

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
5 • 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

МАЙ

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 10.05.2021.
Подписано в печать 25.05.2021. Формат
60 × 88½.
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. № 5. 257–320.

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

5 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MAY

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. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*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

Цанава И.А., Булгакова С.В., Меликова А.В.
Синдром гипотиреоза: роль трийодтиронина в диагностике и комбинированной терапии (обзор литературы) 261

Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Боташева Т.Л., Каушанская Л.В.
Нарушение баланса свободных металлов и металлосодержащих белков в околоплодных водах при плацентарной недостаточности. 266

ГЕМАТОЛОГИЯ

Кишкун А.А., Синяк М.Ю.
Стандартизация методов определения СОЭ 271

ИММУНОЛОГИЯ

Сустицын Е.Н., Раупов Р.К., Кучинская Е.М., Костик М.М.
Анализ профиля экспрессии интерферонзависимых генов для дифференциальной диагностики заболеваний иммунной системы (обзор литературы). 279

Шершневая Н.Н., Марданлы С.С., Кленяев И.Н., Самосадова П.В.
Разработка иммунофлюоресцентных диагностикумов для выявления антител к герпесвирусам 1и 2 типов 285

Лапштанова А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н.
Лабораторные предикторы наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения. 291

Генинг С.О., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Ризванов А.А., Генинг Т.П., Гуфурбаева Д.У.
Стволово-подобные опухолевые клетки и провоспалительные цитокины в асцитической жидкости пациенток с раком яичников. 297

МИКРОБИОЛОГИЯ

Тапальский Д.В., Тимошкова Е.В., Петровская Т.А., Осипкина О.В., Карпов И.А.
Микробиологическая эффективность комбинаций из двух карбапенемов в отношении антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. 304

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Акайзин Э. С., Акайзина А. Э.
Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике инфицированного панкреонекроза, осложнённого флегмонами забрюшинной клетчатки. 310

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Курочкин Д.В., Маслокова И.Е., Субботина Т.Н., Хазилова А.С., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Дунаева Е.А., Миронов К.О.
Скрининг соматических мутаций в генах JAK2 и CALR методом анализа кривых плавления с высоким разрешением 315

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Tsanava I.A., Bulgakova S.V., Melikova A.V.*
Hypothyroidism syndrome: role of triiodothyronine in diagnostics and combination therapy (review of literature) 261
- Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Botasheva T.L., Kaushanskaya L.V.*
Violation of the balance of free metals and metal-containing proteins in
amniotic fluid in placental insufficiency 266

HEMATOLOGY

- Kishkun A.A., Siniak M.Yu.*
Standardization of methods for determining ESR 271

IMMUNOLOGY

- Suspitsin E.N., Raupov R.K., Kuchinskaya E.M., Kostik M.M.*
Analysis of interferon type I signature for differential diagnosis of diseases of the immune system (review of literature) 279
- Shershneva N.N., Mardanly S.S., Klenyaev I.N., Samosadova P.V.*
Development of immunofluorescent diagnostics for the determination of IgM and IgG antibodies to herpes
simplex virus types 1 and 2. 285
- Lapshtaeva A.V., Sychev I.V., Goncharova L.N.*
Laboratory predictors of pregnancy in vitro fertilization 291
- Gening S.O., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Rizvanov A.A.,
Gening T.P., Gafurbaeva D.U.*
Stem-like tumor cells and proinflammatory cytokines in the ascitic fluid of ovarian cancer patients. 297

MICROBIOLOGY

- Tapalski D.V., Timoshkova E.V., Petrovskaya T.A., Osipkina O.V., Karpov I.A.*
Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. 304

GENERAL CLINICAL METHODS

- Akayzin E.S., Akayzina A.E.*
Indicators of volatile fatty acids for differential diagnostics of infected of pancreatic necrosis complicated
by retroperitoneal phlegmon. 310

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Kurochkin D.V., Maslyukova I.E., Subbotina T.N., Khazieva A.S., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A.,
Dunaeva E.A., Mironov K.O.*
Screening of somatic mutations in the JAK2 and CALR genes by high-resolution melting curve analysis 315

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Цанова И. А.¹, Булгакова С. В.², Меликова А. В.¹

СИНДРОМ ГИПОТИРЕОЗА: РОЛЬ ТРИЙОДТИРОНИНА В ДИАГНОСТИКЕ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ООО «Клиника Пяти Благ», 443110, Самара, Россия;

²ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Синдром гипотиреоза является одной из самых часто встречающихся патологий эндокринной системы. Оценка эутиреоидного статуса далеко не всегда может быть проведена по показателю ТТГ. У ряда пациентов с нормальными уровнями ТТГ и клинической картиной гипотиреоза концентрация T_3 в сыворотке крови определяется на нижней границе нормы или ниже неё при высоком содержании свободного T_4 в крови. В мировой практике накоплен положительный опыт совместного применения препаратов левотироксина натрия и лиотиронина – синтетической формы экзогенного трийодтиронина. В ряде исследований отмечаются преимущества применения комбинированной терапии гипотиреоза над монотерапией левотироксином у определённых групп пациентов. Описаны возможные причины неэффективности стандартного лечения гипотиреоза.

Ключевые слова: гипотиреоз; комбинированная терапия гипотиреоза; левотироксин; лиотиронин; тироксин; трийодтиронин; обзор.

Для цитирования: Цанова И.А., Булгакова С.В., Меликова А.В. Синдром гипотиреоза: роль трийодтиронина в диагностике и комбинированной терапии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (5): 261-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-261-265>

Tsanava I.A.¹, Bulgakova S.V.², Melikova A.V.¹

HYPOTHYROIDISM SYNDROME: ROLE OF TRIODTHYRONINE IN DIAGNOSTICS AND COMBINATION THERAPY (REVIEW OF LITERATURE)

¹«Klinika P'yati Blag», Samara, Russia;

²Samara State Medical University, Samara, Russia

Hypothyroidism syndrome is one of the most common pathologies of the endocrine system. Assessment of euthyroid status can not always be carried out according to the TSH indicator. In a number of patients with normal TSH levels and a clinical picture of hypothyroidism, the serum T_3 concentration is determined at the lower limit of the norm or below it with a high content of free T_4 in the blood. In world practice, positive experience has been accumulated in the combined use of preparations of sodium levothyroxine and liothyronine, a synthetic form of exogenous triiodothyronine. A number of studies have noted the advantages of using combination therapy for hypothyroidism over levothyroxine monotherapy in certain groups of patients. Possible reasons for the ineffectiveness of standard treatment for hypothyroidism are described.

Key words: hypothyroidism; combination therapy for hypothyroidism; levothyroxine; liothyronine; thyroxine; triiodothyronine; overview.

For citation: Tsanava I.A., Bulgakova S.V., Melikova A.V. Hypothyroidism syndrome: role of triiodothyronine in diagnostics and combination therapy (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (5): 261-265 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-261-265>

For correspondence: Tsanava I.A., PhD (Medicine); e-mail: ira.tsanava@gmail.com

Information about authors:

Tsanava I.A., <http://orcid.org/0000-0002-2891-3050>;

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>;

Melikova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4600-1610>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 27.08.2020
Accepted 03.09.2020

Синдром гипотиреоза является едва ли не самой часто встречающейся патологией эндокринной системы. По европейским оценкам, его распространённость достигает 5% населения [1-3], при этом ещё до 5% людей может иметь недиагностированную недо-

статочность гормонов щитовидной железы [2]. Гипотиреоз характеризуется дефицитом тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). При манифестном первичном гипотиреозе отмечается повышение концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) гипофиза. Основным

Для корреспонденции: Цанова Ирина Амирановна, канд. мед. наук, врач-эндокринолог; e-mail: ira.tsanava@gmail.com

синтезируемым гормоном щитовидной железы является T_4 . Выработка T_3 непосредственно щитовидной железой составляет не более 20%. Продукция основной части T_3 (более 80%) происходит в результате ферментативного превращения T_4 в T_3 в тканях-мишенях [4]. Референсные значения тиреоидных гормонов являются предметом постоянных дискуссий и могут различаться в зависимости от возраста, пола, этнического происхождения человека, зависимости от используемого метода анализа [5]. У отдельных индивидуумов есть собственный диапазон нормальных значений ТТГ, T_4 и T_3 , который может иметь отклонения до 25% от референсного диапазона, общепринятого для всей популяции [6].

Заместительная терапия левотироксином натрия ($L-T_4$), экзогенной формой T_4 , является «золотым стандартом» лечения первичного гипотиреоза уже более 60 лет [7]. Со второго десятилетия XX века для терапии гипотиреоза использовались препараты экстракта щитовидной железы мелкого рогатого скота. Синтетические препараты левотироксина стали доступны для использования в 1950-х годах, однако до 1970-х годов препараты высушенной щитовидной железы оставались основной терапией гипотиреоза. Несмотря на переход к монотерапии левотироксином в 1970-е годы [8], в некоторых клинических руководствах отмечается необходимость применения комбинации левотироксина и лиотиронина ($L-T_3$) – синтетической формы гормона T_3 [9-11]. Это связано с тем, что более трети пациентов, несмотря на проводимую терапию левотироксином остаются недостаточно компенсированными, имея повышенные уровни ТТГ в крови и/или постоянные симптомы гипотиреоза [9,12]. Даже когда уровни ТТГ и свободного T_4 соответствуют референсным показателям на фоне применения левотироксина, до 20% пациентов продолжают испытывать постоянные симптомы гипотиреоза [12]. Выделяют несколько причин данного феномена, включая различия в индивидуальных контрольных значениях, наличие других аутоиммунных заболеваний, помимо аутоиммунного тиреоидита, и нарушение конверсии T_4 в T_3 с низким соотношением T_3/T_4 при монотерапии левотироксином. Поскольку подавляющее большинство пациентов с гипотиреозом получают монотерапию $L-T_4$, уровень трийодтиронина в их сыворотке крови полностью зависит от экстратиреоидной продукции T_3 . Пациенты, получающие монотерапию $L-T_4$, обычно имеют более высокие соотношения T_4/T_3 , чем лица с эутиреозом. У некоторых пациентов с нормальными уровнями ТТГ концентрация T_3 в сыворотке крови определяется на нижней границе нормы или ниже её, при высоком содержании свободного T_4 в крови. Исходя из вышесказанного, представляется возможным назначение комбинации $L-T_4$ и $L-T_3$ с целью улучшения качества жизни пациентов.

В 2012 г. Европейская тиреологическая ассоциация (European Thyroid Association – ETA) опубликовала первые рекомендации по комбинированной терапии $L-T_4$ и $L-T_3$ при гипотиреозе [11]. ETA сообщает, что у 5-10% пациентов с гипотиреозом, получавших монотерапию левотироксином при нор-

мальных значениях ТТГ в сыворотке крови, зачастую наблюдаются стойкие симптомы снижения уровня гормонов щитовидной железы, а именно: нарушения общего самочувствия, эмоциональная лабильность и когнитивные расстройства [11]. Это утверждение основано на трёх популяционных исследованиях в Великобритании (2002), Нидерландах (2005), Норвегии (2009) [13-15]. В обзорных исследованиях указывается, что до трети пациентов с гипотиреозом не получают адекватного лечения [9,12]. В 2017 г. Американской тиреологической ассоциацией (American Thyroid Association – ATA) проведён онлайн-опрос пациентов с гипотиреозом [16]. Среди респондентов без выраженных клинических симптомов гипотиреоза (3670 опрошенных), удовлетворенность по шкале от 1 до 10 на фоне лечения левотироксином составила 5 (межквартильный размах – IQR 3-7), на фоне же применения комбинации левотироксин и лиотиронин этот индекс выше (удовлетворенность по шкале от 1 до 10-6, IQR 3-8). У пациентов, принимающих натуральный экстракт высушенной ткани щитовидной железы, количество баллов самое высокое – 7 по шкале от 1 до 10 (IQR 5-9) ($p < 0,0001$). Среди тех, кто имел клинические проявления гипотиреоза несмотря на проводимую терапию (около 22% респондентов, принимающих $L-T_4$ или $L-T_4$ и $L-T_3$, и 14% – натуральный экстракт щитовидной железы) преобладали жалобы на усталость или снижение сил (77%), набор массы тела (69%), снижение памяти и другие когнитивные нарушения (58%), гипотимию (45%).

В проводимых ранее исследованиях в рамках программы NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey – Национальная программа проверки здоровья и питания) в США показано, что у пациентов с нормальной концентрацией ТТГ в сыворотке крови на фоне применения $L-T_4$ отмечаются более высокие уровни общего и свободного T_4 и более низкие концентрации общего и свободного T_3 в сравнении с аналогичными показателями лиц группы контроля без гипотиреоза [17]. Снижение уровня свободного T_3 наблюдается примерно у 15% пациентов с гипотиреозом на фоне монотерапии $L-T_4$ [16]. Возникает вопрос: могут ли низкие уровни T_3 в сыворотке крови быть связаны с постоянными жалобами у пациентов, принимающих левотироксин? Вероятно, да. Ниже приведём подтверждающие этот факт данные.

Механизм, ответственный за низкий уровень T_3 в сыворотке крови на фоне монотерапии $L-T_4$, связан с йодтирониндейодиназой 2-го типа (D2). Этот фермент катализирует дейодирование T_4 до T_3 в экстратиреоидных тканях. D2 имеет короткий период полураспада (около 60 мин), который становится ещё короче (до 20 мин) при взаимодействии с T_4 , что ведёт к убиквитинированию D2 и протеолитической деградации [18]. D2 в гипоталамусе, в отличие от других тканей, довольно стабилен и менее чувствителен к убиквитинации [19]. В то время как в других тканях D2-опосредованная продукция T_3 прогрессивно снижается с увеличением дозы $L-T_4$ из-за убиквитинирования D2, выработка T_3 в гипоталамусе и гипофизе остаётся на прежнем уровне, и доза $L-T_4$, необходимая для нормализации сывороточного ТТГ ниже, чем доза, которая приводит к нор-

мализации уровня T_3 . Из этого следует, что для достижения нормальной концентрации T_3 в сыворотке крови необходим приём относительно высокой дозы $L-T_4$, которая может подавлять уровень ТТГ.

Оценка эутиреоидного статуса далеко не всегда может быть проведена по показателю ТТГ. Оценивались биохимические маркёры функции щитовидной железы до тотальной тиреоидэктомии и через 1 год после операции на фоне супрессивной терапии $L-T_4$ [20]. Пациенты были разделены на три группы по уровню ТТГ (1 группа – $ТТГ \leq 0,03$ мЕ/л, 2 группа – ТТГ от 0,03 до 0,3 мЕ/л, 3 группа – ТТГ от 0,3 до 5,0 мЕ/л). Помимо тиреоидного статуса оценивались значения уровней ЛПНП, ГСПГ и щелочной фосфатазы. Полученные данные продемонстрировали, что у пациентов с послеоперационным уровнем $ТТГ \leq 0,03$ мЕ/л, были самые высокие показатели ГСПГ и щелочной фосфатазы и самый низкий уровень ЛПНП, в то время как пациенты с ТТГ от 0,3 до 5,0 мЕ/л имели самые низкие значения ГСПГ и щелочной фосфатазы и самый высокий уровень ЛПНП, что подтверждает у них наличие тканевого гипотиреоза, несмотря на относительно невысокий уровень ТТГ. Результаты проведённой ранее работы подтверждают, что назначение $L-T_4$ в дозах, снижающих сывороточный ТТГ до референсных значений, не приводит к нормализации системных маркёров передачи сигналов тиреоидных гормонов, включая общий холестерин и холестерин ЛПНП [21]. Нормальный уровень ТТГ не является гарантией эутиреоидного состояния во всех тканях-мишенях [17, 21]. Можно сделать вывод, что терапия $L-T_4$ не всегда позволяет достичь эутиреоза одновременно во всех тканях-мишенях. Такое заключение сделали ранее Н.Ф. Escobar-Mogreale и соавт. [22] в своих известных экспериментах по заместительной гормональной терапии на крысах с гипотиреозом: только комбинация $L-T_4$ и $L-T_3$ может обеспечить одновременный эутиреоз во всех тканях. Введение только $L-T_4$ крысам с тиреоидэктомией в различных дозах не приводило к нормальным концентрациям T_4 и T_3 одновременно во всех тканях, что может быть принято за один из критериев эутиреоза [22]. Доза $L-T_4$, необходимая для нормализации концентрации гормонов щитовидной железы, вариабельна для каждой ткани, приходится достигать супрафизиологических концентраций T_4 , чтобы нормализовать концентрации T_3 . Только комбинированное лечение $L-T_4$ и $L-T_3$ ведёт к нормальным концентрациям T_4 и T_3 в плазме и всех тканях, к нормальному сывороточному ТТГ и активности йодтирониндейодиназ 1-го типа (D1) и 2-го типа (D2) [23]. Добавление небольших доз $L-T_3$ уменьшает количество $L-T_4$, необходимое для нормализации T_3 в большинстве тканей примерно на 50% по сравнению с дозами $L-T_4$ на монотерапии.

Одна из причин сохранения симптомов гипотиреоза у части пациентов на монотерапии левотироксином может быть связана с генетическими факторами. Выдвинуто предположение, что в данном случае имеет значение однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) гена, кодирующего D2, а именно *Thr92Ala*. Полиморфизм *Thr92Ala* ассоциировался со снижением психологического благополучия на терапии $L-T_4$

и усилением ответа на комбинированную терапию $L-T_4$ и $L-T_3$ [24]. Ряд исследований демонстрируют снижение активности D2 при наличии полиморфизма *Thr92Ala* [25]. Показано, что снижение уровней FT_3 после тиреоидэктомии более значительный у носителей *Thr92Ala*, чем у лиц без данного ОНП. В других работах такая связь не наблюдалась [26, 27]. В большом популяционном когортном исследовании не выявлено различий между уровнями ТТГ, свободного T_4 , свободного T_3 , соотношения T_3/T_4 в группах лиц с генотипом *Thr92Ala* и без него [26]. Вероятно, это расхождение в результатах можно объяснить тем, что большинство крупных исследований включало популяционные когорты, в которые входили лица с эутиреозом. Клинические эффекты варианта 92Ala могли быть замаскированы собственной выработкой T_3 щитовидной железой. Предполагается, что эффекты *Thr92Ala* проявляются только у пациентов с атиреозом, получающих монотерапию $L-T_4$ [28].

В исследовании голландских авторов сообщается, что генотип Ala/Ala этого полиморфизма D2 присутствует у 11,3% пациентов на терапии T_4 и у 10,7% населения в целом. В обеих группах ОНП не связан ни с различиями в сывороточных уровнях ТТГ, свободных T_4 и FT_3 или T_3/T_4 , ни с качеством жизни [29].

В ходе датского рандомизированного контролируемого испытания (РКИ) обнаружена связь двух ОНП (*Thr92Ala DIO2* и *rs17606253 MCT10*-монокарбоксилатный транспортер 10) с предпочитаемым пациентами лечением. При отсутствии обоих ОНП предпочтение терапии $L-T_4$ и $L-T_3$ отдавали 42% пациентов, при наличии одного из ОНП – 63% и при наличии обоих ОНП – 100% [30].

В метаанализе одиннадцати РКИ 2006 г., в котором сравнивали монотерапию $L-T_4$ с комбинированной терапией $L-T_4$ и $L-T_3$, не выявлено различий между показателями исходов (качество жизни, когнитивные способности, настроение или наличие симптомов гипотиреоза) [11]. Частота возникновения неблагоприятных событий значимо не различалась на фоне лечения обоими вариантами. РКИ последних лет не продемонстрировали преимуществ использования той или иной терапии [31]. Большинство РКИ могут быть подвергнуты критике по ряду вопросов. Например, предвзятость выбора из-за включения гетерогенных групп пациентов по этиологии и прогнозу, искажение истинного эффекта низкой долей пациентов, имеющих клинические симптомы, небольшой размер выборки, некорректные цели ТТГ, наличие пациентов с нарушением конверсии T_4 в T_3 по ряду причин [32]. В семи из одиннадцати РКИ пациентов опрашивали относительно их предпочтения проводимому лечению: 48% предпочли терапию $L-T_4$ и $L-T_3$, 25% – монотерапию T_4 , 27% не имели предпочтения [11, 33]. Пациенты, рандомизированные для лечения $L-T_4$ и $L-T_3$, теряли около 0,5-1,5 кг массы тела, в то время как пациенты, получавшие только $L-T_4$, увеличивали вес на 0,1-0,5 кг.

В рекомендациях ETA 2012 г. указывается, что «комбинированную терапию $L-T_4$ и $L-T_3$ можно рассматривать как экспериментальный подход у пациентов с гипотиреозом на монотерапии $L-T_4$, у которых

сохраняются постоянные жалобы, несмотря на значения сывороточного ТТГ в контрольном диапазоне, при условии, что ранее они соблюдали режим рекомендованной терапии, и у них исключены аутоиммунные заболевания. Комбинированная терапия L-T₄ + L-T₃ не рекомендуется беременным женщинам и пациентам с нарушениями сердечного ритма. Эти рекомендации приняты итальянской и британской ассоциациями щитовидной железы, тогда как АТА занимает более нейтральную позицию [34]. Комбинированную терапию необходимо прекращать, если улучшение не наблюдается в течение трёх месяцев. Всё ещё существует озабоченность относительно долгосрочной безопасности комбинированной терапии L-T₄ и L-T₃. Результаты 17-летнего обсервационного популяционного исследования в Шотландии по применению литирина обнадёживают. По сравнению с пациентами, принимающими только L-T₄, у пациентов на фоне применения L-T₃ (с или без L-T₄) после поправки на возраст не было повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний, учащения эпизодов мерцательной аритмии, переломов [35]. В исследовании S.Kanjji и соавт. [36] ретроспективно оценивались показатели 70 пациентов с синдромом эутиреоидной патологии, находящихся в отделении интенсивной терапии в критическом состоянии и получавших трийодтиронин. На фоне проводимого лечения, у пациентов отмечалась нормализация уровня T₃ в сыворотке крови при отсутствии нежелательных реакций со стороны сердечно-сосудистой системы. Данные работы A. Ringitore и соавт. [37] демонстрируют не только безопасность применения L-T₃ у пациентов с острым инфарктом миокарда, но и улучшение функции сердца по данным эхокардиографического исследования и МРТ при сравнении с показателями пациентов, получавших стандартное лечение.

