНК, высокая пропускная способность, а главное, возможность получить абсолютную длину теломер (АДТ) [25]. Недостатком этого метода является низкая воспроизводимость, вариабельность результатов, трудности в определении длины коротких теломер [17].

Целью нашего исследования является сопоставление результатов измерения длины теломер методами ПЦР и flow-FISH, а также создание точного и надежного способа перевода относительной длины теломер (ОДТ), определенной методом flow-FISH, в абсолютную длину теломер в парах нуклеотидов (АДТ).

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы периферической крови с ЭДТА, полученные от 21 здорового донора. Соотношение мужчин к женщинам составило 15 : 6, возраст варьировал от 19 до 62 лет, медиана – 36 лет. Забор крови осуществлялся после подписания добровольного информированного согласия.

Flow-FISH. Мононуклеары периферической крови получали с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола 1,077 г/см³. Для определения длины теломер полученных мононуклеаров использовали коммерческий набор Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания). В качестве контроля гибридизации зонда использовали клеточную линию 1301 (АТСС, Великобритания). Клетки линии 1301 выращивали в суспензионной культуре в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре +37 °С, 5 % CO₂. До использования клетки хранились при температуре -80° С в криобриках.

В состав набора Telomere PNA Kit/FITC входит два типа растворов. Первый содержит пептидно-нуклеиновый зонд, комплементарный последовательности теломерных повторов, меченый флуоресцентным красителем флуоресцеин-изоотиоцианатом (fluorescein isothiocyanate, FITC). Второй раствор представляет собой буфер для гибридизации, но не содержит зонд. Два миллиона выделенных мононуклеаров смешивали с двумя миллионами клеток линии 1301, затем разделяли на 4 равные части в разные пробирки и добавляли в две пробирки раствор с зондом и в две другие пробирки раствор без зонда. После гибридизации и инкубации проводили отмывку от не связанного зонда. Получали пробирку с зондом (исследуемая проба) и пробирку без зонда (контрольная проба) в двух повторах. Далее проводили цитометрический анализ. Вся пробоподготовка выполнялась в соответствии с рекомендациями производителя набора.

Анализ клеток выполняли параллельно на двух цитометрах CytoFLEX (Beckman Coulter, КНР) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Перед новой серией измерений проводили калибровку цитометра CytoFLEX с целью поддержания выхода флуоресцентного сигнала с помощью набора FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles (Dako, Дания). Регулировка напряжения на фотоумножителях цитометра BD FACSCanto II проводилась с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США).

Гейтирование выполняли с помощью программы Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) по каналу FITC для мононуклеаров и клеток линии 1301. В пробах, инкубированных с гибридизационным буфером без зонда, СИФ отражала аутофлуоресценцию клеток, которую вычитали из СИФ от проб, инкубированных с зондом. Затем подсчитывали среднее значение полученных разниц СИФ.

Набор FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles применяли для построения калибровочных прямых с целью перевода полученных средних СИФ к показателю молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ). Подробное описание гейтирования, переход от СИФ к МЭФ

представлено в исследованиях Дёминой И.А. с соавт. (2018) и Rufer N. с соавт. (1998) [23,26].

ПЦР в реальном времени. Получение стандартных плазмидных образцов, содержащих известное число теломерных повторов. Реакционную смесь объемом 40 мкл, содержащую олигонуклеотиды k-tl1 5'-TTAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' и k-tl2 5'-AACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT-3' в концентрации 3 мкМ, 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl и 2 mM EDTA, подвергали денатурации в течение 5 мин при 95 °С и медленному охлаждению до комнатной температуры с целью формирования двухцепочечного олигонуклеотида с «липкими» концами. Полученную ДНК подвергали самолигированию в присутствии лигазы T4 и киназы T4 в течение 3 ч при 8 °С. Репарировали концы ДНК добавлением dNTP до 200 мкМ и 2,5 ед. акт ДНК-полимеразы T4 в течение 20 мин при 37 °С. Далее прогревали смесь 15 мин при 65 °С. Доводили объем до 100 мкл водой и добавляли 100 мкл ресуспендированных магнитных частиц Agcount (Beckman). Перемешивали и инкубировали 5 мин, собирали частицы на магните, супернатант отбрасывали и промывали частицы два раза 400 мкл 75% спирта в 10 mM TrisHCl pH8. Высушивали частицы в течение 10 мин при 37 °С с открытой крышкой. Элюировали ДНК в 30 мкл воды. Полученные конкатомеры ДНК лигировали с плазмидой pBluscript-ISK(+), лианеризованной эндонуклеазой рестрикции EcoRV, трансформировали полученной лигазной смесью компетентные клетки E.coli XL-blue I. Отобранные рекомбинантные плазмиды подвергали секвенированию по Сенгеру на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН) с целью оценки количества проклонированных теломерных повторов. Плазмидные ДНК pTL17 (17 повторов) и pTL17 (28 повторов) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы производителя.

Получение калибраторов. Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли флуорометрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen) по следующему протоколу: 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁷-10¹ копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM TrisHCl pH7,6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР фрагмента гена бета-лактамазы на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (<66 нг на 20 мкл), 1X ПЦР-смесь (Bio-Rad), 600 нМ олигонуклеотидные праймеры Blac-U 5'-CGTCTTTGGTATGGCTTCATTC-3' и Blac-R 5'-AGGACCGAAGGAGCTAACCG-3', 150 нМ зонд Blac-P 5'-HEX-CGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAG-BHQ2-3'. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили в 96-луночную ПЦР-плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96 °С – 10 мин и далее 50 циклов 96 °С – 15 сек, 58 °С – 40 сек с фи-

нальным прогревом в течение 10 мин при 98°C. После этого микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Количественный анализ теломерных повторов методом ПЦР в режиме реального времени. Для количественного анализа количества теломерных повторов проводили две количественных ПЦР: одну для теломерных повторов, другую для определения количества геном-эквивалентов ДНК. Первая смесь для ПЦР (объемом 20 мкл) содержала 300 нМ telg 5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3' и telc 5'-TGTTAGGTATCCSTATCCCTATCCSTATCCSTATCCСТААСА-3', а также 1x буфер для Taq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 15 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1x SybrGreenI, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и 5-50 нг геномной ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 2 цикла – 10 с при 95 °С, 20 с при 49 °С, 38 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM, 10 с при 72 °С сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM. Вторая смесь для ПЦР (объемом 20 мкл) содержала 450 нМ RPP-U 5'-GATTTGGACCTGC-GAGCG-3', RPP-R 5'-GCGGTGTCTCCACAAGT-3', ALB-U 5'-GACTTGCCAAGACATATGAAACC-3', ALB-R 5'-TCCAACAATAAACCTACCACCTTTG-3' и 100 нМ зонды ALB-FAM 5'-FAM-TGCTGTGCCGCTGCAGATCC-BHQ1-3' RPN-H 5'-HEX-TCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3', а также 1x буфер для Taq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и 5-50 нг геномной ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX, 10 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторах, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10⁹, 10⁸, 10⁷ копий на мкл для ПЦР1 и 10⁵, 10⁴, 10³ копий на мкл для ПЦР2. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору. Полученные абсолютные значения числа копий теломер нормализовали путем деления на количество геном-эквивалентов, рассчитанное как среднее арифметическое абсолютных значений двух однокопийных locus: гена альбумина и рибонуклеазы Р.

Статистический анализ данных. Статистическая обработка выполнена с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Корреляционный анализ выполняли с использованием критерия Пирсона, так как выборки были с нормальным распределением. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При анализе линейной регрессии проверяли остатки регрессии (остатки регрессии – это разности между наблюдаемыми значениями и значениями, рассчитанными по полученному

уравнению регрессии) на гомоскедастичность (гомоскедастичность – постоянство дисперсий случайных ошибок модели) и нормальность распределения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе нами была оценена воспроизводимость молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ), полученная от одних и тех же проб на разных цитометрах. Нами обнаружена сильная прямая связь между МЭФ, полученными при анализе проб на BD FACSCanto II и CytoFLEX ($r = 0,97$; $p < 0,0001$). Рассчитано уравнение регрессии $y = 0,84x$, где x – это МЭФ от CytoFLEX, а y – МЭФ от BD FACSCanto II. Доверительный интервал для коэффициента a (ДИ) составил 0,81-0,86. На рис.1 представлена взаимосвязь МЭФ одних и тех же проб на разных цитометрах.

При корреляционном анализе результатов ПЦР и результатов flow-FISH была обнаружена значимая взаимосвязь между абсолютной длиной теломер (АДТ) и МЭФ, полученных на BD FACSCanto II и CytoFLEX (рис. 2, а, в). Мы рассчитали уравнения зависимости АДТ от МЭФ для обоих приборов, которые можно использовать для перевода МЭФ в абсолютные значения длины теломер для других проб (для CytoFLEX: $y = 0,0043x$ (ДИ = 0,0040 – 0,0046); для BD FACSCanto II: $y = 0,0051x$ (ДИ = 0,0048 – 0,0055)).

По регрессионным моделям для CytoFLEX и BD FACSCanto II были подтверждены гомоскедастичности ($p = 0,10$ и $p = 0,09$) и нормальности распределения остатков регрессии ($p = 0,29$ и $p = 0,35$ соответственно). Распределение остатков регрессии в зависимости от входящих параметров показано на рис. 2, б, г. Проведенные проверки регрессионного анализа указывают на правомерность применения выведенных уравнений для перевода МЭФ в АДТ.

Обсуждение. Определение длины теломер является важной задачей, решение которой представляет интерес как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической лабораторной практике и клинической практике врача [27–30].

Методы, которые применяются для определения длины теломер, разнообразны и имеют разную физическую основу. В нашем исследовании мы показали значительную сходимость результатов определения длины теломер методами ПЦР и flow-FISH. Работ, посвященных прямому сравнению нескольких способов измерения длины теломер, к настоящему времени не так много. По результатам одной из них обнаруживалась значимая корреляция данных ПЦР и flow-FISH, но только в группе здоровых доноров ($R^2 = 0,33$; $p < 0,0001$). Взаимосвязь этих методов в группе пациентов с синдромом недостаточности костного мозга не была достоверной ($R^2 = 0,1$; $p = 0,08$). Авторы объясняют это преаналитическими факторами, в частности качеством образцов. Низкая клеточность крови пациентов, вероятно, приводила к неточности результатов ПЦР [17].

Полученные нами высокие значения коэффициента Пирсона (r) и коэффициента детерминации (R^2) позволяют провести линейный регрессионный анализ. Проверка гомоскедастичности и нормальности распределения остатков показала правомерность полученных уравнений линейной регрессии. Эти уравнения можно будет использовать для перевода относительных значений флуоресценции в абсолютные значения длины теломер, что является немаловажным в клинической практике.

Как указывалось ранее, flow-FISH позволяет получить только относительную длину теломер (ОДТ), что делает мало сопоставимыми результаты разных иссле-

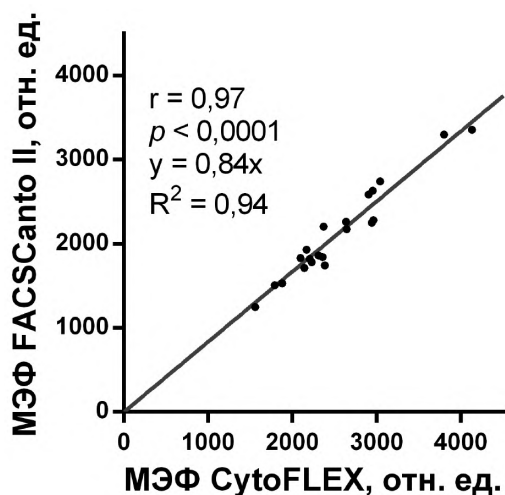


Рис.1. Взаимосвязь между показателями МЭФ, полученных от одних и тех же проб на цитометрах BD FACSCanto II и CytoFLEX.

довательских групп. Поэтому разрабатываются подходы для пересчета флуоресценции в абсолютную длину в килобазах. Например, показана возможность пересчета АДТ, используя клеточную культуру 1301 и зная тот факт, что длина теломер этих клеток равна приблизительно 70 килобазам (кб) [26]. В другом исследовании сопоставляли результаты flow-FISH и результаты анализа концевых рестрикционных фрагментов Саузерн-блотом. Получив значимую корреляцию ($r = 0,9; p < 0,0001$) авторы получали уравнение линейной регрессии [23]. Аналогичный подход использовался и в данной работе.

Обращает на себя внимание, что полученные уравнения регрессии несколько отличаются для разных цитометров, несмотря на то, что мы использовали одни и те же частицы для расчета МЭФ. С одной стороны, высокая сходимость анализа данных, полученных с двух цитометров, указывает на стабильность и воспроизводимость метода. С другой стороны, пересчитанные значения МЭФ при анализе на BD FACSCanto II были в среднем на 15% ниже, чем при анализе на CytoFLEX, что отражено в уравнении регрессии. Поэтому, даже использование одного и того же

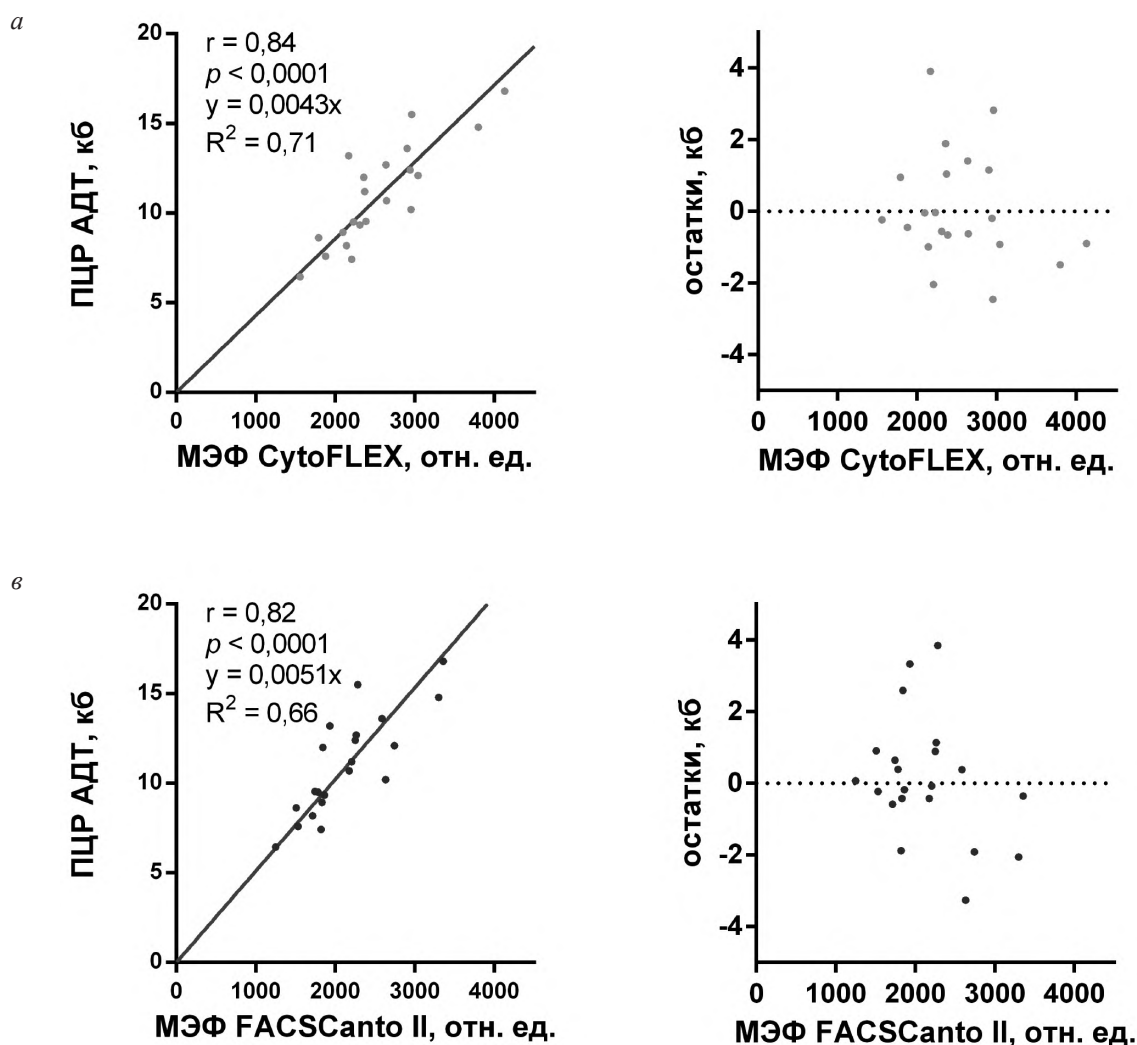


Рис. 2. Результаты регрессионного анализа. *а* – взаимосвязь АДТ, определенных методом ПЦР, и МЭФ, подсчитанных на цитометре CytoFLEX; *б* – МЭФ, подсчитанные на цитометре CytoFLEX, и соответствующие остатки линейной регрессии; *в* – взаимосвязь АДТ, определенных методом ПЦР, и МЭФ, подсчитанных на цитометре BD FACSCanto II; *г* – МЭФ, подсчитанные на цитометре BD FACSCanto II, и соответствующие остатки линейной регрессии.

набора, контроля и частиц для пересчета МЭФ, не решает проблемы различия между разными цитометрами. Следовательно, при планировании многоцентровых исследований, является необходимым построение калибровочных прямых и выведения уравнения для пересчета АДТ в индивидуальном порядке. Кроме того, эти уравнения можно применять только при условии сохранения флуоресцентного сигнала на постоянном уровне, а это значит, что калибровка прибора является обязательной, так как способствует сохранению воспроизводимости данных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Дризе Н.И., Петинати Н.А. (НМИЦ гематологии Минздрава России) за проведенную работу по культивированию клеток; Попову А.М., Дёминой И.А. (НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России), Борисову В.И. (ООО Новартис Фарма) за помощь в освоении методики по определению длины теломер методом проточной цитометрии, а также предоставленную клеточную культуру.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 8-10, 13-17, 19-23, 25, 27-30 см. REFERENCES)

- Богданов А. Теломеры и теломераза. *Соросовский образовательный журнал*. 1998;(12):12-8.
- Егоров Е.Е. Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2010;3(2):184-95.
- Демина И.А., Овсянникова Г.С., Калинина И.И., Сунцова Е.В., Горонкова О.В., Райкина Е.В. и др. Значение длины теломер для индивидуализации терапии апластической анемии. *Педиатрия Журнал им ГН Сперанского*. 2017;96(5):97-103.
- Кулагин А.Д., Борисов В.И., Пронкина Н.В., Лисуков И.А., Козлов В.А., Афанасьев Б.В. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(S1):20.
- Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А. и др. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология*. 2009;11(6):523-30.
- Борисов В.И., Кожевников В.С., Сениуков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А. и др. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите. *Медицинская иммунология*. 2006;8(1):87-90.
- Дёмина А.И., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2018; 17 (4): 66–72.

REFERENCES

- Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* 2006;12(10):1133-8.
- Palm W., De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.
- Levy M.Z., Allsopp R.C., Fitcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 1992;225(4):951-60.
- Blackburn E.H. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000;408(6808):53-6.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965;37(3):614-36.
- Bogdanov A. Telomeres and telomerase. *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*. 1998;(12):12-8. (in Russian)
- Yegorov Y.E. Telomeres, telomerase, oncogenesis and measure of health. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledo-*

- vaniya i klinicheskaja praktika*. 2010;3(2):184-95. (in Russian)
- Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;106(6):661-73.
- Greider C.W. Telomere Length Regulation. *Annu Rev. Biochem.* 1996;65(1):337-65.
- Calado R.T., Young N.S. Mechanisms of disease: Telomere diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(24): 2353–65.
- Demina I.A., Ovsyannikova G.S., Kalinina I.I., Suntsova E.V., Goronkova O.V., Raikina E.V., et al. Telomere length value for individualization of aplastic anemia therapy. *Pediatriya*. 2017; 96(5):97-103. (in Russian)
- Kulagin A.D., Borisov V.I., Pronkina N.V., Lisukov I.A., Kozlov V.A., Afanas'ev B.V. Frequency and prognostic value of telomeric DNA regions shortening in aplastic anemia. *Gematologija i transfuziologija*. 2014;59(S1):20. (in Russian)
- Engelhardt M., Mackenzie K., Drullinsky P.R., Silver R.T., Moore M.A.S. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* 2000;60(3):610-7.
- Cottliar A., Pedrazzini E., Corrado C., Engelberger M.I., Narbaitz M., Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur. J. Haematol.* 2003;71(5):334-40.
- Boultonwood J., Fidler C., Kusec R., Rack K., Elliott P.J.W., Atoyebi O., et al. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 1997;56(4):266-71.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
- Gutierrez-Rodriguez F., Santana-Lemos B.A., Scheucher P.S., Alves-Paiva R.M., Calado R.T. Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One*. 2014;9(11):e113747.
- Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyashchikh V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Barovskaya N.A., et al. Some features of changing telomere length in lymphocytes from the patients with bronchial asthma. *Med. Immunol.* 2009;11(6):523-30. (in Russian)
- Baerlocher G.M., Mak J., Tien T., Lansdorp P.M. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls. *Cytometry*. 2002;47(2):89-99.
- Law H.K.W., Lau Y.L. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence in situ hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry*. 2001;43(2):150-3.
- Gil M.E., Coetzer T.L. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Appl. Biochem. Biotechnol. – Part B Mol. Biotechnol.* 2004;27(2):169-72.
- O'Callaghan N.J., Dhillon V.S., Thomas P., Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques*. 2008;44(6):807-9.
- Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 1998;16(8):743-7.
- Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Seniukov V.V., Sizikov A.E., Konenkova L.P., Gerzog O.A. et al. Telomere shortening in monocytes of the patients with rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006;8(1):87-90. (in Russian)
- Cawthon R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
- Demina A.I., Semchenkova A.A., Kagirova Z.R., Popov A.M. Flow cytometric measurement of absolute telomere length. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2018; 17 (4): 66–72. (in Russian)
- Wynn R.F., Cross M.A., Hatton C., Will A.M., Lashford L.S., Dexter T.M., et al. Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet*. 1998;351(9097):178-81.
- Zimmermann S., Glaser S., Ketteler R., Waller C.F., Klingmüller U., Martens U.M. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem. Cells*. 2004;22(5):741-9.
- Graham M.K., Meeker A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat. Rev. Urol.* 2017;14(10): 2607-19.
- Heaphy C.M., Meeker A.K. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J. Cell Mol. Med.* 2011;15(6):1227-38.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И.

ДИСРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ ОБЩЕВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

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

Общевариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) – вариант первичного иммунодефицита, при котором угнетение антителопродукции формируется вследствие нарушений межклеточного взаимодействия, затрагивающего клеточные элементы и врожденного, и адаптивного иммунного ответа. Особенностью ОВИН является поздний старт и вариативность клинической манифестации. Перечисленные аргументы определяют цель исследования: выявить динамику изменений клеточных параметров адаптивного и врожденного иммунного ответа в зависимости от длительности и тяжести инфекционной манифестации ОВИН. В этой связи проведен ретроспективный анализ историй болезни и динамическое наблюдение за пятнадцатью пациентами с ОВИН. Выбор конкретных параметров клеточных показателей факторов врожденной резистентности и приобретенного иммунитета осуществляли исходя из системно-функционального подхода иммунодиагностики. Показано, что у пациентов с опосредованной ОВИН гипогаммаглобулинемией и инфекционным фенотипом клинической манифестации регистрируется усиление количественных и функциональных потенциалов эффекторных клеток Т-звена адаптивного иммунитета на фоне снижения числа регуляторных Т-лимфоцитов. При более тяжелом клиническом течении заболевания количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA DR, ниже, чем при более благоприятном варианте, прослеживается тенденция к снижению числа этих клеток, также как и количества периферических Treg при увеличении стажа заболевания. Для клеточных компонентов врожденного иммунитета характерно снижение активности нейтрофилов, угнетение антигенпредставляющей активности моноцитов, численности и цитотоксичности натуральных киллеров. При этом зарегистрирована тенденция к снижению цитолитического потенциала НК при увеличении стажа болезни и статистически значимые отличия в зависимости от тяжести манифестации инфекционного фенотипа ОВИН. Полученные результаты определяют важность оценки клеточного звена иммунной системы у пациентов с ОВИН, в том числе в качестве прогностического критерия тяжести течения.

Ключевые слова: ОВИН; Т-лимфоциты; врожденный иммунитет.

Для цитирования: Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И. Дисрегуляторные процессы клеточного звена иммунной системы в динамике общевариабельной иммунной недостаточности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 160-165. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-160-165>

Sizyakina L.P., Andreeva I.I. Danilova D.I.