Современной тиреологии предстоит проследить ещё множество механизмов действия тех или иных вариантов лечения. Учитывая наличие большого числа пациентов, не удовлетворённых монотерапией левотироксином, очевидно, что в ряде случаев необходимо использование альтернативных режимов терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Asvold B.O., Vatten L.J., Bjoro T. Changes in the prevalence of hypothyroidism: the HUNT Study in Norway. *Eur. J. Endocrinol.* 2013; 169: 613–20.
2. Garmendia Madariaga A., Santos Palacios S., Guillen-Grima F., Galofre J.C. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99: 923–31.
3. Knudsen N., Bulow I., Jorgensen T., Lauberg P., Ovesen L., Perrild H. Comparative study of thyroid function and types of thyroid dysfunction in two areas in Denmark with slightly different iodine status. *Eur. J. Endocrinol.* 2000; 143: 485–91.
4. Abdalla S.M., Bianco A.C. Defending plasma T3 is a biological priority. *Clin. Endocrinol.* 2014; 81: 633–41.
5. Chaker L., Bianco A.C., Jonklaas J., Peeters R.P. Hypothyroidism. *Lancet.* 2017; 390: 1550–62.
6. Andersen S., Pedersen K.M., Bruun N.H., Laurberg P. Narrow individual variations in serum T(4) and T(3) in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2002; 87: 1068–72.
7. Elmor R., Sandulli W., Carter C.A. The economic impact of changing levothyroxine formulations in difficult-to-treat hypothyroid patients: an evidence-based model. *Pharmacoeconomics.* 2017; 2: 1–10.
8. Hennessey J.V. The emergence of levothyroxine as a treatment for hypothyroidism. *Endocrine.* 2017; 55: 6–18.
9. Kraut E., Farahani P. A systematic review of clinical practice guidelines' recommendations on levothyroxine therapy alone versus combination therapy (LT4 plus LT3) for hypothyroidism. *Clin. Invest. Med.* 2015; 38: E305–13.
10. Perros P. European Thyroid Association guidelines on L-T4+L-T3 combination for hypothyroidism: a weary step in the right direction. *Eur. Thyroid J.* 2012; 1: 51–4.
11. Wiersinga W.M., Duntas L., Fadeyev V., Nygaard B., Vanderpump M.P. 2012 ETA guidelines: the use of L-T4+L-T3 in the treatment of hypothyroidism. *Eur. Thyroid J.* 2012; 1: 55–71.
12. Dew R., Okosieme O., Dayan C., Eligar V., Khan I., Razvi S. et al. Clinical, behavioural and pharmacogenomic factors influencing the response to levothyroxine therapy in patients with primary hypothyroidism-protocol for a systematic review. *Syst. Rev.* 2017; 6: 60–71.
13. Saravanan P., Chau W.F., Roberts N., Vedhara K., Greenwood R., Dayan C.M. Psychological well-being in patients on 'adequate' doses of L-thyroxine: results of a large, controlled community-based questionnaire study. *Clin. Endocrinol.* 2002; 57: 577–85.
14. Wekking E.M., Appelhof B.C., Fliers E., Schene A.H., Huyser T., Tijssen J.G.P. et al. Cognitive functioning and well-being in euthyroid patients on thyroxine replacement therapy for primary hypothyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* 2005; 153: 747–53.
15. Panicker V., Evans J., Bjoro T., Asvold B.O., Dayan C.M., Bjerkeset O. A paradoxical difference in relationship between anxiety, depression and thyroid function in subjects on and not on T4: findings from the HUNT study. *Clin. Endocrinol.* 2009; 71: 574–80.
16. Peterson S.J., Cappola A.R., Castro M.R., Dayan C.M., Farwell A.P., Hennessey J.V. et al. An online survey of hypothyroid patients demonstrates prominent dissatisfaction. *Thyroid.* 2018; 28: 707–21.
17. Peterson S.J., McAninch E.A., Bianco A.C. Is a normal TSH synonymous with "euthyroidism" in levothyroxine monotherapy? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016; 101: 4694–973.
18. Gereben B., McAninch E.A., Ribeiro M.O., Bianco A.C. Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; 11: 642–52.
19. Werneck de Castro J.P., Fonseca T.L., Ueta C.B., McAninch E.A., Abdalla S., Wittmann G. et al. Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. *J. Clin. Investig.* 2015; 125: 769–81.
20. Ito M., Miyauchi A., Hisakado M., Yoshioka W., Ide A., Kudo T. et al. Biochemical markers reflecting thyroid function in athyreotic patients on levothyroxine monotherapy. *Thyroid.* 2017; 27: 484–90.
21. Hoermann R., Midgley J.E., Larisch R., Dietrich J.W. Is pituitary TSH an adequate measure of thyroid hormone-controlled homeostasis during thyroxine treatment? *Eur. J. Endocrinol.* 2013; 168: 271–80.
22. Escobar-Morreale H.F., Obregon M.J., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *Endocrinology.* 1995; 28: 2828–38.
23. Escobar-Morreale H.F., Escobar del Rey F., Obregon M.J., Morreale de Escobar G. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomised rat. *Endocrinology.* 1996; 137: 2490–502.
24. Panicker V., Saravanan P., Vaidya B., Evans J., Hattersley A.T., Frayling T.M., Dayan C.M. Common variation in the DIO2 gene

- predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 1623–29.
25. Castagna M.G., Dentice M., Cantara S., Ambrosio R., Maino F., Porcelli T. et al. DIO2 Thr92Ala reduces deiodinase-2 activity and serum-T3 levels in thyroid-deficient patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017; 102: 1623–30.
 26. Wouters H.J., van Loon H.C., van der Klauw M.M., Elderson M.F., Slagter S.N., Kobold A.M. et al. No effect of the Thr92Ala polymorphism of deiodinase-2 on thyroid hormone parameters, health-related quality of life, and cognitive functioning in a large population-based cohort study. *Thyroid.* 2017; 27(2): 147–55.
 27. Appelhof B.C., Peeters R.P., Wiersinga W.M., Visser T.J., Wekking E.M., Huyser J. et al. Polymorphisms in type 2 deiodinase are not associated with well-being, neurocognitive functioning, and preference for combined thyroxine/3,5,3'-triiodothyronine therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(11): 6296–9.
 28. Gullo D., Latina A., Frasca F., LeMoli R., Pellegritti G., Vigneri R. et al. Levothyroxine monotherapy cannot guarantee euthyroidism in all athyreotic patients. *PLoS ONE* 6. 2011; e22552.
 29. Medici M., Chaker L., Peeters R.P. A step forward in understanding the relevance of genetic variation in type 2 deiodinase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017; 102: 1775–8.
 30. Carlé A., Faber J., Steffensen R., Laurberg P., Nygaard B. Hypothyroid patients encoding combined MCT10 and DIO2 gene polymorphisms may prefer L-T3+L-T4 combination treatment – data using a blind, randomized clinical study. *Eur. Thyroid J.* 2017; 6: 143–51.
 31. Kaminski J., Miasaki F.Y., Paz-Filho G., Graf H., de Carvalho G.A. Treatment of hypothyroidism with levothyroxine plus liothyronine: a randomized, double-blind, crossover study. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2016; 60: 562–72.
 32. Hoermann R., Midgley J.E.M., Larisch R., Dietrich J.W. Lessons from randomised clinical trials for triiodothyronine treatment of hypothyroidism: have they achieved their objectives? *J. Thyroid Res.* 2018: 1-9.
 33. Kaminski J., Miasaki F.Y., Paz-Filho G., Graf H., de Carvalho G.A. Treatment of hypothyroidism with levothyroxine plus liothyronine: a randomized, double-blind, crossover study. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2016; 60: 562–72.
 34. Hennessey J.V., Espaillet R. Current evidence for the treatment of hypothyroidism with levothyroxine/levotriiodothyronine combination therapy versus levothyroxine monotherapy. *Int. J. Clin. Pract.* 2018; 72: e13062.
 35. Leese G.P., Soto-Pedre E., Donnelly L.A. Liothyronine use in a 17 year observational population-based study – the TEARS study. *Clin. Endocrinol.* 2016; 85: 918–25.
 36. Kanji S., Neilipovitz J., Neilipovitz B., Kim J., Haddara W.M.R., Pittman M. et al. Triiodothyronine replacement in critically ill adults with non-thyroidal illness syndrome. *Can. J. Anaesth.* 2018; 65(10): 1147-53.
 37. Pingitore A., Mastorci F., Piaggi P., Donato Aquaro G., Molinaro S., Ravani M. et al. Usefulness of Triiodothyronine Replacement Therapy in Patients With ST Elevation Myocardial Infarction and Borderline/Reduced Triiodothyronine Levels (from the THIRST Study). *Am. J. Cardiol.* 2019; 123(6): 905-12.

Поступила 27.08.20

Принята к печати 03.09.20

Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Боташева Т.Л., Каушанская Л.В.

НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА СВОБОДНЫХ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ В ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ ПРИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344012, Ростов-на-Дону, Россия

Изучено содержание ионов металлов и белков, содержащих или связывающих эти металлы, в околоплодных водах в разные периоды физиологической беременности и плацентарной недостаточности (ПН). С помощью спектрофотометрических методов, методов имунотурбометрического и имуноферментного анализа оценивали содержание ионов цинка, меди, магния, железа, цинк- α -2-гликопротеина, ферритина, церулоплазмينا и активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы. Установлено, что при ПН в обоих триместрах имеет место снижение содержания цинка, меди, железа и повышение уровня меди. Показатели церулоплазмينا, ферритина, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы при ПН ниже, а цинк- α -2-гликопротеина выше, чем в аналогичные сроки физиологической гестации. Тесная корреляционная связь разной направленности установлена между уровнем металлов и соответствующих белков. Выявленные нарушения, очевидно, играют определенную патогенетическую роль в развитии ПН, а показатели соотношения между металлами могут служить маркерами прогнозирования состояния новорожденных.

Ключевые слова: металлы; металлсодержащие белки; околоплодные воды; плацентарная недостаточность.

Для цитирования: Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Боташева Т.Л., Каушанская Л.В. Нарушение баланса свободных металлов и металлсодержащих белков в околоплодных водах при плацентарной недостаточности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (5): 266-270. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-266-270>

Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Botasheva T.L., Kaushanskaya L.V.

VIOLATION OF THE BALANCE OF FREE METALS AND METAL-CONTAINING PROTEINS IN AMNIOTIC FLUID IN PLACENTAL INSUFFICIENCY

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

The content of metal ions and proteins containing or binding these metals in amniotic fluid during different periods of physiological pregnancy and placental insufficiency (PI) was studied. The content of zinc, copper, magnesium, iron, zinc- α -2-glycoprotein, ferritin, ceruloplasmin and the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase were estimated using spectrophotometric methods, immunoturbometric and enzyme immunoassay methods. It was found that in PI in both trimesters there is a decrease in the content of zinc, copper, iron and an increase in the level of copper. The indices of ceruloplasmin, ferritin, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in PI are lower, and zinc- α -2-glycoprotein is higher than in similar periods of physiological gestation. A close correlation of different directions has been established between the level of metals and the corresponding proteins. The revealed violations obviously play a certain pathogenetic role in the development of PI, and the indicators of the ratio between metals can serve as markers for predicting the state of newborns.

Key words: metals; metal-containing proteins; amniotic fluid; placental insufficiency.

For citation: Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Botasheva T.L., Kaushanskaya L.V. Violation of the balance of free metals and metal-containing proteins in amniotic fluid in placental insufficiency. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 266-270 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-266-270>

For correspondence: Pogorelova Tatyana Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of Department of Biomedical Problems in Obstetrics, Gynecology and Pediatrics; e-mail: tnp.miiap@yandex.ru

Information about authors:

Pogorelova T.N.: <https://orcid.org/0000-0002-0400-0652>;
Gunko V.O.: <https://orcid.org/0000-0001-8607-9052>;
Nikashina A.A.: <https://orcid.org/0000-0001-8099-9093>;
Mikhelson A.A.: <https://orcid.org/0000-0002-8282-2248>;
Botasheva T.L.: <https://orcid.org/0000-0001-5136-1752>;
Kaushanskaya L.V.: <https://orcid.org/0000-0001-8574-6394>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.12.2020
Accepted 07.04.2021

Введение. Полноценность репродуктивных процессов во многом зависит от снабжения организма женщины жизненно важными микроэлементами, значительная часть которых находится в состоя-

нии, связанном белками, в том числе с ферментами [1, 2]. Особую роль металлсодержащие белки, как и свободные ионы металлов, играют в период гестации в связи с необходимостью обеспечения не-

только потребностей материнского организма, но и плода. К наиболее значимым микроэлементам относятся металлы: цинк, медь, магний, а также железо [3].

Цинк является незаменимым микроэлементом для нормального роста и развития, он участвует в регуляции экспрессии генов, процессов дифференцировки и пролиферации клеток [4,5]. Известно, что цинксодержащие белки принимают участие во всех видах обмена веществ, включая обмен нуклеиновых кислот, белков, углеводов, тканевое дыхание, синтез многих гормонов, в частности эстрогенов [6]. В числе этих белков большую роль в клеточном метаболизме играет цинк- α -2-гликопротеин [7]. Ионы меди входят в состав ферментов, также участвующих во многих биохимических процессах, что определяет значение этого микроэлемента в функционировании фетоплацентарной системы [8]. К числу специфических медьсодержащих белков относится церулоплазмин, обладающий сильным антиоксидантным действием и влияющий на стабилизацию клеточных мембран [9].

В поддержании липидного обмена, синтезе нуклеиновых кислот, трансмембранных процессах, регуляции энергетического потенциала клетки участвует магний [10]. Известно, что дефицит магния, затрагивающий вышеперечисленные метаболические процессы, приводит к нарушению репродукции [11], и беременность, развивающаяся на фоне этих нарушений, может протекать с осложнениями. Среди магний-зависимых белков особое значение имеет Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая аденозинтрифосфатаза (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза), активность которой в определенной степени определяется запасом магния.

Еще одним микроэлементом, играющим важную роль в механизмах биологического окисления, является железо. Оптимальный запас железа необходим для поддержания нормального уровня физиологически важных процессов [12, 13]. Основным белком, выполняющим функции депонирования железа, является ферритин, который служит высоко информативным маркером, характеризующим метаболизм железа [14]. Дисбаланс указанных металлов создает условия, способствующие развитию акушерской патологии.

Среди факторов, осложняющих беременность и нарушающих нормальное развитие плода, особое место принадлежит плацентарной недостаточности (ПН), которая является одной из важных причин высокой перинатальной заболеваемости и смертности. С данной патологией непосредственно связано 20% случаев перинатальной смерти [15, 16]. Частота ПН во всем мире до настоящего времени остается достаточно высокой [17]. В связи с этим, несмотря на значительное количество работ по изучению функциональных нарушений при ПН, уточнение ее патогенеза, как и разработка достоверных диагностических критериев, требует дальнейших исследований. Последнее особенно необходимо для своевременной и эффективной коррекции проводимых лечебных мероприятий.

Важной биосредой материнского организма являются околоплодные воды, играющие ведущую роль

в параплацентарном обмене и осуществляющие взаимосвязь между матерью и плодом [18, 19]. Околоплодные воды в определенной мере участвуют в обеспечении условий для физиологического роста и развития плода и в то же время реагируют изменением своего состава на любые нарушения, происходящие в системе мать-плацента-плод [20]. В связи с этим изучение биохимических показателей в околоплодных водах позволяет судить о развитии гестации, течении пренатального периода и прогнозировать состояние новорожденного.

Актуальность изложенного определила цель настоящей работы – изучить количество цинка, меди, железа, магния, а также содержащих или связывающих их белков: цинк- α -2-гликопротеина, ферритина, церулоплазмينا и активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в околоплодных водах при физиологической беременности и ПН.

Материал и методы. В исследование были включены 62 женщины в возрасте 24-30 лет. Контрольную группу составили 28 клинически здоровых женщин с неосложненным течением беременности и родов. Основную группу составили 34 женщины, беременность которых осложнилась ПН, верифицированной после родов. По возрасту, индексу массы тела, соматическому, акушерско-гинекологическому анамнезу, паритету беременностей и родов женщины обеих групп были сопоставимы. В обеих группах преобладали первородящие женщины: в основной группе они составили 61,8%, в контрольной – 60,7%. В анамнезе прерывание беременности по желанию женщины было в 25% и 23,6% случаев, соответственно в основной и контрольной группах. Самопроизвольные выкидыши у всех пациенток отсутствовали. Наличие хронических заболеваний имело место в 21,5% и 17,7% случаев.

Из исследования исключали женщин с инфекционными заболеваниями, декомпенсированными формами соматических заболеваний, многоплодной беременностью, аутоиммунной патологией, признаками преэклампсии, задержки роста плода и не давших информированного согласия на расширенный протокол исследования.

Критериями при постановке диагноза (и для включения в основную группу) служили: снижение фето- и маточно-плацентарного кровотока без признаков централизации кровообращения при доплерометрии, начальные признаки гипоксии при кардиотокографии. Отставание роста плода по показателям ультразвуковой фетометрии отсутствовало. Микроскопические исследования выявили в плацентах женщин основной группы патологические изменения, являющиеся морфологическими критериями ПН: наличие участков кальциноза, фиброза, гиперваскуляризация ворсин, мелкие межворсинчатые кровоизлияния.

Обследованные пациентки наблюдались в амбулаторно-консультативном отделении НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России в рамках программы «Акушерский мониторинг». Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом НИИАП.

Материалом для исследования служили околоплодные воды, взятые в сроки 16-18 нед и 39-40 не-

дель. В первом случае околоплодные воды получали путем трансабдоминального амниоцентеза. Проведение этой процедуры согласно приказу Минздрава России 572н от 01.11.2012 г. осуществлялось для исключения хромосомной патологии плода. У всех плодов женщин, включенных в исследование, был нормальный хромосомный набор. Во втором случае околоплодные воды получали при вскрытии плодного пузыря в первом периоде родов.

Содержание цинка и меди в околоплодных водах определяли с помощью наборов фирмы «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия) на спектрофотометре UV-Visible Spectrophotometer Evolution 300 (США). Содержание железа и магния оценивали, используя наборы фирмы «Randox» (Германия) на анализаторе Sapphire 400 (Япония). Количество цинка- α -2-гликопротеина и ферритина определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирм «BioVendor» (Чехия) и «Вектор-Бест» (Россия), соответственно, на микропланшетном фотометре Sunrise («Tecan», Швейцария). О количестве церулоплазмينا судили по результатам иммунотурбидиметрического анализа, который проводили с использованием наборов фирмы «Sentinel» (Италия). Исследования проводили в соответствии с протоколами фирм-разработчиков. Активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы (К.Ф.3.6.1.3) оценивали по приросту содержания неорганического фосфата в реакции с молибдатом аммония. Реакционная смесь содержала 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,0), 5 мМ $MgCl_2$, 0,15 мМ $CaCl_2$, 5 мМ АТФ, 100 мкг белка [21].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 6.0 фирмы «StatSoft Inc.»). Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий

проверяли по критерию Фишера. При заданных объемах выборок ($n_1=28$, $n_2=34$) значение F-критерия Фишера для различных параметров изменялось от 2,0 до 3,1, что давало уровень значимости $p<0,05$. Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (t-критерий) для независимых выборок. Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Пирсона с расчетом коэффициента корреляции (r). Результаты оценивали как статистически значимые при $p<0,05$.

Результаты. Проведенные исследования свидетельствуют об изменении содержания металлов и связанных с ними белков в околоплодных водах женщин основной группы по сравнению с аналогичными величинами в контрольной группе (см. таблицу). Как следует из таблицы, содержание цинка, железа и магния в околоплодных водах при ПН уменьшается. Степень снижения в среднем одинаковая во II и III триместрах гестации (от 31% до 38%). В то же время, уровень меди в эти периоды беременности возрастает, соответственно на 59% и 90%. Важным показателем дисбаланса ионов металлов является коэффициент отношения цинка и меди, который при осложненной беременности резко снижается. При физиологической беременности этот показатель равен 4,4 во II триместре и 4,8 – в III триместре, а при ПН в среднем – 1,7 в обоих триместрах.

Для изученных ферментов также установлены разнонаправленные изменения их уровня и активности (для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы). Количество цинка- α -2-гликопротеина в околоплодных водах при дисфункции плаценты возрастает на 63% и 70%, а уровень медьсодержащего церулоплазмينا уменьшается практически одинаково в течение гестации (на 36-37%). В такой же степени в околоплодных водах снижается активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы. Подобная

Содержание металлов, металлсодержащих и металлсвязывающих белков в околоплодных водах при физиологической беременности и плацентарной недостаточности

Показатели	Физиологическая беременность, триместр		Плацентарная недостаточность, триместр		p
	II	III	II	III	
Цинк, ммоль/л	1,28±0,10 [1,18-1,48]	1,54±0,15 [1,25-1,83]	0,83±0,09 [0,65-1,01]	0,98±0,09 [0,80-1,16]	$p_1=0,001$ $p_2=0,002$
Медь, ммоль/л	0,29±0,03 [0,23-0,35]	0,32±0,04 [0,24-0,35]	0,46±0,04 [0,38-0,54]	0,61±0,07 [0,47-0,75]	$p_1=0,002$ $p_2=0,001$
Железо, мкмоль/л	0,21±0,02 [0,17-0,25]	0,29±0,03 [0,23-0,35]	0,13±0,02 [0,09-0,17]	0,19±0,02 [0,15-0,23]	$p_1=0,007$ $p_2=0,006$
Магний, ммоль/л	0,81±0,06 [0,69-0,93]	1,43±0,11 [1,21-1,65]	0,56±0,05 [0,46-0,66]	0,97±0,08 [0,81-1,13]	$p_1=0,002$ $p_2=0,001$
Цинк- α -2- гликопротеин, мкг/мл	23,2±2,5 [18,3-28,1]	21,7±2,1 [17,6-25,8]	39,6±3,8 [32,2-47,1]	35,4±3,2 [29,1-41,7]	$p_1=0,001$ $p_2=0,001$
Церулоплазмин, мг/мл	0,38±0,04 [0,30-0,46]	0,28±0,03 [0,22-0,34]	0,24±0,02 [0,20-0,28]	0,18±0,01 [0,16-0,20]	$p_1=0,002$ $p_2=0,001$
Ферритин, нг/мл	33,5±3,3 [27,1-40,0]	42,2±3,1 [36,1-48,3]	20,1±2,3 [15,6-24,6]	29,8±2,1 [25,7-33,9]	$p_1=0,001$ $p_2=0,001$
Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза, активность, нмоль/мин х мг белка	0,40±0,03 [0,34-0,46]	0,48±0,04 [0,40-0,56]	0,26±0,03 [0,20-0,32]	0,32±0,03 [0,26-0,38]	$p_1=0,002$ $p_2=0,003$

Примечание. p_1 – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и ПН во II триместре; p_2 – между показателями при физиологической беременности и ПН во III триместре. Данные представлены в виде средней величины \pm ошибки среднего и в скобках 95% доверительный интервал.

направленность отклонения характерна и для содержания ферритина (снижение в II и III триместрах от 30% до 40 %).

О взаимосвязи между уровнем ионов металлов и показателями соответствующих ферментов при ПН свидетельствуют результаты корреляционного анализа. Положительная корреляционная связь выявлена между содержанием железа и ферритина: $r=0,80$ ($p<0,01$) во втором триместре беременности и $0,82$ ($p<0,01$) в третьем триместре, а также между активностью Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и уровнем магния: $r=0,79$ ($p<0,01$) во II триместре и $r=0,83$ ($p<0,01$) в III триместре. Отрицательная зависимость в обоих триместрах беременности установлена для меди и церулоплазмينا ($r=-0,81$ и $-0,84$, $p<0,01$). Между содержанием цинка и цинк- α -2-гликопротеина также обнаружена негативная зависимость: $r=-0,84$ ($p<0,001$) и $-0,85$ ($p<0,01$) во II и III триместре соответственно.

Обсуждение. Последствия, к которым может приводить изменение содержания металлов, весьма разнообразны. Так, снижение количества цинка способно вызвать самопроизвольный выкидыш, пороки развития плода и новорожденного, дискоординацию родовой деятельности [22]. Последнее объясняется действием цинка на метаболизм простагландинов, а также ряда стероидных гормонов в результате его включения в специфический домен белков, регулирующих действие этих гормонов [6]. Противоположная динамика уровня меди, по-видимому, объясняется конкуренцией между этим микроэлементом и цинком за связывание с плацентарными транспортерами двухвалентных ионов [23]. Можно полагать, что снижение содержания ионов цинка при дисфункции плаценты является результатом его повышенного связывания, что освобождает сайты для ионов меди и приводит к увеличению их транспорта в околоплодные воды. В свою очередь, высокая концентрация ионов меди вызывает снижение активности ряда ферментов пентозофосфатного шунта, способствуя энергетическому дисбалансу в фетоплацентарной системе [24]. Известно, что между динамикой меди и цинка существует взаимосвязь: высокий уровень меди усиливает тератогенный эффект дефицита цинка [25]. О высокой степени различий между величинами этих микроэлементов можно судить по их соотношению, приведенному выше, причем данный показатель в связи со значительной информативностью может быть использован в качестве прогностического теста оценки состояния плода и новорожденного ребенка.

Что касается цинк- α -2-гликопротеина, то повышение его уровня в околоплодных водах при ПН, помимо уменьшения свободного фонда цинка, очевидно, приводит к нарушению регулируемых им процессов, таких как пролиферация, клеточная дифференциация, апоптоз [26], физиологический уровень которых необходим для нормального функционирования фетоплацентарной системы. Уменьшение количества медьсодержащего церулоплазмينا, по-видимому, сопровождается падением антиоксидантной защиты, усилением свободнорадикальных реакций и, как следствие, развитием внутриутробной гипоксии, имеющей место при дисфункции плаценты [20].

Снижение содержания железа и ферритина в околоплодных водах может оказывать негативное влияние прежде всего на энергообеспечение в системе мать-плацента-плод, тем самым способствуя развитию осложненной гестации и нарушению процессов пренатального развития [27]. Уменьшение уровня магния, являющегося кофактором большого числа ферментов, необходимых для регуляции практически всех видов обмена веществ [11], очевидно, также служит одной из важных причин формирования акушерской патологии, в том числе дисфункции плаценты и всего фетоплацентарного комплекса. Отрицательные последствия, особенно в обмене макроэргов, усугубляются снижением активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы.

Подытоживая причины и последствия выявленных изменений в околоплодных водах при ПН, можно полагать, что они вызваны модификацией механизмов трансплацентарного перехода из материнской крови к плоду различных химических компонентов, необходимых для развития плода, в том числе, и микроэлементов. В свою очередь, нарушение баланса металлов и уровня металлсодержащих/металлсвязанных белков усиливает функциональные и метаболические повреждения в плаценте, что приводит к нарушению развития внутриутробного плода и в дальнейшем – новорожденного. Наблюдение за новорожденными основной группы, которые были переведены в отделение патологии и реабилитации новорожденных и детей младшего возраста, показали, что у 27% из них появились признаки постнатальной энцефалопатии. Наличие церебральных повреждений у новорожденных на 7-8 сутки и в более поздние сроки подтверждалось результатами комплексного клинко-функционального обследования согласно классификации перинатальных повреждений нервной системы у новорожденных [28]. Информативным прогностическим маркером развития энцефалопатии у новорожденных может служить коэффициент соотношения цинк/медь в околоплодных водах уже во втором триместре беременности. Величина этого показателя при выявленной церебральной патологии снижена почти в 3 раза.

Заключение. Резюмируя полученные данные, можно заключить, что развитие ПН происходит на фоне изменения в околоплодных водах баланса металлов и белков, содержащих или связывающих металлы на протяжении II и III триместров гестации, что нарушает нормальное функционирование фетоплацентарной системы. Результаты настоящего исследования позволяют расширить наши представления о биохимических механизмах формирования и дальнейшего развития дисфункции плаценты, а также предложить информативный диагностический и прогностический тест пренатальной патологии и состояния новорожденного ребенка, позволяющий проводить превентивную терапию на доклинической стадии патологии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской помощи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-14, 17-19, 22-27)
см. REFERENCES

1. Шаторная В.Ф., Линник В.А., Каплуненко В.Г., Савенкова Е.А., Чекман И.С. Морфологическое исследование влияния некоторых микроэлементов на репродуктивную систему и эмбриогенез. *Микроэлементы в медицине*. 2014; 15(1): 34-9.
15. Стрижаков А.Н., Тимохина Е.В., Игнатко И.В., Белоцерковцева Л.Д. Патогизиология плода и плаценты. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
16. Липатов И.С., Тезиков Ю.В., Линева О.И., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е., Мартынова Н.В. и др. Патогенетические механизмы формирования плацентарной недостаточности и преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2017; 9: 64-71. Doi: 10.18565/aig.2017.9.64-71.
20. Погорелова Т.Н., Никашина А.А., Гунько В.О., Ларичкин А.В., Чеботарев Д.А. Особенности окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при плацентарной недостаточности. *Биомедицинская химия*. 2018; 64 (3): 290-7. Doi: 10.18097/PBMC20186403290.
21. Лызлова С.Н., Владимиров В.Г. ред. Ферменты и нуклеиновые кислоты. СПб: Изд-во Санкт-Петербургского университета; 1997.
28. Володин Н.Н., ред. Классификация перинатальных поражений нервной системы и их последствий у детей первого года жизни. Методические рекомендации. М.: ВУНМИЦ; 2006.