DYSREGULATORY PROCESSES OF THE CELLULAR LINK OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE DYNAMICS OF COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY

Rostov State Medical University, 344022, 29 Nakhichevan, Rostov-on-Don, Russia

Common variable immunodeficiency (CVID) is a variant of primary immunodeficiency in which inhibition of antibody production is formed due to disorders of intercellular interaction affecting cellular elements of both innate and adaptive immune responses. A feature of CVID is the late start and variability of clinical manifestation. These arguments determine the purpose of the study: to identify the dynamics of changes in the cellular parameters of the adaptive and innate immune response depending on the duration and severity of the infectious manifestation of CVID. In this regard, a retrospective analysis of medical histories and dynamic observation of fifteen patients with CVID were carried out. Selection of specific parameters of cellular indices of factors of innate resistance and adaptive immunity was carried out on the basis of systemic-functional approach of immunodiagnosics. It is shown that in patients with CVID-mediated hypogammaglobulinemia and infectious phenotype of clinical manifestation, enhancement of quantitative and functional potentials of T-link effector cells of adaptive immunity is recorded against the background of reduction of number of regulatory T-helpers. With a more severe clinical course of the disease, the number of CD3+HLA DR + lymphocytes is lower than with a more favorable version, there is a tendency to decrease the number of these cells, as well as the number of peripheral Treg with an increase in the length of the disease. Cellular components of innate immunity are characterized by a decrease in neutrophil activity, inhibition of antigen-presenting monocyte activity, the number and cytotoxicity of natural killers. At the same time, the tendency to decrease the cytolytic potential of NK with an increase in the length of illness and statistically significant differences depending on the severity of the manifestation of the infectious phenotype of CVID was recorded. The obtained results determine the importance of evaluating the cellular link of the immune system in patients with CVID, including as a prognostic criterion for the severity of the course.

Key words: CVID; T-lymphocytes; innate immunity.

For citation: Sizyakina L.P., Andreeva I.I. Danilova D.I. Dysregulatory processes of the cellular link of the immune system in the dynamics of common variable immunodeficiency. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 160-165 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-160-165>

For correspondence: *Andreeva I.I.*, PhD, professor of the department of clinical immunology and allergology;
e-mail: iai3012@rambler.ru

Information about authors:

Sizyakina L.P., <http://orcid.org/0000-0001-5716-4397>;

Andreeva I.I., <https://orcid.org/0000-0002-7735-4275>;

Danilova D.I., <https://orcid.org/0000-0002-9521-1403>.

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

Acknowledgment. *The work was performed under state task, state registration number AAAA-A18-118013090213-5.*

Received 01.02.2021
Accepted 01.03.2021

Введение. Настоящее время отличает существенный рост формата возможностей клинической иммунологии, что достаточно зримо находит свое отражение в проблеме первичных иммунодефицитов (ПИД). Данный диагноз не только перестал рассматриваться с позиции фатальности, но и прочно вышел за рамки компетенции исключительно педиатров, уже сейчас существует поколение больных ПИД старше 18 лет [1, 2] Увеличение числа пациентов с ПИД связано как с успехами терапии, так и с улучшением выявляемости тех клинических форм, для которых характерно нарастание симптоматики с максимальной манифестацией именно во взрослом возрасте. В этом преломлении наиболее ярким примером является ОВИН [3].

Общий вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) — первичный дефицит, характеризующийся гипогаммаглобулинемией, нарушением выработки специфических антител после иммунизации и повышенной восприимчивостью к инфекциям [4, 5]. ОВИН показывает значительную фенотипическую и генетическую гетерогенность. Современные технологии секвенирования способствовали описанию мутаций в нескольких генах, приводящих к развитию ОВИН, при этом, в отличие от многих других первичных иммунодефицитов, моногенные дефекты выявляются лишь у 2-10% пациентов [6]. Установленные генетические поломки способствуют дефекту таких молекул, как ICOS, CD81, CD27, CTLA4, NFKB1, NFKB2 и целого ряда других, имеющих важное значение в кооперации между В и Т-клетками в зародышевом центре, в проведении внутренних сигнальных путей разных типов клеток иммунной системы [7 – 9]. Эти данные предоставили возможное объяснение патогенеза ОВИН: нарушение антителопродукции есть результат дефекта межклеточного взаимодействия, затрагивающего элементы и врожденного, и адаптивного иммунного ответа. Становится понятным также и то, что многообразие генетических вариантов, связанных с дефектом того или иного компонента, как уже известных, так и пока неустановленных, обеспечивают и фенотипическую вариативность ОВИН [10–12]. Как уже отмечалось, клиническая манифестация заболевания возможна в подростковом и во взрослом возрасте, заболевание может проявляться у лиц как мужского, так и женского пола, не всегда ведущим клиническим симптомом является тяжелая инфекция, спектр неинфекционной манифестации разнообразен, возможны аутоиммунные, лимфопролиферативные заболевания, высока предрасположенность к злокачественным новообразованиям, выделяют энтеропатический и смешанный варианты [13, 14]. Известны исследования, в которых авторы пытаются выявить особенности фенотипической характеристики клеток иммунной системы, ассоциированные

с различными клиническими фенотипами [15]. Следует отметить, что большая часть этих работ относится к изучению В-лимфоцитов, значительно меньше исследований, дающих комплексную характеристику клеточного компонента адаптивной и врожденной иммунной защиты [16, 17]. Между тем, характер взаимосвязи клинической вариативности у пациентов с ОВИН с изменениями реагирования Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, моноцитов, нейтрофилов представляет безусловный интерес ввиду возможного выявления тех количественных либо функциональных параметров, которые могут быть использованы в качестве прогноза вариативности течения.

Цель исследования: выявить динамику изменений клеточных параметров адаптивного и врожденного иммунного ответа в зависимости от длительности и тяжести инфекционной манифестации общевариабельной иммунной недостаточности.

Материал и методы. При реализации цели данного наблюдения проведены ретроспективный анализ историй болезни и динамическое наблюдение за 15 пациентами с ОВИН, женщин – 11, мужчин – 4. Средний возраст 39,7±11,7 лет, возраст возникновения первых клинических проявлений 25±10 лет, возраст, в котором был верифицирован диагноз 32,6±12,4 лет, задержка в постановке диагноза составила 15±4 лет. Выбор конкретных методов оценки клеточных показателей факторов врожденной резистентности и приобретенного иммунитета основан на использовании системно-функционального подхода иммунодиагностики иммуноопосредованных заболеваний [18]. Для исследования фенотипа Т-лимфоцитов в связи с одновременным определением количества клеток и их активационного потенциала, использованы антитела с двухцветной и трехцветной меткой: CD45-FITC/CD4-PE/CD3-PC; CD45-FITC/CD8-PE/CD3-PC; CD45-FITC/CD25-PE/CD3-PC; CD45-FITC/HLADR-PE/CD3-PC (Beckman Coulter, США). Для исследования внутриклеточных маркеров Foxp3 и Granzyme B использовали моноклональные антитела к Foxp3-PC5, (eBioscience, США) и Granzyme B (Serotec, США) в соответствии с методиками производителя. Количественное определение В-лимфоцитов проводили с использованием CD45-FITC/CD20-PE-МкАТ (Beckman Coulter, США). Уровень иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови проводили методом простой радиальной иммунодиффузии в геле с использованием наборов производства ФГУП НПО «Микроген». Определение образования активных форм кислорода нейтрофилов проводили с помощью НСТ-теста в модификации, основанной на спектрофотометрическом варианте учета и определения НСТ сп., НСТ ст. и Кст [19]. Количество НК оценивали с использованием CD45-FITC/CD16-

PE-МкАТ (Beckman Coulter, США). Функциональную активность НК определяли по внутриклеточному содержанию Granzyme B с использованием соответствующих моноклональных антител (Serotec, США) в соответствии с методиками производителя. Для характеристики клеток моноцитарного ряда использовали МкАТ (Beckman Coulter, США) с двойной меткой и в каждый образец добавляли CD14-FITC/HLADR-PE; CD14-FITC/CD282-PE, CD14-FITC/CD284-PE. Фенотип клеток изучали на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Результаты представлены в виде процента позитивных клеток (Mean \pm SD). Для количественной характеристики циркулирующих иммунных комплексов использовали метод преципитации сыворотки в ПЭГ (Haskova et al., 1978) в модификации Гриневич Ю. А., Алфёрова А. Н. [20]. Группу контроля составили практически здоровые доноры крови, 30 человек: 20 мужчин (средний возраст 24,3 \pm 5,1 года) и 10 женщин (средний возраст 25,8 \pm 6,2 года). Частота эпизодов ОРВИ в течение года в среднем составляла 1,76 \pm 0,54 раз в год. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием статистического пакета STATISTICA 10 и R (версия 3.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Анализ соответствия вида распределения признака проводили по критерию Шапиро-Уилка. Описательную статистику количественных признаков представляли в виде центральной тенденции медианы (Me) и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили), в тексте представлено как Me[LQ;UQ]. При анализе использованы непараметрические методы Манна-Уитни, Вилкоксона, Неменьи, теста Фридмана. Различия признавались статистически значимыми на уровне $p < 0,05$.

Результаты. Ретроспективная клиническая характеристика пациентов показала, что в анамнезе у всех регистрировались обострения бронхитов с варибельной частотой рецидивов в течение года, у каждого третьего острый бронхит приводил к осложнениям в виде повторных эпизодов пневмоний, в одном случае развился адгезивный плеврит. У трети пациентов диагностировали синуситы с потребностью в проведении пункций и применением антибиотиков с продолжительностью курсов выше стандартных схем, у каждого пятого проводилось лечение гнойного отита, у одного из пациентов диагностировано снижение слуха. Помимо рецидивов бактериальных инфекций у пятой части больных отмечались рецидивы (до 5–7 эпизодов в год) герпетических высыпаний. Неинфекционные проявления заболевания в нашей группе по большей части представлены патологией желудочно-кишечного тракта, а именно: гистологически, инструментально и анамнестически подтвержденной болезнью Крона, энтероколитом неуточненной этиологии, гепатитом неинфекционной этиологии и фиброзом печени. Также из неинфекционных клинических проявлений зафиксированы транзиторные цитопении, суставной синдром, васкулитоподобные поражения голени. Выявленная гетерогенность клинических проявлений стала основанием для выделения из общего числа находящихся под наблюдением пациентов группы из 10 человек с преимущественно инфекционной манифестацией ОВИН. Особенностью этих больных стало то, что клинические симптомы, которые должны были быть расценены как настораживающие признаки иммунодефицита, развились в возрасте 15 лет, но при сборе анамнеза выяснилось, что еще в раннем детстве у всех пациентов из этой группы отмечены ОРВИ затяжного характера

с последующим развитием осложнений и необходимостью продолжительного применения антибиотиков. К вариантам таких осложнений в основном относились отиты и гаймориты, реже – острые бронхиты, частота отмеченных обострений составляла 2–3 раза в год. После 15 лет, в течение последующих 5 лет жизни частота рецидивов инфекционных заболеваний среди пациентов этой группы значительно возросла и в среднем составила 6–8 раз в течение года, у троих человек развилась бронхоэктатическая болезнь на фоне ежегодных эпизодов пневмонии в течение нескольких лет. В возрастном промежутке от 20 до 30 лет этим больным проведено хирургическое лечение (билобэктомия и пульмонэктомия). У одного пациента диагностирован адгезивный плеврит на фоне двух рецидивов пневмоний в течение года. У двух пациенток зарегистрированы частые рецидивы бактериальных инфекций придаточных пазух носа, приведшие к развитию менингита. У двух других больных со стартом заболевания, характеризовавшимся патологией ЛОР-органов без развития тяжелых жизнеугрожающих инфекций, диагностированы синуситы (до 2 в год) с потребностью в проведении пункций, гнойные отиты. Средний возраст больных этой группы наблюдения 41,6 \pm 11,7, клиническая манифестация стартовала в среднем в возрасте 15 \pm 2 лет, средний возраст, когда был выявлен ПИД, составил 35,6 \pm 10,2 лет.

При верификации диагноза все пациенты прошли полное обследование. Микробиологические исследования мокроты, бронхолегочного лаважа и отделяемого из пазух показали преобладание стрептококковой флоры. При рентгенологических исследованиях значительные отклонения от нормы были верифицированы у пациентов, подвергшихся хирургическим вмешательствам в рамках лечения бронхоэктатической болезни. В остальных случаях отклонений от нормы по данным рентгенографического исследования выявлено не было. Однако по данным СКТ у всех пациентов определялись признаки усиления легочного рисунка, корни легких расширены, в 5 случаях выявлены участки легочной ткани с признаками фиброобразования. В 2-х других случаях легочные поля повышенной пневматизации, без видимых очагово-инфильтративных изменений, легочной рисунок обеднен, умеренный линейный склероз стенок, структурность корней легких снижена. Еще у 3-х пациентов легочная тень эмфизематозна, у одного, перенесшего билобэктомию определялись танталовы швы, корни расширены, легочной рисунок усилен. При оценке состояния сердечно-сосудистой системы, исследования брюшной полости и мочеполовой системы структурных изменений не выявлено. Таким образом, в группе пациентов с ведущим инфекционным синдромом преобладающие патологические изменения затрагивают бронхолегочную систему.

Анализ параметров иммунной системы пациентов с инфекционной манифестацией ОВИН, обследованных до назначения патогенетического лечения либо после значительного (не менее трех месяцев) перерыва иммуноглобулинотерапии, показал, что на фоне угнетения антителообразования выявляются статистически значимые изменения и в показателях клеточного звена адаптивного и врожденного иммунитета (табл. 1). Так, при сравнении с результатами контрольной группы практически здоровых доноров выявляется повышение числа Т-лимфоцитов за счет Т-клеток эффекторной субпопуляции при снижении количества CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов. Верифицированы

и функциональные изменения, проявляющиеся повышением количества Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней активации, увеличением числа содержащих Гранзим В CD8⁺-Т-эффекторов, снижением количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ -Т-регуляторных клеток. В клеточном звене врожденного иммунитета по отношению к контрольным значениям выявлено угнетение активности внутриклеточных кислородзависимых антимикробных систем нейтрофилов, снижение численности и подавление цитолитической активности натуральных киллеров. В моноцитарном сегменте фиксируется повышение числа моноцитов, экспрессирующих TLR 4 и уменьшении количества HLA DR⁺-моноцитов (табл. 1).

При детальном изучении анамнеза заболевания была определена неоднородность группы по средней частоте обострений эпизодов хронических бактериальных инфекций в течение года. Для определения возможных

причин этих различий вся группа была разделена на 2 подгруппы. Первую составили пациенты с частотой эпизодов острых инфекций не больше 3-х раз в течение года (4 человека), во вторую вошли пациенты, уровень заболеваемости которых острыми инфекциями был выше среднего популяционного, то есть, более 4-х раз в течение года (6 человек). Сопоставление данных оценки параметров иммунного статуса двух групп, представленное в табл. 2, свидетельствует, что меньшая частота эпизодов острых инфекций ассоциирована с такими различиями иммунного реагирования, как большее количество Т-клеток, экспрессирующих маркер поздней активации HLA DR, большее число циркулирующих В-лимфоцитов, увеличение доли функционально активных Гранзим-содержащих натуральных киллеров, более выраженная кислородпродуцирующая активность нейтрофилов, меньшее количество TLR4⁺-моноцитов.

Таблица 1

Показатели клеточного звена адаптивного и врожденного иммунного ответа

Показатели, %	ОВИН	Контроль	<i>p</i>
CD3 ⁺	82 [78; 86] *	68 [66; 72]	0.01
CD3 ⁺ CD25 ⁺	3.1 [2.8; 4] *	2.2 [2; 2.3]	0.01
CD4 ⁺	24.8 [20; 30] *	41 [39; 43]	0.004
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	0.7 [0.4; 1.1] *	1.3 [1.0; 1.5]	0.001
CD8 ⁺	53 [38; 59] *	21 [18; 23]	<0.0001
CD8 ⁺ Gr ⁺	43 [33; 50] *	9.38 [7.5; 12.2]	<0.0001
НСТсп., у.е.	79 [72; 82] *	90 [89; 92]	0.004
CD16 ⁺	5 [2; 8] *	12 [10; 13]	0.002
CD16 ⁺ Gr ⁺	2.6 [1; 5] *	10 [8; 11]	<0.0001
CD14 ⁺ CD284 ⁺	37 [30; 48] *	20 [15; 23]	0.01
CD14 ⁺ HLA DR ⁺	60 [54; 66] *	85 [80; 92]	0.001

Примечание. Здесь и в табл.2: * – статистическая значимость различий показателей по сравнению с контролем (*p*<0,05). Средние значения представлены в виде медианы [нижний квартиль; верхний квартиль]. Сравнение по тесту Манна-Уитни.

Таблица 2

Показатели адаптивного и врожденного иммунного ответа у пациентов с ОВИН в зависимости от частоты обострений хронических бактериальных инфекций

Показатели	Частота обострений		<i>p</i>
	≤ 3 раз в год	> 4 раз в год	
CD3 ⁺ , %	80 [75; 84]	82 [80; 88]	0.2
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	5.4 [3.8; 6.7]	4.7 [2.2; 7.3]	0.1
CD3 ⁺ HLA DR ⁺ , %	25.1 [13; 30]	8.5 [2; 12] *	<0.0001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	34 [29; 44]	33 [20; 36]	0.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , %	1.2 [0.8; 1.5]	1.3 [0.6; 1.5]	0.7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	45 [38; 50]	49 [40; 56]	0.08
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Gr ⁺ , %	33 [25; 40]	38.1 [31; 45]	0.07
CD20 ⁺ , %	8.3 [4.4; 11]	5.5 [3.4; 8] *	0.04
IgA, г/л	0.48 [0.21; 0.66]	0.55 [0.15; 0.91]	0.9
IgM, г/л	0.59 [0.33; 0.85]	0.53 [0.32; 0.61]	1
IgG, г/л	3.5 [1.8; 4.6]	2.9 [0.8; 3.9]	0.8
НСТсп., у.е.	95.2 [92; 105]	80.6 [78; 90] *	0.0002
Кст. НСТ	1.5 [1.4; 1.6]	1.1 [1; 1.5]	0.9
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	6.6 [2; 10]	7.4 [4; 11]	0.8
CD3 ⁺ CD16 ⁺ Gr ⁺ , %	5.6 [4; 6]	3.3 [1; 5] *	0.01
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	60.4 [55; 68]	57.5 [49; 66]	0.6
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	25.3 [18; 30]	39.3 [34; 46] *	0.002
CD14 ⁺ HLA DR ⁺ , %	71.2 [64; 80]	63 [56; 78]	0.1

Длительное наблюдение за пациентами с ОВИН и наличие данных, позволяющих провести ретроспективную оценку анамнеза заболевания, обеспечило возможность деления пациентов на группы по давности течения болезни. В нашей группе наблюдения 6 пациентов имели клинически выраженную манифестацию ОВИН, превышающую 10 лет, тогда как 4 пациента считали себя больными менее 10 лет. Сопоставительный анализ результатов иммунологического тестирования при разделении пациентов в зависимости от стажа клинической манифестации ОВИН показал, что срок заболевания более 10 лет ассоциирован с повышением относительного количества моноцитов, экспрессирующих TLR4 (%), 48[45;56] и 37[31;43], $p=0,002$), что является единственным статистически значимым отличительным признаком. В то же время следует отметить ряд тенденций, не подтвержденных статистической обработкой данных, но четко прослеживающихся при сопоставительном анализе: в группе с продолжительностью течения заболевания более 10 лет, относительное число Т-клеток, экспрессирующих поздние активационные маркеры, меньше ($CD3^+HLA\ DR^+$, % 9.7 [7; 14] и 14.1 [10; 21] соответственно при $p=0.07$), меньше и количество Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$, % (0.96 [0.5; 1.2] и 1.24 [0.9; 1.7], $p=0.08$), выявляется тенденция к угнетению суммарного цитолитического потенциала Т-эффекторов ($CD8^+Gr^+$, $10^9/л$ 0.4[0.27; 0.6] и 0.62 [0.39; 0.7], $p=0.09$) и относительного количества функционально активных натуральных киллеров ($CD16^+Gr^+$, % 2.4 [1; 3] и 3.4 [2; 6], $p=0.06$).

Обсуждение. Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что у пациентов с опосредованной ОВИН гипогаммаглобулинемией и инфекционным фенотипом клинической манифестации изменения затрагивают и клеточное звено иммунной системы. При этом клеточное звено адаптивного иммунного ответа характеризует усиление количественных и функциональных потенциалов. Так, повышение общего числа Т-лимфоцитов обусловлено эффекторной субпопуляцией, более того, медианы, отражающие относительное и абсолютное число Т-индукторов меньше контрольных показателей почти вдвое. Следует отметить, что цитотоксические клетки адаптивного иммунного ответа характеризуются увеличением не только количества, но и усилением функциональных свойств, а для всей популяции Т-лимфоцитов характерно повышение экспрессии ранних активационных маркеров. Следует подчеркнуть важность оценки и числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих антигены HLA II класса. Нами установлено, что при более тяжелом клиническом течении заболевания количество $CD3^+HLA\ DR^+$ -лимфоцитов существенно ниже, чем при более благоприятном течении, кроме того, прослеживается тенденция к снижению числа этих клеток в периферической циркуляции при увеличении стажа заболевания. Весьма интересна взаимосвязь между значительным увеличением функциональных потенциалов Т-звена и снижением количества регуляторных Т-хелперов. Факт снижения количества Treg, обеспечивающих интраиммунную супрессию, при ОВИН отмечен в ряде публикаций других исследователей [21;22], нами, помимо этого, зарегистрирована и тенденция к обратной корреляции количества периферических Treg и длительности ОВИН. Еще одна тенденция, обусловленная различием функций Т-лимфоцитов в динамике течения заболевания, прослеживается и в отношении функ-

циональных резервов Т-эффекторов, а именно, сниженные количества Гранзим-позитивных Т-эффекторов, что наводит на вывод о формирующемся со временем истощении адапционных ресурсов цитолитических Т-лимфоцитов. Без сомнений, данное заключение нуждается в дальнейшем подтверждении на большем числе пациентов.

Безусловный интерес вызывают данные об особенностях клеточных реакций врожденной системы защиты при ОВИН, где, в отличие от адаптивного иммунного ответа, регистрируется угнетение количественных и качественных характеристик. Этот факт подтвержден при характеристике свойств нейтрофильного звена: при инфекционном фенотипе ОВИН снижена спонтанная кислородпродуцирующая функция нейтрофилов, а менее благоприятный вариант течения сопряжен с большим угнетением способности спонтанной продукции активных метаболитов кислорода. Изменению подвержено и моноцитарное звено, что верифицируется снижением числа $HLA\ DR^+$ -моноцитов при ОВИН, в сравнении с показателями группы здоровых. Этот факт интересен с позиции значимости данного критерия для оценки способности клеток моноцитарно-макрофагального ряда к презентации антигена. По-видимому, одним из факторов, определяющих угнетение антителлопродукции при ОВИН, может служить и нарушение этого свойства. Анализ способности числа моноцитов, экспрессирующих Toll-подобные рецепторы показал, что выявленные особенности могут быть применены при клинической характеристике пациентов с ОВИН. Так, нами показано увеличение числа $CD14^+CD284^+$ моноцитов как в общей группе пациентов с инфекционной манифестацией, так и выявлена статистически более значимая активация распознавания паттернов посредством TLR 4 при более выраженной клинической манифестации и при увеличении продолжительности течения ОВИН. Весьма убедительны данные, характеризующие киллерную популяцию врожденного иммунитета. Нами показано не только уменьшение общего числа натуральных киллеров при ОВИН, но и уменьшение их цитолитических свойств, тенденция к снижению этого показателя при увеличении стажа болезни и статистически значимые отличия в зависимости от тяжести манифестации инфекционного фенотипа ОВИН. Следует отметить, что выявленные отличия стали основой выбора критерия для прогноза эффективности заместительной терапии [23].

Заключение. У пациентов с инфекционным фенотипом общевариабельной иммунной недостаточности интенсифицировано созревание Т-лимфоцитов при активации Т-эффекторов, уменьшении количества Т-индукторов, ослаблении иммуносупрессии, снижении активности нейтрофилов, численности и цитотоксичности натуральных киллеров, угнетении антигенпредставляющей активности моноцитов при усилении ими первичного распознавания посредством TLR 4. Как сами показатели, отражающие перечисленные особенности иммунного ответа, так и связь степени их изменений с длительностью и тяжестью инфекционной манифестацией ОВИН, определяют важность оценки клеточного звена иммунной системы у пациентов с ОВИН, в том числе в качестве прогностического критерия тяжести течения и эффективности патогенетической терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания на выполнение прикладных научных исследований, № госрегистрации: АААА-А18-118013090213-5.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 17, 21, 22 см. REFERENCES)

1. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты у взрослых. Преимущественное нарушение синтеза антител. *Терапия*. 2018; 7-8 (25-26): 119-25. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2018.7-8.119-124>.
18. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
19. Пинегин Б.В., Бурая Т.Л., Бутаков А.А. Влияние некоторых иммуномодуляторов на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови здоровых людей *in vitro*. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 1994; 3: 79-82.
20. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов. *Лабораторное дело*. 1981; 8: 493.
23. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Кролевец Д.И. Способ оценки эффективности лечения больных с общевариабельной иммунной недостаточностью. Патент РФ № 2683242; 2019.

REFERENCES

1. Latysheva E.A. Primary immune deficiency disease in adults. Preferential disturbance of antibody synthesis. *Terapiya*. 2018; 7-8 (25-26): 119-25. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2018.7-8.119-124>. (in Russian)
2. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A. et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J. Clin. Immunol.* 2020; 40: 24-64. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-01900737-x>.
3. Rider N.L., Kutac C., Hajjar J., Scalchunes C., Seeborg F.O., Boyle M. et al. Health-related quality of life in adult patients with common variable immunodeficiency disorders and impact of treatment. *J. Clin. Immunol.* 2017; 37(5):461–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0404-8>.
4. Salzer U., Grimbacher B. Common variable immunodeficiency: The power of co-stimulation. *Semin Immunol.* 2006;18(6):337-346. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.004>.
5. Abbott J.K., Gelfand E.W. Common variable immunodeficiency: diagnosis, management, and treatment. *Immunol. Allergy Clin.* 2015; 35 (4): 637-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.009>.
6. Bogaert D.J.A., Dullaers M., Lambrecht B.N., Vermaelen K.Y., de Baere E., Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet.* 2016; 53:575–90. DOI: [10.1136/jmedgenet-2015-103690](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690).
7. Bergbreiter A., Salzer U. Common variable immunodeficiency: a multifaceted and puzzling disorder. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2009;5 (2):167-80. doi:10.1586/1744666X.5.2.167.
8. Berrón-Ruiz L. Alteraciones inmunológicas en la inmunodeficiencia común variable [Immunological alterations in common variable immunodeficiency]. *Rev. Alerg. Mex.* 2017; 64(1):87-108. doi:10.29262/ram.v64i1.227.
9. Quinn J., Modell V., Holle J., Truty R., Aradhya S., Johnson B., Orange J. Jeffrey's insights: Jeffrey Modell Foundation's global genetic

- sequencing pilot program to identify specific primary immunodeficiency defects to optimize disease management and treatment. *Immunol. Res.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09131-x>.
10. Bousfiha A J.L., Jeddane L., Al-Herz W. A.F., Ailal F., Casanova J.L., Chatila T. et al. The 2015 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* 2015; 35:727–38. doi: [10.1007/s10875-015-0198-5](https://doi.org/10.1007/s10875-015-0198-5).
 11. Farmer J.R., Ong M.S., Barmettler S., Yonker L.M., Fuleihan R., Sullivan K. E. Common Variable Immunodeficiency Non-Infectious Disease Endotypes Redefined Using Unbiased Network Clustering in Large Electronic Datasets. *Front Immunol.* 2018;8:1740. doi:10.3389/fimmu.2017.01740.
 12. Li R., Zheng Y., Li Y., Zhang R., Wang F., Yang D. et al. Common variable immunodeficiency with genetic defects identified by whole exome sequencing – Electronic text. *Hindawi. BioMed Research International.* 2018; Article ID 3724630: 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/3724630>.
 13. Chapel H., Lucas M., Patel S., Lee M., Cunningham-Rundles C., Resnick E. et al. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130 (5): 1197-8. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.046.
 14. Bousfiha A., Jeddane L., Picard C., Ailal F., Gaspar H.B., Al-Herz W. et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* 2018; 38(1):129-43. doi: [10.1007/s10875-017-0465-8](https://doi.org/10.1007/s10875-017-0465-8).
 15. Ameratunga R., Woon S.-T., Gillis D., Koopmans W., Steele R. New diagnostic criteria for CVID. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014;10(2): 183-6. doi: [10.1586/1744666X.2014.875274](https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.875274). PMID: 24410535.
 16. Warnatz K., Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry. Part B (Clinical Cytometry)*. 2008; 74B: 261–71. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20432>.
 17. Suchanek O., Sadler R., Bateman E. A., Patel S. Y., Ferry B. L. Immunophenotyping of putative human B 1 B cells in healthy controls and common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clinical and Experimental Immunology.* 2012; 170: 333–41. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04656.x.
 18. Khaïtov R.M., Pinegin B.V., Yarin A.A. Guidelines for Clinical Immunology. Diagnosis of diseases of the immune system: a guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
 19. Pinegin B.V., Buraya T.L., Butakov A.A. The influence of some immunomodulators on the functional activity of polymorphonuclear leukocytes in the peripheral blood of healthy people *in vitro*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1994; 3: 79-82. (in Russian)
 20. Grinevich Yu.A., Alferov A.N. Determination of the concentration of circulating immune complexes. *Laboratornoe delo.* 1981; 8: 493. (in Russian)
 21. Yu G.P., Chiang D., Song S.J., Hoyte E.G., Huang J., Vanisharn C. et al. Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. *Clin. Immunol.* 2009; 131 (2): 240–53. DOI: [10.1016/j.clim.2008.12.006](https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.12.006).
 22. Horn J., Manguiat A., Berglund L.J., Knerr V., Tahami F., Grimbacher B. et al. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 156 (3): 446–54. doi: [10.1111/j.1365-2249.2009.03913.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03913.x).
 23. Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Krolevets D.I. A method of evaluating treatment efficacy in patients with common variable immune deficiency. Patent Russian Federation No. 2683242; 2019. (in Russian)

Поступила 01.02.21

Принята к печати 01.03.21

© КРАВЧЕНКО Л.В., 2021

Кравченко Л.В.

ДИСБАЛАНС ФАКТОРОВ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, 344012, Ростов-на-Дону, Россия

Цель исследования: оценить дисбаланс параметров иммунного статуса в момент манифестации цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) у новорожденных с целью прогноза развития тяжелой формы заболевания. Обследованы 133 новорожденных с ЦМВИ. В зависимости от тяжести состояния все дети были разделены на две группы: 1 – ЦМВИ, тяжелая форма – 60 человек (45,1 %); 2 – ЦМВИ, среднетяжелая форма – 73 человек (54,9 %). Проведено иммунологическое обследование, включающее определение Т и В-лимфоцитов, а также межклеточное взаимодействие между ними. С помощью метода «дерева классификации» нами проведено сопоставление двух дифференцированных подходов к прогнозу тяжелой формы ЦМВИ: на основе исследования взаимосвязей между Т-лимфоцитами (CD3⁺), Т-хелперами (CD4⁺), содержанием цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) и В лимфоцитов (CD20⁺), и путем исследования взаимодействия молекул костимуляции CD3+ CD28+, CD3- CD28+, CD3+ CD28-, CD20+CD40+. В данном исследовании продемонстрировано, что «стандартная иммунограмма», ограничиваясь определением CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ лимфоцитов показывает меньшую информативность в прогнозе развития тяжелой формы заболевания у данного контингента больных, чем комбинация маркеров, включающая CD3+CD28-, CD20+CD40+. Модель прогнозирования тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей, основанная на анализе содержания молекул костимуляции CD 28, CD 40, имеет более высокую информативность, что делает возможным своевременное начало специфической терапии.

Ключевые слова: новорожденные; цитомегаловирусная инфекция; Т-лимфоциты; нарушения активации.

Для цитирования: Кравченко Л.В.. Дисбаланс факторов приобретенного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в зависимости от тяжести заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 166-171. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-166-171>

Kravchenko L.V.

IMBALANCE OF ACQUIRED IMMUNITY FACTORS IN NEWBORNS WITH CYTOMEGALOVIRAL INFECTION DEPENDING ON THE SEVERITY OF THE DISEASE

Rostov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 344012, Rostov-on-Don, Russia

Objective: to assess the imbalance of the parameters of the immune status at the time of manifestation of CMVI in newborns in order to predict the development of a severe form of the disease. *Methods:* 133 newborns with CMVI were examined. Depending on the severity of the condition, all children were divided into two groups: 1 – CMVI, severe form – 60 people (45.1%); 2 – CMVI, moderate form – 73 people (54.9%). An immunological examination was carried out, including the determination of T and B lymphocytes, as well as intercellular interaction between them. Using the “classification trees” method, we compared two differentiated approaches to the prediction of severe CMVI: based on a study of the relationships between T-lymphocytes (CD3⁺), T-helpers (CD4⁺), the content of cytotoxic lymphocytes (CD8⁺) and B lymphocytes (CD20⁺) and by studying the interaction of co-stimulation molecules CD28, CD3 + CD28 +, CD3-CD28 +, CD3 + CD28-. *Results.* In this study, it was demonstrated that the “standard immunogram”, limited to the definition of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ lymphocytes, shows less information in predicting the development of a severe form of the disease in this patient population than the combination of markers, including CD3 + CD28-, CD20 + CD40 +. *Findings.* A model for predicting a severe form of cytomegalovirus infection in newborns based on the analysis of the content of CD 28 costimulation molecules has a higher information content, which makes it possible to start specific therapy on time.

Key words: neonatal infant; cytomegalovirus infection; T-lymphocytes; impaired activation.

For citation: Kravchenko L.V. Imbalance of acquired immunity factors in newborns with cytomegaloviral infection depending on the severity of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 166-171 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-166-171>

For correspondence: *Kravchenko L.V.*, Dr. Sci. Med., lead researcher of the department of pediatric; e-mail: larakra@list.ru

Information about author:

Kravchenko L.V., <https://orcid.org/0000-0002-0036-4926>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.05.2020
Accepted 24.02.2021

Введение. Частота врожденной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) составляет в мире в среднем около 1%; в развитых странах эта инфекция встречается реже,

чем в развивающихся: 0,2–2 и 0,6–5,4% соответственно [1 – 5]. Цитомегаловирус является наиболее распространенной причиной врожденных инфекций.

Для корреспонденции: *Кравченко Лариса Вахтанговна*, докт. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела педиатрии; e-mail: larakra@list.ru

Врожденная ЦМВИ проявляется поражением внутренних органов, нередко с вовлечением ЦНС, и патологическими лабораторными тестами [6]. Инфицирование до 24-й недели беременности, приводит к различным мальформациям головного мозга, нарушению формирования коры микроцефалии, гипоплазии мозжечка, вентрикуломегалии [7].

Клиническая картина врожденной ЦМВИ в неонатальном периоде варьирует от легких неспецифических проявлений до тяжелого поражения различных органов [8]. Изменения со стороны ЦНС, по данным нейровизуализации, встречаются в 50–87% случаев при симптоматическом варианте. Характерно повреждение герминального матрикса, белого вещества мозга и коры. Обусловленные ЦМВИ воспалительные и некротические изменения в зонах герминального матрикса, белого вещества мозга и коры приводят к образованию кист и кальцификатов. Врожденная ЦМВИ нередко ведет к серьезным отдаленным последствиям, таким, как нейросенсорная тугоухость в сочетании с расстройствами равновесия (наиболее часто), интеллектуальная недостаточность, поведенческие расстройства, детский церебральный паралич, эпилепсия, нарушение зрения, микроцефалия. Риск последствий наиболее высок (до 40–65%) при манифестной цитомегаловирусной инфекции [9–11].

Учитывая, что ЦМВИ в детском возрасте в настоящее время рассматривается как ведущий фактор формирования вторичных иммунодефицитов, становится очевидной необходимость изучения особенностей иммунологических нарушений у детей с этой патологией. Недавние исследования показывают, что представления о процессах активации и стимуляции Т-лимфоцитов до сих пор активно развиваются [12–15]. Иммунологическое обследование таких пациентов имеет диагностическую и прогностическую значимость.

Цель исследования: оценить дисбаланс параметров иммунного статуса в момент манифестации ЦМВИ у новорожденных с целью прогноза развития тяжелой формы заболевания.

Материал и методы. Проведен ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных 133 новорожденных ребенка с ЦМВИ. Исследование одобрено локальным Этическим комитетом НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

В зависимости от тяжести состояния все дети были разделены на две группы: 1 – ЦМВИ (тяжелая форма) – 60 человек (45,1 %); 2 – ЦМВИ (среднетяжелая форма) – 73 человек (54,9 %).

Всем наблюдавшимся пациентам проводили иммунологическое обследование, включающее определение Т и В-лимфоцитов. Для выявления вируса цитомегалии использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Материалом для исследования служили периферическая кровь и моча. Экспрессию мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток периферической крови CD3, CD4, CD8, CD20, CD28, CD40 определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Beckman COULTER» Epics XL II с помощью моноклональных антител к соответствующим кластерам дифференцировки фирмы IMMUNOTECH (Франция).

Нами был применен Критерий U Манна – Уитни для независимых выборок. В случае $p < 0,05$ предполагалось, что исследуемые выборки по этим параметрам не случайны, т.е. между ними возможно существуют связи и взаимодействия, которые были изучены в данном исследовании.

Применялись процедуры описательной статистики, с помощью которой оценивались значения медианы и интерквартильного размаха (25%, 75%). Достоверность полученных результатов рассчитывалась при доверительной вероятности 95%.

Для выбора статистически значимых параметров для прогноза тяжелой формы ЦМВИ при помощи пакета SPSS 26.00 были применены: метод (алгоритм) «случайный лес», где из входного потока параметров выбиралась некая иерархия важности параметров (т.е. подпотоков параметров), и метод (алгоритм) «деревья решений», с помощью которого строились (выявлялись) аналитические зависимости. Для визуальной оценки мощности полученной системы диагностических правил применяли метод построения характеристической ROC – кривой (Receiver-operating characteristic curve) [16].

Результаты. В ходе проведенного исследования выявлены изменения субпопуляционного состава лимфоцитов между группами (табл. 1).

Уровень относительного количества Т-хелперов (CD4⁺), Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы ко-стимуляции CD3⁺ CD28⁺ при тяжелой форме ЦМВИ был статистически значимо ниже, чем при среднетяжелой форме инфекции. Содержание В-лимфоцитов (CD 20⁺), В-лимфоцитов, несущих ко-стимулирующие молекулы CD 40 (CD20⁺CD40⁺) оказалось в группе детей с тяжелой формой ЦМВИ статистически значимо выше, чем в группе детей со среднетяжелой формой заболевания (табл. 1).

С помощью метода «деревья классификации» нами проведено сопоставление двух дифференцированных подходов к прогнозу тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей.

Таблица 1

Характеристика Т и В-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией при различных формах заболевания

Показатели, %	Тяжелая форма – группа 1 (n = 60)	Среднетяжелая форма – группа 2 (n = 73)	Значимость различий между группами
CD3 ⁺	68,60(60,87-78,88)	66,00 (56,70-77,00)	0,416
CD4 ⁺	41,25(33,60-51,31)	47,00(41,13-55,83)	0,003
CD8 ⁺	17,02(13,20-20,97)	17,20(14,50-24,46)	0,414
CD20 ⁺	20,14 (11,78 – 29,90)	16,02 (9,20 – 29,90)	0,001
CD3 ⁺ CD28 ⁺	50,10 (41,26-60,25)	61,35 (53,85-72,31)	0,0001
CD3 ⁺ CD28 ⁺	7,18 (2,46-15,43)	10,51(4,41 -17,30)	0,495
CD3 ⁺ CD28 ⁻	18,52 (6,90-37,26)	4,49 (2,80-7,30)	0,0001
CD20 ⁺ CD40 ⁺	24,23 (16,70-30,22)	15,82 (10,17-22,30)	0,0001

Примечание. Результаты представлены в виде медианы, в скобках даны значения 1-3 квартиля.

Таблица 2

Показатели, необходимые для определения чувствительности и специфичности (первый прогноз)

Группы больных	Предсказанный положительный прогноз тяжелой формы ЦМВИ (1 группа)	Предсказанный отрицательный прогноз тяжелой формы ЦМВИ (2 группа)	Процент правильных предсказаний
Наличие тяжелой формы ЦМВИ (1 группа) (n= 60)	Истинно положительный результат (n=51)	Ложноположительный результат (n=9)	85,0%
Отсутствие тяжелой формы ЦМВИ (2 группа) (n=73)	Ложноотрицательный результат (n= 18)	Истинно отрицательный результат (n=55)	75,3%

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

Таблица 3

Показатели, необходимые для определения чувствительности и специфичности (второй прогноз)

Группы больных	Предсказанный положительный прогноз тяжелой формы ЦМВИ (1 группа)	Предсказанный отрицательный прогноз тяжелой формы ЦМВИ (2 группа)	Процент правильных предсказаний
Наличие тяжелой формы ЦМВИ (1 группа) (n=60)	Истинно положительный результат (n=51)	Ложноположительный результат (n= 9)	85,0%
Отсутствие тяжелой формы ЦМВИ (2 группа) (n=73)	Ложноотрицательный результат (n=0)	Истинно-отрицательный результат (n=73)	100,0%

Первый прогноз – на основе исследования взаимосвязей между параметрами «стандартной иммунограммы»: Т-лимфоцитами (CD3⁺), Т-хелперами (CD4⁺), содержанием цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) и В лимфоцитов (CD20⁺).

Второй – путем исследования взаимодействия молекул костимуляции Т (CD3⁺ CD28⁺, CD3⁻ CD28⁺, CD3⁺ CD28⁻) и В (CD20⁺ CD 40⁻)- лимфоцитов.

Прогноз тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции путем исследования взаимосвязей между параметрами «стандартной иммунограммы» (первый прогноз).

Так как в клиническом тесте всегда сохраняется возможность ложноположительного и ложноотрицательного результата, были построены черырехпольные таблицы (табл. 2, 3), в которых приведены показатели, необходимые для определения чувствительности и специфичности [16].

1. Истинно положительный результат: пациенты с тяжелой формой ЦМВИ (1 группа) и положительным результатом обследования.

2. Ложноотрицательный результат: пациенты с тяжелой формой ЦМВИ (1 группа) и отрицательным результатом обследования.

3. Ложноположительный результат: пациенты без тяжелой формы ЦМВИ, т.е. 2 группа, но с положительным результатом обследования.

4. Истинно отрицательный результат: пациенты без тяжелой формы ЦМВИ, т.е. 2 группа и с отрицательным результатом обследования.

В результате процедуры отсеивания из всей совокупности изучаемых показателей клеточного и гуморального звеньев иммунной системы были обнаружены статистически значимые параметры для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции: CD20⁺, CD3⁺, CD4⁺. Важность вышеуказанных независимых переменных для прогноза тяжелой формы ЦМВИ оставила 100%, 60,8% и 45,9% соответственно.

С помощью метода «деревья классификации» (рис. 1) были получены системы неравенств, четыре из которых классифицируют 1 группу (тяжелая форма цитомегало-

вирусной инфекции).

Последовательное применение полученных неравенств позволяет выделить из входного потока больных пациентов с прогнозом развития тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции. Применение метода «деревья классификации» (рис. 1) позволило сформулировать следующее диагностическое правило:

1. если $CD20 > 25,345\%$;

или

2. если $CD20 \leq 25,345\%$ и $CD 4 \leq 36,965\%$;

или

3. если $CD20 \leq 15,07\%$ и $CD 4 > 36,965\%$ и $60,945\% < CD3 \leq 72,97\%$;

или

4. если $CD20 \leq 25,345\%$ и $CD20+ > 15,07\%$ и $CD4 > 36,965\%$ и $0,33\% < CD 3 \leq 72,97\%$,

то прогнозируем тяжелую форму цитомегаловирусной инфекции.

Информационная значимость диагностического теста прогноза развития тяжелой формы ЦМВИ (первый прогноз): чувствительность – 73,9%, специфичность – 85,9%, диагностическая точность теста – 79,7%.

Для визуальной оценки полученной системы диагностических правил построена ROC- кривая (рис. 2).

Показатель AUC, отражающий площадь под кривой, равный 0,846, свидетельствует об очень хорошем качестве прогностической качества модели.

Прогноз тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции путем исследования взаимосвязей между наличием либо отсутствием костимулирующих молекул (второй прогноз). Показатели, необходимые для определения чувствительности и специфичности, представлены в табл. 3.

В результате процедуры отсеивания из всей совокупности изучаемых показателей клеточного и гуморального звеньев иммунной системы были обнаружены статистически значимые параметры для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции: CD3⁺CD28⁻; CD20⁺CD40⁺. Важность вышеуказанных независимых переменных для прогноза тяжелой формы ЦМВИ оста-

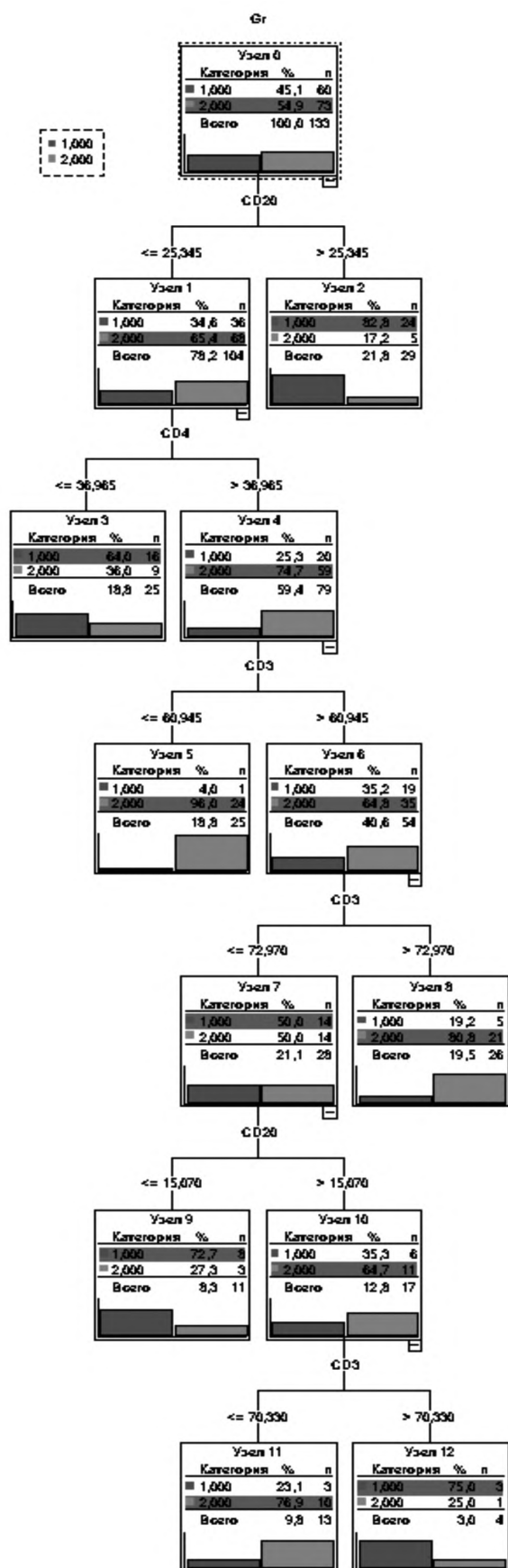


Рис. 1 Деревья классификации (первый прогноз).

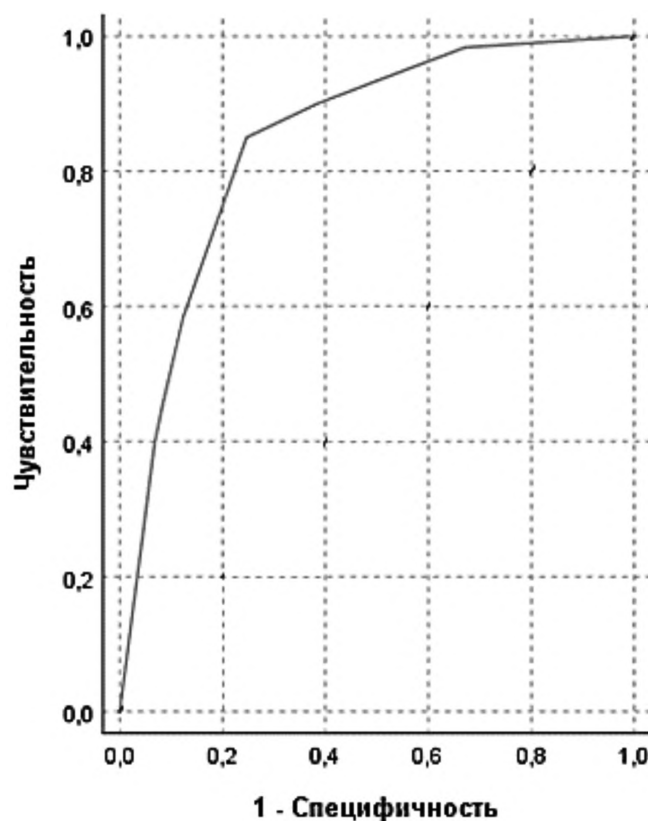


Рис. 2. ROC-кривая (первый прогноз) для тяжелой формы ЦМВИ (группа 1).

вила 100% и 18,9 % соответственно.

С помощью метода «деревья классификации» (рис. 3) были получены системы неравенств, три из которых классифицируют тяжелую форму ЦМВИ (1 группа).

Последовательное применение полученных неравенств позволяет выделить из входного потока больных пациентов с прогнозом развития тяжелой формы ЦМВИ.