REFERENCES

1. Shatornaya V.F. Linnik, V.A., V.G. Kaplunenko, Savenkova E. A., Chekman I.S. Morphological study of influence of some trace elements in the reproductive system and embryogenesis. *Mikroelementy v meditsine*. 2014; 15(1): 34-9. (in Russian)
2. Mirnamniha M., Faroughi F., Tahmasbpour E., Ebrahimi P., Beigi Harchegani A. An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Rev. Environ. Health*. 2019; 34(4): 339-48. Doi: 10.1515/reveh-2019-0008.
3. Lewicka I., Kocylowski R., Grzesiak M., Gaj Z., Oszukowski P., Suliburska J. Selected trace elements concentrations in pregnancy and their possible role - literature review. *Ginekol. Pol*. 2017; 88(9): 509-14. Doi: 10.5603/GP.a2017.0093.
4. Jarosz M., Olbert M., Wyszogrodzka G., Młyniec K., Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*. 2017; 25(1): 11-24. Doi: 10.1007/s10787-017-0309-4.
5. Wilson R.L., Grieger J.A., Bianco-Miotto T., Roberts C.T. Association between maternal zinc status, dietary zinc intake and pregnancy complications: a systematic review. *Nutrients*. 2016; 8(10): pii: E641. Doi: 10.3390/nu8100641.
6. Cassandri M., Smirnov A., Novelli F., Pitolli C., Agostini M., Malewicz M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov*. 2017; 3: 17071. Doi: 10.1038/cddiscovery.2017.71.
7. Hassan M.I., Waheed A., Yadav S., Singh T.P., Ahmad F. Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol. Cancer Res*. 2008; 6(6): 892-906. Doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2195.
8. Lutsenko S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2010; 14(2): 211-217. Doi: 10.1016/j.cbpa.2010.01.003.
9. Linder M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics*. 2016; 8(9): 887-905. Doi: 10.1039/c6mt00103c.
10. Chen P., Bornhorst J., Aschner M. Manganese metabolism in humans. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2018; 23: 1655-79. Doi: 10.2741/4665.
11. Dalton L.M., Ni Fhloinn D.M., Gaydazhieva G.T., Mazurkiewicz O.M., Leeson H., Wright C.P. Magnesium in pregnancy. *Nutr. Rev*. 2016; 74(9): 549-57. Doi: 10.1093/nutrit/nuw018.

12. Gozzelino R., Arosio P. Iron homeostasis in health and disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17(1). pii: E130. Doi: 10.3390/ijms17010130.
13. Fisher A.L., Nemeth E. Iron homeostasis during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr*. 2017; 106 (Suppl. 6):1567S-1574S. Doi: 10.3945/ajcn.117.155812.
14. Arosio P., Elia L., Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*. 2017; 69(6): 414-422. Doi: 10.1002/iub.1621.
15. Strizhakov A.N., Timokhina E.V., Ignatko I.V., Belotserkovtseva L.D. Pathophysiology of the fetus and placenta. [Patofiziologiya ploda i platsenty]. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. (in Russian)
16. Lipatov I.S., Tezikov Yu.V., Lineva O.I., Tyutyunnik V.L., Kan N.E., Martynova N.V. et al. Pathogenetic mechanisms of placental insufficiency and preeclampsia. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2017; 9: 64-71. Doi: 10.18565/aig.2017.9.64-71. (in Russian)
17. Hunt K., Kennedy S.H., Vatish M. Definitions and reporting of placental insufficiency in biomedical journals: a review of the literature. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2016; 205: 146-149. Doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.08.029.
18. Tong X. Amniotic fluid may act as a transporting pathway for signaling molecules and stem cells during the embryonic development of amniotes. *J. Chin. Med. Assoc*. 2013; 76(11): 606-610. Doi: 10.1016/j.jcma.2013.07.006.
19. Palmas F., Fattuoni C., Noto A., Barberini L., Dessi A., Fanos V. The choice of amniotic fluid in metabolomics for the monitoring of fetus health. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2016; 16(4): 473-86. doi: 10.1586/14737159.2016.1139456.
20. Pogorelova T.N., Nikashina A.A., Gunko V.O., Larichkin A.V., Chebotarev D.A. (2018). Features of redox processes in the amniotic fluid at placental insufficiency. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2018; 64(3): 290-7. Doi: 10.18097/PBMC20186403290. (in Russian)
21. Lyzlova S.N., Vladimirov V.G., eds. Enzymes and nucleic acids. [Fermenty i nukleinovye kisloty]. St.Petersburg: Sankt-Petersburgskiy universitet; 1997. (in Russian)
22. Lamberti L.M., Fischer Walker C.L., Black R.E. Zinc deficiency in childhood and pregnancy: evidence for intervention effects and program responses. *World Rev. Nutr. Diet*. 2016; 115: 125-33. Doi: 10.1159/000442079.
23. Arredondo M., Martínez R., Núñez M.T., Ruz M., Olivares M. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res*. 2006; 39(1): 95-102. Doi: 10.4067/s0716-97602006000100011.
24. Roychoudhury S., Nath S., Massanyi P., Stawarz R., Kacaniova M., Kolesara A. Copper-induced changes in reproductive functions: in vivo and in vitro effects. *Physiol. Res*. 2016; 65(1): 11-22. DOI: 10.33549/physiolres.933063.
25. Fukada T., Yamasaki S., Nishida K., Murakami M., Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: zinc signaling. *J. Biol. Inorg. Chem*. 2011; 16(7): 1123-34. Doi: 10.1007/s00775-011-0797-4.
26. Terrin G., Berni Canani R., Di Chiara M., Pietravalle A., Aleandri V., Conte F. et al. Zinc in early life: a key element in the fetus and preterm neonate. *Nutrients*. 2015; 7(12): 10427-46. Doi: 10.3390/nu7125542.
27. Cerami C. Iron nutrition of the fetus, neonate, infant, and child. *Ann. Nutr. Metab*. 2017; 71 (Suppl. 3): 8-14. Doi: 10.1159/000481447.
28. Volodin N. N., ed. Classification of perinatal lesions of the nervous system and their consequences in children of the first year of life [Klassifikatsiya perinatal'nykh porazheniy nervnoy sistemy i ikh posledstviy u detey pervogo goda zhizni. Metodicheskie rekomendatsii]. Methodological recommendations. Moscow: VUNMC; 2006. (in Russian)

Поступила 25.12.20
Принята к печати 07.04.21

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КИШКУН А.А., СИНЯК М.Ю., 2021

Кишкун А.А., Синяк М.Ю.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЭ

ООО «Алифакс», 125367, Москва, Россия

В исследовании представлен исторический анализ проблем стандартизации методов определения СОЭ. Приведены современные подходы к автоматизации исследования СОЭ. Показано, что решение проблем стандартизации методов определения СОЭ лежит в плоскости регулярного проведения внутрилабораторного контроля качества. В соответствии с принципами доказательной медицины даны рекомендации по использованию методов определения СОЭ в клинической практике.

Ключевые слова: *методы определения СОЭ; стандартизация СОЭ; автоматизация СОЭ; внутрилабораторный контроль качества.*

Для цитирования: Кишкун А.А., Синяк М.Ю. Стандартизация методов определения СОЭ. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (5): 271-278. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-271-278>

Kishkun A.A., Siniak M.Yu.

STANDARDIZATION OF METHODS FOR DETERMINING ESR

LLC «Alifax», 125367, Moscow, Russia

The study presents a historical analysis of the problems of standardization of methods for determining ESR. The modern approaches to the automation of ESR research are presented. It is shown that the solution to the problems of standardization of methods for determining ESR lies in the plane of regular intra-laboratory quality control. In accordance with the principles of evidence-based medicine, recommendations are given on the use of methods for determining ESR in clinical practice.

Key words: *ESR determination methods; ESR standardization; ESR automation; in-laboratory quality control.*

For citation: Kishkun A.A., Siniak M.Yu, Standardization of methods for determining ESR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (5): 271-278 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-271-278>

For correspondence: *Kishkun Alexey Alexeevich*, Dr. biol. sciences, Honored Doctor of Russia Federation; e-mail: kishkuna@yandex.ru

Information about authors:

Kishkun A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1546-9480>;

Siniak M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1357-560X>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 30.03.2021
Accepted 21.04.2021

Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) является одним из старейших, широко и часто используемым в клинической практике лабораторным тестом. СОЭ входит в состав показателей общеклинического анализа крови. В европейских странах СОЭ назначается 20% амбулаторных пациентов, и составляет более 16% всех лабораторных анализов крови [1].

Данные обзорных публикаций в международных клинических изданиях показывают, что СОЭ, по-прежнему, широко используется как для диагностики заболеваний, так и для наблюдения за пациентами [2, 3]. Этот тест считается полезным для мониторинга воспалительных заболеваний, в частности ревматоидного артрита.

СОЭ является не до конца понятным физико-химическим феноменом. Процесс характеризуется 3 различными фазами: 1) агрегации, в которую отрицательно заряженные эритроциты соединяются в столбики; 2) седиментации (оседания) – быстрое появление эритро-плазматической границы – продолжение формирования столбиков эритроцитов и их оседание; 3) уплотнения (упаковки) – завершение агрегации эритроцитов и оседания столбиков эритроцитов на дне пробирки.

Несмотря на длительное использование в клинической и лабораторной медицине, СОЭ является тестом очень низкого качества. Он плохо измеряет то, что должен измерить, часто измеряет то, чего не должен, и ненадежен. Рабочая группа Международного

совета по стандартизации в гематологии показала, что повторные тесты определения СОЭ один пациент – один и тот же – образец имели величину отклонения в 44% при значениях, близких к верхнему пределу «нормального» [4]. Анализ результатов контроля качества, проведенный этой рабочей группой, при использовании одного и того же контрольного материала, показал различия в результатах метода Вестергрена выше 40% (286 лабораторий), а в других методах, основанных не на принципах метода Вестергрена – 142% (376 лабораторий).

1. История теста. В 1897 г. польский врач-терапевт Эдмунд Бирнацкий (Edmund Biernacki) [5] впервые показал, что скорость, с которой оседают красные тельца, может помочь идентифицировать болезнь пациента, и что повышенная скорость оседания эритроцитов у больных людей обусловлена присутствием фибриногена». Позже, в 1918 г., шведский патолог и гематолог Роберт (Робин) Санно Фареус (Robin Fahraeus) [6] продолжил работу Э. Бирнацкий, первоначально использовав скорость оседания эритроцитов (СОЭ) в качестве теста на беременность.

Альф Вильгельм Альбертссон Вестергрэн (Alf Westergren) [7], шведский терапевт, предложил свою методику проведения СОЭ и показал полезность теста для определения прогноза у пациентов с туберкулезом. Разработанный А. Вестергреном метод измерения СОЭ стал широко использоваться в клинической практике, и был назван в его честь.

В классическом методе Вестергрена используют стандартные капилляры из стекла или пластика длиной 300 мм ± 1,5 мм (рабочей является длина капилляра 200 мм), диаметром – 2,55 мм ± 0,15 мм, что повышает чувствительность метода. Время измерения – 1 ч. Для анализа может быть использована как венозная, так и капиллярная кровь. Пробу венозной (капиллярной) крови смешивают с 5% раствором натрия цитрата в соотношении 4:1. В 1973 г. Международным комитетом по стандартизации в гематологии метод Вестергрена был принят в качестве эталонного метода для определения скорости оседания эритроцитов [8].

У нас в стране широкое распространение получил метод Т.П. Панченкова [9]. В этом методе используется стандартный стеклянный капилляр длиной 172 мм (рабочей является длина капилляра 100 мм), наружным диаметром 5 мм и диаметром отверстия – 1,0 мм. В качестве антикоагулянта используется раствор натрия цитрата.

В 1935 г. американский гематолог Максвелл Майер Винтроуб (M.M. Wintrobe) [10] предложил свой метод определения СОЭ, который одно время получил широкое распространение. В методе М. Винтроуба использовался более короткий капилляр (100 мм) и другой антикоагулянт (оксид аммония и оксалат калия). Метод обладал более высокой чувствительностью при умеренных повышениях СОЭ, но давал много ложноположительных результатов, в то время как метод А. Вестергрена более чувствителен к изменениям СОЭ при высоких значениях и является более полезным, когда СОЭ используется для оценки реакции на проводимое лечение при таких заболеваниях,

как височный артериит. Поэтому в дальнейшем от применения метода М. Винтроуба отказались.

С внедрением в клиническую практику вакуумных систем для определения СОЭ стали использовать вакуумные пробирки с 0,105 моль/л (3,13%) тринатрийцитрат лимонной кислоты в соотношении кровь/антикоагулянт 4:1. При этом рабочая длина вакуумной пробирки составляла 100 мм. При этом диаметр пробирки у разных производителей мог существенно отличаться.

В дальнейшем, метод А. Вестергрена был подвергнут различным модификациям. В одних методах стали использовать укороченное время постановки СОЭ (15-30 мин), в других использовали установку капилляра не вертикально, а под углом, в третьих, в качестве антикоагулянта применяют ЭДТА.

В последние десятилетия в практику КДЛ пришли технологии автоматизации СОЭ. Наиболее простые анализаторы осуществляют простое измерение результата анализа через 1 ч или меньшее время. Более сложные автоматизируют взятие пробы крови с антикоагулянтом из пробирки, разведение ее тринатрийцитратом лимонной кислоты, заполнение капилляра кровью и измерение результата. Появились анализаторы, полностью автоматизирующие все процедуры определения СОЭ, и использующие принципы, совершенно отличные от метода Вестергрена (например, центрифугирование или фотометрия агрегации).

Новые методы определения СОЭ позволили значительно быстрее получать результаты анализа, обеспечили безопасность специалистов лаборатории, значительно снизили трудовые затраты на проведение анализа, а некоторые позволили отказаться от вакуумных пробирок для взятия проб крови на СОЭ.

Разнообразие методов определения СОЭ привело к увеличению расхождений в результатах исследований, что затрудняет их сравнение. Использование в практике лабораторий различных методов определения СОЭ, новых технологий и средств автоматизации обостряют проблему стандартизации этого метода исследования для лабораторий нашей страны.

2. Классификация методов определения СОЭ. В настоящее время только 28% КДЛ используют в своей работе немодифицированный метод Вестергрена, в то время как 72% -модифицированные методы [4]. Международный комитет по стандартизации в гематологии (International Committee for Standardization in Haematology – ICSH) классифицирует методы определения СОЭ на 3 группы:

1) метод Вестергрена – референсный метод (золотой стандарт);

2) модифицированные методы Вестергрена – методы, основанные на методологии Вестергрена с некоторыми модификациями, например, более коротким временем анализа, без использования тринатрийцитрата лимонной кислоты в качестве антикоагулянта, с использованием других добавок в качестве антикоагулянта.

3) альтернативные методы определения СОЭ (основанные не на методе Вестергрена) – анализа-

торы, использующие новые технологии, такие как центрифугирование или фотометрическое измерение агрегации.

Поскольку модифицированные и альтернативные методы не обязательно измеряют те же патофизиологические процессы, что и метод Вестергрена, ICSH рекомендует производителям четко обозначить эти методы как модифицированные или альтернативные методы.

Непрерывная разработка и внедрение в практику КДЛ модифицированных и альтернативных методов измерения СОЭ обуславливает необходимость разработки универсальных рекомендаций, которые служили бы основой для внедрения этих методов в повседневную практику. Автоматизация измерения СОЭ на фоне роста количества лабораторных анализов в КДЛ, при одновременном повышении безопасности пациентов специалистов лаборатории являются объективным требованием времени. Очевидно, что стандартизация методов и сопоставимость результатов измерения СОЭ стали проблемой.

3. Методы автоматизации определения СОЭ.

На результаты определения СОЭ классическим методом Вестергрена и другими методами могут оказывать существенное влияние ряд факторов преанали-

тического и аналитического этапов (не связанных с заболеванием пациента) производства лабораторных анализов:

- 1) температура в помещении где проводится анализ (повышение температуры в помещении на 1°C увеличивает СОЭ на 3%);
- 2) время хранения пробы (не более 4 ч при комнатной температуре);
- 3) используемый антикоагулянт;
- 4) вертикальность установки капилляра;
- 5) длина капилляра;
- 6) внутренний диаметр капилляра;
- 7) степень разведения крови антикоагулянтом;
- 8) величина гематокрита (низкие значения гематокрита, ниже 35%, могут вносить искажения).

В целях снижения влияние этих факторов на результаты СОЭ были предприняты усилия по автоматизации анализа. Для автоматизации СОЭ используются специальные приборы – анализаторы СОЭ. Технологическими преимуществами автоматизированного измерения СОЭ являются:

- 1) быстрота выполнения процедуры;
- 2) уменьшение числа ручных манипуляций;
- 3) стандартизация условий проведения анализа;
- 4) возможность проведения контроля качества.

Частичный перечень анализаторов СОЭ и их принципы измерения результатов

Анализатор	Производитель	Принцип измерения
Excyte M	Vital Diagnostics, Lincoln, США	Пробу крови разбавляют цитратом натрия в 120 мм пластиковых вакуумных пробирках. Измерение седиментации через 30 мин, математически скорректированное до 1-часового СОЭ по Вестергренау
iSED	Alcor Scientific Inc., Smithfield, США	Фотометрическое измерение агрегации эритроцитов. Результаты сопоставлены с методом Вестергрена
Roller 20	Alifax S.r.L., Polverara, Италия	Используется капиллярная фотометрическо-кинетическая технология. Кровь из пробы с ЭДТА поступает в капилляр, где ускоряется через контур «остановленного потока», который вызывает осаждение эритроцитов. Результаты преобразуются в значения Вестергрена и доступны в течение 20 с
Sedimatic 100	Analysis Instrument AB, Broma, Швеция	Измеряет оседание эритроцитов в специальной вакуумной пробирке для определения СОЭ с цитратом натрия
Sedisystem	Becton Dickinson, Meylan Cedex, Франция	Пробирки Seditainer для СОЭ помещаются в системную стойку; пробы перемешиваются. Камера измеряет начальную высоту столба крови и показание конечного уровня седиментации через 20 мин. Результаты преобразуются полиномиальной экстраполяцией для корреляции с традиционным методом Вестергрена
Seditainer	Becton Dickinson Vacutainer Systems, Oxford, Великобритания	Проба крови берется в силиконизированную 100-миллиметровую стеклянную вакуумную пробирку, содержащую антикоагулянт. Пробирки помещаются в измерительный штатив и через 1 ч отмечают показание конечного уровня седиментации
Starsed Auto Compact	Mechatronics Manufacturing BV, Zwaag, Нидерланды	Измеряет СОЭ в специальных капиллярах с использованием цельной крови, разведенной цитратом. Полностью закрытая, автоматизированная система. Седиментацию измеряют через 30 мин и экстраполируют до значений 60 мин
Streck ESR Auto Plus	Streck, Omaha, США	Измерение седиментации через 30 мин, математически скорректированное до результата, сравнимого с 1 часовым Вестергрена
Test 1	Alifax S.r.L., Polverara, Италия	Используется капиллярная фотометрическо-кинетическая технология. Кровь из пробы с ЭДТА поступает в капилляр, где ускоряется через контур «остановленного потока», который вызывает осаждение эритроцитов. Результаты преобразуются в значения Вестергрена и доступны в течение 20 с
Vesmatic Cube 200	Diesse Diagnostica Senese, Siena, Италия	Использует стандартные вакуумные пробирки с ЭДТА; пробы крови устанавливают в анализатор. Камера измеряет начальную высоту столба крови и показание конечного уровня седиментации через 20 мин. Результаты преобразуются в единицы Вестергрена

Вместе с тем, принципы работы анализаторов СОЭ различных производителей существенно отличаются. В таблице представлен частичный перечень анализаторов для определения СОЭ.

Ves-Matic Cube 200 – это закрытый автоматический анализатор СОЭ, который выполняет исследование из первичных вакуумных пробирок с ЭДТА. Метод, используемый в анализаторе, основан на модифицированной методике Вестергрена. СОЭ определяется с помощью оптической разницы высоты столбика эритроцитов до и после седиментации за 20 мин. Последующие результаты анализатор выдает каждые 18 с. Результаты корректируются с поправкой на температуру, а также математически преобразуются в значения по Вестергрену.

Анализатор СОЭ Starrsed Auto Compact представляет собой полностью автоматизированную систему. Для определения СОЭ используется проба крови с K_2 -ЭДТА, взятая в вакуумную пробирку. Для анализа достаточно 3 мл крови. Анализатор с помощью вакуумного насоса разбавляет пробу крови с ЭДТА – к 1,6 мл крови добавляет 0,4 мл 3,8% раствора тринатрийцитрата лимонной кислоты, а затем заполняет капилляр Вестергрена (200 мм). Результат анализа измеряется через 30 мин. Для измерения результата используется оптическая система с длиной регистрационной волны 950 нм. С помощью корреляционной кривой результаты анализа преобразуются в 1–часовое измерение. Конечный результат анализа получают в мм/ч с учетом коррекции температуры (приводятся к 18°C).

Анализаторы Ves-Matic Cube 200, Starrsed Auto Compact и ряд других, приведенных в таблице используют методологию модифицированных методов Вестергрена.

Анализаторы Test 1 производства фирмы Alifax S.r.L. и iSED компании Alcor Scientific, используют технологию кинетического измерения агрегации эритроцитов, отличную от метода Вестергрена. Теоретическим основанием данного метода определения СОЭ служит агрегационная модель оседания эритроцитов, объясняющая этот процесс образованием агрегатов эритроцитов при адсорбции на них макромолекул, способствующих их адгезии, и оседанием агрегатов в соответствии с законом Стокса. Согласно данному закону, частица, плотность которой превышает плотность среды, оседает под действием силы тяжести с постоянной скоростью. Скорость оседания пропорциональна квадрату радиуса частицы, разнице ее плотности и плотности среды, и обратно пропорциональна вязкости среды [11].

Test 1 – это полностью автоматический анализатор СОЭ производительностью до 180 проб/ч. Для анализа используется кровь из вакуумных пробирок с ЭДТА, тех же, которые поступают на гематологические анализаторы. Вакуумные пробирки загружаются в анализатор (в специальные штативы), и все дальнейшие процедуры анализа выполняются в автоматическом режиме. Первоначально штативы с вакуумными пробирками тщательно перемешиваются со скоростью вращения 60 об/мин. Затем образец крови, извлеченный непосредственно из вакуумной пробирки с помощью закрытой аспирационной иглы, поступает в капилляр-

ную трубку, где ускоряется, а затем останавливается (технология «остановленного потока»). Остановка пробы в капилляре вызывает агрегацию (оседание) эритроцитов. Для регистрации агрегации используется инфракрасный микрофотометр с длиной волны 650 нм. Импульсы, измеренные за единицу времени, затем используются для определения кривой седиментации для каждого образца с помощью математического алгоритма. Среднее уменьшение сигнала за единицу времени, называемое средним сигналом, и квадратный корень интегрального сигнала были преобразованы в сопоставимые значения с данными метода Вестергрена с помощью модели линейной регрессии. Технология «остановленного потока» позволяет уменьшить время получения результата до 20 секунд. Важным преимуществом анализатор служит то, что все измерения осуществляются при постоянной температуре 37°C, которая является золотым стандартом для определения большинства аналитов.

Автоматический анализатор Roller 20 позволяет определять СОЭ в капиллярной и венозной крови, так как имеет 2 аналитических контура. Анализатор может работать как с вакуумными пробирками, так и с первичными микропробирками с ЭДТА для капиллярной крови. Одновременная загрузка анализатора составляет до 20 проб, производительность – до 75 тестов/ч.

Анализаторы компании Alifax S.r.L. измеряют кинетику агрегации эритроцитов, благодаря этому, данная методика способна устранить влияние факторов преаналитического и аналитического этапов, присущие классическому методу Вестергрена и модифицированным методам, а также ряду анализаторов СОЭ, основанных на оседании.

В настоящее время активно разрабатывается уникальная рабочая станция для измерения СОЭ и определения других гематологических показателей (подсчета числа эритроцитов, лейкоцитов, определения концентрации гемоглобина и др.) в одной пробе крови.

Таким образом, существуют 2 подхода к автоматизации СОЭ, первый основан на автоматизации модифицированных методов Вестергрена, второй – автоматизации альтернативных методов определения СОЭ.

4. Стандартизация методов определения СОЭ.

Анализ, используемых методов и подходов к их автоматизации, показывает, что клиническая практика остро нуждается в стандартизации методов определения СОЭ. Вместе с тем, история стандартизации этого метода быстрее свидетельствует о не том, как ее решить, а о том, как ее не решить.

В мире существуют 2 некоммерческих профессиональных организации, которые на протяжении более 40 лет пытаются решить проблему стандартизации метода определения СОЭ. Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS; теперь называется Институтом клинических лабораторных стандартов – Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI) и Международный комитет по стандартизации в гематологии (International Committee for

Standardization in Haematology – ICSH) неоднократно предпринимали усилия по стандартизации методов определения СОЭ.

В 1973 г. Международный комитет по стандартизации в гематологии, а в 1977 г. Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам рекомендовали метод Вестергрена в качестве референсного метода для определения СОЭ [8, 12]. В качестве антикоагулянта был рекомендован дигидрат тринатрийцитрата лимонной кислоты, определены требования к параметрам капилляра для измерения СОЭ (стеклянный капилляр длиной 300 мм с четко маркированным и нумерованным шагом 10 или менее мм от 0 до 200 мм, внутренним диаметром $2,55 \pm 0,15$ мм).

В 1977 г. ICSH внес некоторые изменения в предыдущие рекомендации [13]. Самым важным моментом в обновленной версии было то, что для рутинных методов было допустимо использовать пластиковые капилляры и этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Пробу крови, взятую с ЭДТА необходимо было развести дигидрат тринатрийцитратом лимонной кислоты в точной пропорции 4:1.

Следующие рекомендации ICSH вышли в 1988 г. [14]. В этой публикации был представлен стандартизированный метод. В стандартизованном методе использовались неразбавленные образцы крови с ЭДТА, а проведение анализа должно было выполняться в стандартных условиях в капилляре Вестергрена. Полученные результаты анализа сопоставлялись со стандартным (референсным) методом Вестергрена следующим образом: (результаты неразбавленного образца крови с ЭДТА $\times 0,86$) – 12. Конечный результат должен выражаться в мм/ч. В рекомендациях была описана методика сравнения рутинных или используемых в лаборатории методов определения СОЭ со стандартизированным методом.