Применение метода «деревья классификации» (рис. 3) позволило сформулировать следующее диагностическое правило:

1. если $CD3^+CD28^- > 14,085\%$;
- или
2. если $CD3^+CD28^- \leq 14,085\%$;
- или
3. если $CD3^+CD28^- \leq 14,085\%$ и $CD20^+CD40^+ > 37,15\%$, то прогнозируем тяжелую форму цитомегаловирусной инфекции.

Информационная значимость диагностического теста прогноза развития тяжелой формы ЦМВИ (второй прогноз): чувствительность – 100 %, специфичность – 89,0%, диагностическая точность теста – 92,0%.

Для визуальной оценки полученной системы диагностических правил построена ROC-кривая (рис. 4).

Показатель AUC, отражающий площадь под кривой, равный 0,925, свидетельствует об отличном качестве прогнозирующей модели.

Обсуждение. В ходе исследования был использован ROC-анализ, с помощью которого анализировали информативность параметров прогнозирования тяжелой формы ЦМВИ у новорожденных. Комбинация параметров «стандартной иммунограммы», выявленных в ре-

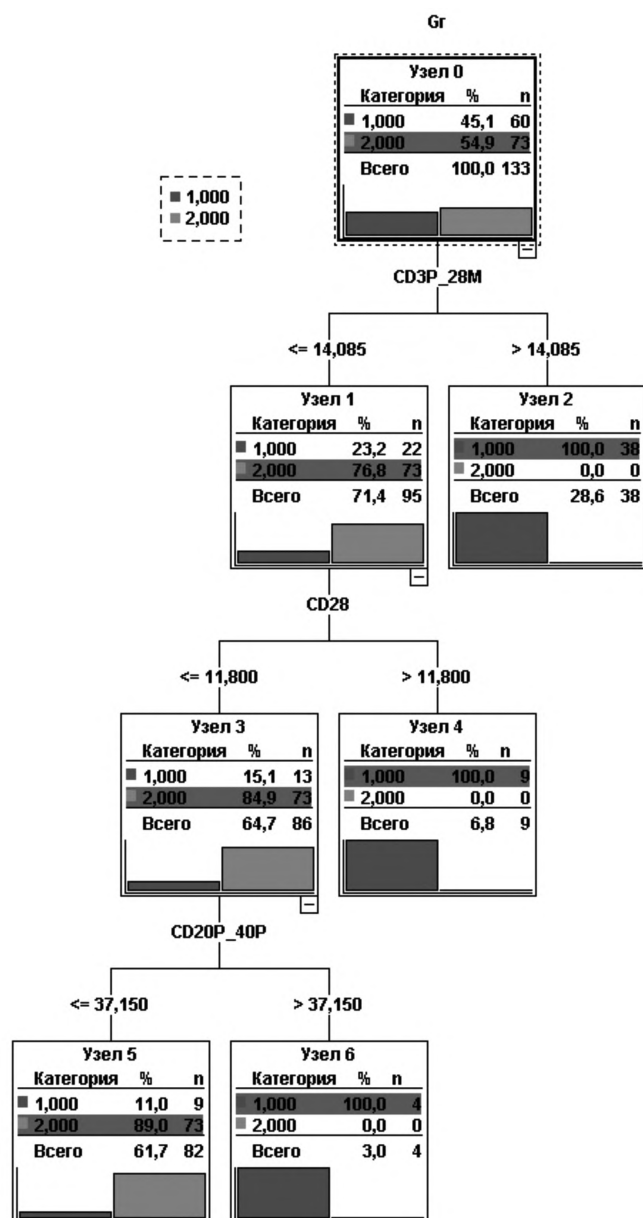


Рис. 3. Деревья классификации (второй прогноз).

зультате процедуры отсеивания ($CD20^+$, $CD3^+$, $CD4^+$) и статистически значимых для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции свидетельствовала о хорошей информативности (значение площади под ROC-кривой - 0,846). Чувствительность методики - 73,9%, специфичность - 85,9% и диагностическая точность - 79,7%.

Однако, в ходе проведенного ROC-анализа влияния молекул костимуляции на развитие тяжелой формы ЦМВИ, была продемонстрирована их более высокая информативность, чем в ходе предыдущего анализа. В частности, комбинация маркеров, включающая $CD3^+CD28^-$, $CD20^+CD40^+$, повысила значение площади под кривой до 0,925, чувствительность метода до 100%, специфичность до 89,0%, а диагностическую точность до 92,0%.

В данном исследовании продемонстрировано, что «стандартная иммунограмма», ограничиваясь опреде-

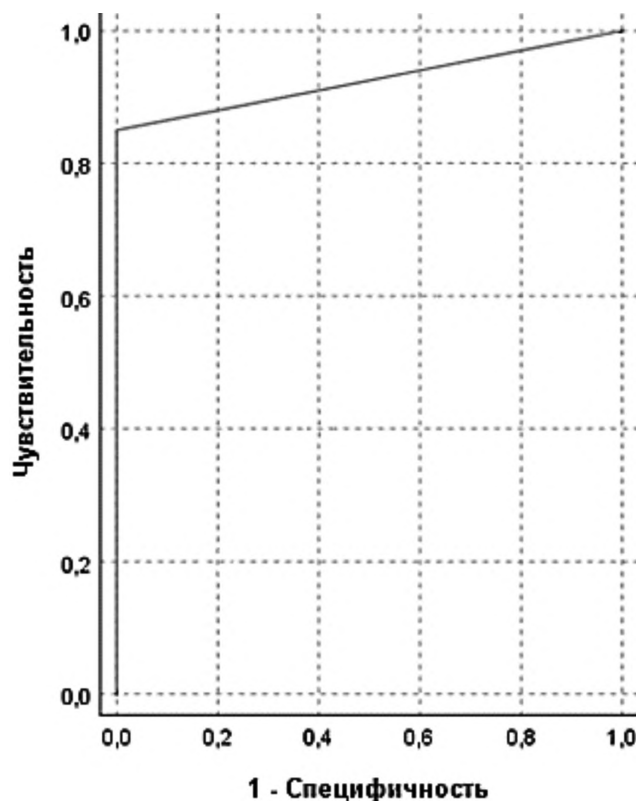


Рис. 4. ROC – кривая (второй прогноз) для тяжелой формы ЦМВИ (группа 1).

лением $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$ -лимфоцитов, показывает меньшую информативность в прогнозе развития тяжелой формы заболевания у данного контингента больных.

Выявленное в данном исследовании повышенное содержание форм Т-лимфоцитов без рецепторов межклеточной адгезии» $CD28$ ($CD3^+CD28^-$) и их 100% статистическая значимость в прогнозе тяжелой формы ЦМВИ свидетельствует о важности костимулирующего сигнала в развитии адаптивного иммунного ответа при ЦМВИ.

Полученные нами данные согласуются с работами других исследователей, в которых показано, что для функционирования иммунной системы ключевую роль играют межклеточные взаимодействия, в которых, в частности, связывание молекул $CD28$ Т-лимфоцитов и вариантов молекул В7 необходимы для взаимодействия антигенпредставляющей клетки и Т-хелперов. В результате взаимодействия В7 с $CD28$ происходит пролиферация Т-клеток и синтез цитокинов, в первую очередь интерлейкина-2, а также усиление выживаемости Т-клеток [5,7,10]. Преобладание форм Т-лимфоцитов без экспрессии $CD28$ ($CD3^+CD28^-$) (таблица 1) свидетельствует об отсутствии костимулирующего сигнала, что ослабляет активацию Т-лимфоцитов при тяжелой форме ЦМВИ.

Статистически значимое увеличение экспрессии костимулирующих молекул $CD20^+40^+$ на В-лимфоцитах при тяжелой форме ЦМВИ объясняется их важной ролью в реализации полноценного гуморального иммунного ответа, переклещении и синтезе основных классов иммуноглобулинов.

Выводы.

1. Предложенные диагностические правила можно считать скрининговыми маркерами прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных, что делает возможным своевременное начало специфической терапии.

2. Одной из патогенетических особенностей развития тяжелой формы ЦМВИ у новорожденных является нарушение процессов костимуляции, проявляющихся повышенным уровнем CD3⁺ CD28⁻ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, несущих костимулирующие молекулы CD 40.

3. Модель прогнозирования тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей, основанная на анализе содержания молекул костимуляции CD 28, CD40 имеет более высокую информативность по сравнению с прогностической моделью, учитывающей параметры «стандартной иммунограммы».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-11 см. REFERENCES)

1. Карпова А.Л., Нароган М.В., Карпов Н.Ю. Врожденная цитомегаловирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2017; 62: (1): 10–18.
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. «Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(6): 525–38.
3. Кравченко Л.В. Роль нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса. *Инфекция и иммунитет*. 2019; Т. 9(2): 288–94.
4. Кравченко Л.В., Левкович М.А. Механизмы иммуносупрессии при частых острых респираторно-вирусных инфекциях у детей, перенесших цитомегаловирусную инфекцию в периоде новорожденности. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017; 3(9): 34 – 8.
5. Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В. Роль полиморфизма гена интерферона γ и интерферонпродукции в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6 типа у детей раннего возраста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (6). – 357-61.
6. Бояркина А.В., Потапов А.Л. Методология оценки информационной значимости диагностических тестов в анестезиологии и реаниматологии. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2013; 12 (5). – 71-75.

REFERENCES

1. Karpova A L Narogan M V Karpov N IU Congenital cytomegalovirus infection: Diagnosis, treatment, and prevention. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii*. 2017; 62: (1): 10–8. DOI: 10.21508/1027–4065–2017–62–1–10–18. (in Russian)
2. Halwachs-Baumann G. (Ed.). Congenital Cytomegalovirus Infection. Epidemiology, Diagnosis, Therapy. Springer Wien New York; 2011.
3. Reddehase M. J., ed. Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention. Norfolk, UK. Caister Academic Press; 2013.
4. Cannon M.J., Griffiths P.D., Aston V., Rawlinson W.D. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit. *Rev. Med. Virol*. 2014; 36(24): 291–307.
5. Williams E.J., Kadambari S., Berrington J.E. et al. Feasibility and acceptability of targeted screening for congenital CMV-related hearing loss. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*. Ed. 2014; 99: 230–6.
6. Lanzieri T.M., Dollard S.C., Bialek S.R., Grosse S.D. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int. J. Infect. Dis*. 2014; (22): 44–8.
7. Hayakawa J., Kawakami Y., Takeda S., Ozawa H, Fukazawa R., Takase M., Fukunaga Yu. A neonate with reduced cytomegalovirus DNA copy number and marked improvement of hearing in the treatment of congenital cytomegalovirus infection. *J. Nippon Med. Sch*. 2012; (79): 471–7.
8. Khan R., Ranganathan M., Mondal T. Congenital Cytomegalovirus (Cmv) Infection and Ascending Aorta Dilation. *J Cardiol Curr Res*. 2015; 4 (1): 21-30. DOI: 10.15406/jccr.2015.04.00130.
9. Cannon M.J., Griffiths P.D., Aston V., Rawlinson W.D. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit. *Rev. Med. Virol* 2014; (24):291–307.
10. Alarcon A., Martinez-Biarge M., Cabanas F., Hernanz A., Quero J., Garcia-Alix A. Clinical, Biochemical, and Neuroimaging Findings Predict Long-Term Neurodevelopmental Outcome in Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Pediatr*. 2013; 163: 828–34. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.03.014.
11. Bernard S., Wiener-Vacher S., Abbeele T.V.D., Teissier N. Disorders in Children With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics*. 2015; 136: (4): 887–95.
12. Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subset. *Meditsinskaia immunologiya*. 2015; 17(6): 525–38. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538. (in Russian)
13. Kravchenko L.V. A role of impaired neonatal T cell activation upon late CMV detection. *Infektsiia i immunitet*. 2019; 9(2): 288–94. DOI 10.15789/2220-7619-2019-2-288-294. (in Russian)
14. Kravchenko L.V., Levkovich M.A. Mechanisms of immunosuppression upon frequent acute viral respiratory infections in infants after neonatal cytomegalovirus infection. *VICH-infektsiia i immunosupressii*. 2017; 3(9): 34–8. DOI 10.22328/2077-9828-2017-9-3-34-38. (in Russian)
15. Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Piatikova M.B. The role of polymorphism of the interferon gene γ and interferon production in the pathogenesis of infection caused by herpes 6 type virus in children of early age. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (6): 357-61. (in Russian)
16. Boyarkina A.V., Potapova A.L. Evaluation technique for informative value of diagnostic tests in anesthesiology and intensive care. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2013; 12 (5): 71-5. (in Russian)

Поступила 23.05.20

Принята к печати 24.02.21

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Каликова Л.Б., Бойко Е.Р.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН ФГБУН Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения РАН», 167982, Сыктывкар, Коми Республика, Россия

Адениновые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) играют центральную роль в регуляции обмена веществ и энергии: обеспечивают энергетический баланс клетки, определяют её окислительно-восстановительное состояние, действуют как аллостерические эффекторы ряда ферментов, модулируют сигнальные и транскрипционные факторы, активируют субстраты окисления или биосинтеза. Для определения уровня АТФ, АДФ, АМФ разработано большое количество методов, но наиболее универсальным и эффективным методом разделения и анализа сложных смесей является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Цель исследования – определение оптимальных условий для качественного разделения и количественного определения стандартных растворов АТФ (1 ммоль/л), АДФ (0,5 ммоль/л), АМФ (0,1 ммоль/л) методом ОФ ВЭЖХ. Степень разделения адениновых нуклеотидов оценивали по времени выхода пиков на хроматограмме. Для достижения цели поставлены следующие задачи: оценить влияние температуры проведения анализа на разделение и изменение времени выхода анализируемых веществ на хроматограмме; определить оптимальный состав подвижной фазы на разделение АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме (содержание органического растворителя в растворе); выявить влияние рН подвижной фазы на разделение стандартных растворов адениновых нуклеотидов; установить оптимальную молярность подвижной фазы для разделения АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме. Установлено, что температура проведения анализа не влияет на качество разделения пиков, тогда как состав и рН подвижной фазы оказывает значительное влияние на полное и чёткое разделение исследуемых нуклеотидов на хроматограмме. Оптимальными для разделения пиков адениновых нуклеотидов являются температура проведения анализа 37°С и подвижная фаза 0,05 М КН₂РО₄ (рН 6,0).

Ключевые слова: адениновые нуклеотиды; АТФ; АДФ; АМФ; обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Для цитирования: Каликова Л. Б., Бойко Е. Р. Определение адениновых нуклеотидов модифицированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Клиническая лабораторная диагностика, 2021;66 (3): 172-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-172-176>

Kalikova L. B., Boyko E. R.

DETERMINATION OF ADENINE NUCLEOTIDES BY THE MODIFIED METHOD OF HIGH – PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, FCR Komi SC UB RAS, 167982, Syktывkar, Komi Republic, Russia

Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) play a central role in the regulation of metabolism and energy: they provide the energy balance of the cell, determine its redox state, act as allosteric effectors of a number of enzymes, modulate signaling and transcription factors and activate oxidation or biosynthesis substrates. A large number of methods have been developed to determine the level of ATP, ADP and AMP, but the most universal and effective method for the separation and analysis of complex mixtures is the reversed-phase high-performance liquid chromatography method (RP-HPLC). The aim of this study is to determine the optimal conditions for the qualitative separation and quantitative determination of standard solutions of ATP (1 mmol/l), ADP (0,5 mmol/l) and AMP (0,1 mmol/l) by RP-HPLC. The degree of separation of adenine nucleotides was estimated by the time of peak output in the chromatogram. To achieve the goal, the following tasks were set: assess the effect of the temperature of the analysis on the separation and change of the release time of the analytes in the chromatogram; determine the most optimal composition of the mobile phase for the separation of ATP, ADP and AMP in the chromatogram (the content of the organic solvent in the solution); to identify the effect of pH of the mobile phase on the separation of standard solutions of adenine nucleotides; set the optimal molarity of the mobile phase for the separation of ATP, ADP and AMP in the chromatogram. It was found that the temperature of the analysis does not affect the quality of peak separation, while the composition and pH of the mobile phase have a significant effect on the complete and clear separation of the studied nucleotides in the chromatogram. It was determined that the analysis temperature of 37°C and the mobile phase of 0.05 M KН₂РO₄ (pH 6.0) are optimal for separating the peaks of adenine nucleotides.

Key words: adenine nucleotides; ATP; ADP; AMP; reversed-phase high-performance liquid chromatography.

For citation: Kalikova L. B., Boyko E. R. Determination of adenine nucleotides by the modified method of high-performance liquid chromatography. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 172-176 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-172-176>

For correspondence: Kalikova Lyubov Borisovna, Junior Researcher, Department of Environmental and Medical Physiology, e-mail: Kalikova_81@mail.ru

Information about authors:

Kalikova L.B., <http://orcid.org/0000-0001-7963-1662>;
Boyko E.R., <http://orcid.org/0000-0002-8027-898X>.

Conflict of interests. The authors are declaring absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The work was performed at the expense of the subsidy funds for the implementation of the State Assignment No. GR AAAA-A17-117012310157-7, GR No. AAAA-A17-117012310153-9.

Received 01.02.2021
Accepted 01.03.2021

Введение. АТФ, АДФ, АМФ играют центральную роль в регуляции обмена веществ и энергии. Они обеспечивают энергетический баланс клетки и определяют её окислительно-восстановительное состояние, действуют как аллостерические эффекторы ряда ферментов, модулируют сигнальные и транскрипционные факторы и активируют субстраты окисления или биосинтеза [1].

Для определения уровня адениновых нуклеотидов разработано большое количество методов: спектрофотометрический, флуоресцентный, ферментативный методы [2], тем не менее, наиболее широко используют билюминесцентный метод или хроматографический метод анализа [3]. Билюминесцентный метод наиболее чувствителен (предел обнаружения анализируемых веществ 10^{-14} М), но дорогостоящий и поэтому мало подходит для серийных анализов [4]. Наиболее универсальным и эффективным методом разделения и анализа сложных смесей является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), который позволяет разделить и одновременно определить микроколичества нуклеотидов за короткий промежуток времени [5 – 7]. В ряде случаев время выхода анализируемых веществ на хроматограмме совпадает и полного разделения исследуемых веществ не происходит [8]. На разделение адениновых нуклеотидов влияют такие факторы, как температура проведения анализа, содержание органического растворителя в подвижной фазе, молярность, рН подвижной фазы [6].

Цель исследования – определение оптимальных условий для качественного разделения и количественного определения стандартных растворов АТФ, АДФ, АМФ методом ОФ ВЭЖХ. Для достижения цели поставлены следующие задачи: оценить влияние температуры проведения анализа на разделение и изменение времени выхода анализируемых веществ на хроматограмме; определить оптимальный состав подвижной фазы на разделение АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме (содержание органического растворителя в растворе); выявить влияние рН подвижной фазы на разделение стандартных растворов адениновых нуклеотидов; установить оптимальную молярность подвижной фазы для разделения АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме.

Материал и методы. В работе использованы стандартные образцы АТФ, АДФ, АМФ в концентрации 1,0 ммоль/л (АТФ), 0,5 ммоль/л (АДФ), 0,1 ммоль/л (АМФ), что соответствует уровню адениновых нуклеотидов в эритроцитах человека [9]. Подвижную фазу (ПФ) готовили аналогично работе Е.К. Jackson [10], состоящую из 0,05 М KH_2PO_4 и 5% ацетонитрила CH_3CN (1:1). Разделение образцов проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 20 (Япония) с колонкой Диасфер-110-С18 (Россия) (150* 4,6 мм). Каждый образец исследовали в 3-х повторностях. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения LC Solution.

Степень разделения адениновых нуклеотидов оценивали по времени выхода пиков на хроматограмме. Для ОФ ВЭЖХ использованы реактивы фирмы Sigma (США), растворы стандартов известной концентрации и ПФ готовили на бидистиллированной воде, приготовленной с использованием системы Milli-Q® Reference (США).

Результаты. В качестве условий проведения анализа стандартных образцов адениновых нуклеотидов выбраны следующие характеристики: разделение проводили в изократическом режиме; скорость потока составила 1,0 мл/мин; работу выполняли при комнатной температуре ($+24^\circ\text{C} - +27^\circ\text{C}$); давление в системе составляло 4,9 МПа. Объем вводимой пробы 20 мкл. Спектрофотометрическое определение осуществляли при двух длинах волн 254 и 280 нм. Общее время анализа не превышало 15 минут.

При данных условиях проведения анализа время выхода пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме составляет 2,48 мин, 2,82 мин и 4,73 мин соответственно. Время выхода пиков АТФ и АДФ практически совпадает и их полного разделения не происходит (рис. 1).

Проведено исследование по определению факторов, способных оказать влияние на разделение нуклеотидов, включая температуру проведения анализа, содержание органического растворителя в ПФ и др. (см.таблицу).

Влияние температуры проведения анализа на разделение и количественное определение адениновых нуклеотидов оценивали в диапазоне от 27°C до 37°C . При 27°C давление в хроматографической системе составляло 4,9 МПа, тогда как при повышении температуры давление в системе понижалось. При 31°C и 32°C давление было 4,6 МПа, в диапазоне от 33°C до 37°C этот показатель составил всего 4,1 МПа. При увеличении температуры проведения анализа от 27°C до 37°C наблюдается снижение давления в приборе, что, по нашему мнению, положительно сказывается на состоянии работы хроматографической колонки. По времени выхода пиков АТФ, АДФ, АМФ, установлено, что на качество разделения анализируемых веществ температура проведения анализа практически не влияет, поэтому оптимальной рабочей температурой проведения анализа выбрана 37°C , наиболее близкая к температуре ядра тела человека.

По данным литературы на разделение адениновых нуклеотидов может оказывать влияние молярность ПФ и/или процент органического растворителя в растворе [6]. Оценку влияния органической части ПФ проводили следующим образом: 0,05 М KH_2PO_4 (рН 5,2), разделяли на семь частей и к каждой части добавляли раствор CH_3CN (10%; 5%; 2%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0%) в соотношении 1:1. Установлено, что концентрация органической части ПФ оказывает значительное влияние на разделение и время выхода пиков адениновых нуклеотидов на хроматограмме. При введении в состав ПФ 10% CH_3CN

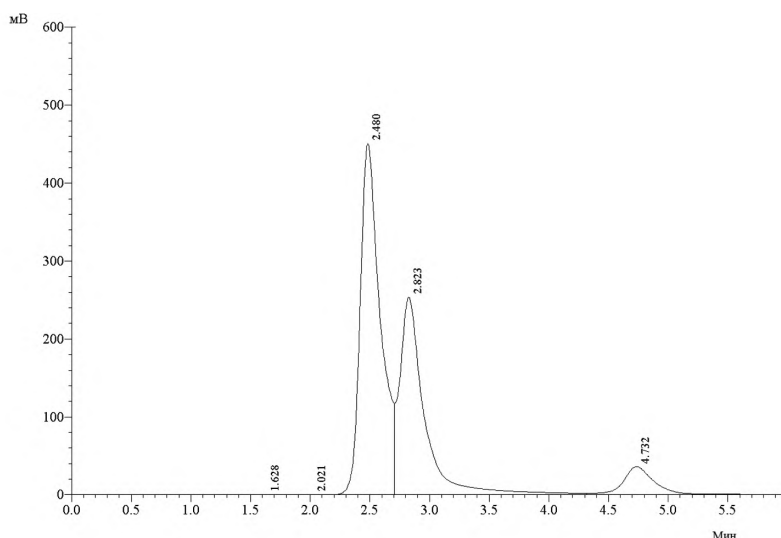


Рис. 1. Разделение стандартных образцов АТФ, АДФ и АМФ методом ОФ ВЭЖХ.
 Подвижная фаза: 5% ацетонитрил – 0,05 М KH_2PO_4 (1:1), pH 5,2.

Влияние отдельных факторов на разделение хроматографических пиков адениновых нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ

Скорость потока, мл/мин	Температура проведения анализа, °С	Давление в системе (P), МПа	Ацетонитрил в подвижной фазе, %	pH подвижной фазы	KH_2PO_4 , молярность подвижной фазы	Время выхода стандарта АТФ, мин	Время выхода стандарта АДФ, мин	Время выхода стандарта АМФ, мин
Разделение нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ на подвижной фазе по Джексону [11]								
1,0	Комнатная (24-27)	4,9	5	5,2	0,05	2,48	2,82	4,73
Влияние температуры проведения анализа на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	27	4,9	5	5,2	0,05	2,48	2,82	4,73
	31	4,6				2,39	2,74	4,36
	32	4,6				2,34	2,62	4,19
	33	4,1				2,35	2,62	4,16
	34	4,1				2,27	2,63	4,06
	35	4,1				2,27	2,57	4,01
	37	4,1				2,22	2,46	3,78
Влияние органической части подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	5,2	0,05	3,14	4,11	9,00
			0,1			2,98	-	-
			0,5			2,77	3,24	7,49
			1			2,71	3,54	7,53
Влияние органической части подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	2	5,2	0,05	2,41	3,15	6,17
			5			2,27	2,44	4,35
			10			1,78	1,94	2,71
Влияние pH подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	5,0	0,05	3,21	4,14	9,18
				5,2		3,14	4,13	9,01
				5,5		3,10	4,08	8,85
				6,0		3,04	3,90	7,75
				6,5		2,95	3,57	5,95
				7,0		2,81	3,18	4,30
Влияние молярности подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	6,0	0,05	3,04	3,90	7,75
					0,1	3,43	4,24	7,94
					0,3	4,20	4,91	8,40
					0,5	4,66	5,32	8,71
					1	5,67	6,21	9,2

разделение стандартных образцов АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме практически не происходит. При снижении концентрации CH_3CN в растворе с 5% до 0,1% наблюдается небольшое разделение пиков АТФ, АДФ, АМФ. Наиболее выраженное разделение анализируемых веществ выявлено при работе с ПФ, включающей только 0,05 М KH_2PO_4 . Время выхода адениновых нуклеотидов на хроматограмме составило 3,14 мин для АТФ, 4,11 мин и 9,00 мин для АДФ и АМФ соответственно. Последующее разделение и количественное определение стандартных образцов АТФ, АДФ, АМФ проводили на ПФ, в состав которой входит только 0,05 М KH_2PO_4 .

Проведён анализ влияния рН ПФ (5,0–7,0) на разделение нуклеотидов. Установлена взаимосвязь между концентрацией ионов водорода ПФ (рН) и временем выхода пиков стандартных растворов АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме. При работе с ПФ (рН 5,0) время выхода пика АТФ приходилось на 3,21 мин, при рН рабочего раствора 6,0, время выхода пика АТФ составило 3,04 мин и 2,81 мин (рН 7,0). Аналогичная зависимость прослеживалась по времени выхода пика АДФ (4,14–3,90 – 3,18 мин) и пика АМФ (9,18–7,75 – 4,30 мин). При работе с ПФ рН 6,0 наблюдали максимальное и почти полное разделение пиков АТФ и АДФ на хроматограмме, тогда как при работе с ПФ (рН 7,0) данные пики перекрывались в большей степени. Принимая во внимание эти результаты, дальнейшее разделение и количественное определение АТФ, АДФ, АМФ проводили на ПФ рН 6,0.

Для оценки влияния молярности ПФ на степень разделение адениновых нуклеотидов использовали 1 М, 0,5 М, 0,3 М, 0,1 М, 0,05 М растворы KH_2PO_4 , не содержащие CH_3CN . Увеличение молярности KH_2PO_4 в ПФ способствовало изменению времени выхода анализируемых веществ и степени их разделения на хроматограмме. Для АТФ с 3,04 мин (0,05 М KH_2PO_4) до 5,67 мин (1 М KH_2PO_4), для АДФ с 3,90 до 6,21 мин и для АМФ с 7,75 до 9,2 мин соответственно. Максимальное разделение пиков АТФ и АДФ наблюдали при работе с 0,05

М KH_2PO_4 , тогда как при работе на 1 М KH_2PO_4 происходило их частичное слияние. 0,05 М раствор KH_2PO_4 оптимален для разделения адениновых нуклеотидов.

Обсуждение. Разделение и количественное определение адениновых нуклеотидов на хроматограмме зависит от целого ряда факторов – температуры проведения анализа, % CH_3CN в ПФ, от рН ПФ и её молярности. По данным литературы анализ адениновых нуклеотидов проводят при разных температурных условиях: при комнатной температуре 23° С – 24° С [11], при 30° С [12, 13], при 75° С [14]. Оценено влияние температуры проведения анализа в диапазоне от 27° С до 37° С. С увеличением температуры проведения анализа наблюдали понижение давления в хроматографической системе. На качество разделения пиков исследуемых образцов адениновых нуклеотидов и время выхода анализируемых веществ на хроматограмме температурный режим не оказывал значительного влияния, поэтому в качестве оптимальной рабочей температуры проведения анализа выбрана 37° С, близкая физиологической температуре тела.

ПФ состоит из двух компонентов – полярного органического растворителя (ацетонитрила или метанола) и неорганической части (KH_2PO_4 , фосфатный или цитратный буферные растворы) [6]. В составе ПФ может присутствовать 30% CH_3CN [15], 10% CH_3CN [16], 5% CH_3CN [17], встречаются исследования, где используется ПФ без органической составляющей [12]. В ходе исследования установлено, что концентрация CH_3CN в ПФ значительно влияет на разделение и время выхода пиков адениновых нуклеотидов на хроматограмме: чем выше процент органического растворителя в растворе, тем сильнее связь между анализируемыми образцами и хуже их разделение. Наиболее чёткое разделение пиков адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) наблюдалось в случае, когда ПФ включала только неорганическую часть (0,05 М KH_2PO_4) без органического компонента.

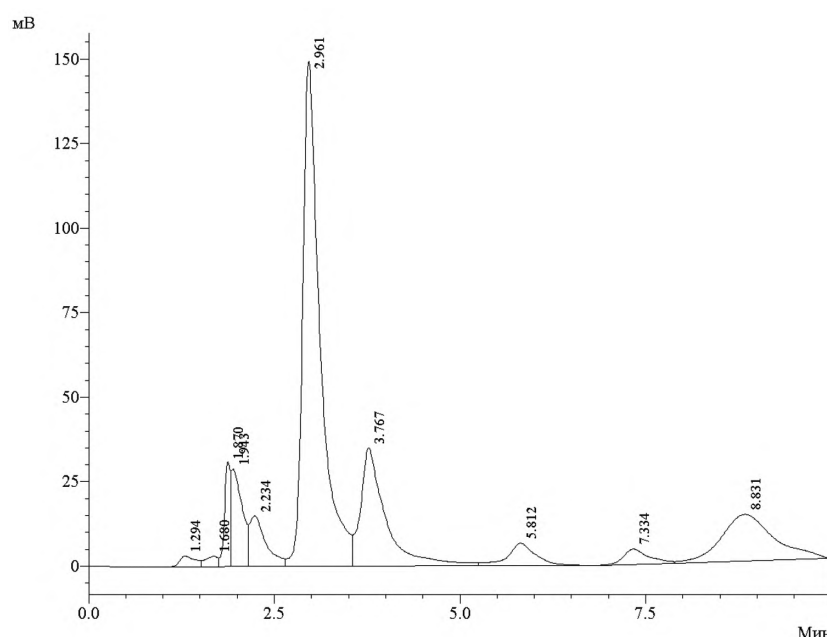


Рис. 2. Разделение адениновых нуклеотидов эритроцитов самцов крыс методом ОФ ВЭЖХ. Подвижная фаза: 0,05 М KH_2PO_4 , рН 6,0.

Анализ влияния показателя рН (5,0–7,0) на разделение пиков адениновых нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ показал, что максимальное разделение пиков АТФ и АДФ на хроматограмме наблюдалось при работе в условиях, когда рН ПФ составляло величину 6,0. При работе с нейтральной подвижной фазой рН 7,0 разделение происходило в меньшей степени. Принимая во внимание эти результаты, в последующем для разделения адениновых нуклеотидов использована ПФ с рН 6,0. Полученные результаты совпадают с данными ряда зарубежных авторов, которые рекомендуют использовать в работе ПФ с рН 6,0 [11, 18, 19]. Изменение молярности ПФ влияет на разделение пиков анализируемых веществ: установлено, что максимальное разделение пиков АТФ и АДФ наблюдало при работе с ПФ, молярность которой составила 0,05 М KH_2PO_4 . Модифицированный нами метод ОФ ВЭЖХ был успешно апробирован для разделения и количественного определения АТФ (время выхода пика на хроматограмме составило 2,96 мин.), АДФ (3,77 мин.) и АМФ (5,81 мин.) эритроцитов самцов крыс линии Wistar (рис. 2).

Выводы:

1. Температурный режим не оказывает влияния на качество разделения пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме, поэтому в качестве оптимальной рабочей температуры проведения анализа рекомендуется к использованию температура 37°C, близкая к температуре ядра тела человека.

2. Наиболее выраженное разделение пиков адениновых нуклеотидов наблюдалось при работе на ПФ без включения CH_3CN .

3. При изменении рН ПФ с 5,0 до 6,0 наблюдается максимальное разделение пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме, тогда как при работе с нейтральной подвижной фазой рН 7,0 разделение происходило в меньшей степени.

4. Изменение молярности ПФ влияет на разделение пиков анализируемых веществ. Максимальное разделение пиков АТФ, АДФ и АМФ наблюдало при работе с ПФ, молярность которой составила 0,05 М.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение Государственного задания № ГР АААА-А17-117012310157-7, № ГР АААА-А17-117012310153-9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–6, 8–19 см. REFERENCES)

7. Хацаюк А. С., Павлова О. Е., Эхова М. Э. Роль и значение высокоэффективной жидкостной хроматографии в практике высокотехнологических лабораторных исследований. *Здоровье. Медицинская Экология. Наука.* 2016; 3(66): 215-9.

REFERENCES

1. Xiaorong Fu, Stanislaw Deja, Blanka Kucejova, Joao A.G. Duarte, Jeffrey Glen McDonald, and Shawn C. Burgess. Targeted determination of tissue energy status by LC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2019; 91(9): 5881-7.

2. Khllyntseva S. V., Bazel' Ya. R., Vishnikin A. B., Andruch V. Methods for the determination of Adenosine Triphosphate and other Adenine Nucleotides. *Journal of Analytical Chemistry.* 2009; 64(7): 657-73.

3. Abraham E. H., Salikhova A. Y., Eugen B. Hug. Critical ATP parameters associated with blood and mammalian cells: Relevant measurement techniques. *Drug development research.* 2003; 59(1): 152-60.

4. Ozer N., Aksoy Y., Oguş I.H. New sample preparation method for the capillary electrophoretic determination of adenylate energy charge in human erythrocytes. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2000; 45: 141-6.

5. Karatzaferi C., De Haan A., Offringa C., Sargeant A.J. Improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of «high-energy» phosphates in mammalian skeletal muscle. Application to a single – fibre study in man. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999; 730(2): 183-91.

6. Zagrebelnyi S.N., Pupkova V.I., Khripin Yu.L. Methods for the separation and quantitative determination of nucleotides, nucleosides, and bases. *Usp. Khim.* 1988; 57(11): 1913-32.

7. Hatsayuk A.S., Pavlova O.E., Echova M.E. Role and importance of high-performance liquid chromatography in the practice of high-tech laboratory. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya.Nauka.* 2016; 3 (66): 215-9. (in Russian)

8. Zakaria M., Brown P.R. Investigation of clinical methodology for sample collection and processing prior to the reversed-phase liquid chromatographic determination of UV –absorbing plasma constituents. *Anal. Biochem.* 1982; 120: 25-37.

9. Teldcanat K.K., Fox I.H. Isocratic separation of ATP and its degradation products from biological fluids by automated liquid chromatography. *Clin. Chem.* 1988; 34(5): 925-32.

10. Jackson E.K., Ohnishi A. Development and application of a simple microassay for Adenosine in rat plasma. *Hypertension.* 1987; 10: 189-97.

11. Pérez-Milicua M.B., Zenteno-Savín T., Crocker D.E., Gallo-Reynoso J.P. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activities in three mammalian species: Aquatic (*Mirounga angustirostris*), semi-aquatic (*Lontra longicaudis annectens*) and terrestrial (*Sus scrofa*). *Front. Physiol.* 2015; 6(212): 1-7.

12. Shengming Sun, Zhongbao Gu, Hongtuo Fu, Jian Zhu, Xianping Ge and Xugan Wu. Hypoxia Induces changes in AMP – Activated Protein Kinase activity and energy metabolism in muscle tissue of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *Front. Physiol.* 2018; 9(751): 1-13.

13. Garcia-Tardon N., Guigas B. Determination of adenine nucleotide concentrations in cells and tissues by high-performance liquid chromatography. *Chapter in Methods in molecular biology.* 2018; 1732: 229-37.

14. Brown P.R., Parks R.E. Jun. and Herod J. Use of high-pressure liquid chromatography for monitoring nucleotide concentration in human blood: a preliminary study with stored blood cell suspensions. *Clin. Chem.* 1973; 19(8): 919-22.

15. Pereira R.S., Bertoncheli C.M., Adefegha S.A., Castilhos L.G., Silveira K.L., Rezer J.F.P., Doleski P.H., Abdalla F.H., Santos K.F., Leal C.A.M., Santos R.C.V., Casali E.A., Moritz C.E.J., Stainki D.R., Leal D.B.R. Sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP) alters nucleotidase activities in platelets of rats. *Microb. Pathog.* 2017; 111: 345-51.

16. Sikk P., Käämbre T., Vija H., Tepp K., Tiivel T., Nutt A., and Saks V.A. Ultra performance liquid chromatography analysis of adenine nucleotides and creatine derivatives for kinetic studies. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences.* 2009; 58(2): 122-31.

17. Ozkok E., Yorulmaz H., Ates G., Aksu A., Balkis N., Şahin Ö., Tamer S. Amelioration of energy metabolism by Melatonin in skeletal muscle of rats with LPS induced Endotoxemia. *Physiol. Res.* 2016; 65(5): 833-42.

18. Moritz C.E.J., Teixeira B.C., Rockenbach L., Reischak-Oliveira A., Casali E.A., Battastini A.M.O. Altered extracellular ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Mol. Cell. Biochem.* 2017; 426: 55-63.

19. Doná F., Conceição I. M., Ulrich H., Ribeiro E.B., Freitas T.A., Nencioni A.L.A., da Silva Fernandes M.J. Variations of ATP and its metabolites in the hippocampus of rats subjected to pilocarpine – induced temporal lobe epilepsy. *Purinergic Signalling.* 2016; 12: 295-302.

Поступила 01.02.21

Принята к печати 01.03.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Жеребятёва О. О.¹, Махалова Г. О.¹, Киргизова С. Б.¹, Кшнясева С. К.¹, Миронов А. Ю.², Михайлова Е. А.¹

МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ И МИКРОФЛОРА РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ДО И ПОСЛЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ

¹ГБОУ ВПО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 460000, Оренбург, Россия;

²ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

В клинической медицине широко используются иммуномодулирующие препараты, как лекарственные средства для лечения воспалительных заболеваний микробной этиологии. Проведена оценка эффективности лечебного действия иммуномодулятора «Циклоферон» при терапии хронических гнойно-воспалительных заболеваний репродуктивного тракта по клиническим, микробиологическим, иммунологическим параметрам. Под воздействием иммуномодулирующей терапии наблюдалось восстановление видового и количественного состава нормофлоры с элиминацией этиологически значимых микроорганизмов. Установлено иммунокорректирующее действие терапии на показатели мукозального иммунитета: в цервикальном секрете увеличивалась концентрация лактоферрина, нормализовался уровень содержания цитокинов ИЛ-1β и γ-IFN, увеличилось количество секреторного IgA, что способствовало усилению местных защитных реакций и клинической эффективности терапии, что проявлялось в уменьшении и/или исчезновении болевого синдрома, отсутствии рецидива в течение двух и более лет. Проведённые исследования свидетельствуют об иммуотропных препаратах как перспективном направлении в терапии воспалительных процессов репродуктивного тракта, значительным преимуществом которого является рациональная иммуномодуляция непосредственно в очаге воспаления, доступность проведения, отсутствие побочных эффектов при адекватных терапевтических режимах, что делает актуальным дальнейшее изучение данного направления иммунокоррекции и внедрения его в широкую клиническую практику.

Ключевые слова: иммуномодулирующая терапия; циклоферон; мукозальный иммунитет; микрофлора.

Для цитирования: Жеребятёва О.О., Махалова Г.О., Киргизова С.Б., Кшнясева С.К., Миронов А.Ю., Михайлова Е.А. Мукозальный иммунитет и микрофлора репродуктивного тракта гинекологических больных до и после иммуномодулирующей терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 177-180. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-177-180>

Zherebyateva O. O., Makhalova G. O., Kirgizova S. B., Kshnyaseva S. K., Mironov A. Yu., Mikhailova E. A.

LOCAL IMMUNITY AND MICROFLORA OF THE REPRODUCTIVE TRACT OF GYNECOLOGICAL PATIENTS BEFORE AND AFTER IMMUNOMODULATING THERAPY

¹The Orenburg state medical university of Minzdrav of Russia, Orenburg, 460000, Russian Federation;

²The G. N. Gabricheskiy Moscow research institute for epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, 125212, Russian Federation

Immunomodulatory drugs are widely used as drugs for the treatment of inflammatory diseases of microbial etiology in clinical medicine. The authors evaluated the effectiveness of the therapeutic effect of the Cycloferon immunomodulator in the treatment of chronic purulent-inflammatory diseases of the reproductive tract using clinical, microbiological and immunological parameters. It was shown that under the influence of immunomodulatory therapy, the restoration of the qualitative and quantitative composition of the normoflora was observed with the elimination of etiologically significant microorganisms. The immunocorrective effect of therapy on the indices of local immunity was established: the concentration of lactoferrin increased in the cervical secretion, the level of cytokines IL-1β and γ-IFN normalized, the amount of secretory IgA increased significantly, which contributed to the enhancement of local protective reactions, as well as the clinical efficacy of therapy, which was manifested in the reduction and/or disappearance of pain syndrome and the absence of relapse for 2 or more years. Conducted researches allow us to speak of immunotropic drugs as a promising direction in the treatment of inflammatory processes of the reproductive tract, a significant advantage of which is rational immunomodulation directly in the focus of inflammation, the availability of treatment, the absence of side effects with adequate therapeutic regimens, which makes it relevant to further study this direction of immunocorrection and its implementation into wide clinical practice.

Key words: immunomodulatory therapy; cycloferon; local immunity; microflora.

For citation: Zherebyateva O. O., Makhalova G. O., Kirgizova S. B., Kshnyaseva S. K., Mikhailova E. A., Mironov A. Yu. Microflora and local immunity of the reproductive tract of gynecological patients before and after immunomodulatory therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 177-180 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-177-180>

For correspondence: *Mikhailova E.A.*, Doctor of Biological Sciences, professor's assistant, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology; e-mail: l Elenaalekseevna@yandex.ru

Information about authors:

Zherebyateva O. O., <https://orcid.org/0000-0002-6751-3519>;
Makhalova G.O., <https://orcid.org/0000-0001-8949-8877>;
Kirgizova S. B., <https://orcid.org/0000-0002-8594-2835>;
Kshnyaseva S.K., <https://orcid.org/0000-0002-9157-205X>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Mikhailova E. A. <https://orcid.org/0000-0003-1074-8963>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 13.11.2020
Accepted 23.11.2020

Введение. В современных условиях воспалительные заболевания половых органов характеризуются рядом особенностей: увеличением значимости условно-патогенной микрофлоры, ростом антибиотикорезистентности микроорганизмов, изменением клинической картины – бессимптомные, стёртые формы, атипичное течение [1]. Одним из признаков воспаления, является нарушение функции вовлечённого органа. В случае урогенитального микробного поражения у женщин репродуктивного возраста, помимо дискомфорта, болевого синдрома и нарушений сексуальной активности, тяжелейшими физиологическими и социальными осложнениями являются нарушения фертильности [2, 3].

Развитие и течение инфекционного процесса во многом определяется состоянием иммунореактивности организма и, прежде всего, эффективностью локальной антимикробной защиты репродуктивного тракта. Приводящие к тому изменения иммуно-эндокринной регуляции, являются мультиэтиологическими и проявляются на фоне цитокинового дисбаланса при участии микрофлоры биотопа [4,5].

Эффективность иммуномодулирующей терапии, как одного из методов лечения хронических инфекционно-воспалительных процессов, ставит вопрос об изучении влияния иммуномодуляторов на состав микрофлоры и на факторы местной противоинфекционной защиты репродуктивного тракта [6,7]. С этой точки зрения перспективным является исследование официального препарата «Циклоферон», применяемого в комплексном лечении урогенитальных воспалений, поскольку ранее показана целесообразность его применения в санации биотопов при длительно персистирующих возбудителях [8, 10].

Цель исследования – оценка эффективности действия иммуномодулятора «Циклоферон» при терапии хронических гнойно-воспалительных заболеваний репродуктивного тракта на основе микробиологических, иммунологических, клинических критериев.

Материал и методы. Обследовано 80 пациенток с хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями репродуктивного тракта (ХГВЗ): хронический вагинит, хронический сальпингит и оофорит, хроническая воспалительная болезнь матки, проходивших обследование и лечение в ГАУЗ ООКБ № 2 г. Оренбурга. Все пациенты дали информированное согласие на проведение обследования и лечения.

Всем больным до и после лечения проводилось бактериологическое исследование с последующей видовой идентификацией микрофлоры при помощи тест-систем «ENTEROtest», «STREPTOtest», «NEFERMtest», «STARPHYtest», «ANAEROtest» (Lachema, Чехия). Факторы мукозального иммунитета до и после лечения определя-

ли методом твёрдофазного иммуоферментного анализа тест-системами с использованием наборов реагентов: лактоферрин («Вектор-Бест», Россия), C₃ компонент комплемента («Цитокин», Россия), секреторный IgA (sIgA) («Полигност», Россия), ИЛ-1β и γ-IFN («Цитокин», Россия).

Лечение больных проведено индуктором эндогенного интерферона – препаратом «Циклоферон» (регистрационный номер: Р № 001049/01 от 14.03.2008). Производитель: ООО «Научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН». Препарат циклоферон назначали внутримышечно в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием непараметрических методов [9].

Результаты. Микробиологическое исследование цервикального отделяемого у пациенток с ХГВЗ показало, что спектр выделенных микроорганизмов, характеризовался большим разнообразием аэробной условно-патогенной микрофлоры: *Staphylococcus aureus* выделен в 43,8±9,0% случаях, преобладающим видом среди коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) являлся *S. epidermidis*, доля которого составила 18,7±10,0%, другие КОС регистрировались с частотой 12,5±10,4% (*S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*). Стрептококки из исследуемого материала выделены в 25,0±10,4% случаев (*S. salivarius*, *S. acidominimus*, *S. vestibularis*, *S. parauberis*). Среди энтеробактерии доминирует *E. coli* в 68,7±6,2%, тогда как представители родов *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* регистрировались только 17,5±10,1%; реже среди выделенных штаммов встречались неферментирующие бактерии, представленные *Pseudomonas aeruginosa* (12,5±10,4%); энтерококки (преимущественно, *E. faecalis*) высеивались в 16,2±10,2% случаев, грибы рода *Candida* выделены в 12,5±10,4% (преимущественно, *C. albicans*). Культуральное исследование выявило и представителей нормофлоры, характерных для данного биотопа, таких как бактерии рода *Lactobacillus spp.* и *Corynebacterium spp.* (в 23,7±9,7% и 26,2±9,5% случаев, соответственно). Анаэробные микроорганизмы изолированы в 27,5%±9,4% случаев и представлены грамположительными (*Clostridium ramosum*, *Actinomyces naeslundii*) и грамотрицательными (*Bacteroides distasonis*, *Fusobacterium mortiferum*, *Mitsuokella multiacidus*, *Capnocytophaga ochracea*) палочками и грамположительными кокками – *Streptococcus parvulus*, *Peptococcus saccharolyticus*.

При анализе иммунологических показателей цервикального секрета у женщин с ХГВЗ изучен средний уровень гуморальных факторов антимикробной защиты цервикальной слизи. Первичное исследование показало: уровень цитокинов составил – ИЛ-1β – 39,7±3,6 пг/мл

и γ -IFN – $10,1 \pm 0,6$ пг/мл; лактоферрина – 1153 ± 49 нг/мл, C_3 компонент комплемента – $3,8 \pm 0,1$ мг/мл; уровень секреторного IgA (sIgA) – $7,65 \pm 0,3$ мг/мл.

Для терапии пациенток с ХГВЗ, использован препарат «Циклоферон». Все женщины, проходившие лечение в больнице, отмечали положительную динамику, что проявлялось в уменьшении и/или исчезновении болевого синдрома. После лечения циклофероном наблюдалось отсутствие рецидива в течение двух лет. Сравнительный анализ состояния микробиоценоза и локальных механизмов противоинфекционной защиты половой системы женщин при использовании иммуномодулирующей терапии проведён через 1 мес после окончания лечения.

Под действием иммуномодулирующей терапии наблюдалось восстановление нормофлоры: возрос показатель частоты выделения бактерий рода *Lactobacillus spp.* и *Corynebacterium spp.* ($33,7 \pm 9,0\%$ и $36,2 \pm 8,8\%$, соответственно). После лечения отмечалось уменьшение частоты выделения стафилококков ($17,5 \pm 10,1\%$), энтерококков ($11,2 \pm 10,4\%$), грибов рода *Candida* ($11,2 \pm 10,4\%$). Изучение микробиоценоза генитального тракта после проведённого лечения выявило снижение частоты выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae* (в том числе *E. coli*) до $18,7 \pm 10,0\%$ случаев. Значительных видовых и количественных изменений в составе анаэробной микрофлоры после лечения не установлено.