Последние рекомендации ICSH по измерению СОЭ были опубликованы в 1993 г. [15]. В качестве эталонного метода для определения СОЭ рекомендовалось использовать пробы крови с ЭДТА. Стандартизованный (референсный) метод был описан как такой же, как и эталонный метод, за тем исключением, что для референсного метода Вестергрена можно было использовать стеклянные и пластиковые капилляры. Основная причина применения обоих методов заключалась в их использовании для проверки, контроля качества и установления сопоставимости результатов, полученных другими методами.

В 2011 г. ICSH опубликовал обзор, в котором перечислены конкретные подробности эталонного метода для определения СОЭ [16].

Длительная история разработки рекомендаций ICSH по стандартизации методов определения СОЭ показывает, что они имеют много недостатков, имеют весьма относительную ценность для практических лабораторий и скорее подстраивались под непрерывный поток различных модификаций методов измерения СОЭ, чем пытались решить проблему.

Параллельно Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS) и его приемником Институтом клинических лабораторных

стандартов (CLSI) разрабатывались стандарты в отношении методов определения СОЭ. Следует констатировать, что CLSI более целенаправленно пытался решить проблему стандартизации.

В 2011 г. CLSI опубликовал 5-е издание стандарта (H02-A5) «Процедуры проведения теста на скорость оседания эритроцитов» [17]. Этот документ является пересмотром четвертого издания утвержденного стандарта, который был опубликован в декабре 2000 года. Примечательно, что этот стандарт использует унифицированный подход для оптимального использования всех существующих методов СОЭ и рекомендует стандартизированный метод с использованием разбавленной крови. С этой целью в документе изложены необходимые детали для работы этого нового стандартизированного метода (в основе методология Вестергрена) на разведенных образцах крови (4:1) для определения СОЭ. Также описывается обеспечение качества и оценка других методов измерения СОЭ, включая процедуры подготовки эталонного материала свежей крови для использования в лаборатории или изготовления приборов СОЭ. Кроме того, стандарт предоставляет руководство по валидации, верификации, контролю качества и контролю качества измерительных приборов СОЭ и связанных с ними средств контроля.

Стандарт предназначен для использования производителями анализаторов СОЭ, клиническими лабораториями, аккредитующими организациями и регулирующими органами.

В качестве «золотого стандарта» утверждена новая методика определения СОЭ (пересмотрен классический метод Вестергрена):

- 1) венозная кровь берется в вакуумные пробирки с K_2 -ЭДТА или K_3 -ЭДТА;
 - 2) использование натрия цитрата (4:1) неприемлемо для определения СОЭ;
 - 3) время хранения пробы крови после взятия – не более 4 ч при комнатной температуре; при хранении крови при $+4^\circ\text{C}$ СОЭ можно исследовать в течение 24 ч, но перед выполнением анализа пробу крови необходимо прогреть до комнатной температуры;
 - 4) исследование СОЭ должно выполняться при $18-25^\circ\text{C}$;
 - 5) перед проведением анализа проба крови должна быть тщательно перемешана;
 - 6) капилляр Вестергрена наполняют пробой венозной крови;
 - 7) время измерения результата 60 ± 1 мин.
- Проба крови с ЭДТА имеет несколько преимуществ:
- 1) сохраняет морфологию эритроцитов;
 - 2) не влияет на механизмы, которые приводят к оседанию эритроцитов;
 - 3) повышает стабильность пробы крови;
 - 4) не вызывает проблем, связанных с разведением пробы крови цитратом натрия.

Любой другой метод определения СОЭ, перед его использованием в лаборатории в обязательном порядке должен быть подвергнут сравнению с «золотым стандартом» (эталонным методом). Кроме этих требований любой метод определения СОЭ в лаборато-

рии должен сопровождаться проведением следующих процедур контроля качества:

- 1) проведением 3-х уровневого контроля качества с использованием контрольных материалов или
- 2) внутренним статистическим контролем качества, основанным на постоянном усреднении результатов измерения проб пациентов;
- 3) участием во внешнем контроле качества.
- 4) контролем функциональных возможностей считывающих датчиков анализатора во время каждой промывки.

Лаборатория может использовать любой метод определения СОЭ отвечающего этим требованиям.

В 2017 г. группа экспертов ICSH опубликовала рекомендации по созданию уникального протокола валидации для методов определения СОЭ и предпосылок для контроля качества и представления результатов, чтобы обеспечить сопоставимость с эталонным методом [4]. Протокол валидации которой позволит специалистам лабораторий провести объективную оценку того, может ли конкретный модифицированный или альтернативный метод СОЭ применяться в лаборатории.

Минимальные процедуры проверки для новых модифицированных и альтернативных методов измерения СОЭ включают:

- 1) проведение сравнительного исследования метода «золотого стандарта» и нового метода или анализатора, чтобы определить их пригодность для разных групп пациентов;

- 2) проверить путем сравнения двух методов контрольные диапазоны, предоставленные производителем.

ICSH рекомендует рассматривать для практики лабораторий только методы, валидированные в соответствии с этими определенными критериями. Производители должны четко указать, можно ли проследить результаты, полученные на их инструментах, по методу Вестергрена.

Несмотря на эти усилия, стандартизация и сопоставимость методов СОЭ оставались неудовлетворительными. В первую очередь это обусловлено тем, что Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) и Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI) основные усилия направил не на строгую регламентацию процедур контроля качества при использовании методов СОЭ, а регламентацию и приведения к единому стандарту разнообразных методов определения СОЭ. Добиться этого не удалось, кроме того в результате этих усилий классический метод Вестергрена перестал быть золотым стандартом, подвергся модификации, и от оригинальной методики постановки СОЭ в настоящее время остался только капилляр Вестергрена. В связи с этим Международная организация по стандартизации (ISO) в настоящее время разрабатывает международный стандарт по методам определения СОЭ.

5. Контроль качества при определении СОЭ. Внутрилабораторный контроль качества (ВКК) является ключевой процедурой обеспечения качества результата лабораторного исследования на аналити-

ческом этапе. В КДЛ проведение ВКК регламентируется следующими документами:

- 1) приказом Минздрава РФ № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»;

- 2) Отраслевым стандартом (ОСТ 91500.13.0001-2003) «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»;

- 3) ГОСТ Р 15333 2-2008. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.

В Приказе Минздрава РФ от 07.02.2000 г. № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» указывается, что ВКК состоит в постоянном (повседневном, в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий: исследовании проб контрольных материалов или применении мер контроля с использованием проб пациентов. Целью ВКК является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности обнаружения недопустимой погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий. ВКК обязателен в отношении всех видов исследований, выполняемых в лаборатории.

ОСТ 91500.13.0001-2003 и ГОСТ Р 15333 2-2008 констатируют, что ВКК обязателен в отношении всех видов количественных исследований, выполняемых в лаборатории для которых разработаны контрольные материалы. Если для количественного метода контрольные материалы недоступны, рекомендуется использование других способов контроля качества с использованием проб пациентов: метод оценки воспроизводимости измерений аналита «по дубликатам», «по ежедневным средним».

Большим недостатком метода Вестергрена и модифицированных методов является отсутствие возможности осуществлять доступный ВКК. Правильнее говорить об отсутствии доступных коммерческих контрольных материалов 3-х уровней. Вместе с тем, результаты исследования параллельно тестируемых проб, проведенные Национальной академией клинической биохимии и стандартизации США показали достаточно высокую аналитическую вариацию даже для определения СОЭ методом Вестергрена – 18,99% [18]. Данные многих других публикаций свидетельствуют о том, что такой контроль в отношении метода Вестергрена является объективной необходимостью [19]. Поэтому проблема проведения ВКК в отношении методов измерения СОЭ в настоящее время является самой острой для практики лабораторий.

В 5-м издании (H02-A5) стандарта CLSI указывается на обязательность проведения 3-х уровнево-

го контроля качества с использованием контрольных материалов для применения метода измерения в лаборатории. Не смотря на то, что в стандарте указывается, что ВКК можно проводить внутренним статистическим контролем качества, основанным на постоянном усреднении результатов измерения проб пациентов. В реальности ежедневно такой контроль выполнить практически очень сложно и трудозатратно.

Если объективно рассмотреть состояние и возможность проведения ВКК (согласно регламентирующим документам) в отношении применяемых в нашей стране методов измерения СОЭ, то необходимо констатировать, что только в отношении альтернативного метода, основанного на измерении агрегации эритроцитов, этот контроль качества можно практически осуществить в полном объеме. Корреляция данной технологии с классическим методом Вестергрена составляет 94-99% [20, 21].

Для калибровки анализаторов компании Alifax и проведения регулярного контроля качества используются специальные латексные частицы. Наборы латексных контролей трех уровней выпускаются готовыми к использованию – низкий (3–6 мм/ч), средний (23–33 мм/ч) и высокий (60–80 мм/ч). На основании исследования контрольных материалов строится карта Леви-Дженнинга, а результаты регулярного ВКК оценивают согласно правилам Westgard.

В эпоху сертификации и аккредитации лабораторий, обеспечение качества результатов лабораторных исследований, в том числе СОЭ должно быть документировано. Не смотря на то, что измерение СОЭ должно проводиться со свежей пробой крови и ограничено во времени, на рынке представлено несколько стабилизированных образцов человеческой крови в качестве контрольных материалов для практики лабораторий. Проблему контрольных материалов для измерения СОЭ необходимо решать. Несколько десятилетий назад она стояла также остро в отношении гематологических анализаторов.

Заключение. История стандартизации методов измерения СОЭ привела к коренному изменению классического метода Вестергрена и использованию в практике лабораторий множества его модификаций, а также альтернативных методов. Вместо дигидрат тринатрийцитратом лимонной кислоты в качестве антикоагулянта, в эталонном методе стали применять ЭДТА, что привело к возможности исследовать пробу крови в течение 24 ч. Требование времени к снижению затрат на проведение лабораторных исследований при одновременном повышении безопасности пациентов и специалистов лаборатории указывает на то, что без автоматизации измерения СОЭ обойтись невозможно.

В настоящее время в лабораториях нашей страны используется множество модифицированных и альтернативных методов измерения СОЭ. Очевидно, что для реальной клинической практики необходимости в этом нет. Для клинической практики остро стоит вопрос качества результатов измерения СОЭ, их воспроизводимости и точности. Без систематического и полного ВКК решить проблему качества СОЭ не удастся.

Процедура ВКК в нашей стране строго регламентирована, однако в отношении большинства методов измерения СОЭ не работает. Приведенный выше анализ показал, что только метод агрегации эритроцитов соответствует требованиям по верификации и валидации аналитических измерительных процедур, хорошо стандартизирован и может быть легко встроен в менеджмент качества и аккредитации деятельности медицинских лабораторий.

В заключение необходимо отметить, что, несмотря на широкое применение в клинической практике, определение СОЭ имеет ограниченное диагностическое значение. Вместе с тем, большинство авторитетных экспертов в области клинической медицины, однозначно указывают на то, что диагностические возможности этого метода используются далеко не полностью, и основная проблема для практики отечественных лабораторий лежит в плоскости методических особенностей постановки теста и их качества. Если в отношении используемого в лаборатории метода измерения СОЭ не может быть выполнена процедура ВКК, то от использования метода в клинической практике полезней отказаться.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 12-21
см. REFERENCES)

9. Панченков Т.П. Определение оседания эритроцитов при помощи микрокапилляра. *Врачебное дело.* 1924; 16-17: 695-7.
11. Чижевский А.Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. Новосибирск: Наука; 1980.

REFERENCES

1. Hjortdahl P. Use of laboratories at a municipal health center. An analysis of volume, type of tests and economy. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 1989; 109: 1056-8.
2. Cantini F., Salvarani C., Olivieri I. et al. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in the evaluation of disease activity and severity in polymyalgia rheumatica: a prospective follow-up study. *Semin. Arthritis Rheum.* 2000; 30: 17-24.
3. Wolfe F., Pincus T. The level of inflammation in rheumatoid arthritis is determined early and remains stable over the longterm course of the illness. *J. Rheumatol.* 2001; 28: 1817-24.
4. Kratz A., Plebani M., Peng M., Lee Y.K., McCafferty R., Machin S.J. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int. J. Lab. Hem.* 2017; 1–10. DOI: 10.1111/ijlh.12693.
5. Biernacki E.F. Samoistna sedymentacja krwi jako naukowa, praktyczno-kliniczna metoda badania. *Gazeta Lekarska.* 1897; 17: 962–96.
6. Fahraeus R. The suspension-stability of the blood. *Acta Med. Scand.* 1921; 55: 1–7.
7. Westergren A. Studies of the suspension stability of the blood in pulmonary tuberculosis. *Acta Med. Scand.* 1921; 54: 247–82.
8. International Committee for Standardization in Haematology. Reference method for the sedimentation rate (ESR) test on human blood. *Br. J. Haematol.* 1973; 24: 671-4.
9. Panchenkov T.P. Determination of erythrocyte sedimentation using a microcapillary. *Vrachebnoe delo.* 1924; 16-17: 695-7. (in Russian)
10. Wintrobe M.M., Landsberg J.W. A standardized technique for the blood sedimentation test. *Am. J. Med. Sci.* 1936; 189:102-15.

ГЕМАТОЛОГИЯ

11. Chizhevskiy A.L. Biological mechanisms of the erythrocyte sedimentation reaction. Novosibirsk: Nauka; 1980. (in Russian)
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference procedure for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test. In: Approved Standard; NCCLS document H02-A2, 8. Villanova; NCCLS, 1988; 13-32.
13. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977; 66: 505-7.
14. International Committee for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology). Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41:1203-12.
15. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology). ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 198-203.
16. Jou J.M., Lewis S.M., Briggs C., et. al. ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33: 125-3.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Procedures for the Erythrocyte Sedimentation Rate Test; Approved Standard-Fifth Edition. H02-A5, May. 2011. ISBN 1-56238-754-5.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) «Reference and Selected Procedure for ESR Test; Approved standard- 4th ed.». 1992.
19. Plebani M., Piva E. Erythrocyte sedimentation rate: use of fresh blood for quality control. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117: 621-6.
20. de Jonge N., Sewkaransing I., Slinger J., Rijdsdijk J.J.M. Erythrocyte Sedimentation Rate by Test-1 Analyzer. *Clinical Chemistry.* 2000;46 (June): 881-2.
21. Lee B.H., Choi J., Gee M.S., Lee K.K., Park H. Basic Evaluation and Reference Range Assessment of TEST1 for the Automated Erythrocyte Sedimentation Rate. *Journal of Clinical Pathology and Quality Control.* 2002; 24 (1): 621-6.

Поступила 30.03.21
Принята к печати 21.04.21

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Суспицын Е.Н.^{1,2}, Раупов Р.К.¹, Кучинская Е.М.³, Костик М.М.^{1,3}

АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕРФЕРОН-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург, Россия

Интерфероны типа 1 (ИФН1) являются ключевыми молекулами противовирусной защиты, а также мощными медиаторами воспаления. В 2003 году было впервые установлено, что в клетках крови пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) наблюдалась повышенная экспрессия целого ряда генов, индуцированных интерферонами типа 1. Данный феномен получил название интерфероновой сигнатуры (type 1 interferon signature) или интерферонового профиля. В дальнейшем паттерны экспрессии, свидетельствующие о наличии ИФН1-профиля были обнаружены при разнообразных аутоиммунных и аутовоспалительных состояниях, которые либо наследуются в соответствии с законами Менделя, либо относятся к многофакторным заболеваниям. Количественным показателем, позволяющим оценить степень гиперактивации ИФН1-пути, является т.н. интерфероновый индекс (interferon score). В настоящем обзоре обсуждаются возможные причины изменения экспрессии интерферон-зависимых генов, клинико-лабораторные подходы к анализу интерферонового индекса, а также практическое использование этого индикатора для диагностики различных заболеваний.

Ключевые слова: интерфероны типа 1; ИФН1; интерфероновый индекс; интерферонопатии; аутоиммунные заболевания; обзор.

Для цитирования: Суспицын Е.Н., Раупов Р.К., Кучинская Е.М., Костик М.М. Анализ профиля экспрессии интерферон-зависимых генов для дифференциальной диагностики заболеваний иммунной системы (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (5): 279-284. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-279-284>

Suspitsin E.N.^{1,2}, Raupov R.K.¹, Kuchinskaya E.M.³, Kostik M.M.^{1,3}

ANALYSIS OF INTERFERON I SIGNATURE FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DISEASES OF THE IMMUNE SYSTEM (REVIEW OF LITERATURE)

¹St.-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, St.-Petersburg, Russia;

²N.N. Petrov Institute of Oncology, 197758, St.-Petersburg, Russia;

³Almazov National Medical Research Centre, 197341, St.-Petersburg, Russia

Type 1 interferons (IFN1) are both key molecules of antiviral defense and potent inflammatory mediators. In 2003, increased expression of a variety of interferon 1-regulated genes was observed in a blood cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). This phenomenon was called the type 1 interferon signature (IFN1-signature). Since then, expression patterns indicating the presence of an IFN1-signature were consistently detected in a range of monogenic and complex autoimmune and autoinflammatory conditions. A quantitative indicator reflecting the degree of hyperactivation of the IFN1 pathway is known as interferon score. This review discusses the possible causes of upregulated expression of interferon 1-induced genes, the laboratory approaches to the interferon score analysis, as well as the practical use of this indicator for the diagnosis of various conditions.

Key words: type 1 interferons; interferon score; interferonopathy; autoimmune disease, review.

For citation: Suspitsin E.N., Raupov R.K., Kuchinskaya E.M., Kostik M.M. Analysis of interferon type I signature for differential diagnosis of diseases of the immune system (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 279-284 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-279-284>

For correspondence: *Suspitsin E.N.*, MD, PhD; St.-Petersburg Pediatric Medical University; e-mail: evgeny.suspitsin@gmail.com

Information about authors:

Suspitsin E.N., <https://orcid.org/0000-0001-9764-2090>;

Raupov R.K., <https://orcid.org/0000-0001-7749-6663>;

Kuchinskaya E.M., <https://orcid.org/0000-0002-1383-3373>;

Kostik M.M., <http://orcid.org/0000-0002-1180-8086>.

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

Acknowledgment. *The study was supported by Russian Science Foundation grant 20-45-01005.*

Received 25.09.2020
Accepted 25.03.2021

Для корреспонденции: Суспицын Евгений Николаевич, канд. мед. наук, доц. каф. общей и мол. мед. генетики СПбГПМУ; ст. науч. сотр. лаб. мол. онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова; e-mail: evgeny.suspitsin@gmail.com

Интерфероны типа 1 (ИФН1), наиболее известными представителями которых являются интерфероны α и β , относятся к семейству цитокинов с противовирусными и иммуномодулирующими свойствами. Помимо важнейшей роли в качестве компонента врожденного иммунитета, они прямо и косвенно задействованы в регуляции клеточной пролиферации, ингибировании ангиогенеза и промоции апоптоза [1]. Биологические свойства ИФН1 достаточно давно нашли применение в медицине: рекомбинантные интерфероны используются для лечения гепатитов В и С, рассеянного склероза и некоторых опухолей [2].

Секреция интерферонов α и β индуцируется преимущественно в ответ на распознавание вирусных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) т.н. паттерн-распознающими рецепторами (PRR). К последним относятся расположенные в эндосомах рецепторы TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, а также цитозольные сенсоры нуклеиновых кислот RIG1, MDA5 и cGAS. Помимо микробных патогенов, паттерн-распознающие рецепторы могут быть активированы за счет молекул из поврежденных тканей или апоптотических клеток; нарушение распознавания собственных нуклеиновых кислот играет важнейшую роль в развитии аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний [3].

Все интерфероны типа 1 связываются с гетеродимерным рецептором IFNAR, который присутствует на поверхности большинства клеток. Посредством активации нескольких сигнальных каскадов, в первую очередь, канонического пути JAK/STAT, происходит усиление экспрессии ряда интерферонов и интерферон-индуцируемых генов (IFN-response genes, IRG). По-видимому, число последних может достигать 2000 [4]. Точная функция многих из них пока не изучена, однако, некоторые, такие как IRF5 и TLR7, стимулируют продукцию интерферона типа 1 [5]. При этом паттерны экспрессии IRG, как правило, специфичны для определенных типов клеток. Лишь ограниченное число этих молекул гиперэкспрессируется повсеместно и стабильно вне зависимости от того, какой именно стимул вызвал активацию сигнального каскада.

В норме индукция, интенсивность и продолжительность интерферонового ответа строго регулируется. Избыточная активация ИФН1-каскада может приводить к крайне неблагоприятным для организма последствиям – например, развитию тромботической микроангиопатии [6]. Нарушение регуляции ИФН1-опосредованного пути лежит в основе патогенеза ряда редких моногенных заболеваний, получивших название интерферопатий типа 1. К ним относятся синдромы Айкарди-Гутьерес, Синглтон-Мертен, хронический атипичный нейтрофильный дерматоз с липодистрофией и повышением температуры (CANDLE), STING-ассоциированная васкулопатия с началом в детском возрасте (SAVI) и т.д. [7]. Кроме того, гиперактивация ИФН1-каскада продемонстрирована при целом ряде аутоиммунных заболеваний многофакторной этиологии, в частности, при системной красной волчанке (СКВ), ювенильном дерматомиозите (ЮДМ), системной склеродермии и т.д. [8].

Причины гиперактивации ИФН1-пути. Усиление продукции ИФН-1 в ответ на вирусную инфек-

цию в основном происходит в плазмацитоидных дендритных клетках. Эта активация запускается и за счет эндогенных стимулов, например, образования аутоантител и иммунных комплексов, содержащих РНК или двухцепочечную ДНК [9]. Генерация аутоантител может быть, в частности, связана с процессом нетоза (NETosis) – разновидности запрограммированной клеточной гибели нейтрофилов с высвобождением т.н. нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NET). Деконденсированный хроматин, присутствующий в составе этих ловушек, может индуцировать продукцию альфа-интерферона дендритными клетками [10].

Компоненты комплемента в норме осуществляют удаление иммунных комплексов и апоптотических клеток, стимулируя их фагоцитоз моноцитами. Однако при дефиците «ранних» компонентов этой системы, например, отсутствии достаточного количества C1q, иммунные комплексы связываются вместо моноцитов с плазмацитоидными дендритными клетками, что приводит к активации продукции ИФН1 [11].

В случае моногенных интерферопатий одним из механизмов гиперактивации ИФН1-пути является повышенная чувствительность сенсоров нуклеиновых кислот – паттерн-распознающих рецепторов (MDA5, RIG-1, STING) – к собственным или чужеродным нуклеиновым кислотам. В частности, роль мутаций гена IFIH1, кодирующего белок-сенсор MDA5, продемонстрирована при целом ряде заболеваний, включая синдром Айкарди-Гутьерес, Синглтон-Мертен, моногенные формы СКВ и т.д. [12].

Еще одной причиной гиперактивации ИФН1 могут быть нарушения метаболизма нуклеиновых кислот, например, дефекты активности нуклеаз TREX1, SAMHD1, ADAR1, RNASEH2A, RNASEH2B, DNASE1, DNASE1L3 и т.д. В результате в цитоплазме накапливаются иммуногенные фрагменты собственной ДНК или РНК, которые в норме подвергаются утилизации [8].

В некоторых ситуациях гиперактивация ИФН1 происходит вследствие дефекта молекул, принимающих непосредственное участие в ИФН1-сигналинге. Например, белок USP18 негативно регулирует ИФН1-каскад за счет связывания с рецептором IFNAR2, что, в свою очередь не дает ему взаимодействовать с JAK1. Мутации USP18 вызывают очень редкое заболевание – т.н. псевдо-TORCH синдром типа 2, проявления которого могут напоминать очень тяжелую вирусную инфекцию [13].

Наконец, существует группа заболеваний, при которых точный механизм гиперактивации интерферонового пути неизвестен. К таким болезням относятся, в частности, синдромы COPA (COatomeг Protein complex subunit Alpha) и PRAAS (proteasome-associated autoinflammatory syndrome) [14].

Методы детекции интерферонового профиля. Прямая детекция уровня ИФН1 в крови пациентов представляется затруднительной, поскольку его физиологические концентрации очень низки. В связи с этим, применение традиционного иммуноферментного анализа (ELISA) не представляется возможным. Показано, что эта проблема может быть преодолена

путем использования ультрачувствительной разновидности метода ELISA – Single Molecular Array (Simoa), недавно предложенной компанией Quanterix. Simoa позволяет выявлять аттомолярные концентрации ИФН α , а также одновременно детектировать все 13 типов ИФН α [15]. Этот метод успешно использовался для мониторинга уровня ИФН α у пациентов с СКВ [16] и идиопатическими воспалительными миопатиями [17]. Однако, необходимость приобретения специального оборудования и реагентов ограничивает широкое применение Simoa, поэтому косвенные методы выявления гиперактивации интерфероновой пути по-прежнему доминируют.

Были разработаны тест-системы, основанные на функциональном анализе клеточных культур: cytopathic protection assay [18], recombinant replicon assay [19], gene reporter assays [20]. Упомянутые молекулярно-биологические методики, как правило, непригодны для практического применения в медицине ввиду сложности и отсутствия стандартизации, поэтому главным направлением исследований активности ИФН1-пути стала оценка РНК-экспрессии интерферон-индуцируемых генов.

Впервые повышение экспрессии ряда интерферон-индуцируемых генов было выявлено у пациентов с СКВ с помощью метода РНК-микрочипов [21,22]. Данный феномен получил название интерфероновой сигнатуры (IFN1 signature, ИФН1-сигнатура, ИФНС). В дальнейшем ряд исследований подтвердил устойчивое наличие характерного паттерна экспрессии ИФН1-зависимых генов у больных с СКВ, а также выявил его присутствие у пациентов с рядом других ревматологических заболеваний (дерматомиозит, системная склеродермия, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, синдром Айкарди-Гутьерес [23–32]. Несмотря на то, что профиль гиперэкспрессии ИФН1-зависимых генов обладает определенной специфичностью при различных заболеваниях, по-видимому, можно выделить несколько «универсальных» генов, стабильно отражающих наличие активацию интерфероновой сигнального каскада. После того, как удалось выделить наиболее информативные ИФН1-индуцируемые гены, основными методами детекции ИФНС стали количественная ПЦР в реальном времени (с предварительной обратной транскрипцией РНК) и, в меньшей степени, технология NanoString [33]. Последняя позволяет одновременно анализировать до нескольких сотен индивидуальных транскриптов [34]. В отличие от ПЦР в режиме реального времени, метод NanoString основан на прямой гибридизации молекул РНК со специфическими пробами, содержащими уникальные идентификаторы (баркоды); это позволяет снизить погрешности косвенного измерения транскриптов, возникающие на этапе обратной транскрипции. Сравнение ПЦР и NanoString продемонстрировало хорошую конкордантность двух методов; при этом преимуществом NanoString является большая степень автоматизации процесса [35]. В то же время, ПЦР, в отличие от NanoString, не является «закрытой» системой и не требует специального оборудования, т.е., оценка ИФН1-сигнатуры может

проводиться практически в любой современной молекулярно-генетической лаборатории.

Как правило, для оценки наличия интерфероновой сигнатуры используется т.н. интерфероновый индекс (interferon score, IFN score). Этот показатель оценивает изменение экспрессии исследуемых генов у больных в сравнении с здоровыми донорами; обычно анализируется сумма стандартизированной экспрессии исследуемых генов и рассчитываются пороговые значения, превышение которых свидетельствует об активации ИФН1-зависимого сигнального каскада [33]. Значительное повышение ИФН1-индекса выявлено при ряде редких интерферопатий – дефиците аденозин-дезаминазы 2 (DADA2), синдромах CANDLE, SAVI [36,37], COPA [38], семейной ознобленной волчанке [39] – соответственно, данный тест может оказать существенную помощь в диагностике этих состояний. Определение ИФН1-индекса в совокупности с изучением цитокинового профиля и секвенированием нового поколения позволило выделить несколько ранее неизвестных нозологических форм в группе пациентов с недифференцированными системными аутовоспалительными заболеваниями [40].

Различные исследовательские коллективы предлагают использовать для анализа интерфероновой сигнатуры различные наборы генов – их число варьирует от 5-6 [26,31] до нескольких десятков [40]. Наиболее часто применяется анализ 6 генов (IFI27, IFI44L, IFIT1, ISIG15, RSAD2, SIGLEC1) [32].

Некоторые исследователи используют менее универсальные сочетания транскриптов, выделяя индексы IFN-A и IFN-B [41] и добиваясь таким образом большей специфичности. Например, score A позволяет дифференцировать больных СКВ от пациентов с ревматоидным артритом (РА), тогда как score B позволяет отличить лиц с СКВ и РА от здоровых индивидуумов [42].

Сравнение данных измерения ИФН1-индекса, полученных в разных лабораториях, представляется проблематичным, учитывая использование разных панелей генов, разных исследуемых состояний и разных контрольных групп. Недавнее методологическое исследование показало, что проблему нормализации данных можно решить за счет использования стандартного набора пулированных образцов здоровых индивидуумов, верифицированных методом РНК-секвенирования [43].

По-видимому, могут влиять на результат и особенности преаналитического этапа. Для обеспечения сохранности РНК кровь исследуемых помещается в специальные пробирки. Существует два основных вида пробирок для забора крови, предлагаемые компаниями PreAnalytiX (PAXgene Blood RNA tubes) и ThermoFisher Scientific (Tempus Blood RNA tubes); экстракция РНК осуществляется с помощью соответствующих коммерческих наборов. По данным некоторых авторов, использование разных преаналитических систем может приводить к различиям в результатах измерения экспрессии [44,45], в том числе и при оценке экспрессии ИФН-индуцируемых генов IFI44L и IFIT1 [46]. В то же время, исследование

базовой и интерферон-индуцированной экспрессии в цельной крови здоровых доноров свидетельствует о хорошей корреляции между образцами, хранившимися в разных пробирках [47].

Прогностическое значение интерфероновой профили. Исследования транскриптома свидетельствуют, что пациенты с низким и высоким ИФН1-индексом могут существенно различаться в отношении активности течения различных ревматических заболеваний [48]. По всей видимости, развитие ИФН1-сигнатуры является ранним событием в патогенезе СКВ и других аутоиммунных состояний, поэтому величина ИФН1-индекса может иметь прогностическое значение. В частности, из 118 пациентов с повышенным уровнем антинуклеарного фактора (АНФ) и наличием максимум одного симптома СКВ у 14 больных в течение года развилась СКВ и у 5 – первичный синдром Шегрена. У всех пациентов, развивших аутоиммунное заболевание, уровни IFN-score А и, в более значительной степени, IFN-score В оказались выше по сравнению с теми, у кого заболевание не прогрессировало [49]. В то же время, в другом исследовании у бессимптомных субъектов, позитивных в отношении наличия антинуклеарных антител, ИФН1-профиль коррелировал с титром антител, но не являлся предиктором развития системного аутоиммунного заболевания [50].

Исследование экспрессии 12 ИФН1-индуцированных генов (IP10, IFI44L, IFIT3, LY6E, MX1, SERPING1, IFITM1, IRF7, STAT1, C1QA, IFI16, IRF9) у 39 пациентов с СКВ и 29 с вероятной СКВ показало, что половина пациентов с вероятной СКВ имела повышенный ИФН1-индекс. Повышение индекса было значимо ассоциировано с низким уровнем компонентов комплемента С3 и С4, наличием специфических антител и повышенным уровнем IgG, что свидетельствует о более высоком риске прогрессирования заболевания. У пациентов с СКВ повышенный уровень ИФН1-индекса коррелировал с поражением кожи, алопецией и более высокими значениями индекса клинической активности SLEDAI [51].

ИФН-индекс позволяет дифференцировать подтипы идиопатических воспалительных миопатий, что, в свою очередь, открывает перспективы выбора таргетной терапии в зависимости от выявленного подтипа. При анализе мышечных биоптатов было выявлено, что миозит с включениями (inclusion body myositis) и миозит в структуре антисинтетазного синдрома ассоциированы с сигнатурой интерферонов типа 2, классический дерматомиозит – только с ИФН1-сигнатурой, а некротизирующий миозит – ни с одной из них [52].

Связь с активностью ревматических заболеваний. Начиная с пионерских работ, посвященных исследованию ИФН1-сигнатуры [21,22], была многократно подтверждена связь между наличием этого феномена и тяжестью течения СКВ [53–55]. В частности, при изучении 5 ИФН1-индуцированных генов (LY6E, OAS1, OASL, MX1, ISG15) у 48 пациентов с СКВ выявлена достоверная зависимость между высоким ИФН1-индексом и активностью СКВ по индексу SELENA-SLEDAI. Пациенты с волчаночным нефритом имели более высокие показатели ИФН1-индекса.

Уровень экспрессии LY6E позволял дифференцировать активный и неактивный нефрит, тогда как у пациентов с вовлечением нервной системы корреляции с ИФН1-индексом не было выявлено. Высокий ИФН1-индекс ассоциирован с наличием антител к двухцепочечной ДНК и гипокомплементемией [56]. В другом исследовании, несмотря на ассоциацию уровня 5-генного ИФН1-индекса и активности СКВ в исходной точке, при измерении в динамике наблюдалась слабая корреляция [57].

Результаты ряда работ свидетельствуют, что связь между ИФН1-индексом и клиническими параметрами активности СКВ, системной склеродермии и синдрома Шегрена зависит от уровня экспрессии гена BAFF (B-cell activating factor) [26,58,59]. Во многих исследованиях была доказана взаимосвязь между активностью кожного поражения при дерматомиозите и наличием ИФН1-сигнатуры [22,25,60–62].

Данные, полученные отечественными ревматологами, свидетельствуют о наличии позитивной корреляции между величиной ИФН1-индекса, уровнем экспрессии ИФН1-стимулированного гена EPST11, и длительностью терапии метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом [63].

Подходы к патогенетической терапии. Установление важнейшей роли гиперактивации ИФН1-пути в развитии аутоиммунных заболеваний привело к попыткам фармакологического подавления ИФН-сигнатуры. Достаточно успешным оказалось блокирование ИФН1-сигнального каскада с помощью ингибиторов янус-киназ (барицитиниб, тофацитиниб) [64]; следует отметить, что столь мощная иммуносупрессия приводит к развитию оппортунистических инфекций у некоторых пациентов с интерферонопатиями. Применение человеческих моноклональных антител к ИФН-α показало неплохие результаты в отношении снижения ИФН1-индекса и снижения показателей активности СКВ и дерматомиозита [65–67].

Предпринимаются успешные попытки активной иммунизации, направленной на выработку нейтрализующих антител к ИФН-α с помощью киноидов – производных цитокинов, обладающих иммуногенностью, но лишенных биологической активности [68]. Перспективным подходом является непосредственное воздействие на главные продуценты ИФН1 – плазмацитоидные дендритные клетки посредством блокирования лектина BDCA2 (Blood dendritic cell antigen 2), экспрессируемого на их поверхности [69,70].

Заключение. Исследование ИФН1-сигнатур является перспективным направлением современной ревматологии. Определение ИФН1-индекса может эффективно использоваться для мониторинга активности как многофакторных аутоиммунных заболеваний, так и редких моногенных интерферонопатий и аутовоспалительных синдромов. С технической точки зрения, оценка этого показателя с помощью ПЦР в режиме реального времени обладает хорошей воспроизводимостью и может быть внедрена в любой лаборатории, обладающей соответствующим оборудованием.

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ 20-45-01005.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8-62, 65-70
см. REFERENCES)

7. Насонов Е.Л., Авдеева А.С. Иммуновоспалительные ревматические заболевания, связанные с интерфероном типа I: новые данные. *Научно-практическая ревматология*. 2019; 57(4):452–61.
63. Авдеева А.С., Четина Е.В., Черкасова М.В., Маркова Г.А., Артюхов А.С., Дашинамаев Э.Б., Насонов Е.Л. Экспрессия интерферон-стимулированных генов (интерфероновый «автограф») у пациентов с ревматоидным артритом: предварительные результаты. *Научно-практическая ревматология*. 2020; 58(6):673–77.
64. Насонов Е.Л., Авдеева А.С., Лиля А.М. Эффективность и безопасность тофацитиниба при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (часть I). *Научно-практическая ревматология*. 2020; 58(1):62–9.

REFERENCES

1. Ivashkiv L.B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; 18:545–58.
2. Rizza P., Moretti F., Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN- α : Implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2010; 43(3):204–9.
3. Barrat F.J., Crow M.K., Ivashkiv L.B. Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease. *Nat. Immunol.* 2019; 20:1574–83.
4. Hertzog P., Forster S., Samarajiwa S. Systems biology of interferon responses. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(1):5–11.
5. Forster S. Interferon signatures in immune disorders and disease. *Immunol. Cell Biol.* 2012; 90:520–27.
6. Kavanagh D., McGlasson S., Jury A., Williams J., Scolding N., Belamy C. et al. Type I interferon causes thrombotic microangiopathy by a dose-dependent toxic effect on the microvasculature. *Blood*. 2016; 128(24):2824–33.
7. Nasonov E.L., Avdeeva A.S. Immunoinflammatory rheumatic diseases associated with type I interferon: new evidence. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2019; 57(4):452–61. (in Russian)
8. Demirkaya E., Sahin S., Romano M., Zhou Q., Aksentijevich I. New Horizons in the Genetic Etiology of Systemic Lupus Erythematosus and Lupus-Like Disease: Monogenic Lupus and Beyond. *J. Clin. Med.* 2020; 9(3):712.
9. Rönnblom L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups. J. Med. Sci.* 2011; 18:227–37.
10. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(21):9813–18.
11. Hagberg N., Rönnblom L. Systemic Lupus Erythematosus – A Disease with A Dysregulated Type I Interferon System. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82:199–7.
12. Rice G.I., Del Toro Duany Y., Jenkinson E.M., Forte G.M.A., Anderson B.H., Ariaudo G. et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat. Genet.* 2014; 46(5):503–9.
13. Meuwissen M.E.C., Schot R., Buta S., Oudesluijs G., Tinschert S., Speer S.D. et al. Human USP18 deficiency underlies type I interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *J. Exp. Med.* 2016; 213(7):1163–74.
14. Davidson S., Steiner A., Harapas C.R., Masters S.L. An Update on Autoinflammatory Diseases: Interferonopathies. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2018; 20(7):38.
15. Rodero M.P., Decalf J., Bondet V., Hunt D., Rice G.I., Werneke S. et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J. Exp. Med.* 2017; 214(5):1547–55.
16. Mathian A., Mouries-Martin S., Dorgham K., Devilliers H., Barnabei L., Ben Salah E. et al. Monitoring Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus With Single-Molecule Array Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Quantification of Serum Interferon- α . *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71(5):756–65.
17. Melki I., Devilliers H., Gitiaux C., Bondet V., Belot A., Bodemer C. et al. Circulating Interferon- α Measured With a Highly Sensitive Assay as a Biomarker for Juvenile Inflammatory Myositis Activity: Comment on the Article by Mathian et al. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72(1):195–7.
18. Kuri T., Habjan M., Penski N., Weber F. Species-independent bioassay for sensitive quantification of antiviral type I interferons. *Virology*. 2010; 7:50.
19. Widman D.G. Bioassay for the measurement of type-I interferon activity. *Methods Mol. Biol.* 2013; 1031:91–6.
20. Rees P.A., Lowy R.J. Measuring type I interferon using reporter gene assays based on readily available cell lines. *J. Immunol. Methods* 2018; 461:63–72.
21. Bennett L., Palucka A.K., Arce E., Cantrell V., Borvak J., Banchereau J. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 2003; 197(6):711–23.
22. Baechler E.C., Batliwalla F.M., Karypis G., Gaffney P.M., Ortmann W.A., Espe K.J. et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(5):2610–15.
23. Liu M., Liu J., Hao S., Wu P., Zhang X., Xiao Y. et al. Higher activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus patients with a high type I IFN score: relation to disease activity. *Clin. Rheumatol.* 2018; 37(10):2675–84.
24. Psarras A., Emery P., Vital E.M. Type I interferon-mediated autoimmune diseases: Pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2017; 56: 1662–75.
25. Greenberg S.A., Higgs B.W., Morehouse C., Walsh R.J., Won Kong S., Brohawn P. et al. Relationship between disease activity and type I interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun.* 2012; 13(3):207–13.
26. Brkic Z., Van Bon L., Cossu M., Van Helden-Meeuwse C.G., Vonk M.C., Knaapen H. et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(8):1567–73.
27. Lübbbers J., Brink M., Van De Stadt L.A., Vosslander S., Wesseling J.G., Van Schaardenburg D. et al. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72(5):776–80.
28. Bodewes I.L.A., Versnel M.A. Interferon activation in primary Sjögren's syndrome: recent insights and future perspective as novel treatment target. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2018; 14(10):817–29.
29. Yao Y., Richman L., Higgs B.W., Morehouse C.A., De Los Reyes M., Brohawn P. et al. Neutralization of interferon- α/β -inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon- α monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(6):1785–96.
30. Higgs B.W., Liu Z., White B., Zhu W., White W.I., Morehouse C. et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(11):2029–36.
31. Rice G.I., Melki I., Frémond M.L., Briggs T.A., Rodero M.P., Kitabayashi N. et al. Assessment of Type I Interferon Signaling in Pediatric Inflammatory Disease. *J. Clin. Immunol.* 2017; 37(2):123–32.
32. Rice G.I., Forte G.M.A., Szykiewicz M., Chase D.S., Aeby A., Abdel-Hamid M.S. et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: A case-control study. *Lancet Neurol.* 2013; 12(12):1159–69.
33. Lamot L., Niemietz I., Brown K.L. Methods for type I interferon detection and their relevance for clinical utility and improved understanding of rheumatic diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2019; 37(6):1077–83.
34. Geiss G.K., Bumgarner R.E., Birditt B., Dahl T., Dowidar N., Dunaway D.L. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(3):317–25.
35. Pescarmona R., Belot A., Villard M., Besson L., Lopez J., Mosnier I. et al. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine*. 2019; 113:446–52.

36. Kim H., De Jesus A.A., Brooks S.R., Liu Y., Huang Y., Vantries R. et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. *J. Interf. Cytokine Res.* 2018; 38(4):171–85.
37. Skrabl-Baumgartner A., Plecko B., Schmidt W.M., König N., Herschfield M., Gruber-Sedlmayr U. et al. Autoimmune phenotype with type I interferon signature in two brothers with ADA2 deficiency carrying a novel CECR1 mutation. *Pediatr. Rheumatol.* 2017; 22:15(1).
38. Volpi S., Tsui J., Mariani M., Pastorino C., Caorsi R., Sacco O. et al. Type I interferon pathway activation in COPA syndrome. *Clin. Immunol.* 2018; 187:33–6.
39. König N., Fiehn C., Wolf C., Schuster M., Cura Costa E., Tüngler V. et al. Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Ann. Rheum. Dis.* 2017; 76(2):468–72.
40. de Jesus A.A., Hou Y., Brooks S., Malle L., Biancotto A., Huang Y. et al. Distinct interferon signatures and cytokine patterns define additional systemic autoinflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 2020; 130(4):1669–82.
41. El-Sherbiny Y.M., Psarras A., Yusof M.Y.M., Hensor E.M.A., Tooze R., Doody G. et al. A novel two-score system for interferon status segregates autoimmune diseases and correlates with clinical features. *Sci Rep.* 2018; 8(1).
42. Chiche L., Jourde-Chiche N., Whalen E., Presnell S., Gersuk V., Dang K. et al. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type I and type II interferon signatures. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(6):1583–95.
43. Pin A., Monasta L., Taddio A., Piscianz E., Tommasini A., Tesser A. An Easy and Reliable Strategy for Making Type I Interferon Signature Analysis Comparable among Research Centers. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 2019; 9(3).
44. Yip L., Fuhlbrigge R., Atkinson M.A., Fathman C.G. Impact of blood collection and processing on peripheral blood gene expression profiling in type I diabetes. *BMC Genomics* 2017; 18(1):1–16.
45. Menke A., Rex-Haffner M., Klengel T., Binder E.B., Mehta D. Peripheral blood gene expression: It all boils down to the RNA collection tubes. *BMC Res. Notes.* 2012; 5:1.
46. Skogholt A.H., Ryeng E., Erlandsen S.E., Skorpen F., Schönberg S.A., Sætrum P. Gene expression differences between PAXgene and Tempus blood RNA tubes are highly reproducible between independent samples and biobanks. *BMC Res. Notes.* 2017; 10(1):136.
47. Lamot L., Niemietz I., Brown K.L. Comparable type I interferon score determination from PAXgene and Tempus whole blood RNA collection and isolation systems. *BMC Res. Notes.* 2019; 12(1).
48. Brohawn P.Z., Streicher K., Higgs B.W., Morehouse C., Liu H., Illei G. et al. Type I interferon gene signature test—low and —high patients with systemic lupus erythematosus have distinct gene expression signatures. *Lupus* 2019; 28(13):1524–33.
49. Md Yusof M.Y., Psarras A., El-Sherbiny Y.M., Hensor E.M.A., Dutton K., Ul-Hassan S. et al. Prediction of autoimmune connective tissue disease in an at-risk cohort: Prognostic value of a novel two-score system for interferon status. *Ann. Rheum. Dis.* 2018; 77(10).
50. Wither J., Johnson S.R., Liu T., Noamani B., Bonilla D., Lisnevskaja L. et al. Presence of an interferon signature in individuals who are anti-nuclear antibody positive lacking a systemic autoimmune rheumatic disease diagnosis. *Arthritis Res. Ther.* 2017; 19(1).
51. Lambers W.M., De Leeuw K., Doornbos-Van Der Meer B., Diercks G.F.H., Bootsma H., Westra J. Interferon score is increased in incomplete systemic lupus erythematosus and correlates with myxovirus-resistance protein A in blood and skin. *Arthritis Res. Ther.* 2019; 21(1).
52. Rigolet M., Hou C., Baba Amer Y., Aouizerate J., Periou B., Gherardi R.K. et al. Distinct interferon signatures stratify inflammatory and dysimmune myopathies. *RMD Open* 2019; 5(1).
53. Bauer J.W., Petri M., Batliwalla F.M., Koeuth T., Wilson J., Slattery C. et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(10):3098–107.
54. Nikpour M., Dempsey A.A., Urowitz M.B., Gladman D.D., Barnes D.A. Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67(8):1069–75.
55. Kirou K.A., Lee C., George S., Louca K., Peterson M.G.E., Crow M.K. Activation of the interferon- α pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(5):1491–503.
56. Feng X., Wu H., Grossman J.M., Hanvivadhanakul P., FitzGerald J.D., Park G.S. et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(9):2951–62.
57. Landolt-Marticorena C., Bonventi G., Lubovich A., Ferguson C., Unnithan T., Su J. et al. Lack of association between the interferon- α signature and longitudinal changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 68(9):1440–46.
58. Brkic Z., Maria N.I., Van Helden-Meeuwse C.G., Van De Merwe J.P., Van Daele P.L., Dalm V.A. et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren’s syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72(5):728–35.
59. Landolt-Marticorena C., Wither R., Reich H., Herzenberg A., Scholley J., Gladman D.D. et al. Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B Cells in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2011; 38(4):642–51.
60. Reed A.M., Peterson E., Bilgic H., Ytterberg S.R., Amin S., Hein M.S. et al. Changes in novel biomarkers of disease activity in juvenile and adult dermatomyositis are sensitive biomarkers of disease course. *Arthritis Rheum.* 2012 Dec; 64(12):4078–86.
61. Walsh R.J., Sek W.K., Yao Y., Jallal B., Kiener P.A., Pinkus J.L. et al. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(11):3784–92.
62. Kim H., Gunter-Rahman F., McGrath J.A., Lee E., De Jesus A.A., Targoff I.N. et al. Expression of interferon-regulated genes in juvenile dermatomyositis versus Mendelian autoimmune interferonopathies. *Arthritis Res Ther.* 2020; 22(1).
63. Avdeeva A.S., Tcheta E.V., Cherkasova M.V., Markova G.A., Artyuhov A.S., Dashinimaev E.B., Nasonov E.L. The expression of interferon-stimulated genes (interferon “signature”) in patients with rheumatoid arthritis (preliminary results). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2020; 58(6):673–77. (in Russian)
64. Nasonov E.L., Avdeeva A.S., Lila A.M. Efficacy and safety of tofacitinib for immunemediated inflammatory rheumatic diseases (part 1). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2020; 58(2):214–24. (in Russian)
65. Merrill J.T., Wallace D.J., Petri M., Kirou K.A., Yao Y., White W.I. et al. Safety profile and clinical activity of sifalimumab, a fully human anti-interferon α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: A phase I, multicentre, double-blind randomised study. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(11):1905–13.
66. Khamashta M., Merrill J.T., Werth V.P., Furie R., Kalunian K., Illei G.G. et al. Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(11):1909–16.
67. Higgs B.W., Zhu W., Morehouse C., White W.I., Brohawn P., Guo X. et al. A phase 1b clinical trial evaluating sifalimumab, an anti-IFN- α monoclonal antibody, shows target neutralisation of a type I IFN signature in blood of dermatomyositis and polymyositis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73(1):256–62.
68. Bizzini B., Drouet B., Zagury D., Abitbol M., Burny A., Boissier M.C. Kinoids: A family of immunogens for active anticytokine immunotherapy applied to autoimmune diseases and cancer. *Immunotherapy.* 2010; 2(3):347–65.
69. Pellerin A., Otero K., Czerkowiec J.M., Kerns H.M., Shapiro R.I., Ranger A.M. et al. Anti- BDCA 2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7(4):464–76.
70. Furie R., Werth V.P., Merola J.F., Stevenson L., Reynolds T.L., Naik H. et al. Monoclonal antibody targeting BDCA2 ameliorates skin lesions in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 2019; 129(3):1359–71.

Поступила 25.09.20

Принята к печати 25.03.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Шершнева Н.Н.¹, Марданлы С.С.^{1,2}, Кленяев И.Н.¹, Самосадова П.В.¹.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ГЕРПЕСВИРУСАМ 1 И 2 ТИПОВ

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

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия

Разработан российский набор реагентов «ВПГ-1-Флюороген-скрин» и «ВПГ-2-Флюороген-скрин» для определения в реакции иммунофлюоресценции антител классов М и G к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов. Исследование на сыроворотках стандартной панели положительных и отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», показало 100% чувствительность и специфичность нового набора. 125 сывороток крови людей с клиническими диагнозами: герпетическая, цитомегаловирусная инфекции, пиелонефрит, конъюнктивит и поражение центральной нервной системы были параллельно протестированы в иммуноферментных тест-системах разных производителей и в разработанных наборах. При исследовании этих образцов наблюдалась высокая степень совпадения результатов с наборами сравнения. Разработанные диагностикумы могут успешно применяться в клинической практике как для скрининга, так и для верификации результатов в диагностике герпесвирусных инфекций, вызванных вирусами простого герпеса 1 и 2 типов.

Ключевые слова: ВПГ-1; ВПГ-2; разработка; иммунофлюоресцентная диагностика.

Для цитирования: Шершнева Н.Н., Марданлы С.С., Кленяев И.Н., Самосадова П.В. Разработка иммунофлюоресцентных диагностикумов для выявления антител к герпесвирусам 1 и 2 типов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (5): 285-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-285-290>

Shershneva N.N.¹, Mardanly S.S.^{1,2}, Klenyaev I.N.¹, Samosadova P.V.¹

DEVELOPMENT OF IMMUNOFLUORESCENT DIAGNOSTICS FOR THE DETERMINATION OF IGM AND IGG ANTIBODIES TO HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1 AND 2

¹EKOlab, 142530, Moscow Region, Elektrogorsk, Russia;

²National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N. F. Gamalei of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

The Russian kits «HSV-1-Fluorogen-screen» and «HSV-2-Fluorogen-screen» have been developed for the determination of antibodies M and G to herpes simplex virus types 1 and 2 by the immunofluorescence reaction. The kits were used to examine the positive and negative standard «EKOlab» panels sera and showed 100% sensitivity and specificity of the developed tests. 125 samples of blood serum from people with clinical diagnoses such as herpetic, cytomegalovirus infections, pyelonephritis, conjunctivitis and central nervous system damage were tested in parallel with using the enzyme-linked immunosorbent assay systems from different manufacturers and the developed tests «HSV-1-Fluorogen-screen» and «HSV-2-Fluorogen-screen». A high degree of matching of results with comparison sets was observed in examined samples. The developed diagnostics can be successfully used in clinical practice both for screening and for verification of results of the diagnosis of herpesvirus infections caused by herpes simplex virus types 1 and 2.