Проведённая иммуномодулирующая терапия, оказывает влияние на микробиологические параметры и на состояние мукозального иммунитета. После окончания лечения у женщин с ХГВЗ в цервикальном секрете увеличивалась концентрация лактоферрина (1751 ± 94 нг/мл), отмечалось понижение до нормального уровня содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β ($14,1 \pm 2,1$ пг/мл), γ -IFN ($7,2 \pm 0,4$ пг/мл), увеличилось количество секреторного IgA ($50,1 \pm 3,9$ мг/мл), тогда как средний уровень C_3 компонента комплемента после лечения сохранился практически на прежнем уровне ($3,9 \pm 0,1$ мг/мл).

Обсуждение. Иммуномодулирующая терапия сопровождается изменениями микробной экологии репродуктивного тракта, при этом изменения в микробиоценозе связаны не только с элиминацией ряда патогенных видов микроорганизмов, но и увеличением частоты выделения представителей нормофлоры.

Положительным эффектом иммунотерапии препаратом «Циклоферон» является, отмеченная у всех пациенток, нормализация ИЛ-1 β и γ -IFN, рассматриваемых в качестве предикторов фертильности [2]. Позитивные изменения иммунологических показателей в цервикальном секрете проявились в усилении местных защитных реакций и в клинической эффективности терапии.

Полученные в ходе работы данные представляют интерес в свете предварительно проведённых нами исследований. Ранее нами показано, что метилглюкаминная соль карбоксиметиленакридона – циклоферон, в большей, по сравнению с иммуномодуляторами других групп, степени подавляет пенетрантность и экспрессивность карнозин- и лизоцимнейтрализующих свойств микрофлоры [10]. Указанная способность микроорганизмов к инаktivации эффекторов врождённого иммунитета ведёт к их длительной персистенции, и, следовательно, модификация цитокинового зеркала экологической ниши. Учитывая, воздействие циклоферона на обе составляющие инфекционного процесса, представляет-

ся целесообразным, рассматривать данный иммуномодулятор в качестве одного из предпочтительных препаратов для коррекции состояния биотопа.

Эффективность иммуномодулирующей терапии может быть связана с её нормализующим действием на микробиоценоз репродуктивного тракта, что подтверждается элиминацией этиологически значимых штаммов микроорганизмов [11] и с иммунокорригирующим действием на показатели мукозального иммунитета [12–14]. Применение циклоферона в качестве иммуностропного препарата является эффективным, патогенетически обоснованным способом терапии для устранения дисфункций в системе мукозального иммунитета и восстановления колонизационной резистентности репродуктивного тракта женщин с гнойно-воспалительными заболеваниями репродуктивного тракта. Регистрируемая динамика параметров мукозального иммунитета, клинических данных и характеристик микрофлоры позволяет дать оценку рациональности применения изучаемого иммуностропного препарата с точки зрения использования его в практике.

Выводы:

1. Нормализация состояния микробиоценоза урогенитального тракта под воздействием препарата «Циклоферон» выражается в изменении концентраций цитокинов отделяемого половых путей и модификации видового и количественного состава микрофлоры данного биотопа.

2. ИЛ-1 β и γ -IFN являются показателями состояния мукозального иммунитета урогенитального тракта женщин.

3. Определение концентрации ИЛ-1 β – и γ -IFN уместно проводить для диагностики отклонений от нормального состояния и для детекции модулирования локальной иммунной реакции медикаментозными средствами.

Финансирование. Научные исследования выполнены по проекту «Технология рационального применения лекарственных препаратов, избирательно подавляющих факторы вирулентности микроорганизмов» НИИР в рамках государственного задания Минздрава Российской Федерации на 2018–2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Довлетханова Д.Р. Возможность применения иммуномодуляторов в комплексном лечении ВЗОМТ. *Медицинский совет*. 2012; 12: 84–7.
2. Кшнясева С.К., Жеребятёва О.О., Махалова Г.О., Михайлова Е.А., Константинова О.Д., Киргизова С.Б. и др. Способ профилактики постинфекционных репродуктивных нарушений. Патент РФ № 2686302 С1; 2019.
3. Яковлева Е.А. Пути восстановления функциональной активности репродуктивных органов женщин после перенесённых воспалительных заболеваний. *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. Серия: Медицина, Фармация. 2013; 24(168): 66–72.
4. Долгушин И.И., Курносенко И.В., Спиридонова К.С., Долгушина В.Ф., Никушкина К.В. Показатели врождённого иммунитета у беременных с хроническим эндометритом в анамнезе. *Иммунпатология, аллергология, инфектология*. 2016; 1:27–31.
5. Андиферова Ю. С., Сотникова Н. Ю., Шохина М. Н. Цитокиновый профиль перинеальной жидкости при эндометриозе: связь с бесплодием. *Цитокины и воспаление*. 2002; 11(2): 145–6.
6. Летяева О.И., Гизингер О.А. Место иммунокорригирующих препаратов в терапии воспалительных заболеваний урогени-

- тального тракта, ассоциированных с оппортунистическими микроорганизмами. *Уральский медицинский журнал*. 2013; 7: 163-8.
7. Летьева О.И., Гизингер О.А. Терапия урогенитальных микстинфекций у женщин репродуктивного возраста: современное состояние проблемы. *Гинекология*. 2014; 16 (6): 15-20.
 8. Линимент циклоферона (меглумина акридоната) в клинической практике: Клинические рекомендации для врачей. СПб: Изд-во «Тактик-Студио»; 2007.
 9. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина; 1973.
 10. Михайлова Е.А., Киргизова С.Б., Миронов А.Ю., Жеребятёва О.О., Махалова Г.О. Санация стафилококкового бактерионосительства – новые возможности и перспективы *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (7): 56-7.
 11. Нестеров И.М. Эффективность 5% линимента циклоферона в терапии вагинальных инфекций и дисбиозов. *Трудный пациент*. 2009; 7 (8-9): 17-20.
 12. Аракелян М.А., Галкина О.В., Нестеров И.М., Сысоев К.А., Айламазян Э.К., Тотолян А.А. Дефекты местного иммунитета при хронических заболеваниях нижних отделов репродуктивного тракта и возможности коррекции ликолипидом. *Российский иммунологический журнал*. 2007; 10 (1): 56-61.
 13. Михайлова Е.А., Махалова Г.О., Жеребятёва О.О., Киргизова С.Б., Азнабаева Л.М., Фомина М.В. и др. Иммуномодулирующая терапия постинфекционных нарушений фертильности. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 21(3): 375-8.
 14. Тотолян А.А., Нестеров И.М., Галкина О.В., Коваленко А.Л., Алексеева Е.Ф., Алёшина Л.А. и др. Клинико-иммунологическая эффективность линимента циклоферона в лечении больных некоторыми формами вагинальных инфекций. *Медицинская иммунология*. 1999; 1(3-4): 137-8.
 4. Dolgushin I. I., Kurnosenko I. V., Spiridonova K. S., Dolgushina V. F., Nikushkina K. V. Innate immunity of pregnant women with a history of chronic endometritis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2016; 1:27-31. (in Russian)
 5. Antsiferova Yu. S., Sotnikova N. Yu., Shokhina M. N. Cytokine pro-file of perineal fluid in endometriosis: connection with infertility. *Tsitokiny I vospalenie*. 2002; 11(2): 145-6. (in Russian)
 6. Letyeva O. I., Hisinger O. A. Place immunocorrective drugs in the treatment of inflammatory diseases of the urogenital tract, associated with opportunistic pathogens. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 7: 163-8. (in Russian)
 7. Letyeva O. I., Hisinger O. A. Therapy of urogenital mixed infection in women of reproductive age: current state of problem. *Gynecologiya*. 2014; 16 (6): 15-20. (in Russian)
 8. Liniment of cycloferon (meoglumin acridonacetate) in clinical practice: Clinical guidelines for physicians. St. Petersburg: Taktik-Studio; 2007. (in Russian)
 9. Gubler E. V., Genkin A. A. Application of nonparametric criteria of statistics in medical and biological research. Leningrad: Meditsina; 1973. (in Russian)
 10. Mikhailova E.A., Kirgizova S.B., Mironov A.Yu., Zherebyateva O.O., Mahalova G.O. Sanitation of staphylococcus bacteria carrying: new possibilities and prospectives. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (7): 56-7. (in Russian)
 11. Nesterov I. M. The effectiveness of 5% liniment cycloferon in the treatment of vaginal infections and dysbiosis. *Trudnyi patsient*. 2009; 7 (8-9): 17-20. (in Russian)
 12. Arakelyan M.A., Galkina O.V., Nesterov I.M., Sysoev K.A., Ailamazyan E.K., Totolyan A.A. Defects of local immunity in chronic diseases of the lower parts of the reproductive tract and the possibility of correction with lycopid. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2007; 1 (10): 56-61. (in Russian)
 13. Mikhailova E.A., Makhalova G.O., Zherebyatyeva O.O., Kirgizova S.B., Aznabaeva L.M., Fomina M.V. et al Immunomodulatory therapy of post-infectious disorders of fertility. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2018; 21 (3): 375-8. (in Russian)
 14. Totolyan A.A., Nesterov I.M., Galkina O.V., Kovalenko A.L., Alekseeva E.F., Aleshina L.A. et al. Clinical and immunological efficacy of cycloferon liniment in the treatment of patients with certain forms of vaginal infections. *Meditsinskaya immunologiya*. 1999; 1 (3-4): 137-8. (in Russian)

REFERENCES

1. Dovletkhanova D. R. The possibility of using immunomodulators in the complex treatment of PID. *Meditsinskiy konsilium*. 2012; 12: 84-7. (in Russian)
2. Kshnyaseva S. K., Zherebyateva O. O., Makhalova G. O., Mikhailova E. A., Konstantinova O. D., Kirgizova S. B. et al. Method for the prevention of post-infectious reproductive disorders. Patent RF № 2686302; 2019. (in Russian)
3. Yakovleva E. A. Ways of restoring the functional activity of the reproductive organs of women after inflammatory diseases. *Nauchnye*

Поступила 13.11.20
Принята к печати 23.11.20

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сычевская К.А., Рисинская Н.В., Кравченко С.К., Никулина Е.Е., Мисюрин А.Е., Магомедова А.У., Судариков А.Б.

СЛОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МОНОНУКЛЕОТИДНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ (MSI) У БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИМФОМАМИ

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

Анализ микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability) является рутинным исследованием в диагностике солидных опухолей. Стандартом определения MSI служит пенталексная панель мононуклеотидных повторов: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. Факт наличия MSI устанавливается на основании различий длины маркеров в опухолевой и здоровой тканях, однако в силу квазимонорфного характера стандартных мононуклеотидных локусов появление опухолевых ПЦР-продуктов может быть идентифицировано без исследования парных образцов и использование контроля в диагностике MSI-позитивных солидных опухолей на настоящий момент не считается строго необходимым. Значение феномена MSI при гемобластозах исследовано недостаточно. В работе представлены результаты анализа MSI при В-клеточных лимфомах: фолликулярной лимфоме (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ), В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности (HGBL). Показано, что абберации мононуклеотидных маркеров имеют место при перечисленных нозологиях, однако их характер не соответствует классическим проявлениям MSI при солидных новообразованиях. Этот факт требует дальнейшего изучения с позиций уточнения патогенеза подобных генетических нарушений. Ввиду возможности неоднозначной трактовки результатов исследования MSI при ранее не охарактеризованных заболеваниях строгое соблюдение методологии параллельного анализа опухолевой ткани и контрольного образца представляется обязательным.

Ключевые слова: генетическая нестабильность; короткие тандемные повторы (STR); микросателлитная нестабильность (MSI); потеря гетерозиготности (LOH); фолликулярная лимфома (ФЛ); диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ); В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности (HGBL); «stutter bands» (SB).

Для цитирования: Сычевская К.А., Рисинская Н.В., Кравченко С.К., Никулина Е.Е., Мисюрин А.Е., Магомедова А.У., Судариков А.Б. Сложности определения нестабильности мононуклеотидных микросателлитных повторов (MSI) у больных В-клеточными лимфомами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 181-186.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-181-186>

Sychevskaya K.A., Risinskaya N.V., Kravchenko S.K., Nikulina E.E., Misyurina A.E., Magomedova A.U., Sudarikov A.B.

PITFALLS IN MONONUCLEOTIDE MICROSATELLITE REPEATS INSTABILITY ASSESSING (MSI) IN THE PATIENTS WITH B-CELL LYMPHOMAS

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

Analysis of microsatellite instability (MSI) is a routine study in the diagnostics of solid malignancies. The standard for determining MSI is a pentaplex PCR panel of mononucleotide repeats: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. The presence of MSI is established based on differences in the length of markers in the tumor tissue and in the control, but due to the quasimonomorphic nature of standard mononucleotide loci the use of a control sample is not necessary in the diagnosis of MSI-positive solid tumors. The significance of the MSI phenomenon in oncohematology has not been established. This paper presents the results of a study of MSI in B-cell lymphomas: follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), high-grade B-cell lymphoma (HGBL). We have shown that aberrations of mononucleotide markers occur in these diseases, but the nature of the changes does not correspond to the classical MSI in solid neoplasms. This fact requires further study of the pathogenesis of such genetic disorders. Due to the possibility of ambiguous interpretation of the results of the MSI study for previously uncharacterized diseases, strict compliance with the methodology of parallel analysis of the tumor tissue and the control sample is mandatory.

Key words: genetic instability; short tandem repeats (STR); microsatellite instability (MSI); loss of heterozygosity (LOH); follicular lymphoma (FL); diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL); high-grade B-cell lymphoma (HGBL); “stutter bands” (SB).

For citation: Sychevskaya K.A., Risinskaya N.V., Kravchenko S.K., Nikulina E.E., Misyurina A.E., Magomedova A.U., Sudarikov A.B. Pitfalls in mononucleotide microsatellite repeats instability assessing (MSI) in the patients with B-cell lymphomas. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(3): 181-186 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-181-186>

For correspondence: Sychevskaya Kseniia Andreevna, MD, hematologist, department of intensive high-dose hemoblastosis chemotherapy; e-mail: sychevskaya-ka@yandex.ru

Information about authors:

Sychevskaya K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8053-9724>;
Risinskaya N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2957-1619>;

Для корреспонденции: Сычевская Ксения Андреевна, врач-гематолог, отд-ние интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточными и дневным стационарами; e-mail: sychevskaya-ka@yandex.ru

Kravchenko S.K., <http://orcid.org/0000-0001-9086-8521>;
Nikulina E.E., <http://orcid.org/0000-0003-3914-8611>;
Misyurina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>;
Magomedova A.U., <http://orcid.org/0000-0003-4263-8275>;
Sudarikov A.B., <http://orcid.org/0000-0001-9463-9187>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 27.11.2020
Accepted 18.12.2020

Введение. В современной онкологической практике анализ микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability), генетических нарушений микросателлитов, или коротких tandemных повторов (STR – short tandem repeats), является рутинным исследованием, включенным в клинические рекомендации по ведению пациентов с раком толстой кишки [1]. Феномен MSI является уникальной особенностью группы больных наследственным неполипозным колоректальным раком, или синдромом Линча [2-3], для которого характерен дефицит белков комплекса репарации неспаренных нуклеотидов (MMR – mismatch repair) [4], обусловленный сочетанием врожденных гетерозиготных мутаций соответствующих генов и соматической инактивации второго аллеля в опухолевых клетках [5, 6]. Генетический профиль, впервые описанный для новообразований при синдроме Линча, также выявлен при ряде спорадических опухолей ЖКТ [7] и при некоторых опухолях иного гистогенетического происхождения, в частности, при раке эндометрия [8], раке предстательной железы [9] и др. Необходимость проведения анализа MSI солидных новообразований определена его клиническим значением, как метода стратификации пациентов с перечисленными нозологиями и выбора их последующей терапии. На примере колоректального рака доказана строгая ассоциация MSI с особенностями локализации первичной опухоли, морфологической картиной биоптата, низким риском метастазирования, благоприятным прогнозом выживаемости больных и высокой эффективностью противоопухолевых препаратов из группы ингибиторов иммунных контрольных точек [10, 11]. Подобные же зависимости прослеживаются и для пациентов с раком эндометрия [12].

Система MMR включает в себя несколько ключевых компонентов, из которых ферменты MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 регулируют репарацию коротких участков некомплементарности ДНК [13]. Функциональный дефицит именно этих белков встречается наиболее часто при MSI-позитивных опухолях и выражается преимущественно в аберрациях мононуклеотидных повторов. Первая широко признанная методика лабораторной диагностики MSI была предложена в 1997 году и известна как панель Bethesda [14]. Ее оригинальная редакция предполагает определение 5 микросателлитных маркеров (BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123, D17S250), из которых только два являются мононуклеотидными. Более высокая специфичность коротких микросателлитов, доказанная в ряде исследований [15, 16], обусловила создание диагностической панели MSI из пяти мононуклеотидных локусов (NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26), которая на настоящий момент является стандартом верификации MSI [17].

Технически стандартный анализ MSI заключается в специфической амплификации последовательностей мононуклеотидных повторов методом мультиплексной ПЦР с последующим фрагментным анализом смеси ПЦР-продуктов методом капиллярного гель-электрофореза. Различие длин амплифицированных участков при сравнении материала опухолевой ткани и контроля (как правило, клеток периферической крови того же пациента) расценивается как признак нестабильности по вовлеченному локусу. Мононуклеотидные маркеры диагностической панели MSI являются квазиоморфными [18], что означает высокую степень однотипности внешнего вида комплекса ПЦР-продуктов на электрофореграммах при подлежащем истинном генетическом разнообразии в силу гетерозиготного наследования аллельных вариантов микросателлитных повторов. Возможность существования подобного феномена обусловлена двумя причинами. Во-первых, спектр длин наиболее частых в популяции аллелей диагностических мононуклеотидных маркеров ограничен узким диапазоном в пределах 5-6 нуклеотидов, или квазиоморфным интервалом [17]. Во-вторых, амплификация микросателлитной ДНК методом ПЦР сопровождается обязательным артефактом, формированием ложных пиков амплификации, или “stutter bands” (SB) [17], вызванным “соскальзыванием” ДНК-полимеразы со “сложной” матрицы, распадом репликационной вилки и продолжением нового синтеза после некорректного спаривания цепей со сдвигом на кратное число мононуклеотидных мономеров [19]. В результате внешний вид электрофореграммы множественных ПЦР-продуктов напоминает нормальное распределение длин, среднее которого примерно соответствует длине истинных аллелей. В подобной ситуации определение факта гомо- или гетерозиготного носительства и различение отдельных аллельных вариантов практически лишено смысла из-за подавляющего фона SB.

Согласно результатам многочисленных исследований [15, 17, 20, 21], при MSI-позитивных опухолях длины опухолевых ПЦР-продуктов выходят за границы квазиоморфного интервала, что делает диагностику MSI возможной, несмотря на наличие артефакта. На этом основании рядом авторов [15, 17, 20] предполагалась целесообразность анализа MSI только материала опухоли без определения микросателлитного профиля контрольной ткани, что может быть особенно значимым при доступности только архивного материала, например, в практике работы консультативных центров, территориально разобщенных с местом наблюдения и лечения больных.

Несмотря на значительное число работ по MSI при солидных новообразованиях, феномен нестабильности

микросателлитов и нарушения MMR при гемобластозах в когортных исследованиях остается раскрытым недостаточно [22-24]. В рамках изучения MSI при лимфопролиферативных заболеваниях на примере фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBL) нами была проанализирована частота aberrаций мононуклеотидных повторов при указанных нозологиях и впервые продемонстрирована высокая вероятность гетерозиготного наследования редких аллельных вариантов диагностических локусов. Сложности интерпретации результатов исследования предъявляют определенные требования к методике определения MSI у ранее не охарактеризованных групп пациентов.

Материал и методы. В исследование включили 53 больных ФЛ, 27 пациентов с ДВККЛ, 29 пациентов с HGBL, которые наблюдались в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ с 2010 г. по 2020 год. Группу сравнения составили 8 больных с неопухолевой лимфаденопатией (НЛ) по типу гранулематозного воспаления, преимущественно с саркоидозом, которые обследовались в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ с подозрением на гематологическое заболевание в течение последних двух лет.

Анализ профиля микросателлитных маркеров проводили в материале биоптата опухолевого лимфатического узла или аспирата костного мозга при его поражении, доказанном гистологически и при определении В-клеточной клональности по перестройкам генов иммуноглобулинов. В качестве контрольного образца здоровой ткани больного были использованы лейкоциты периферической крови или клетки аспирата костного мозга (в дебюте без вовлечения или после санации), что было доказано путем исключения В-клеточной клональности.

Выделение ДНК из замороженного материала и парафиновых блоков проводили описанным ранее способом [25, 26]. Определение концентрации раствора ДНК выполняли на флуориметре Qubit 4,0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследование MSI выполняли с использованием диагностической панели COrDIS MSI (ООО Гордиз, Россия), в которую включено 5 классических мононуклеотидных маркеров: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендациям производителя. В каждую реакцию было внесено не менее 10 нг ДНК. Условия ПЦР реакции были следующими: 95°C (2 мин); 28 циклов: 95°C (10 сек), 58°C (30 с), 72°C (30 с); 68°C (10 мин). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США). Последующий фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе Нанофор-05 (ООО Синтол, Россия).

Статистический анализ проводился в программах Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 13.0 (StatSoft, Россия). Парное сравнение выборок проводилось с использованием критерия χ^2 Пирсона.

Результаты. Aberrации мононуклеотидных повторов при сравнительном анализе материала опухолевой ткани и контроля были выявлены у 17 больных гемобластомами, что составило 15,6%. Среди них: у 4 пациентов с ФЛ (7,5%), у 3 пациентов с ДВККЛ (11%) и у 10 больных HGBL (34,5%). В тесте Пирсона статистически

значимых различий между группами ФЛ и ДВККЛ получено не было, в то время как частота генетических нарушений в группе HGBL значимо превышала таковую как в группе ФЛ ($df=1$, $\chi^2=9,61$, $p=0,002$), так и ДВККЛ ($df=1$, $\chi^2=4,28$, $p=0,039$) при попарном сравнении. В группе пациентов с НЛ мутации микросателлитов не были обнаружены.

У всех пациентов генетические нарушения вовлекли только один локус из пяти. Исключение составил один больной HGBL, у которого были выявлены aberrации мононуклеотидных повторов в двух локусах.

При анализе случаев aberrаций мононуклеотидных повторов интерпретация электрофореграмм вызвала затруднения с позиций определения соответствия наблюдаемых нарушений феномену MSI. Классическая картина появления множественных опухолевых аллелей за пределами квазимономорфного интервала не была выявлена ни у одного больного. Все изменения микросателлитного профиля носили характер смещения максимума распределения длин в большую или меньшую сторону на 1-2 нуклеотида (рис. 1, а, б), и только в двух случаях в опухолевой ткани был достоверно визуализирован (рис. 1, в) единичный новый пик на границе распределения ПЦР-продуктов, соответствующего контролю. За исключением двух последних примеров, наблюдаемые aberrации могут соответствовать как MSI с изменением длины маркера на незначительное число нуклеотидов, так и потери гетерозиготности (LOH – loss of heterozygosity) с утратой одного из гетерозиготных аллелей, ранее не определяемого на фоне SB. При этом с учетом отсутствия расширения границ распределения длин ПЦР-продуктов, которое неизбежно должно было бы произойти за формирования SB вокруг нового опухолевого аллеля, последний вариант представляется более вероятным.

У 9 пациентов в объединенной когорте из 117 человек, что составило 7,7%, было выявлено гетерозиготное наследование редких вариантов аллелей, находящихся за пределами квазимономорфного интервала. При этом статистически значимых различий при уровне значимости $p<0,05$ между нозологическими формами (3 случая, 5,7%, ФЛ; 2 случая, 7,4%, ДВККЛ; 3 случая, 10%, HGBL; 1 случай, 12,5%, НЛ) обнаружено не было.

Внешний вид распределения длин ПЦР-продуктов при наличии редкого аллельного варианта в гетерозиготной форме подобен MSI и при изолированном исследовании только опухолевого материала неизбежно должен быть расценен в качестве генетического нарушения. В нашей работе параллельный анализ образцов здоровых клеток позволил верифицировать наблюдаемые изменения как проявление нормы. Примеры электрофореграмм при гетерозиготном наследовании редких аллелей представлены на рис. 2, а, б.

Статистически значимых различий между частотами aberrаций того или иного локуса выявлено не было (см. таблицу). Тем не менее, создается впечатление о более высокой частоте редких вариантов аллелей микросателлитов BAT-25 и NR-21, поскольку они были единственными, которые мы обнаружили в когорте из 117 пациентов.