Key words: HSV-1; HSV-2; development; diagnostics; immunofluorescence assay.

For citation: Shershneva N.N., Mardanly S.S., Klenyaev I.N., Samosadova P.V. Development of immunofluorescent diagnostics for the determination of IgM and IgG antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 285-290 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-285-290>

For correspondence: *Shershneva N.N.*, Sc.Cand., Head of science and production department of ToRCH and IFA of «EKOlab»; e-mail: nata.sher@bk.ru

Information about authors:

Shershneva N.N., <https://orcid.org/0000-0002-9229-3765> ;

Samosadova P.V., <https://orcid.org/0000-0003-0033-6754>;

Mardanly S.S., <https://orcid.org/0000-0002-4440-6075>;

Klenyaev I.N., <https://orcid.org/0000-0002-9612-4432>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 08.04.2021

Accepted 19.04.2021

Введение. Одной из актуальных проблем современной мировой медицины является высокая заболеваемость герпесвирусной инфекцией (ГВИ). По дан-

ном ВОЗ, частота инфицирования населения мира герпесвирусами составляет 95-99% [1-3]. Для пациентов с иммунодефицитными состояниями (больных

Для корреспонденции: Шершнева Наталья Николаевна, канд. биол. наук, нач. научно-производственного отделения «ТоRCH, РИФ» ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: nata.sher@bk.ru

СПИДом, пациентов после трансплантации, онкологических больных) эта инфекция представляет особую опасность, так как приводит к тяжелой болезни и в некоторых случаях к летальному исходу [4 - 6]. Отмечено также неблагоприятное, а порой и фатальное влияние герпесвирусов в перинатальной патологии, так как они нарушают эмбриогенез, вызывают спонтанные аборт и плацентарную недостаточность, что в свою очередь приводит к врожденным патологиям плода [7 - 9].

Современная эпидемиологическая и клиническая диагностика невозможна без применения комплекса современных лабораторных методов. В качестве скрининговых методов при диагностике ГВИ рекомендуется использовать ПЦР, ИФА и РИФ, а в качестве подтверждающего – метод выделения герпеса на чувствительных клеточных культурах [10]. Вирусологический метод недоступен большинству медицинских учреждений, так как культивирование с использованием клеточных культур является процессом трудоемким, дорогостоящим, а также требующим высокой квалификации персонала. К числу зарекомендовавших себя современных иммунохимических технологий относят ИФА и реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РИФ), позволяющих с высокой степенью клинической информативности определять в крови больного присутствие иммуноглобулинов (Ig), направленных против антигенов возбудителя заболеваний [11 - 13].

Различают две разновидности реакции иммунофлюоресценции: прямой и непрямой. При прямом методе метят антитела, которые непосредственно взаимодействуют с исследуемым антигеном. В непрямом методе с исследуемым антигеном сначала взаимодействуют специфические к нему антитела, а уже с ними – антивидовые антитела, меченые флюорохромом. Учет результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа, в оптическую систему которого устанавливается набор светофильтров, обеспечивающих освещение препарата ультрафиолетовым или сине-фиолетовым светом с заданной длиной волны. Исследователь оценивает интенсивность и характер свечения [14,15].

Достоинствами РИФ являются: высокая специфичность и чувствительность; простота техники постановки; минимальное количество компонентов и оборудования для проведения анализа. Это метод относится к экспресс-методам, так как в течение двух часов можно получить ответ.

Необходимо отметить, что в настоящее время отечественных коммерческих тест-систем для выявления антител к герпесвирусам методом РИФ не существует.

В связи с этим целью исследования было улучшить серодиагностику ГВИ и разработать иммунофлюоресцентные диагностикумы для определения IgM и IgG антител к вирусу простого герпеса 1 и 2 типа. Оценить показатели чувствительности и специфичности на подтвержденном клиническом материале.

Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: нарабатывать инфицированную вирусами простого герпеса

1 и 2 типа культуру; подобрать условия сорбции и фиксации антигена на поверхности предметных стекол; приготовить готовые к применению лабораторные серии иммунофлюоресцентных диагностикумов и оценить их диагностические возможности.

Материал и методы. *Вирус.* Использовали штаммы «ВН» вируса простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) и «УС» вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1), полученные из лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Клетки. Эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартышки (линия Vero) фирмы ATCC (США) культивировали в среде RPMI-1640 фирмы «Биолот» (Россия), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров (Gibco, Великобритания).

Приготовление антигена ВПГ-1 и ВПГ-2. Клетки Vero заражали вирусами ВПГ-1 штамм «УС» и ВПГ-2 штамм «ВН» в разведении 1:400 и 1: 800. Культивировали в среде RPMI-1640 в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 150 см² при температуре 37°С. Когда цитопатическое действие вируса охватывало не более 60 % площади монослоя проводили трипсинизацию вирусосодержащего инокулята. Вирусный материал инактивировали и наносили по 50 мкл в лунки обезжиренных предметных стекол. Предметные стекла с сорбированным антигеном инкубировали при температуре 37°С в течение 15-16 ч. По истечении этого времени фиксировали антиген на поверхности предметных стекол раствором, содержащим ацетон.

Приготовление конъюгатов. Поликлональные кроличьи антитела к IgG и IgM человека, метили в щелочной среде флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ; «Sigma», США) согласно стандартной методике.

В качестве клинического материала использовали 125 сывороток крови людей проходящих обследование в лабораторно-диагностическом подразделении клинического центра при 1 МГМУ им. Сеченова с различными клиническими диагнозами (герпетическая, цитомегаловирусная инфекции, пиелонефрит, внутриутробные инфекции, конъюнктивит и поражение центральной нервной системы).

В качестве контрольной группы использовали сыворотки здоровых детей в возрасте от 1 до 14 лет из лаборатории «INVITRO».

Результаты и обсуждение. При разработке диагностикума принцип действия, которого основан на реакции непрямой иммунофлюоресценции, решили следующие задачи:

- определили оптимальные инфекционные дозы для вирусных штаммов при заражении клеток Vero.
- подобрали оптимальный состав остальных компонентов тест-системы (буферные растворы для разведения сывороток и конъюгата)
- отработали оптимальные условия проведения реакции (время инкубации, разведение клинического материала).

Нами были подобраны оптимальные разведения вирусных штаммов для заражения в течение 15-16 часов. Дело в том, что для удобства в учете результатов зараженность клеточного монослоя не долж-

Результаты реакции иммунофлюоресценции в диагностикумах для выявления антител классов М и G к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов

Стандартная панель предприятия	ВПГ-1-Флюороген		ВПГ-2-Флюороген	
	- IgG	- IgM	- IgG	- IgM
Положительная по ВПГ 1 (СОП+214)	4+	4+	-	-
Отрицательная по ВПГ 1 (СОП-214)	-	-	-	-
Положительная по ВПГ 2 (СОП+202)	-	-	4+	4+
Отрицательная по ВПГ 2 (СОП-202)	-	-	-	-

Примечание. Интенсивное желто-зеленое свечение на (4+) – положительный результат (+); полное отсутствие флюоресценции - отрицательный результат (-).

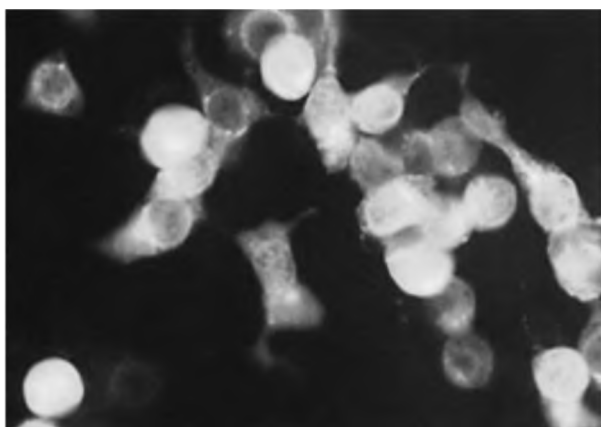


Рис. 1. Фотография положительного результата реакции на ВПГ-1-IgG.

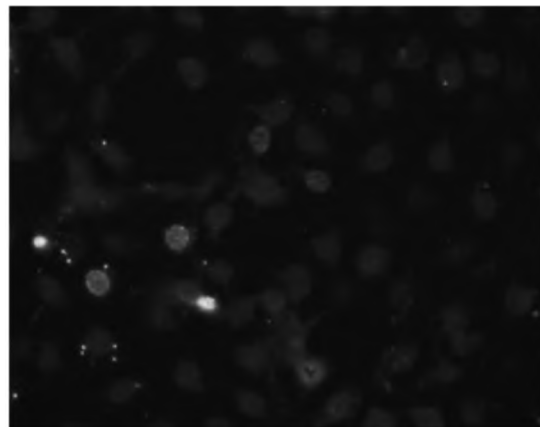


Рис. 2 Фотография отрицательного результата реакции на ВПГ-1-IgG.

на превышать 60 % от площади лунки предметного стекла.

При постановке реакции иммунофлюоресценции, как и других иммунологических реакций широко используют буферные растворы, значение рН и солевой состав которых обеспечивает хорошую растворимость и подвижность молекул иммуноглобулинов, и их быструю диффузию через поры клеток. Кроме того, рН является важным фактором, влияющим на интенсивность специфической люминесценции изолированных клеток [16]. Учитывая это, были проведены специальные исследования с целью изучения состава и рН раствора для разведения сывороток на результаты РИФ. Обнаружено влияние рН растворов на интенсивность свечения клеток и фона. При инкубации сывороток, разведенных в фосфатном буферном растворе с рН 7,0, наблюдалась наибольшая яркость свечения. При разведении в ацетатном буфере интенсивность значительно снижалась из-за влияния на люминесценцию ацетат-иона. При разведении в дистиллированной воде тоже наблюдалась низкая интенсивность свечения. Слабая флюоресценция была также отмечена при использовании трисбуфера из-за способности его основного компонента тригидросиметиланиометана гасить люминесценцию.

Взаимодействие антител с антигенами – это сложный абсорбционно-химический процесс, скорость которого зависит от воздействия температуры инкубаций [17]. Были отработаны режимы постанов-

ки реакции при 24°C и 37°C. При 24°C наблюдался рост люминесценции до определенного предела, достигнув которого, яркость становилась постоянной и не зависела от времени контакта с сыворотками и конъюгатом. При 24°C стабилизация интенсивности свечения отмечалась за более короткий промежуток времени, чего не скажешь о реакции при 37°C, которая шла значительно быстрее и не стабилизировалась в течение 30 минут. Наилучшие показатели чувствительности и специфичности были при инкубации сывороток и конъюгата в течение 30 мин при 24°C.

Для определения активности полученных конъюгатов подбирали рабочее разведение, дающее оптимальную люминесценцию комплекса антиген-антитело снижающую вероятность неспецифического окрашивания клеток. В лунки предметных стекол с сорбированными антигенами ВПГ-1 и ВПГ-2 добавляли двукратные разведения конъюгатов от 1/100 до 1/1200. Рабочие разведения конъюгатов составили – 1/600 для IgG и 1/300 для IgM. Разведение сывороток (диагностический титр) составило 1:20.

Чувствительность и специфичность разработанных наборов вначале оценили на сыворотках стандартной панели положительных и отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», содержащих IgG и IgM к ВПГ-1 и ВПГ-2. Результаты данного исследования приведены в таблице.

Результаты, приведенные в таблице, показывают полное совпадение оценок сывороток панелей пред-

IMMUNOLOGY

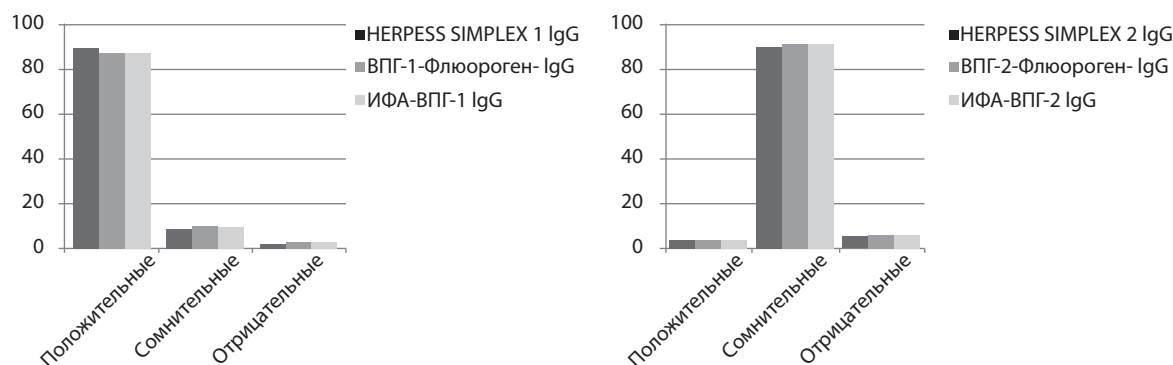


Рис. 3. Выявление антител класса G к ВПГ-1 и ВПГ-2 в различных тест-системах.

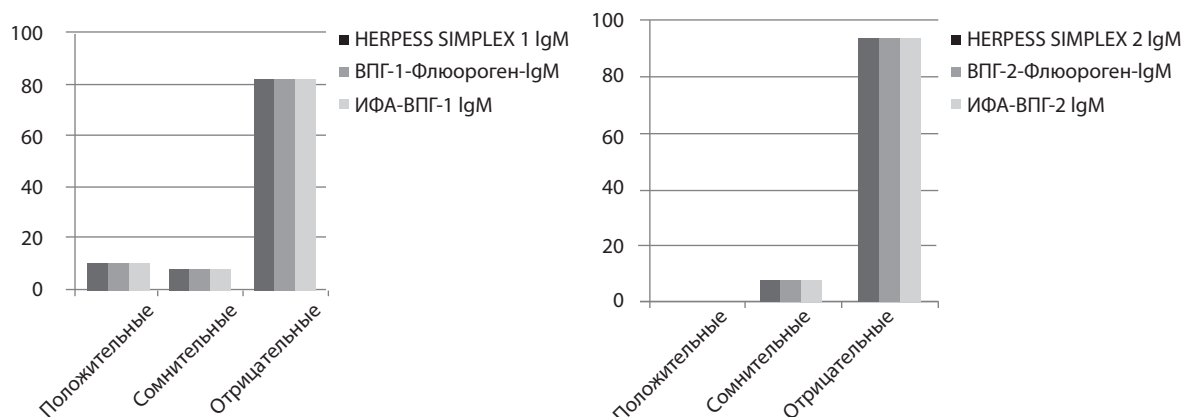


Рис. 4. Выявление антител класса M к ВПГ-1 и ВПГ-2 в различных тест-системах.

приятая с исходными характеристиками, что является свидетельством 100% аналитической чувствительности и специфичности. У положительных по ВПГ-1 и ВПГ-2 сывороток наблюдалось специфическое свечение цитоплазмы и ядра клеток интенсивностью от (2+) до (4+) в колониях из 1-3 клеток (рис. 1). Полное отсутствие свечения или едва различимое свечение цитоплазмы всех клеток (неспецифическая реакция с Fc-рецепторами) являлось показателем отрицательной реакции (рис. 2).

Для оценки диагностической (клинической) чувствительности и специфичности было исследовано 125 сывороток. Предварительно их протестировали на наличие антител классов M и G к ВПГ-1 и ВПГ-2 в иммуноферментных коммерческих тест-системах производства ЗАО «ЭКОлаб» (Россия) и «БиоХим-Мак».

Предварительное исследование на наличие IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2 в скрининговых иммуноферментных тест-системах «HERPES SIMPLEX 1/2 IgG» фирмы «Биохиммак» показало наличие IgG к ВПГ-1 у 112(89,6%) образцов (из них 4(3,2%) образца содержали IgG к ВПГ-2). 2(1,6%) были сомнительными по ВПГ-1 и 6(4,8%) по ВПГ-2. Отсутствие IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2 было у 11(8,8%) и 113(90,4%) образцов. В иммуноферментных тест-системах ЗАО «ЭКОлаб» антитела были обнаружены к ВПГ-1 у 110(88%), к ВПГ-2 у 4(3,2%), сомнительными к ВПГ-1 оказались

3(2,4%) образца, а к ВПГ-2 – 7(5,6%). Отрицательный результат был по ВПГ-1 у 12(9,6%), а по ВПГ-2 у 114(91,2%). При исследовании образцов в реакции иммунофлюоресценции наблюдалась различной степени интенсивность желто-зеленого свечения клеток, инфицированных ВПГ-1 и ВПГ-2 в поле зрения микроскопа, что свидетельствует о наличии антител класса G к ВПГ-1 у 110(87,2%), к ВПГ-2 у 4(3,2%). Образцы с очень слабым желто-зеленым свечением расценивались как сомнительные. Из 125 в РИФ у 2(1,6%) по ВПГ-1 и у 7(5,6%) по ВПГ-2 сомнительные результаты. Отрицательные результаты были получены в 13(10,4%) по ВПГ-1 и в 114(91,2%) по ВПГ-2 случаях (рис. 3).

Аналогичным образом была проведена оценка 125 сывороток на наличие антител классов M к ВПГ-1 и ВПГ-2. В наборах сравнения IgM к ВПГ-1 и ВПГ-2 было выявлено в 13(10,4%) и 1(0,8%) случае. Сомнительные результаты были в 10(8%) по ВПГ-1 и 7(5,6%) по ВПГ-2. Антитела класса M к ВПГ-1 отсутствовали у 102(81,6%), к ВПГ-2 у 117(93,6%). При исследовании этих образцов в тест-системах методом иммуноферментного анализа и в разработанных диагностикумах основанных на реакции иммунофлюоресценции наблюдалось 100-процентное совпадение результатов с наборами сравнения (рис. 4).

Специфичность разработанных тест-систем была оценена на 100 сыворотках здоровых детей, не содер-

жащих антител классов М и G вирусам простого герпеса 1 и 2 типов. При исследовании этих образцов в реакции иммунофлюоресценции наблюдалось 100% совпадение результатов. В поле зрения микроскопа наблюдалось едва различимое свечение или его полное отсутствие – результат отрицательный.

Выводы. При постановке непрямой реакции иммунофлюоресценции наилучшие показатели чувствительности и специфичности наблюдались при разведении сывороток в 20 раз в фосфатно-солевом буферном растворе с рН=7,2. Оптимальные рабочие разведения конъюгатов для IgG -1/600, а для IgM-1/300. Инкубация в течении 30 минут при температуре 24°C сводит к минимуму неспецифическое связывание флюоресцирующих антител.

Специфичность у разработанных иммунофлюоресцентных наборов для выявления специфических IgG к ВПГ-1 выше, чем в иммуноферментных тест-системах. Два образца положительных по результатам ИФА в наборах фирмы «Биохиммак» дали отрицательные результаты в аналогичных ИФА фирмы «ЭКОлаб». Эти же данные были подтверждены в реакции иммунофлюоресценции: в поле зрения микроскопа наблюдалось полное отсутствие специфического свечения – результат отрицательный. По остальным образцам было полное совпадение результатов во всех тест-системах.

При исследовании на наличие IgM к ВПГ-1 и ВПГ-2 методом иммуноферментного анализа и в разработанных диагностикумах основанных на реакции иммунофлюоресценции наблюдалось 100% совпадение результатов с наборами сравнения.

В связи с этим диагностикумы могут успешно применяться в клинической практике как для скрининга, так и для верификации результатов в диагностике этих герпесвирусных инфекций. Непрямая реакция иммунофлюоресценции обладает высокой диагностической эффективностью и наряду с иммуноферментным анализом может использоваться в практической медицине для серодиагностики герпесвирусов. Разработанные наборы успешно прошли регистрационные испытания и на сегодняшний день внедрены в широкую практику здравоохранения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 14 см. REFERENCES)

1. Chayavichitsilp P., Buckwalter J.V., Krakowski A.C., Sheila F. Friedlander. HerpesSimplex. *Pediatrics in Review*. 2009; 30(4): 119-29.
2. Вирус простого герпеса. Всемирная организация здравоохранения Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. (дата обращения: 02.04.2021).
3. Марданлы С.Г. Герпесвирусные инфекции. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
4. Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В.. Распространенность вирусов герпеса человека среди контингентов различного возраста. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 2: 50.
5. Панченко Л.А., Кириченко И.И., Ходак Л.А.. Возбудители герпесвирусных инфекций и наиболее важные клинические проявления у человека. *Провизор*. 1999; 10: 24-8.

6. Богатырева Л.Н. Врожденная инфекция, вызванная вирусом простого герпеса (*Herpes simplex*): этиология, патогенез, клиническая картина, диагностика, лечение, профилактика. *Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования*. 2019; 1: 46.
7. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А., Амелина Е.А. Герпесвирусные инфекции: особенности патогенеза, диагностика, лечение. *Медицинский алфавит*. 2012; 4 (20): 48-50.
8. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. Герпетическая инфекция (простой герпес). Этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, лечение. *Электронный журнал «ЭКОлаб»*; 2011.
9. Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Савинков П.А., Бошьян Р.Е., Лысенкова М.Ю., Корниенко М.Н. и др. Значение герпесвирусов в этиологии ряда инфекционных и соматических заболеваний детей. *Детские инфекции*. 2017; 16(3):10—9.
10. Павлюк А.С. Методы лабораторной диагностики заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса. *Заболевания, передаваемые половым путем*. 1994; 3: 3-7.
11. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. Инфекции TORCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2018.
12. Марданлы С.Г., Авдонина А.С., Марданлы С.С., Шершнева Н.Н. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вирусов простого герпеса первого и второго типов методом иммунного блоттинга в формате Western-Line-Blot. *Медицинский алфавит*. 2017; 4 (38): 33-40.
13. Марданлы С.Г., Томашевская Н.А., Мухина А.И., Гвильдис И.Ю., Кириллова Л.Д., Хожайнова М.П. Опыт использования комплекса тест-систем для диагностики инфекций TORCH-группы. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; 5: 65-9.
14. Michael R. Lewis, Jim Y. Kao, Anne-Line J. Anderson, John E. Shively and Andrew Raubitschek. An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjugate chemistry*. 2001; 12 (2): 320-4.
15. Марданлы С.Г. Иммуноферментные тест-системы ЗАО «ЭКОлаб» для диагностики простого герпеса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 2: 35-8.
16. Алексеев Ю.Д., Савенкова Е.Н. Виды специфического свечения в реакции иммунофлюоресценции (риф). *Проблемы экспертизы в медицине*. 2013; 13(2): 25-6.
17. Марданлы С.Г. Задачи и перспективы совершенствования клинической лабораторной диагностики инфекций группы TORCH. *Вестник службы крови России*. 2013; 2: 54-60.

REFERENCES

1. Chayavichitsilp P., Buckwalter J.V., Krakowski A.C., Sheila F. Friedlander. HerpesSimplex. *Pediatrics in Review*. 2009; 30(4): 119-29.
2. Herpes simplex virus. World health organization. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. (accessed 02.04.2021).
3. Mardanyly S. G. Herpes simplex infections. [Герпесвирусные инфекции]. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
4. Mardanyly S. G., Arsen'eva V.A., Mardanyly S.S., Rotanov S.V.. The prevalence of human herpes viruses among contingents of different ages. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 2: 50. (in Russian)
5. Panchenko L.A., Kirichenko I.I., Khodak L.A. The causative agents of herpesvirus infections and the most important clinical manifestations in humans. *Provizor*. 1999; 10: 24-8.
6. Bogatyreva L.N. Congenital infection caused by the herpes simplex virus (Herpes simplex): etiology, pathogenesis, clinical picture, diagnosis, treatment, prevention. *Meditsina. Sotsiologiya. Filosophiya. Prikladnye issledovaniya*. 2019; 1: 46. (in Russian)

IMMUNOLOGY

7. Mardanly S.G., Kirpichnikova G.I., Neverov V.A., Amelina E.A.. Herpesvirus infections: features of pathogenesis, diagnosis, treatment. *Meditsinskiy alfavit*. 2012; 4 (20): 48-50. (in Russian)
8. Mardanly S. G., Kirpichnikova G. I., Neverov V. A. Herpes infection (herpes simplex). Etiology, epidemiology, pathogenesis, clinic, laboratory diagnostics, treatment. Elektrogorsk: ZAO «EKOLab»; 2011. (in Russian)
9. Rybalkina T.N., Karazhas N.V., Savinkov P.A., Bosh'yan R.E., Ly-senkova M.Yu., Kornienko M.N. et al. The importance of herpes vi-ruses in the etiology of a number of infectious and somatic diseases in children. *Detskie infektsii*. 2017; 16(3):10—9. (in Russian)
10. Pavlyuk A.S. Methods of laboratory diagnosis of diseases caused by the herpes simplex virus. *Zabolevaniya, peredavaemye polovym putem*. 1994; 3: 3-7. (in Russian)
11. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Infections of the TORCH group: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. [Infekcii ToRCH-gruppy: klinicheskaya laboratornaya diagnostika, epidemiologicheskij nadzor i kontrol']. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarno-tekhnologicheskii universitet; 2018. (in Russian)
12. Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mardanly S.S., N. N. Shershneva N.N. Development of a set of reagents for the detection of class G antibodies to individual antigens of herpes simplex viruses of the first and second types by immune blotting in the Western-Line-Blot format. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 38 (4): 33-40. (in Russian)
13. Mardanly S.G., Tomashevskaya N.A., Muhina A.I, Gvil'dis I.YU., Kirillova L.D, Hozhainova M.P. Experience in using a complex of test systems for diagnosing infections of the TORCH group. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; 5: 65-9. (in Russian)
14. Michael R. Lewis, Jim Y. Kao, Anne-Line J. Anderson, John E. Shively and Andrew Raubitschek. An improved method for con-jugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjugate chemistry*. 2001; 12 (2): 320-4.
15. Mardanly S.G. Immunoassay test systems of CJSC «EKOLab» for the diagnosis of herpes simplex. *Klinicheskaya laboratornaya diag-nostika*. 2008; 2: 35-8. (in Russian)
16. Alekseev Yu.D., Savenkova E.N. Types of specific fluorescence in the reaction of immunofluorescence (IFA). *Problemy ekspertizy v meditsine*. 2013; 13 (2); 25-6. (in Russian)
17. Mardanly S.G. Tasks and prospects for improving the clinical labo-ratory diagnosis of infections of the TORCH group. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2013; 2: 54-60. (in Russian)

Поступила 08.04.21
Принята к печати 19.04.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Лапштаева А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ НАСТУПЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», 430005, Саранск, Россия

Цель работы – провести анализ взаимосвязи между сывороточной концентрацией IL-1α, носительством генотипа rs1800587 (C/T) его гена и тиреотропным гормоном (ТТГ), гормонами щитовидной железы (трийодтиронином (Т3) и тетраiodтиронином (Т4)), и оценить прогностическую значимость их сочетаний у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в рамках программы ЭКО. Обследованы 120 пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, обратившихся для проведения программы ЭКО. В зависимости от исхода процедуры было выделено 2 группы пациенток: 1 группа – 40 женщин, у которых наступила беременность после ЭКО, 2 группа – 80 пациенток, у которых беременность не наступила. Содержание IL-1α, ТТГ, Т3, Т4 определяли в крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Проводили генотипирование по полиморфному маркеру rs1800587 (C/T) гена IL-1α. Показатели ТТГ, Т3, Т4 были в пределах нормы у обеих групп. В проведенном нами исследовании, женщины с концентрацией ТТГ от 0,23 до 1,7 нмоль/л имели шанс благоприятного исхода ЭКО в 1,4 раза выше, чем с другими уровнями ТТГ ($p=0,042901$); с уровнем Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л имели шанс забеременеть в 5,7 раз выше, чем с другими уровнями Т3 ($p=0,00002$). Для концентрации Т4 критерий достоверности достигнут не был ($p=0,068505$). Отдельно взятые показатели IL-1α, ТТГ, Т3 и носительство генотипа гена IL-1α на прекоцептивном этапе обладают более низкой диагностической ценностью, чем их совместное сочетание. Максимальной прогностической ценностью обладают три сочетания: сочетание генотипа T/T гена IL-1α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 нмоль/л – OR=8,1 ($p = 0,000048$); сочетание IL-1α от 28,7 до 85,1 пг/мл, генотипа T/T гена IL-1α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 нмоль/л – OR=8,1 ($p = 0,000048$); сочетание IL-1α от 28,7 до 85,1 пг/мл, генотипа T/T гена IL-1α, уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 нмоль/л и уровня Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л – OR=8,1 ($p = 0,000146$). Таким образом, предложены новые прогностические маркеры эффективности программ ЭКО.

Ключевые слова: IL-1α; цитокины; предикторы ЭКО; rs1800587 (C/T) гена IL-1α; ТТГ; гормоны щитовидной железы; Т3, Т4.

Для цитирования: Лапштаева А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н. Лабораторные предикторы наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (5): 291-296. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-291-296>

Lapshtaeva A.V., Sychev I.V., Goncharova L.N.

LABORATORY PREDICTORS OF PREGNANCY IN VITRO FERTILIZATION

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Ogarev Mordovia State University», 430005, Saransk, Russia

Identification of factors determining both of favorable and unfavorable outcome of IVF will increase the effectiveness of this method and optimize infertility treatment. The aim of the research is to analyze the correlation between serum IL-1α concentration, its gene rs1800587 (C/T) genotype carrier and thyroid-stimulating hormone (TSH), thyroid hormones (triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4)), and evaluate the prognostic significance of their combinations in women with tube-peritoneal infertility under the IVF program. 120 patients with tube-peritoneal infertility who applied for an IVF program were examined. Depending on the outcome of the procedure, 2 groups of patients were allocated: 1 group – 40 women who had a pregnancy after IVF, 2 group – 80 patients who did not have a pregnancy. The content of IL-1α, TSH, T3, T4 was determined in blood by ELISA. Genotyping was performed on the rs1800587 (C/T) polymorphic marker of the IL-1α gene. TSH, T3, T4 were within the norm for both groups. In our study, women with a TSH concentration of 0.23 to 1.7 nmol/L had a chance of a favorable IVF outcome 1.4 times higher than with other TSH levels ($p = 0.042901$); with a T3 level of 1.0 to 1.8 nmol/L had a chance of becoming pregnant 5.7 times higher than with other levels of T3 ($p = 0.00002$). For T4 concentration, the confidence test was not achieved ($p = 0.068505$). The individual indicators of IL-1α, TSH, T3 and carrier of the genotype of the gene IL-1α at the preconceptive stage have lower diagnostic value than their combined combination. Three combinations have maximum predictive value: a combination of the T/T genotype of the IL-1α gene and the TSH level of 0.23 to 1.7 nmol/l – OR = 8.1 ($p = 0.000048$); combination of IL-1α of 28.7 to 85.1 pg/ml, T/T gene genotype IL-1α and TSH level of 0.23 to 1.7 nmol/l – OR = 8.1 ($p = 0.000048$); combination of IL-1α of 28.7 to 85.1 pg/ml, T/T gene genotype IL-1α, TSH level of 0.23 to 1.7 nmol/l and T3 level of 1.0 to 1.8 nmol/l – OR = 8.1 ($p = 0.000146$). Thus, proposed new prognostic markers of IVF program effectiveness.

Key words: IL-1α; cytokines; predictors of IVF; rs1800587 (C/T) gene IL-1α; TSH; thyroid hormones; T3; T4.

For citation: Lapshtaeva A.V., Sychev I.V., Goncharova L.N. Laboratory predictors of pregnancy in vitro fertilization. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 291-296 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-291-296>

Information about authors:

Lapshtaeva A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4828-2476>;

Sychev I.V., <https://orcid.org/0000-0002-6454-2349>;

Goncharova L.N. <https://orcid.org/0000-0002-1450-7158>.

For correspondence: Lapshtaeva A.V., PhD (Medicine), Docent of Department of Immunology, Microbiology and Virology; e-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Received 09.12.2020
Accepted 14.01.2021

Для корреспонденции: Лапштаева Анна Васильевна, канд. мед. наук, доц. каф. иммунологии, микробиологии и вирусологии; e-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Введение. В последние годы все большую актуальность приобретает поиск клиничко-лабораторных параметров пациенток, обладающих прогностической ценностью и дающих возможность до начала стимуляции суперовуляции предсказать исход процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Определение шансов наступления беременности на преемственном этапе позволит включить в программу ЭКО наиболее перспективных в физиологическом плане пациенток, что позволит обеспечить персонализированный подход к каждой женщине, оптимизировать процесс лечения, избежать лишней гормональной нагрузки и повысить результативность процедуры.

В предыдущих работах нами было установлено, что интерлейкин-1 α (IL-1 α) (в концентрации от 28,7 до 85,1 пг/мл) и полиморфный вариант T/T rs1800587 гена IL-1 α обладают прогностической значимостью и могут быть использованы в качестве ранних маркеров благоприятного исхода программы ЭКО у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием [1].

Безусловно, IL-1 α играет фундаментальную роль в ремоделировании тканей и создании воспалительно-подобного иммунного ответа при имплантации эмбриона и децидуализации [2], регулируя экспрессию других цитокинов, факторов роста и молекул адгезии в эпителиальных и стромальных клетках эндометрия [3, 4]. На самой бластоцисте экспрессируются рецепторы к IL-1 α [5].

В свою очередь, гормоны щитовидной железы тоже влияют на взаимодействие плода и матери через взаимодействие с рецепторами тиреоидных гормонов и рецепторами тиреотропного гормона (ТТГ), присутствующими на эндометрии и трофобласте во время имплантации [6]. В настоящее время накоплены данные о тесной двунаправленной связи и регуляции между нейроэндокринной и иммунной системами. Гормоны щитовидной железы оказывают влияние на различные иммунные клетки – моноциты, макрофаги, естественные клетки-киллеры и лимфоциты, регулируя хемотаксис, фагоцитоз, генерацию активных форм кислорода и выработку цитокинов [7 – 14]. Известно, что взаимодействие между эндокринной и иммунной системами способствуют развитию патофизиологических состояний, включая сепсис, воспаление и аутоиммунные заболевания [15].

Изменения концентрации гормонов щитовидной железы могут по-разному влиять на иммунологические показатели [7-14]. Однако данные результаты немногочисленны и противоречат друг другу, поэтому трудно установить четкую корреляцию между иммунной функцией и гипер- или гипотиреоидными состояниями.

Безусловно, многие из неудачных попыток ЭКО происходят из-за системных факторов, которые оказывают воздействие на материнскую среду и отрицательно влияют на способность эмбриона к имплантации. В этой связи важен комплексный анализ возможного влияния нескольких факторов, в том числе и для их оптимизации и коррекции с целью достижения наибольших шансов на успех процедуры для каждой пациентки.

Цель работы – провести анализ взаимосвязи между сывороточной концентрацией IL-1 α , носительством генотипа rs1800587 (С/Т) его гена и ТТГ, гормонами щитовидной железы и оценить прогностическую значимость их сочетаний у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в рамках программы ЭКО.

Материал и методы. На базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ РМ «Мор-

довский республиканский клинический перинатальный центр» было отобрано 120 пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием для проведения программы ЭКО. Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биопроб. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Возраст женщин в среднем составил 33,4 \pm 3,8 года. Включением в исследование явилось: трубно-перитонеальная форма бесплодия; нормофункция щитовидной железы, подтвержденная результатом определения ТТГ, гормонов щитовидной железы (трийодтиронина (Т3) и тетрайодтиронина (Т4)), антител к тиреопероксидазе и УЗИ; отсутствие противопоказаний к ЭКО. Все пациентки были обследованы согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». В качестве единого протокола был применен короткий протокол стимуляции суперовуляции. Диагностика беременности проводилась на основании определения в сыворотке концентрации β -субъединицы хорионического гонадотропина (ХГч) через 14 дней после переноса эмбрионов в полость матки и ультразвуковой диагностики клинической беременности с целью оценки наличия одного или двух плодных яиц в полости матки через 21 день после переноса эмбрионов.

Путем ретроспективного анализа в зависимости от исхода процедуры было выделено 2 группы пациенток: 1-я группа – 40 женщин, у которых наступила беременность после ЭКО, 2-я группа – 80 пациенток, у которых беременность не наступила. Группы были сопоставимы по возрасту и анамнестическим данным.

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь, полученная на 3-4 день менструального цикла, предшествующего процедуре ЭКО. Содержание IL-1 α , ТТГ, Т3, Т4 определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. За нормальные значения были приняты следующие показатели: ТТГ – 0,23-3,4 мкМЕ/мл, Т3 – 1,0-2,8 нмоль/л, Т4 – 10-25 нмоль/л.

Для молекулярно-генетического исследования использованы образцы крови, собранные в вакутайнер с ЭДТА в объеме 5 мл. Выделение ДНК проводили на автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот QIAcube, используя комплект реагентов QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). ДНК-типирование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием по Сэнгеру. Амплификацию фрагмента гена IL-1 α , содержащий полиморфный локус, проводили с использованием подобранных в рамках настоящего исследования праймеров в двух отдельных реакциях. Для подбора праймеров использовали Интернет-ресурс Primer-BLAST и референсную нуклеотидную последовательность NM_000575.5 из базы данных NCBI. Секвенирование очищенных продуктов ПЦР осуществляли на анализаторе ABI PRISM 3500 с использованием наборов для циклического секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли используя программы Sequence Scanner v.1.0, Peak Trace, Vector NTI Advance 10, Chromas Lite 2.1.1.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Stat Soft Statistica 10.0 (США). Учтывая, что данные подчинялись нормально-

му распределению, для анализа различий между количественными признаками использовалась описательная статистика с использованием *t*-критерия Стьюдента, а для оценки взаимосвязи между показателями проводился линейный корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Пирсона (*r*). Пороговый уровень значимости для коэффициента корреляции был принят при *r*>0,3. Для оценки ассоциаций генотипов с наступлением беременности использовался критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов было проверено на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Значимость выявленных различий и взаимосвязей во всех видах анализа была принята при уровне значимости *p*< 0,05.

Результаты. Показатели ТТГ, Т3, Т4, были в пределах нормы у обеих групп. Проводя сравнительный анализ содержания ТТГ и Т4 у обследованных женщин достоверных различий между группами выявлено не было (*p*>0,05 во всех случаях), в то время как содержание Т3 было достоверно ниже в группе женщин с наступившей беременностью (*p*=0,000087) (табл. 1).

Анализируя взаимосвязь между IL-1 α и ТТГ, Т3, Т4 у женщин из группы с благоприятным исходом ЭКО обнаружена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между IL-1 α и ТТГ (*p*=0,000096) (табл. 2). У женщин с неблагоприятным исходом процедуры ЭКО взаимосвязи между изучаемыми показателями выявлено не было (*p*>0,05 во всех случаях).

Учитывая полученные ранее данные о прогностической значимости полиморфного варианта Т/Т гена IL-1 α [1], нами был проведен анализ содержания ТТГ и гормонов щитовидной железы в зависимости от носительства полиморфного варианта гена IL-1 α (табл. 3). Содержание ТТГ было наименьшим у носителей генотипа Т/Т по сравнению с пациентками-носителями других генотипов (*p*<0,05 во всех случаях). У женщин-носителей благоприятного генотипа Т/Т с благоприятным исходом ЭКО, содержание ТТГ составило 1,6 (1,3-1,7) мкМЕ/мл и было достоверно ниже, чем у женщин-носителей благоприятного генотипа Т/Т с неблагоприятным исходом процедуры (*p*=0,009098).

Было установлено, что у носителей условно благоприятного генотипа Т/Т содержание Т3 составило 1,6 (1,5-1,8) нмоль/л и было достоверно ниже, чем у носи-

телей других генотипов (*p*<0,05 во всех случаях), при разделении внутри группы в зависимости от исхода процедуры содержание Т3 не различалось (*p*>0,05 во всех случаях). В группе женщин с наступившей беременностью содержание Т3 различалось между носителями генотипов С/Т и С/С гена IL-1 α (*p*=0,014896), в то время как в группе женщин с неблагоприятным исходом процедуры у носителей благоприятного генотипа Т/Т уровень Т3 был достоверно ниже, чем у носителей других генотипов (*p*<0,05 во всех случаях). Содержание Т3 у пациенток-носителей генотипов С/Т и С/С из группы с наступившей беременностью было достоверно ниже, чем у носителей этих же генотипов из группы сравнения (*p*<0,05 во всех случаях).

Содержание Т4 у носителей благоприятного генотипа Т/Т не различалось от пациенток с другими генотипами (*p*>0,05 во всех случаях). У носителей генотипа С/Т уровень Т4 был достоверно выше, чем у носителей генотипа С/С (*p*=0,002130).

Для оценки прогностической роли полученных концентраций гормонов был проведен расчет отношения шансов – OR (табл. 4). Установлено, что женщины с концентрацией ТТГ от 0,23 до 1,7 нмоль/л имели шанс благоприятного исхода ЭКО в 1,4 раза выше, чем женщины с другим уровнем ТТГ (*p*=0,042901). Пациентки с концентрацией Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л имели шанс забеременеть в 5,7 раз выше, чем с другими уровнями Т3 (*p* = 0,00002). Женщины с концентрацией Т4 от 10,0 до 14,2 нмоль/л имели шанс развития беременности в 1,2 раза выше, однако критерий достоверности достигнут не был (*p*=0,068505).

Для оценки комплексного вклада на исход процедуры далее была изучена прогностическая значимость комбинаций выявленных показателей: концентрации IL-1 α от 28,7 до 85,1 пг/мл, носительства генотипа Т/Т rs1800587, концентрации ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл, концентрации Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л. Результаты представлены в табл. 4. Следует отметить, что максимальной прогностической ценностью обладают три сочетания: сочетание носительства генотипа Т/Т гена IL-1 α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл – OR=8,1 (*p*=0,000048); сочетание IL-1 α от 28,7 до 85,1 пг/мл, носительства генотипа Т/Т гена IL-1 α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл – OR=8,1 (*p*=0,000048); сочетание IL-1 α 28,7-85,1 пг/мл, генотипа Т/Т гена IL-1 α , уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл и уровня Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л – OR=8,1 (*p*=0,000146).

Таблица 1

Содержание ТТГ, Т3, Т4 у обследованных женщин

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=80)	Достоверность различий
ТТГ, мкМЕ/мл	2,1	2,1	0,970431
Т3, нмоль/л	1,7	2,3	0,000087
Т4, нмоль/л	13,9	13,4	0,269228

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа между IL-1 α и ТТГ, Т3, Т4 в крови у обследованных женщин

Показатель	Все обследованные женщины (n=120)		1 группа (n=40)		2 группа (n=80)	
	R	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
ТТГ	-0,212489	0,019806	-0,577506	0,000096	0,023439	0,836501
Т3	-0,280087	0,001607	-0,023593	0,885104	-0,296146	0,007648
Т4	0,017862	0,846459	0,111957	0,491584	0,000563	0,996047

Обсуждение. Имплантация эмбриона требует сложного взаимодействия между эндометрием и бластоцистой и регулируется множеством факторов, таких как цитокины, растворимые факторы роста, молекулы адгезии, гормоны, простагландины, аутокринно, интракринно и паракринно осуществляющие регуляцию процесса [16 – 20].

Выявленная отрицательная корреляция между IL-1α и ТТГ в группе женщин с благоприятным исходом процедуры ЭКО согласуется с результатами экспериментальных работ авторов, продемонстрировавших, что IL-1 подавляет высвобождение ТТГ из гипофиза [21, 22]. Известно, что нейроны гипофиза и гипоталамуса экспрессируют на своей поверхности рецепторы к некоторым цитокинам. Так наибольшее количество рецепторов к IL-1 обнаружено в таких структурах гипоталамуса как воронка, серый бугор, а также в перивентрикулярных ядрах [23]. IL-1 способен подавлять активность гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, приводя к уменьшению секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ)

гипоталамусом и, как следствие, лютеинизирующего гормона (ЛГ) гипофизом [23-25].

ЛГ, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), ТТГ и ХГч имеют структурную гомологию и представляют собой сложные гликопротеиды, состоящие из идентичных α-субъединиц и специфических β-субъединиц, определяющих их активность. Структурное сходство этих гормонов указывает на их общее эволюционное происхождение из одного предшественника и на способность изменения концентрации одних гормонов влиять на другие. Так, ХГч, возрастающий с первых дней беременности, обладает ТТГ-подобными эффектами, что приводит к стимуляции щитовидной железы [26, 27].

ТТГ играет важную регуляторную роль в определении баланса между IL-1α и его рецепторным антагонистом IL-1Ra посредством индукции обеих молекул. ТТГ способствует увеличению уровня продукции IL-1Ra, являющегося ингибитором и важным физиологическим регулятором экспрессии IL-1α [28].

Таблица 3

Содержание ТТГ, Т3 и Т4 в зависимости от носительства полиморфизма rs1800587 (С/Т) гена IL-1α у обследованных женщин

Показатель	Генотип Т/Т (1)		Генотип С/Т (2)		Генотип С/С (3)		Достоверность различий
	ЭКО + (4)	ЭКО – (5)	ЭКО + (6)	ЭКО – (7)	ЭКО + (8)	ЭКО – (9)	
ТТГ, мкМЕ/мл	1,6 (1,4-2,1)		2,2 (1,6-2,9)		2,0 (1,6-2,3)		p _{4,6} =0,000298, p _{4,8} =0,015201, p _{6,8} =0,077001, p _{5,7} =0,328852, p _{5,9} =0,701114, p _{7,9} =0,480008
	1,6 (1,3-1,7)	2,0 (1,5-2,2)	2,6 (2,4-3,4)	2,1 (1,5-2,8)	2,0 (1,7-2,5)	2,0 (1,3-2,2)	
	p _{1,2} =0,002575, p _{1,3} =0,007058, p _{2,3} =0,187366, p _{4,5} =0,009098, p _{6,7} =0,017608, p _{8,9} =0,132661						
Т3, нмоль/л	1,6 (1,5-1,8)		2,0 (1,5-2,5)		2,0 (1,7-2,6)		p _{4,6} =0,137082, p _{4,8} =0,243203, p _{6,8} =0,014896, p _{5,7} =0,008441, p _{5,9} =0,009213, p _{7,9} =0,392007
	1,7 (1,5-1,8)	1,6 (1,4-1,8)	1,4 (1,3-1,7)	2,2 (1,8-2,8)	1,8 (1,6-1,9)	2,4 (1,7-3,0)	
	p _{1,2} =0,005820, p _{1,3} =0,000593, p _{2,3} =0,243171, p _{4,5} =0,078701, p _{6,7} =0,005571, p _{8,9} =0,001488						
Т4, нмоль/л	13,5 (12,5-14,2)		14,2 (13,4-15,2)		12,8 (11,6-13,9)		p _{4,6} =0,630008, p _{4,8} =0,505825, p _{6,8} =0,039221, p _{5,7} =0,187691, p _{5,9} =0,434355, p _{7,9} =0,008202
	13,7 (12,9-14,2)	13,4 (12,4-13,9)	14,2 (13,5-14,8)	14,2 (12,6-15,6)	13,2 (12,8-13,8)	12,2 (11,0-13,9)	
	p _{1,2} =0,237081, p _{1,3} =0,106327, p _{2,3} =0,002130, p _{4,5} =0,094220, p _{6,7} =0,789623, p _{8,9} =0,0955602						

Таблица 4

Прогностическая значимость изучаемых показателей и их сочетаний в развитии ЭКО-индуцированной беременности

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=80)	χ ²	p	OR	
					знач.	95% CI
cIL-1α	17	13	12,6	0,0035	3,8	1,61-9,04
ген IL-1α	18	12	12,8	0,000347	4,64	1,93-11,1
cIL-1α + ген IL-1α	17	12	12,5	0,000909	4,2	1,76-10,1
ТТГ	18	30	0,62	0,042901	1,4	0,63-2,94
Т3	31	30	18,15	0,000020	5,7	2,41-13,7
Т4	29	55	0,3	0,068505	1,2	0,52-2,77
ТТГ+Т3	13	14	3,1	0,028693	2,3	0,94-5,5
cIL-1α + ТТГ	14	6	14,52	0,000139	6,6	2,3-19,1
cIL-1α +Т3	15	10	6,88	0,008693	4,2	1,8-10,5
ген IL-1α +ТТГ	14	5	16,54	0,000048	8,1	2,65-24,6
ген IL-1α +Т3	16	9	13,73	0,000211	5,2	2,1-13,5
cIL-1α + ген IL-1α +ТТГ	14	5	16,54	0,000048	8,1	2,65-24,6
cIL-1α + ген IL-1α +Т3	15	9	11,48	0,000702	4,7	1,84-12,2
cIL-1α + ген IL-1α +ТТГ +Т3	12	4	14,42	0,000146	8,1	2,42-27,4

Примечание. cIL-1α - концентрация IL-1α от 28,7 до 85,1 пг/мл, ген IL-1α - генотип Т/Т rs1800587, ТТГ – концентрация ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл, Т3 – концентрация Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л, Т4 – концентрация Т4 от 10,0 до 14,2 нмоль/л.

Ранее авторами функция щитовидной железы в основном изучалась в контексте ЭКО с точки зрения пролонгирования беременности, а также развития самопроизвольного выкидыша. В работе авторов, у пациенток с неблагоприятным исходом процедуры отмечены повышенные уровни ТТГ по сравнению с контролем [29]. Исследователями при попытке изолировать влияние функции щитовидной железы на имплантацию на этапе подготовки к ЭКО были выявлены пороговые низконормальные значения ТТГ – менее 2,5 мкМЕ/мл, обеспечивающие успех имплантации [6, 27, 30].

В проведенном нами исследовании уровень ТТГ на прекоцептивном этапе был в пределах нормы, а предложенный уровень от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл обладал прогностической ценностью OR=1,4, однако при изучении его сочетаний с сывороточной концентрацией IL-1 α или носительством условно благоприятного генотипа Т/Т гена IL-1 α , его прогностическая значимость увеличивалась. Это еще раз косвенно подтверждает наличие взаимосвязи между ТТГ и IL-1 α .

Отдельно взятые показатели ТТГ, IL-1 α , Т3, носительство генотипа гена IL-1 α на прекоцептивном этапе обладают более низкой диагностической ценностью, чем их совместное сочетание. Эффективность процедуры ЭКО и благоприятный исход беременности детерминированы многими факторами, в числе которых большое значение имеет иммуноэндокринное взаимодействие. Следует отметить, что в каждом из трех полученных сочетаний факторов, обладающих максимальной прогностической значимостью, присутствует носительство генотипа Т/Т гена IL-1 α и концентрация ТТГ до 1,7 нмоль/л.

В результате проведенной стимуляции супероуляции на протяжении первых месяцев ЭКО-индуцированной беременности, в отличие от спонтанной, формируется выраженный гормональный дисбаланс. Использование препаратов аналогов ГнРГ, эстрогенов, прогестерона, индукторов овуляции приводит к гормональной сверхнагрузке, что может негативно отразиться на щитовидной железе. Индукция супероуляции приводит к одновременному росту нескольких фолликулов и образованию нескольких желтых тел. Эти железы вырабатывают гормоны в концентрациях, которые в десятки раз превышают физиологические. Даже после отмены триггера овуляции гиперпродукция стероидов сохраняется длительное время, что может быть причиной к изменению гомеостаза в организме женщины [29].