Обсуждение. Согласно критериям Bethesda, наличие в пентаплексной панели двух или более локусов с мутациями микросателлитных повторов должно расцениваться как MSI высокой степени (MSI-H) [14]. Aberrации только одного маркера из пяти соответствуют

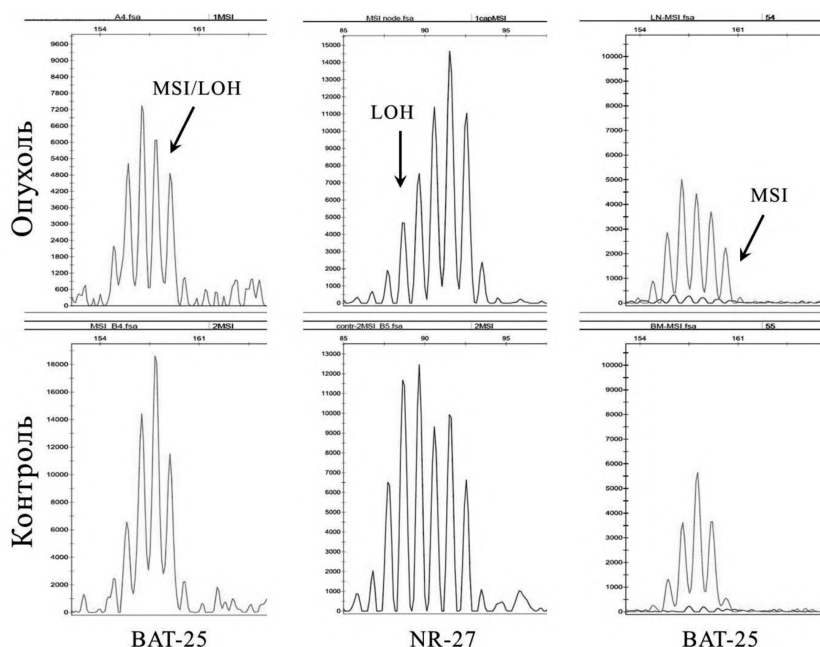


Рис. 1. Электрофореграммы случаев aberrаций мононуклеотидных локусов. *a* – пример невозможности дифференцировать MSI и LOH; *б* – пример достоверного определения LOH; *в* – пример достоверного определения MSI. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс – длина ПЦР продукта, п.н.; по оси ординат – интенсивность флуоресценции ПЦР-продукта.

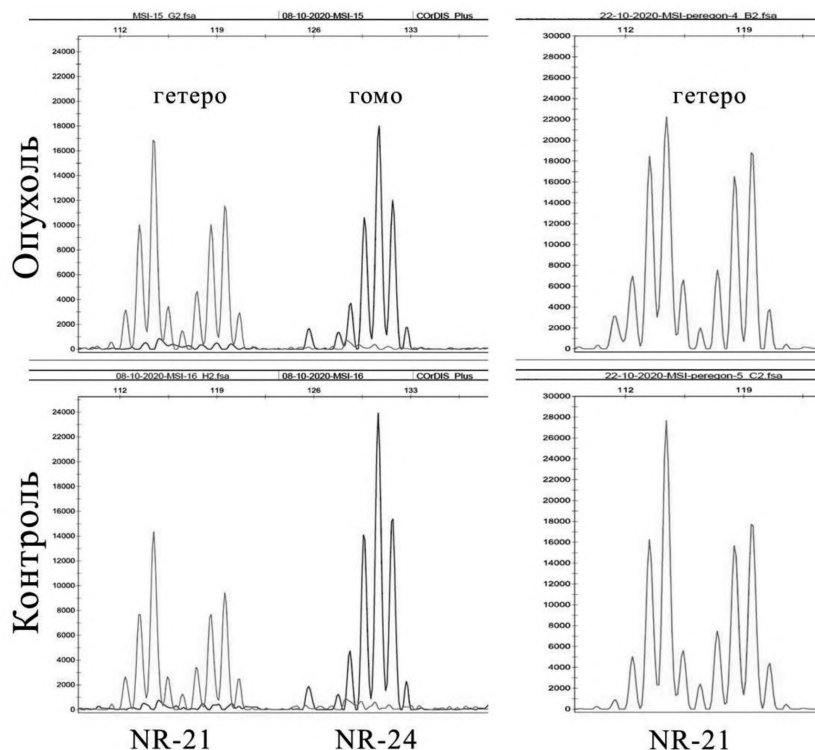


Рис. 2. Электрофореграммы случаев гетерозиготного наследования редких аллелей.

a – пример гетерозиготного и гомозиготного наследования у пациента с ДВККЛ; *б* – пример гетерозиготного наследования у пациента с НГБЛ.

MSI низкой степени (MSI-L) [14]. MSI-H характерна для синдрома Линча и подобных ему (Lynch-like) спорадических опухолей [7], в то время как MSI-L встречается

при многих других заболеваниях, что было продемонстрировано ранее [14], и не имеет на настоящий момент доказанного клинического значения, за исключением случаев колоректального рака, при котором MSI-L, как и феномен экспансии тетра-нуклеотидных повторов (EMAST – elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats), характеризует группу больных с агрессивным течением заболевания и неблагоприятным прогнозом [27, 28].

При солидных новообразованиях анализ aberrаций мононуклеотидных повторов, как правило, не вызывает затруднений, поскольку при MSI-H вследствие дефицита MMR происходят выраженные изменения исходных аллелей в сторону значимого уменьшения длины с формированием множественных новых ПЦР-продуктов. В предшествующих работах по исследованию мутаций микросателлитов было показано существование двух вариантов нестабильности, один из которых соответствует описанному выше, а другой отражает минимальные отклонения от контроля и появление опухолевого продукта только одной новой длины [29]. Авторами эти варианты были обозначены как тип I и тип II MSI, соответственно. MSI-H при синдроме Линча и Lynch-like новообразованиях всегда соответствует I типу нестабильности. Интересно, что длина интервала между нормальным и опухолевым ПЦР-продуктами при MSI, коррелирует с общей мутационной нагрузкой в кодирующей ДНК [30]. Вероятно, этот факт отражает связь между количеством репликационных циклов, выраженном в прогрессирующем накоплении мутаций микросателлитов, и линейным развитием опухоли этой группы.

В нашем исследовании только у одного пациента были выявлены aberrации двух микросателлитных локусов из пентаплексной панели. По формальным критериям Bethesda этот случай соответствует определению MSI-H [14], однако с учетом невозможности разграничения MSI и LOH по полученным электрофореграммам и как минимум их принадлежности к II типу нестабильности, следует признать, что феномен MSI-H в том качестве, в котором он известен при солидных опухолях, не имеет места при В-клеточных лимфомах. На этом же основании мы предполагаем, что дефицит ферментов комплекса MMR не принимает участия в развитии генетических нарушений микросателлитных повторов при исследованных нозологиях. Подобный вывод согласуется с результатами иммуногистохимического анализа экспрессии белков MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 [31-33].

Возвращаясь к вопросу невозможности дифференциации MSI и LOH, формирование SB следует признать основным техническим препятствием в решении данного вопроса. Причиной возникновения

Частоты генетических нарушений и гетерозиготного наследования редких аллелей по мононуклеотидным локусам

Показатели		BAT-25	BAT-26	NR-21	NR-24	NR-27
ФЛ	MSI/LOH	2/53* (3,8%)	0	1/53 (1,9%)	0	1/53 (1,9%)
	Гетеро	2/53 (3,8%)	0	1/53 (1,9%)	0	0
HGBL	MSI/LOH	3/27 (11,1%)	1/23 (4,3%)	3/28 (10,7%)	2/29 (6,9%)	2/29 (6,9%)
	Гетеро	1/27 (3,7%)	0	2/28 (7,1%)	0	0
ДВККЛ	MSI/LOH	3/27 (11,1%)	0	0	0	0
	Гетеро	0	0	2/27 (7,4%)	0	0
НЛ	MSI/LOH	0	0	0	0	0
	Гетеро	0	0	1/8 (12,5%)	0	0

Примечание. * – Вторая цифра каждой ячейки отражает число образцов с успешной амплификацией по конкретному локусу.

SB считают термические условия проведения ПЦР [34], поэтому в попытке уменьшить влияние артефакта на результат исследования MSI были апробированы разные варианты изотермической амплификации, такие как LAMP (loop-mediated isothermal amplification) [35] и RPA (recombinase polymerase amplification) [35]. Целевой результат уменьшения количества SB был достигнут только при применении методики RPA [34], которую можно признать альтернативой ПЦР при анализе MSI.

В нашем исследовании была продемонстрирована возможность гетерозиготного наследования редких вариантов аллелей мононуклеотидных локусов. В опубликованных ранее источниках вероятность обнаружения аллельных вариантов за пределами квазимономорфного интервала варьировала от 0 до 57% по отдельным локусам в зависимости от выбранной этнической группы [17]. Согласно нашим результатам, частота выявления пациента с гетерозиготным носительством составила 2,6% для маркера BAT-25 и 5,1% для маркера NR-21 при вдвое меньшей аллельной частоте: 1,3% и 2,55% соответственно. Интерес подробного анализа этого феномена заключается в том, что в случае гетерозиготного носительства редкого аллеля изолированное исследование материала опухоли без контрольной ткани может привести к ложному выводу о наличии MSI. На настоящий момент параллельный анализ парных образцов является стандартом, однако с учетом квазимономорфного характера мононуклеотидных локусов ранее высказывались предложения [15, 17, 20] о возможности упрощения методики и определения MSI только в биоптате. Следует отметить, что в клинической онкологической практике подобное предложение может быть правомочным, поскольку на больших когортах пациентов было доказано, что феномен MSI-H, определяющий прогноз заболевание и лечение, характеризуется сочетанием aberrаций нескольких микросателлитов, как правило, от 3 до 5 [17]. Вероятность подобного сочетания в силу совпадения редких аллельных вариантов стремится к нулю. Однако при изучении не охарактеризованных столь подробно групп больных в рамках экспериментальных исследований анализ каждого случая генетических нарушений имеет самостоятельное значение. Поэтому мы считаем нужным подчеркнуть, что определение микросателлитного профиля контрольного образца является обязательным при любых условиях,

возможность гетерозиготного наследования редких аллелей должна быть принята во внимание, а “неклассический” вид электрофореграммы квазимономорфных локусов может быть вариантом нормы.

Определение клинического значения нарушений мононуклеотидных повторов у больных гемобластозами не являлось задачей настоящей работы методологического характера и будет выполнено коллективом авторов в последующем. Однако стоит отметить два следствия проведенного исследования, которые могут иметь практическое применение в клинической медицине. Во-первых, показанные различия между aberrациями микросателлитов при В-клеточных лимфомах и MSI при солидных опухолях не позволяют проводить параллель между этими феноменами и переносить закономерности формирования прогноза и терапии из онкологической практики в практику ведения гематологических больных. В первую очередь это касается перспектив применения ингибиторов иммунных контрольных точек, ниша использования которых в онкогематологии определена и, возможно, должна быть расширена, однако уже не на основании определения MSI.

Во-вторых, различия генетического профиля, выявленные между проанализированными нозологическими формами, могут отражать неизвестные ранее особенности патогенеза лимфом. Высокая степень генетической нестабильности, продемонстрированная для HGBL в ряде исследований [36, 37], согласуется с полученными нами результатами и показывает, что нарушения на разных уровнях организации ДНК взаимосвязаны и, вероятно, имеют общие причины. Более глубокое изучение механизмов генетической нестабильности необходимо для понимания путей лимфогенеза, что особенно актуально для разработки новых терапевтических подходов.

Заключение. В работе представлены результаты исследования MSI при В-клеточных лимфомах: ФЛ, ДВККЛ и HGBL. Показано, что частота aberrаций мононуклеотидных повторов при изученных нозологиях составляет 15,6%. Выявлены статистически значимые различия между группами: частота генетических нарушений при HGBL (34,5%) значительно превышает таковую при ФЛ (7,5%) и при ДВККЛ (11%), что может быть отягчением особенностей патогенеза этих заболеваний.

Характер изменений микросателлитов при В-клеточных лимфомах не соответствует стандартным проявлениям MSI при солидных новообразованиях. Aberrации мононуклеотидных повторов в материале биоптата были ограничены незначительными отклонениями от микросателлитного профиля контрольного образца на 1-2 нуклеотида. В большинстве случаев разделение феноменов MSI и LOH оказалось невозможным. Параллельный анализ опухолевой и контрольной ткани позволил выявить варианты гетерозиготного наследования редких аллелей квазимономорфных мононуклеотидных локусов и исключить ложное определение MSI.

Различия между генетическими нарушениями при изученных В-клеточных лимфомах и MSI при солидных опухолях не позволяют проводить параллель между этими феноменами в онкогематологии и онкологии как с точки зрения особенностей их патогенеза, так и в отношении их клинического значения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-24, 26-37 см. REFERENCES)

25. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисилкина Д.Г., Наумова Е.В. и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 12:22-4, 33-5.

REFERENCES

1. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L., Singh N., Nottegar A., Bosse T. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann. Oncol.* 2019; 30(8):1232-43. doi: 10.1093/annonc/mdz116.

2. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363(6429):558-61. doi:10.1038/363558a0.

3. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260(5109):816-9. doi:10.1126/science.8484122.

4. Parsons R., Li G.M., Longley M.J., Fang W.H., Papadopoulos N., Jen J. et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*. 1993; 75(6):1227-36. doi: 10.1016/0092-8674(93)90331-j.

5. Fishel R., Kolodner R.D. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5(3):382-95. doi:10.1016/0959-437x(95)80055-7.

6. Miyaki M., Konishi M., Tanaka K., Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Yasuno M. et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* 1997; 17(3):271-2. doi: 10.1038/ng1197-271.

7. Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2073-87.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064

8. Hause R.J., Pritchard C.C., Shendure J., Salipante S.J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat. Med.* 2016; 22(11):1342-50. doi:10.1038/nm.4191

9. Fujimoto A., Fujita M., Hasegawa T., Wong J.H., Maejima K., Oku-Sasaki A. et al. Comprehensive analysis of indels in whole-genome microsatellite regions and microsatellite instability across 21 cancer types. *Genome Res.* 2020 Mar 24; 30(3):334-46. doi: 10.1101/gr.255026.119.

10. Gryfe R., Kim H., Hsieh E.T., Aronson M.D., Holowaty E.J., Bull S.B. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342(2):69-77. doi: 10.1056/NEJM200001133420201.

11. Oliveira A.F., Bretes L., Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* 2019;9:396. doi:10.3389/fonc.2019.00396

12. Kunitomi H., Banno K., Yanokura M., Takeda T., Iijima M., Nakamura K. et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. *Oncol. Lett.* 2017; 14(3):3297-3301. doi: 10.3892/ol.2017.6640.

13. Reyes G.X., Schmidt T.T., Kolodner R.D., Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma*. 2015; 124(4):443-62. doi:10.1007/s00412-015-0514-0.

14. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(22):5248-57.

15. Suraweera N., Duval A., Reperant M., Vaury C., Furlan D., Leroy K. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002; 123(6):1804-11. doi: 10.1053/gast.2002.37070.

16. Wong Y.F., Cheung T.H., Lo K.W., Yim S.F., Chan L.K., Buhard O. et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis*. 2006; 27(5):951-5. doi: 10.1093/carcin/bgi333.

17. Buhard O., Cattaneo F., Wong Y.F., Yim S.F., Friedman E., Flejou J.F. et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability

status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(2):241-51. doi: 10.1200/JCO.2005.02.7227.

18. Buhard O., Suraweera N., Lectard A., Duval A., Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis. Markers*. 2004; 20(4-5):251-7. doi: 10.1155/2004/159347.

19. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5(6):435-45. doi: 10.1038/nrg1348.

20. Campanella N.C., Berardinelli G.N., Scapulatempo-Neto C., Viana D., Palmero E.L., Pereira R. et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22(7):875-80. doi: 10.1038/ejhg.2013.256

21. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland C.R. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010; 5(2):e9393. doi: 10.1371/journal.pone.0009393

22. Vanderwalde A., Spetzler D., Xiao N., Gatalica Z., Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med.* 2018; 7(3):746-756. doi:10.1002/cam4.1372

23. Trabucco S.E., Gowen K., Maund S.L., Sanford E., Fabrizio D.A., Hall M.J. et al. A Novel Next-Generation Sequencing Approach to Detecting Microsatellite Instability and Pan-Tumor Characterization of 1000 Microsatellite Instability-High Cases in 67,000 Patient Samples. *J. Mol. Diagn.* 2019; 21(6):1053-66. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.06.011.

24. Bonneville R., Krook M.A., Kautto E.A., Miya J., Wing M.R., Chen H.Z. et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol.* 2017; 1:1-12. doi: 10.1200/PO.17.00073.

25. Сидорова И.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисилкина Д.Г., Наумова Е.В. et al. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 12: 22-4, 33-5. (in Russian)

26. Сидорова И.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Судариков А.В. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp. Dermatol.* 2012; 21(1):57-60. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x.

27. Carethers J.M. Microsatellite Instability Pathway and EMAST in Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 2017; 13(1):73-80. doi: 10.1007/s11888-017-0352-y.

28. Carethers J.M., Koi M., Tseng-Rogenski S.S. EMAST is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes (Basel)*. 2015; 6(2):185-205. doi:10.3390/genes6020185.

29. Larson R.S., Scott M.A., McCurley T.L., Vnencak-Jones C.L. Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Res.* 1996; 56(19):4378-81.

30. Duval A., Rolland S., Compoint A., Tubacher E., Iacopetta B., Thomas G. et al. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(5):513-8. doi: 10.1093/hmg/10.5.513.

31. Miyashita K., Fujii K., Yamada Y., Hattori H., Taguchi K., Yamataka T. et al. Frequent microsatellite instability in non-Hodgkin lymphomas irresponsive to chemotherapy. *Leuk. Res.* 2008; 32(8):1183-95. doi: 10.1016/j.leukres.2007.11.024.

32. Tian T., Li J., Xue T., Yu B., Li X., Zhou X. Microsatellite instability and its associations with the clinicopathologic characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med.* 2020; 9(7):2330-2342. doi:10.1002/cam4.2870.

33. Starostik P., Greiner A., Schwarz S., Patzner J., Schultz A., Müller-Hermelink H.K. The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am. J. Pathol.* 2000; 157(4):1129-1136. doi:10.1016/S0002-9440(10)64628-7.

34. Daunay A., Duval A., Baudrin L.G., Buhard O., Renault V., Deleuze J.F. et al. Low temperature isothermal amplification of microsatellites drastically reduces stutter artifact formation and improves microsatellite instability detection in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(21):e141. doi: 10.1093/nar/gkz811.

35. Lee D., Iallicco M., Akkinepalli H., Morreale G., Liu Y., Leung H. et al. Genotyping SSR length variants by isothermal DNA amplification. *Genome*. 2012; 55(9):691-5. doi: 10.1139/G2012-058.

36. Novo M., Castellino A., Nicolosi M., Santambrogio E., Vassallo F., Chiappella A. et al. High-grade B-cell lymphoma: how to diagnose and treat. *Expert Rev. Hematol.* 2019; 12(7):497-506. doi: 10.1080/17474086.2019.1624157.

37. Hilton L.K., Tang J., Ben-Neriah S., Alcaide M., Jiang A., Grande B.M. et al. The double-hit signature identifies double-hit diffuse large B-cell lymphoma with genetic events cryptic to FISH. *Blood*. 2019; 134(18):1528-1532. doi: 10.1182/blood.2019002600.

Поступила 27.11.20

Принята к печати 18.12.20

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© ИВОЙЛОВ О.О., КОЧЕТОВ А.Г., 2021

Ивойлов О.О.^{1,2}, Кочетов А.Г.^{1,2,3}

МЕТОД АНАЛИЗА ТИПОВОЙ СТРУКТУРЫ ПРЯМЫХ ЗАТРАТ В СЕБЕСТОИМОСТИ ЛАБОРАТОРНОГО ТЕСТА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия;

³АНО ДПО «Институт лабораторной медицины», 117042, Москва, Россия

В основу расчета себестоимости любой продукции, в том числе и лабораторных услуг, заложена оценка прямых затрат на производство. В настоящее время в управленческой практике медицинских лабораторий отсутствуют систематизированные представления об их структуре, не определены подходы к их анализу. Целью данной работы явилась разработка и апробация метода анализа структуры прямых затрат и баз их распределения при расчетах себестоимости лабораторного теста. Были проанализированы данные по объемам лабораторных тестов, выполняемых в клинико-диагностической лаборатории (КДЛ) ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, по ценам накупаемые реактивы, расходные материалы, по расходам на амортизацию и эксплуатацию оборудования, на оплату труда персонала. В результате нами была предложена типовая компонентная структура прямых затрат, установлены базы распределения постоянных затрат, определено отношение компонентов переменных затрат к единице продукции. На основе этих представлений разработан алгоритм расчета технологической себестоимости теста, позволяющий моделировать ее структуру в условиях произвольно заданных переменных. В ходе апробации алгоритма рассчитаны величины прямых затрат и технологической себестоимости для некоторых рутинных лабораторных тестов. Выполнено сравнение экономической эффективности различных методов, а также моделирование изменения себестоимости в зависимости от объема исследований и времени оборота теста (TAT). Можно заключить, что подход к созданию таблиц технологической себестоимости лабораторных тестов, учитывающий разделение прямых затрат на переменные и постоянные, и структурирование их по компонентам и базам распределения, является эффективным инструментом менеджмента медицинской лаборатории.

Ключевые слова: себестоимость теста; прямые затраты; постоянные затраты; база распределения; менеджмент лаборатории; объем исследований, TAT.

Для цитирования: Ивойлов О.О., Кочетов А.Г. Метод анализа типовой структуры прямых затрат в себестоимости лабораторного теста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 187-192. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192>

Ivoylov O.O.^{1,2}, Kochetov A.G.^{1,2,3}

A METHOD FOR ANALYZING THE TYPICAL STRUCTURE OF DIRECT COSTS IN THE COST OF A LABORATORY TEST

¹National Medical Research Center of Cardiology, 121552, Moscow, Russia;

²People's Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia;

³Institute of Laboratory Medicine, 117042, Moscow, Russia

The basis for calculating the cost price of any product, including laboratory tests, is based on an estimate of direct costs of the production. At present, there are no systematic ideas about the structure of such costs, and approaches to their analysis have not been defined, in the management practice of medical laboratories. The purpose of this work was developing and testing a method for analyzing the structure of direct costs and their allocation bases when calculating the cost of a laboratory test. We analyzed data on the volume of laboratory tests performed in the clinical diagnostic laboratory of the National Medical Research Center of Cardiology, prices for purchased reagents and consumables, depreciation and maintenance costs of equipment, staff salaries. As a result, we proposed a typical component structure of direct costs, established the allocation bases of fixed costs, and determined the ratio of some variable cost components to one product unit cost. On the basis of these concepts, an algorithm for calculating the total direct laboratory (technological) cost per test has been developed, which makes it possible to simulate the cost structure under conditions of arbitrarily specified variables. During the testing of the algorithm, the values of direct costs and the technological cost per test were calculated for billable (ordered) laboratory tests. Comparison of the economic efficiency of various methods, as well as modeling of changes in the cost depending on the volume of testing and the turn-around time (TAT) has been performed. It can be concluded that the approach to creating the tables of the technological cost per test based on dividing direct costs into variable and fixed costs and structuring them by components and allocation bases is an effective tool for medical laboratory management.

Key words: cost per test; direct costs; fixed costs; allocation base; laboratory management; volumes; turn-around time.

Для корреспонденции: Ивойлов Олег Олегович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела клин. лаб. диагностики НМИЦ кардиологии, ассистент каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клин. лаб. диагностики медицинского института РУДН; e-mail: kbld@mail.ru

For citation: Ivoylov O.O., Kochetov A.G. A method for analyzing the typical structure of direct costs in the cost of a laboratory test. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(3): 187-192 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192>

Information about authors:

Ivoylov O.O., <https://orcid.org/0000-0002-4684-8440>;
Kochetov A.G., <https://orcid.org/0000-0003-3632-291X>.

For correspondence: Ivoylov O.O., PhD, senior researcher of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of National Medical Research Center of Cardiology; assistant professor of Department of Hospital Therapy with a Course in Clinical Laboratory Diagnostics of Peoples' Friendship University of Russia; e-mail: kbld@mail.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 10.12.2020
Accepted 17.12.2020

Введение. Определение механизмов, влияющих на себестоимость лабораторного теста, неразрывно связано с проблемой структурирования затрат и их распределения по той или иной базе. Прямые затраты подразделяются на переменные (*variable costs*, VC) и постоянные (*fixed costs*, FC) [1]. Первые изменяются пропорционально объему производства, в отличие от вторых, от него не зависящих. Иногда грань между VC и FC весьма тонка: например, одни и те же реагенты используются и для проведения рутинных тестов пациентов, и для выполнения калибровки. Однако простого деления затрат на переменные и постоянные в отношении лабораторных услуг недостаточно. Согласно теоретическим и практическим рекомендациям, FC должны быть распределены по какой-либо базе с последующим включением в себестоимость каждого вида выпускаемой продукции [2]. Но структура FC лаборатории сложна и неоднородна: например калибратор, используемый для калибровки одной единственной лабораторной методики, контрольный материал, применяемый для целой линейки тестов, анализатор, на котором выполняется широкая номенклатура исследований. Следовательно, в каждом случае база распределения будет своя. Более того, VC лаборатории также неоднородны: реагенты, используемые для выполнения одного единственного теста, и пробирка, из которой выполняется целый лабораторный заказ. Очевидно, что при расчёте себестоимости лабораторного теста необходимо учитывать и структуру прямых затрат, и базы их распределения. Однако в настоящий момент методологические подходы к их определению не разработаны.

Цель работы – разработка и апробация метода анализа структуры прямых затрат и баз их распределения при расчетах себестоимости лабораторного теста.

Материал и методы. Проведен анализ деятельности КДЛ ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России за 2018 г. В анализ включены данные по объемам лабораторных тестов, выполняемых в КДЛ, ценам на закупаемые реактивы, расходные материалы, оборудование, оплату труда персонала. Выполнен хронометраж рабочих мест. За основу используемых баз распределения было взято количество произведенной продукции (выполненных рутинных тестов), что не противоречит теоретическим условиям, гарантирующим отсутствие расчетной убыточности [2].

Результаты. FC на каждую лабораторную методику за анализируемый период были рассчитаны по отдельным компонентам, согласно разработанной нами структуры (табл. 1), и распределены в соответствии с установленными базами (табл. 2). Их сумма представле-

на (1) в виде величины общих постоянных затрат (*total fixed costs*, TFC):

$$TFC = \sum(FC_k \times Q / B_k), \quad (1)$$

где: FC_k – величина компонента постоянных затрат за год (руб.);

Q – объем рутинных тестов данной методики за год;

B_k – база распределения для данного компонента затрат (объем тестов за год).

VC представлены в виде затрат на единицу продукции (*unit average variable costs*, AVC) (табл. 3). Общие прямые затраты (*total direct costs*, TC), отражающие сумму FC и VC на выполнение данного объема тестов в год, были рассчитаны по формуле (2):

$$TC = TFC + AVC \times Q. \quad (2)$$

Технологическая себестоимость была рассчитана по формуле (3):

$$P = AVC + TFC / Q. \quad (3)$$

Разработан табличный математический алгоритм анализа технологической себестоимости лабораторного теста, позволяющий моделировать структуру и величины затрат в условиях произвольно заданных переменных: объема тестирования и частоты проведения аналитических серий (частоты постановок в неделю). Алгоритм основан на разработанном нами подходе к структурированию затрат и базам их распределения, и может быть использован для генерирования готовой актуальной технологической карты. В качестве входящих использованы следующие параметры:

1. По статье «реагенты»: цена, объем упаковки и норма расхода на 1 тест основного и дополнительных реактивов и расходных материалов, процент перестановок, кратность разведения и объем используемой для этого аликвоты, цена и объем упаковки дилуэнта, частота разведений.

2. По статье «референсные материалы»: цены и объемы упаковок калибратора и контрольного материала для внутрилабораторного контроля качества (ВЛК), объемы используемых аликвот, сроки стабильности материалов, количество точек калибровки и кратность измерения, периодичность калибровки, количество уровней контрольного материала, стоимость программы внешней оценки качества (ВОК), количество ее циклов и кратность измерения, а также объемы баз распределения для каждого из референсных материалов.

3. По статье «оборудование»: стоимость закупки основного и дополнительного оборудования и ликвидационная его стоимость, расчетные сроки эксплуатации, длительность рабочей смены, предельная длительность полезной работы в течение суток, время на ежедневное обслуживание, производительность, количество модулей измерения, стоимость метрологической поверки и

технического обслуживания (ТО), а также затраты на реагенты, используемые для поддержания работоспособности и обслуживания оборудования (затраты на «рабочий центр»), объемы баз распределения для основного и дополнительного оборудования.

4. По статье «зарплаты персонала» (для персонала со средним и высшим образованием отдельно): величина оклада и годовой бюджет рабочего времени, время на выполнение операций по работе с данным тестом, время на выполнение операций с пробой, время на калибровки, время на операции контроля качества, время на ежедневное и периодическое обслуживание рабочего места, время на подготовку реактивов (ежедневную и по мере их использования). Хронометраж проводили в соответствии с положениями «Методических рекомендаций для федеральных органов исполнительной власти по разработке типовых отраслевых норм труда», утвержденных Приказом Минтруда России № 235 от 31 мая 2013 г. Использовали базы распределения, связанные с соответствующими компонентами деятельности.

5. По статье «преаналитика»: объем и цены упаковок расходного имущества для взятия биоматериала, регистрации и маркировки, а также данные о соотношении частоты встречаемости этого и других тестов, выполняемых из данной пробы.

Мы предлагаем типовую структуру прямых затрат на выполнение лабораторного теста для анализа технологической себестоимости (табл. 1).

Нами определены базы распределения компонентов FC в зависимости от связи их с процессами выполнения других тестов (табл. 2).

Также оценена доля компонентов в формировании AVC теста (табл. 3).

С помощью разработанного алгоритма были рассчитаны величины TC, TFC, AVC и технологической себестоимости для лабораторных тестов, выполняемых в условиях ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России (табл. 4), и созданы актуальные таблицы технологической себестоимости.

На базе используемого алгоритма, на примере рутинных тестов, выполнено сравнение экономической эффективности различных методов, а также моделирование изменения себестоимости в зависимости от объема исследований и времени оборота теста (*turn-around time, TAT*).

Обсуждение. Предложенный нами алгоритм является основой для расчета технологической себестоимости лабораторного теста. Дальнейшее использование полученных данных может преследовать разные цели. Во-первых, обоснование адекватных расценок на выполняемые лабораторные услуги. Во-вторых, решение задач экономического анализа и планирования: выбор оптимального метода и оборудования среди различных предложений на рынке, оценка рентабельности проведения тех или иных исследований на собственной базе в сравнении с услугами аутсорсинга, выявление несоот-

Таблица 1

Типовая структура прямых затрат на выполнение лабораторного теста

Статьи затрат	VC, компоненты	FC, компоненты
Реагенты	Реагенты / расходные материалы для выполнения рутинных исследований	Реагенты / расходные материалы для выполнения калибровок, ВЛК и ВОК
Референсные материалы	-	Калибраторы, контрольные материалы, референсные материалы ВОК
Оборудование	-	Амортизация основного и вспомогательного оборудования, дилерское ТО, метрологическая поверка, реактивы для поддержания работоспособности, обслуживания оборудования, функционирования в режиме ожидания, запуска / выключения
Зарплаты персонала	Непосредственное выполнение теста, работа с пробой, приготовление / загрузка реактивов по мере их израсходования	Калибровки, контроль качества, обслуживание рабочего места / оборудования, ежедневная подготовка реактивов
Преаналитика	Расходные материалы для процедур взятия биоматериала	-

Таблица 2

Базы распределения постоянных затрат на выполнение лабораторного теста

Статьи затрат	Компоненты FC	База распределения
Реагенты	Затраты реагентов на калибровку, ВЛК, ВОК	Объем выполнения данного теста
Референсные материалы	Калибратор Контрольный материал	Объем выполнения данного теста Суммарный объем всех тестов, где этот референсный материал используется
Оборудование	Амортизация и эксплуатация оборудования / рабочего места	Суммарный объем всех тестов, выполняемых на данном оборудовании / рабочем месте
Зарплаты персонала	Калибровки Контроль качества	Объем выполнения данного теста Суммарный объем всех тестов, где этот референсный материал используется
	Обслуживание рабочего места / оборудования	Суммарный объем всех тестов, выполняемых на данном оборудовании / рабочем месте
	Ежедневная подготовка реактивов	Объем выполнения данного теста

Таблица 3

Распределение компонентов переменных затрат на единицу продукции

Статья затрат	Компоненты AVC	Отношение к 1 единице продукции
Реагенты	Реагенты / расходные материалы для выполнения рутинных исследований	1/1
Зарплаты персонала	Непосредственное выполнение теста, приготовление / дозагрузка реактивов по мере их израсходования	1/1
	Работа с пробой	Долевое, с учетом количества прочих тестов в пробе
Преаналитика	Расходные материалы для процедур взятия биоматериала	Долевое, с учетом количества прочих тестов в пробе, заказе

Таблица 4

Величины прямых затрат и технологическая себестоимость (Р) некоторых тестов, выполняемых в КДЛ ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России

Тест	Q за год, тестов	ТС, руб. в год	TFC, руб. в год	AVC, руб.	P, руб.
HbA _{1c}	2 545	1 231 527	720 204	200,91	483,90
АЛТ	19 458	241 140	20 169	11,35	12,39
АСТ	18 194	242 677	20 298	12,22	13,34
Креатинин	20 403	487 291	82 699	19,83	23,88
Общий белок	21 665	242 455	35 685	9,54	11,19
Общий билирубин	17 659	287 108	37 655	14,13	16,26
Прямой билирубин	2 279	56 409	24 213	14,13	24,75
Общий холестерин	15 699	298 405	38 432	16,56	19,01
Глюкоза	16 454	459 738	50 622	24,86	27,94
Общий ПСА	696	551 523	371 627	258,47	792,42
Свободный ПСА	531	451 148	316 636	253,32	849,62
ТТГ	6 996	1 071 000	167 448	129,15	153,09
T4 свободный	6 343	922 191	154 948	120,96	145,39

ветствий между плановыми и фактическими затратами, поиск путей их снижения.

На рис. 1 представлены результаты сравнения двух различных методов определения общего простатспецифического антигена: электрохемиллюминесцентного и иммуноферментного. Очевидно, что смоделированные нами графики изменения себестоимости в зависимости от объема исследований имеют нелинейный характер и повторяют ту же форму, которая была продемонстрирована для различных групп тестов в работе G. Barletta и соавт. [3], анализировавших суммарные фактические затраты лабораторных подразделений. Описанный ход графиков обусловлен изменением соотношения FC к объему выполняемых тестов. С наращиванием последнего, доля FC в себестоимости снижается, стремясь,

в конечном счете, к нулю, поэтому график в правой его части напоминает прямую линию. Таким образом, определяющим фактором становится величина AVC, наиболее значительным компонентом которой являются затраты на реагенты. При небольших объемах исследований себестоимость теста весьма вариабельна и существенно зависит от величины и структуры FC. В этих условиях максимально эффективное использование оборудования и оптимальный подбор референсных материалов может снизить ее в несколько раз.

Оборотной стороной расчета себестоимости теста является оценка точки безубыточности (4), как элемента планирования, например, для принятия обоснованного решения о передаче исследований на аутсорсинг [4]:

$$Q_{\text{ВЕР}} = \text{TFC} / (\text{P} - \text{AVC}) \quad [4], \quad (4)$$

где: $Q_{\text{ВЕР}}$ – точка безубыточности, выраженная в объёме выполнения тестов;

P – цена на выполнение исследования.

Поскольку связь между объемом тестирования и себестоимостью, как выше продемонстрировано, носит нелинейный характер, то величина точки безубыточности для произвольно заданной цены не может быть получена без адекватного разделения и расчета величин прямых затрат.

Пути экономии в КДЛ, так или иначе, сопряжены с относительным или абсолютным уменьшением FC. Это, соответственно, наращивание объемов исследований или уменьшение кратности постановок (а возможно, и передача на аутсорсинг). Масштаб и характер снижения себестоимости теста в зависимости от этих мер продемонстрированы на рис. 2, а, б.

Путь, связанный с увеличением объемов, более эффективен и предпочтителен. Но такая возможность, обычно подразумевающая централизацию исследования, есть не всегда. Второй путь возможен только когда речь идет не об urgentных исследованиях, поскольку он связан с увеличением ТАТ. К таким тестам, например, относится определение гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}). Это исследование стоит существенно дороже, чем большинство биохимических анализов и выполняется, обычно, в относительно небольших объемах. На представленной модели можно видеть, что с урежением постановок снижение себестоимости теста HbA_{1c} не на всех участках диаграммы носит линейный характер (рис. 2, а). Это связано с особенностями структуры FC. В методике используются уникальные калибраторы и контрольные материалы с малым объемом упаковки и коротким сроком годности после восстановления – 10 суток. За счет этого затраты на референсные материалы преобладают в общей структуре (табл. 5). В условиях уменьшения кратности постановок возникает ситуация, когда флакон контрольного материала не успевают израсходовать до истечения срока годности, что и приводит к замедлению снижения себестоимости при 2-3-х кратных постановках в неделю. То есть, определенный экономический эффект дает снижение кратности постановок только до 4 раз в неделю (ТАТ = 2 суткам). Особенно это заметно для объема менее 2500 тестов в год. Дальнейшее уменьшение кратности постановок не даст существенного снижения затрат, но задержит сроки получения результата заказчиком. Экономический выигрыш от однократной постановки нивелирован неприемлемым увеличением ТАТ, превышающим сроки госпитализации пациента. В этом случае следует рассматривать возможности аутсорсинга.

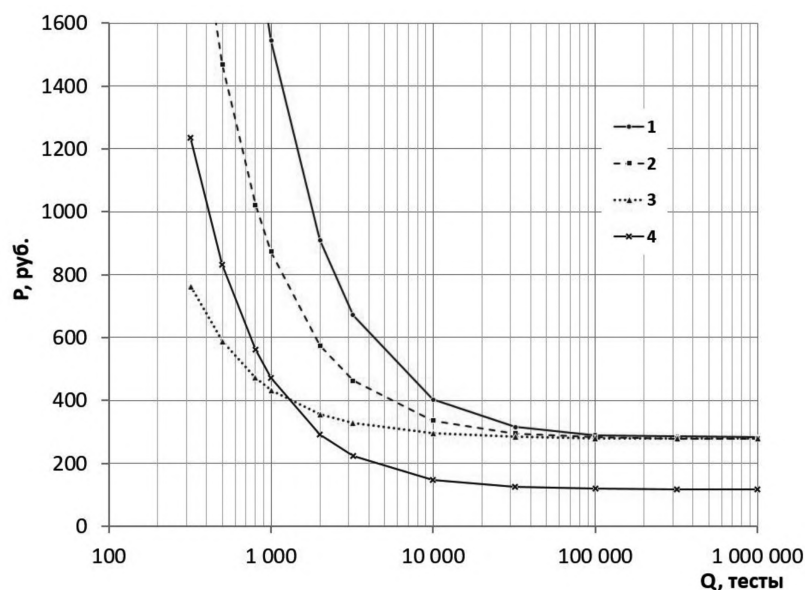


Рис. 1. Модель изменения себестоимости определения общего простатспецифического антигена различными методами в зависимости от объема исследований. Частота постановок – 5 дней в неделю, рабочая смена 7,2 часа. Графики 1-3 – электрохемиллюминесцентный метод: 1 – при использовании оборудования только для выполнения данного теста; 2 – при использовании оборудования только для данного теста в отсутствие затрат на амортизацию и ТО; 3 – при максимальной загрузке оборудования другими тестами, выполняемыми с использованием единого контрольного материала, 4 – иммуноферментный метод. Цены на расходные материалы и основные средства приняты на основании опыта некоторых фактических поставок в течение 2017 – 2019 гг.

В отличие от HbA_{1c} , в определении прямого билирубина применяются мультикалибратор и контрольные материалы, допускающие замораживание аликвот, а главное, используемые для многих других биохимических тестов. Суммарный объем последних превышает количество выполняемых исследований прямого билирубина на 2 порядка. В этих условиях данные компоненты FC распределяются на большое количество выполняемых тестов и не играют существенной роли в структуре себестоимости (табл. 5). Динамика снижения затрат на тест носит более пологий характер, а в зависимости от кратности постановок – линейный (рис. 2, б).

В ходе проведенного анализа структуры и баз распределения FC мы пришли к выводу, что они могут быть разделены на две группы, принципиально отличающиеся по своему поведению. Можно выделить FC, связанные с «поддержанием рабочего места», на котором выполняется большое число различных исследований. К подобной группе затрат следует отнести не только амортизацию и эксплуатацию оборудования, но и закупку мультиконтролей и программ ВОК, используемых одновременно для многих тестов, выполняемых внутри одного лабораторного подразделения, а также ряд трудозатрат. В этом случае в качестве базы распределения выступает суммарный

Таблица 5

Структура постоянных и переменных затрат в разрезе себестоимости выполнения тестов HbA_{1c} и прямого билирубина в условиях КДЛ НМИЦ кардиологии при кратности постановок 5 дней в неделю

Тест, объем выполнения в год	Себестоимость, руб.	FC*			VC		
		Реагенты	Референсные материалы	Оплата труда	Реагенты	Оплата труда	Преаналитика
HbA_{1c} , $Q=2545$	483,90	7,4 %	50,4 %	0,7 %	33,1 %	2,5 %	5,9 %
Прямой билирубин, $Q=2279$	24,75	35,3 %	4,4 %	3,2 %	41,7 %	4,4 %	11,0 %

Примечание. * – затраты, связанные с амортизацией оборудования в структуру не включены, поскольку данное оборудование в анализируемый период находилось в безвозмездном пользовании.

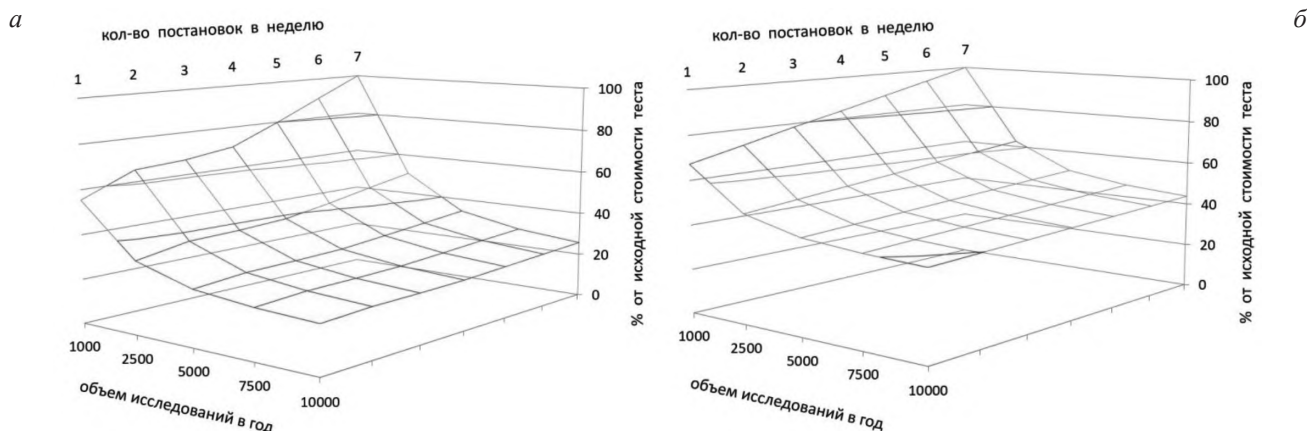


Рис. 2. Модель изменения себестоимости теста (в % от исходной) в зависимости от увеличения объемов и уменьшения частоты постановок, на примерах: а – исследования уровня гликозилированного гемоглобина иммунотурбидиметрическим методом (100 % – 1154 руб.); б – исследования концентрации прямого билирубина (100 % – 41,20 руб.).

объем всех проводимых анализов. При прекращении выполнения какого-либо теста время таких затрат сохраняется, перераспределяясь на прочие исследования, что ведет к некоторому их удорожанию.

Другой вид FC – затраты «на поддержание номенклатуры исследований». Они связаны только с определенным тестом (методикой). К таковым можно отнести затраты реагентов на выполнение процедур калибровки и контроля качества, закупку калибраторов, часть трудозатрат, связанную с перечисленными процессами и ежедневной подготовкой реагентики. Базой распределения здесь является объем выполнения данного теста. Если лаборатория исключит его из номенклатуры проводимых исследований, то данные затраты также исчезнут.

VC, обычно пропорциональны объему выполненных тестов данной методики, а в условиях отсутствия рутинных проб они равны нулю. Но для некоторых, компонентов, в частности, в области преаналитики и трудозатрат на работу с пробой биоматериала, должна учитываться доля теста в общем объеме анализов, выполняемых из проб данного типа (см. табл. 3). Такие затраты можно охарактеризовать, как переменные непропорциональные (прогрессивные) [5].

Экономическая эффективность лаборатории, в конечном счете, сопряжена с тем, чтобы маржинальная прибыль от всех реализованных услуг покрывала сумму всех FC [6]. В работе B.G. Su и соавт. [6] продемонстрировано, что некоторые необходимые лабораторные подразделения, находящиеся в составе КДЛ государственного стационара, убыточны, тогда как другие компенсируют это большей выручкой. Подобные обстоятельства могут быть связаны с несовершенством механизмов финансирования. В Российской Федерации в расчет стоимости лабораторных услуг, оказываемых по системе обязательного медицинского страхования¹, включены условия, не покрывающие все статьи расходов, а подходы к установлению тарифов носят расплывчатый характер. В коммерческой деятельности цена того или иного исследования может подчиняться задачам продвижения продукта на рынке. То есть, цена на отдельные тесты может быть установлена ниже себестоимости, из соображений целесообразности их выполнения на своей базе или в расчете на постепенный рост объемов. Однако цена на такую лабораторную услугу не может быть ниже величины VC, затраченных на ее производство. В противном случае, с увеличением объема тестирования будут неконтролируемо расти и экономические потери. Соответственно, та часть FC, которая будет исключена из структуры себестоимости данного теста, должна быть учтена при ценообразовании на другие лабораторные услуги.

Заключение. Подход к созданию таблиц технологической себестоимости лабораторных тестов, учитывающий разделение прямых затрат на переменные и постоянные, и структурирование их по компонентам и базам распределения, является эффективным инструментом менеджмента медицинской лаборатории. Учитывая

сложные, многомерные, взаимоотношения компонентов затрат, а также динамическое изменение объемов исследований, можно прогнозировать в будущем разработку интеллектуальных программных продуктов, основанных на предложенном подходе. Они позволят не только определять технологическую себестоимость услуг, но и представлять целостную экономическую модель лаборатории, оценивать перспективы ее развития.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Basic Cost Accounting for Clinical Services; Approved Guideline. NCCLS document GP 11-A. Wayne, PA: NCCLS; 1998.
2. Ованесян С.С. Универсальный метод оценки применимости различных баз при распределении постоянных затрат по видам выпускаемой продукции: математический аспект. *Известия Иркутской государственной экономической академии*. 2016; 26(3): 502–8. doi: 10.17150/1993-3541.2016.26(3):502-8.
3. Barletta G., Zaninotto M., Faggian D., Plebani M. Shop for quality or quantity? Volumes and costs in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51(2):295–301. doi: 10.1515/cclm-2012-0415.
4. Kim Y. Experience of a Break-Even Point Analysis for Make-or-Buy Decision. *Korean J. Lab. Med.* 2006;26: 460–4. doi: 10.3343/kjlm.2006.26.6.460.
5. Хот Ф.Т., Климентенко А.С. Анализ поведения затрат в управленческом учете. *Экономический анализ: теория и практика*. 2007; 3(84):39–47.
6. Su B.G., Chen S.F., Yeh S.H., Shih P.W., Lin C.C. Cost evaluation of clinical laboratory in Taiwan's National Health System by using activity-based costing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(11):1753–8. doi: 10.1515/cclm-2016-0193.

REFERENCES

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Basic Cost Accounting for Clinical Services; Approved Guideline. NCCLS document GP 11-A. Wayne, PA: NCCLS; 1998.
2. Ovanesyan S.S. Universal method for assessing the applicability of various bases in the allocation of fixed costs by types of products: the mathematical aspect. *Izvestiya Irkutskoy gosudarstvennoy ekonomicheskoy akademii*. 2016;26(3): 502–8. doi: 10.17150/1993-3541.2016.26(3):502-8. (in Russian)
3. Barletta G., Zaninotto M., Faggian D., Plebani M. Shop for quality or quantity? Volumes and costs in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51(2):295–301. doi: 10.1515/cclm-2012-0415.
4. Kim Y. Experience of a Break-Even Point Analysis for Make-or-Buy Decision. *Korean J. Lab. Med.* 2006;26: 460–4. doi: 10.3343/kjlm.2006.26.6.460.
5. Khot F.T., Klimentenko A.S. Analysis of costs behavior in management accounting. *Ekonomicheskij analiz: teoriya i praktika*. 2007; 3(84): 39–47. (in Russian)
6. Su B.G., Chen S.F., Yeh S.H., Shih P.W., Lin C.C. Cost evaluation of clinical laboratory in Taiwan's National Health System by using activity-based costing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(11):1753–8. doi: 10.1515/cclm-2016-0193.

Поступила 10.12.20

Принята к печати 17.12.20

¹ Приказ Минздрава РФ от 28.02.19 г. № 108н «Об утверждении Правил обязательного медицинского страхования» (с изменениями и дополнениями). <https://base.garant.ru/72243038/>.