Стремительно развивающаяся, выраженная гиперэстрогения при ЭКО-индуцированной беременности приводит к повышенному синтезу тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ), что сопровождается повышением концентрации общего Т4, снижению свободного Т4 и стимуляции по механизму обратной связи продукции ТТГ гипофизом. Существует мнение, что введение ХГч в качестве триггера овуляции за счет прямой стимуляции щитовидной железы может препятствовать снижению свободного Т4 [31].

Заключение. Частота наступления беременности после ЭКО за последние тридцать лет увеличилась в результате достижений в базовых знаниях и внедрения новых технологий. Однако основное внимание в исследованиях, направленных на улучшение результатов ЭКО, было сосредоточено на двух областях: оценке качества эмбриона и оптимизации восприимчивости эндометрия. Однако, несмотря на эти успехи, более половины жен-

щин до сих пор не могут забеременеть после ЭКО. У многих пациенток беременность не наступает даже после переноса зуплоидного эмбриона в, казалось бы, восприимчивый эндометрий.

Часть этих безрезультативных попыток, несомненно, отражает ограниченность современных диагностических методов для отбора наиболее благоприятных пациенток. Многие из этих неудач происходят из-за системных факторов, которые влияют как на материнскую среду, так и на способность эмбриона к имплантации. Хотя исследованиям этих системных факторов уделяется меньше внимания, чем исследованиям доимплантационного эмбриона и восприимчивости эндометрия, ясно, что многие из них влияют на успех ЭКО. Сочетание нескольких факторов увеличивает вероятность того, что перенос отдельного эмбриона приведет к беременности.

В ходе проведенного исследования установлено, что прогностическая значимость отдельных показателей (ТТГ, IL-1 α , Т3, носительство генотипа гена IL-1 α) меньше, чем их сочетаний. Максимальной прогностической ценностью обладают три сочетания: сочетание генотипа Т/Т гена IL-1 α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл; сочетание IL-1 α от 28,7 до 85,1 пг/мл, генотипа Т/Т гена IL-1 α и уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл; сочетание IL-1 α от 28,7 до 85,1 пг/мл, генотипа Т/Т гена IL-1 α , уровня ТТГ от 0,23 до 1,7 мкМЕ/мл и уровня Т3 от 1,0 до 1,8 нмоль/л.

Таким образом, типирование однонуклеотидного полиморфизма rs1800587 (С/Т) гена IL-1 α , определение уровня IL-1 α , ТТГ, Т3 в крови у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и анализ полученных сочетаний могут быть использованы в качестве дополнительных ранних прогностических предикторов исхода ЭКО, позволяющие оптимизировать процесс лечения и повысить результативность процедуры.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2 – 25, 28, 30 см. REFERENCES)

1. Лапштаева А.В., Евсегнеева И.В., Новиков В.В., Сычев И.В., Караулов А.В. Сывороточный уровень интерлейкина-1 α , полиморфизм его гена и результативность лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения. *Медицинская иммунология*. 2018; 20 (1): 115-22.
26. Перминова С.Г. Бесплодие у женщин с заболеваниями щитовидной железы: принципы диагностики, тактика ведения. *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения*. 2013; 2: 18-24.
27. Дружинина А.С., Витязева И.И. Патогенетические особенности влияния иммунологических нарушений на результаты лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщин репродуктивного возраста с носительством антител к тиреопероксидазе. *Проблемы эндокринологии*. 2019; 65(4): 289-94.
29. Ходжаева З. С., Перминова С.Г., Сидельникова В.М. Тактика ведения беременных после экстракорпорального оплодотворения. *Российский медицинский журнал*. 2008; 1: 8-12.
31. Перминова С.Г., Ибрагимов М.Х., Назаренко Т.А., Каширова Т.В., Фадеев В.В. Особенности заместительной терапии гипотериоза у женщин в ранние сроки индуцированной беременности. *Проблемы женского здоровья*. 2008; 3(2): 31-6.

REFERENCES

1. Lapshtaeva A.V., Evsegneeveva I.V., Novikov V.V., Sychev I.V., Karaulov A.V. Serum level of interleukin-1 α , polymorphism of its gene and in vitro fertilization method infertility treatment effectiveness. *Meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20 (1): 115-22. (in Russian)

IMMUNOLOGY

2. Massimiani M., Lacconi V., La Civita F., Ticconi C., Rago, R., Campagnolo L. Molecular Signaling Regulating Endometrium–Blastocyst Crosstalk. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(1), 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21010023>.
3. Nasu K., Fujisawa K., Arima K., Kai K., Sugano T., Miyakawa I. Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2001; 7(8): 741–6.
4. Simon C., Frances A., Piquette G., Hendrickson M., Milki A., Polan M. L. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 78(4): 847–54.
5. Chaouat G., Ledée-Bataille N., Dubanchet S., Zourbas S., Sandra O., Martal J. Th1/Th2 paradigm in pregnancy: Paradigm lost? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004; 134(2): 93–119.
6. Fox C., Morin S., Jeong J. W., Scott R. T. Jr., Lessey B. A. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil Steril.* 2016; 105(4): 873–84.
7. De Vito P., Balducci V., Leone S., Percario Z., Mangino G., Davis P.J. et al. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: new targets, old players. *Steroids.* 2012; 77(10): 988–95.
8. Marino F., Guasti L., Cosentino M., De Piazza D., Simoni C., Piantanida E. et al. Thyroid hormone regulation of cell migration and oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes: clinical evidence in thyroidectomized subjects on thyroxine replacement therapy. *Life Sci.* 2006; 78(10): 1071–7.
9. Duarte C.G., Azzolini A.E., Assis-Pandochi A.I. Effect of the period of treatment with a single dose of propylthiouracil on the antibody response in rats. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3(10–11): 1419–27.
10. De Vito P., Incerpi S., Pedersen J.Z., Luly P., Davis F.B., Davis P.J. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid.* 2011; 21(8): 879–90.
11. Klecha A.J., Genaro A.M., Gorelik G., Barreiro Arcos M.L., Silberman D.M., Schuman M., et al. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *J. Endocrinol.* 2006; 189(1): 45–55.
12. Klecha A.J., Genaro A.M., Lysionek A.E., Caro R.A., Coluccia A.G., Cremaschi G.A. Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000; 22(7): 491–500.
13. Fabris N., Mocchegiani E., Provinciali M. Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Horm. Res.* 1995; 43(1–3): 29–38.
14. Foster M.P., Jensen E.R., Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Horseman N., Dorshkind K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clin. Immunol.* 2000; 96(2): 140–9.
15. Jara E.L., Muñoz-Durango N., Llanos C., Fardella C., González P.A., Bueno S.M., et al. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunol. Lett.* 2017; 184: 76–83.
16. Su R.W., Fazleabas A.T. Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2015; 216, 189–213.
17. Fazleabas A.T. Strakova Z. Endometrial function: Cell specific changes in the uterine environment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 186: 143–7.
18. Tabibzadeh S., Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1579–1602.
19. Norwitz E.R.; Schust D.J., Fisher S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 1400–8.
20. Sharkey A.M., Smith S.K. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2003; 17: 289–307.
21. Rettori V., Jurcovicova J., McCann S.M. Central action of interleukin-1 in altering the release of TSH, growth hormone, and prolactin in the male rat. *J. Neurosci. Res.* 1987; 18: 179–83.
22. Fujii T., Sato K., Ozawa M., Kasono K., Imamura H., Kanaji Y., et al. Effect of interleukin-1 (IL-1) on thyroid hormone metabolism in mice: stimulation by IL-1 of iodothyronine 5'-deiodinating activity (type I) in the liver. *Endocrinology.* 1989; 124(1): 167–74.
23. Kang S.S., Kim S.R., Leonhardt S., Jarry H., Wuttke W., Kim K. Effect of interleukin-1beta on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *J. Neuroendocrinol.* 2000; 12(5): 421–9.
24. Igaz P., Salvi R., Rey J.P., Glauser M., Pralong F.P., Gaillard R.C. Effects of cytokines on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in primary hypothalamic neurons and in GnRH neurons immortalized conditionally. *Endocrinology.* 2006; 147(2): 1037–43.
25. Herman A.P., Krawczyńska A., Bochenek J., Antushevich H., Herman A., Tomaszewska-Zaremba D. Peripheral injection of SB203580 inhibits the inflammatory-dependent synthesis of proinflammatory cytokines in the hypothalamus. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 475152. doi: 10.1155/2014/475152.
26. Perminova S. G. Infertility in women with thyroid disease: principles of diagnosis, management. *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti. Mneniya. Obucheniya.* 2013; 2: 18–24. (in Russian)
27. Druzhinina A.S., Vitjazeva I.I. Pathogenetic features of immunological disorders in women with thyroid peroxidase antibodies presence and their effect on infertility treatment by in vitro fertilization (IVF). *Problemy endokrinologii.* 2019; 65(4): 289–94. (in Russian)
28. Li B., Smith T.J. Regulation of IL-1 receptor antagonist by TSH in fibrocytes and orbital fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(4): E625–33. doi: 10.1210/jc.2013-3977.
29. Hodzhaeva Z. S., Perminova S.G., Sidel'nikova V.M. Management of pregnant women after in vitro fertilization. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2008; 1: 8–12. (in Russian)
30. Stuefer S., Moncayo H., Moncayo R. The role of magnesium and thyroid function in early pregnancy after in-vitro fertilization (IVF): New aspects in endocrine physiology. *BBA Clin. Elsevier.* 2015; 3: 196–204.
31. Perminova S.G., Ibragimova M.H., Nazarenko T.A., Kashirova T.V., Fadeev V.V. Features of replacement therapy for hypothyroidism in women in the early stages of induced pregnancy. *Problemy zhenskogo zdorov'ya.* 2008; 3(2): 31–6. (in Russian)

Поступила 09.12.20

Принята к печати 13.01.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Генинг С.О.¹, Абакумова Т.В.¹, Антонеева И.И.^{1,2}, Ризванов А.А.³, Генинг Т.П.¹, Гафурбаева Д.У.³

СТВОЛОВО-ПОДОБНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОК С РАКОМ ЯИЧНИКОВ

¹ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, 432017, Ульяновск, Россия;

²ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, 432017, Ульяновск, Россия;

³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Казань, Россия

Рак яичников (РЯ) обладает способностью к развитию имплантационных метастазов в брюшной полости. Асцит является перспективным материалом для оценки опухолевого процесса. Целью исследования являлась оценка содержания опухолевых клеток стволового фенотипа и медиаторов воспаления в асците при РЯ. В проспективное исследование включены 11 пациенток с первичным РЯ и 8 пациенток с доброкачественными опухолями яичников, имеющих опухоль-ассоциированный асцит, а также 22 соматически здоровые женщины. В асцитической жидкости, полученной путем лапароцентеза, методом проточной цитометрии на основе молекулярной панели маркеров CD45, CD44 и CD133 определяли популяции опухолевых клеток с признаками стволовости на приборе Cytoflex S[®] (Beckman Coulter, США) и программного обеспечения CytExpert Software с моноклональными антителами. Цитокиновый профиль асцитической жидкости и сыворотки крови (IL-1 β , IL-18, IL-4, IL-10 и VEGF) оценивали методом ИФА. Стволо-подобные клетки обнаружены во всех исследованных образцах асцита. Были оценены 5 популяций клеток. Наименьшим было количество клеток, экспрессирующих оба маркера: CD45-CD44+ и CD45-CD133+. Наибольшим, порядка 32 %, было число клеток CD45-CD44+CD133- в асците сильно положительно коррелировало с содержанием IL-10 в асците, а количество CD45-CD133+ и CD45-CD44-CD133+ – с уровнем VEGF в сыворотке крови. Корреляций между числом клеток стволового фенотипа и стадией болезни, уровнем CA125 в крови не выявлено. Наибольшей значимостью в связи со стадией обладала комбинация IL-4 и IL-10 в асците. Полученные результаты предполагают взаимосвязь между уровнями VEGF, IL-10 и стволовых опухолевых клеток в асците при РЯ. Стволо-подобные клетки в асците РЯ гетерогенны и присутствуют уже на ранней стадии заболевания. Представляется крайне перспективным исследование клеточных популяций и цитокинового статуса асцита в комплексе для оценки их биомаркерного потенциала.

Ключевые слова: рак яичников; асцит; стволовые опухолевые клетки; VEGF; IL-10; IL-18; IL-4; IL-1 β .

Для цитирования: Генинг С.О., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Ризванов А.А., Генинг Т.П., Гафурбаева Д.У. Стволово-подобные опухолевые клетки и провоспалительные цитокины в асцитической жидкости пациенток с раком яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (5): 297-300. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-297-303>

Gening S.O.¹, Abakumova T.V.¹, Antoneeva I.I.^{1,2}, Rizvanov A.A.³, Gening T.P.¹, Gafurbaeva D.U.³

STEM-LIKE TUMOR CELLS AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE ASCITIC FLUID OF OVARIAN CANCER PATIENTS

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State University, 432017, Ulyanovsk, Russia;

²Federal Healthcare Institution Regional Clinical Oncology Center, 432017, Ulyanovsk, Russia;

³Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Kazan (Volga Regional) Federal University», 420008, Kazan, Russia

Ovarian cancer (OC) is able to develop implantation metastases in the abdominal cavity. Ascites is potentially useful for evaluating cancer features. The aim of the study was to assess the content of stem-like tumor cells and inflammatory mediators in ascites of OC. The prospective study included 11 patients with primary OC having ascites, 8 patients with benign ovarian tumors having ascites and 22 healthy women. In ascitic fluid obtained by laparocentesis, the populations of tumor stem-like cells were determined on a Cytoflex S[®] flow cytometer (Beckman Coulter, USA) and CytExpert Software using monoclonal antibodies to CD45, CD44 and CD133. The cytokine profiles of ascitic fluid and blood serum (IL-1 β , IL-18, IL-4, IL-10 and VEGF) were assessed by ELISA. Stem-like cells were found in all samples. 5 cell populations were evaluated. The number of cells expressing both markers: CD44 + and CD133+, was the lowest. The highest, about 32%, was the number of CD44+ cells. The number of cells CD45-CD44+CD133- in ascites strongly positively correlated with the content of IL-10 in ascites, and the numbers of CD45-CD133+ and CD45-CD44-CD133+ – with the level of VEGF in blood serum. No correlations were found between the numbers of stem-like cells and the disease stage or the level of CA125 in blood. The combination of IL-4 and IL-10 in ascites had the greatest significance in predicting the disease stage. These results suggest a relationship between the levels of VEGF, IL-10, and cancer stem cells in the OC ascites. Stem-like cells in OC ascites are heterogeneous and are present even at an early stage of the disease. It seems promising to study cell populations and cytokine profile of ascites together, to assess the biomarker potential of their combination.

Key words: ovarian cancer; ascites; tumor stem cells; VEGF; IL-10; IL-18; IL-4; IL-1 β .

For citation: Gening S.O., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Rizvanov A.A., Gening T.P., Gafurbaeva D.U. Stem-like tumor cells and proinflammatory cytokines in the ascitic fluid of ovarian cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021: 66 (5): 297-300 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-20874-2021-66-5-297-303>

Для корреспонденции: Генинг Татьяна Петровна, д-р биол. наук, зав.каф. физиологии и патофизиологии медицинского факультета им. Т.З.Биктимирова Института медицины, экологии и физической культуры; e-mail: Naum-53@yandex.ru

Information about authors:

Gening S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6970-6659>;
Abakumova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246> ;
Antoneeva I.I., <https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>;
Rizvanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9427-5739>;
Gening T.P., <https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>;
Gafurbaeva D.U. <https://orcid.org/0000-0002-3305-1942>.

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

Acknowledgment. *The reported study was funded by RFBR, project number 19-315-90011*

The authors thank ANO «DNA Research Center» for the opportunity to conduct scientific research on a Cytotex S flow cytometer at no cost.

Received 27.08.2020
Accepted 20.02.2021

Рак яичников (РЯ) отличается высокой летальностью [1] и частым развитием рецидивов болезни, выбор лечебных опций для которых ограничен [2]. Это заболевание обладает уникальной способностью к развитию имплантационных метастазов в брюшной полости. Асцит может появляться на любой стадии, даже в отсутствие канцероматоза брюшины, и относится к факторам неблагоприятного прогноза болезни [3].

Согласно современным представлениям, стволовые опухолевые клетки (СОК) ответственны за процессы инициации, метастазирования, рецидивирования, развития химиорезистентности злокачественных опухолей, в том числе РЯ [4]. При этом «стволовость» – скорее функциональное состояние опухолевой клетки, чем стабильный клеточный подтип [5]. Стволовой фенотип обратим и зависит от воздействия внешних факторов опухолевого микроокружения [6]. Асцитическая жидкость при РЯ содержит большое количество опухолевых клеток с признаками стволовости [7, 8]. Доля СОК в клеточной фракции асцита выше у пациенток с развившейся резистентностью к химиотерапии, чем у женщин до лечения [9]. Характерная высокая устойчивость к апоптозу – гибели клетки в жидкой среде в результате потери межклеточных контактов – дает СОК преимущество в выживании в условиях асцита [10]. Нахождение в непривычных физических условиях брюшной полости может стимулировать приобретение стволовых свойств клетками РЯ [11].

Асцит также является источником широкого спектра биологически активных соединений: цитокинов, хемокинов, факторов роста, а также лейкоцитов, которые способны регулировать характеристики опухолевой клетки [12]. У пациенток с РЯ в асците показано повышенное содержание важнейших провоспалительных цитокинов [13, 14]. Создаваемая провоспалительная ниша способствует агрессивному поведению СОК [15]. Асцитические СОК экспрессируют молекулы адгезии PECAM1 и ICAM1 для прикрепления к мезотелию брюшины [16]; прикрепившись, они индуцируют в мезотелии секрецию ферментов разрушения межклеточного матрикса, чтобы облегчить процесс инвазии [17]. Хемокины асцитической жидкости активируют в СОК проканцерогенный сигнальный путь NFκаррaB [18], отвечающий за такие характеристики, как пролиферация, самообновление и химиорезистентность СОК [19]. При помощи хемокинов СОК также могут влиять на Т-хелперы, обеспечивая развитие иммунологической толерантности [20]. Макрофаги индуцируют создание сфероидных колоний и активируют Wnt-сигналинг в СОК, что также приводит к химиорезистентности [21, 22].

СОК, присутствующие в асците при РЯ, гетерогенны [23]. Универсальный маркер СОК отсутствует, и для определения их характеристик используют комбинации маркеров. CD133 (проминин) – антиген клеточной поверхности, используемый для обнаружения и выделения СОК рака яичников. На сегодня нет четкого представления о роли его экспрессии как биомаркера при данном заболевании, но показано, что CD133+ клетки гораздо более туморогенны, чем остальные [24 – 26]. Значительно больше изучен маркер CD44 (рецептор гиалуроната). Он ответственен за адгезию клеток как друг с другом, так и с внеклеточным матриксом; в ходе метастазирования CD44 также обеспечивает адгезию и трансэндотелиальную миграцию [27]. Активация CD44 в клетках РЯ стимулирует сигналинг Nanog-Stat-3 [28]. В метаанализе [29] показана прогностическая роль экспрессии CD44+ при РЯ. Интересно, что сами CD44+ клетки секретируют большое количество цитокинов IL-6, IL-8, MCP-1 [30]. VEGF также может входить в состав внеклеточных везикул с провоспалительными цитокинами, которые секретируют стволовые клетки РЯ [31].

Несмотря на большое количество работ, доказывающих протуморогенность асцита, о корреляциях его клеточного и цитокинового состава у пациенток известно не так много.

Целью исследования была оценка содержания опухолевых клеток стволового фенотипа и медиаторов воспаления VEGF, IL-10, IL-18, IL-4, IL-1beta в асците при РЯ.

Материал и методы. В исследование были включены пациентки ($n=11$) в возрасте от 37 до 72 лет (медиана 60 лет), проходившие лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере в 2017-2020 гг. Критериями включения в экспериментальную группу были: впервые диагностированный РЯ (I-IV стадии по FIGO) с наличием асцита, до получения противоопухолевого лечения; отсутствие сопутствующих острых заболеваний любой этиологии, а также хронических инфекционных заболеваний. В группу сравнения были включены пациентки ($n=8$) в возрасте от 35 до 50 лет (медиана 45 лет) с асцитом, развившимся вследствие доброкачественной опухоли яичников и направленные на оперативное лечение. Доброкачественная этиология была подтверждена гистологическим исследованием операционного материала. В контрольную группу ($n=22$) вошли практически здоровые женщины в возрасте от 30 до 70 лет (медиана 60 лет). Все участницы исследования предоставили подписанное добровольное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2013 г.). Исследование было одобрено

этическим комитетом ИМЭиФК УлГУ (протокол №3 от 15.03.2017г.).

У всех пациенток до лечения осуществляли взятие образцов асцитической жидкости (путем лапароцентеза) и сыворотки крови. Асцит центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. На основе молекулярной панели маркеров к CD45, CD44 и CD133 методом проточной цитометрии с использованием тройной флуоресцентной метки на приборе Cytotflex S (Beckman Coulter, США) с помощью программного обеспечения CytExpert Software определяли различные популяции асцитических опухолевых клеток с признаками стволовости. Для этого асцитическую жидкость инкубировали с моноклональными антителами к CD45 (PE anti-human CD45 Antibody Clone 2D1, Biolegend, США); CD44 (APC anti-human CD4 Antibody cloneBJ18, Biolegend, США); CD133 (CD133/1 VioBright 667 mouse IgG1 clone AC133, Miltenyi biotec, Германия). Окрашивание проводили в рабочем растворе DPBS с 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS) в концентрации 0,25мг/1млн кл. Подсчитывали количество клеток популяций CD45-/CD44+, CD45-/CD133+, CD45-/CD44-/CD133+, CD45-/CD44+/CD133-, CD45-/CD44+/CD133+. Пересчет производили на 1 млн выделенных из асцита клеток.

Цитокиновый профиль асцитической жидкости и сыворотки крови, а именно уровни IL-1β, IL-4, IL-10, IL-18 и VEGF-A оценивали сэндвич-методом ИФА (ЗАО

Вектор-Бест-Волга). Поскольку распределение количественных переменных не было нормальным (критерий Шапиро-Уилка), средние значения выражены в медиане с указанием интерквартильного размаха (Q1-Q3). При обработке данных использовали коэффициент Спирмена для корреляционных взаимосвязей; методы простой линейной регрессии и множественной регрессии; для оценки различий между группами – критерий Манна-Уитни в программном пакете Statistica 13.6.0 (TIBCO, USA). Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты. Характеристики пациенток с РЯ, включенных в работу, представлены в табл. 1. Медиана возраста пациенток с РЯ составила 60 (37-72) лет. 4 пациентки с РЯ имели стадию заболевания III, 3 – стадию I и 4 – стадию IV.

В результате проведенных исследований в асците пациенток с РЯ выявлено 5 популяций клеток, экспрессирующих маркеры стволовости (табл. 2, рис. 1, 2).

Попарное сравнение при помощи критерия Вилкоксона показало статистически значимые различия между числом клеток выявленных популяций. При этом количество опухолевых клеток асцита, экспрессирующих оба маркера стволовости, CD44 и CD133, было наименьшим и значимо отличалось от количества клеток в остальных популяциях. Наибольшим было число опухолевых клеток с положительной экспрессией CD44 (популяции I и III).

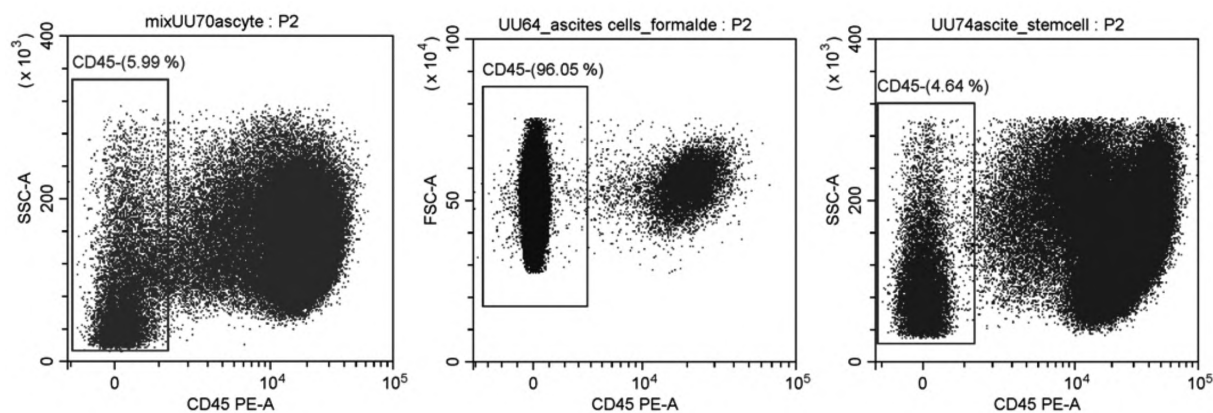


Рис. 1. Дискриминация клеток асцита РЯ в ходе проточной цитометрии по уровню связывания с CD45. Отрицательную по данному признаку популяцию использовали для дальнейшего анализа.

Таблица 1

Характеристики пациенток с РЯ, включенных в исследование

№ образца	Возраст, годы	Стадия РЯ	Гистологический тип	СА-125 до лечения, Ед/мл
1	67	IV, T3cN1M1	-	308
2	62	IIIc, T3cNxMo	Серозная аденокарцинома	635
3	57	IIIc, T3cNxMo	-	485
4	53	IIIc, T3cNxMo	Серозная аденокарцинома	210
5	72	IIIc, T3cNxMo	Серозная аденокарцинома	1618
6	60	Ic3, T1c3N0M0	Серозная аденокарцинома	25
7	37	IV, T3cN1M1b	-	400
8	71	IV, T3N1M1	-	695
9	62	IV, T3CNxM1b	-	1528
10	59	Ic3, T1c3N0M0	Недифференцированный	29
11	56	Ic3, T1c3N0M0	Серозная аденокарцинома	173

Примечание. Гистологический тип указан для пациенток, которым впоследствии выполнялось оперативное вмешательство.

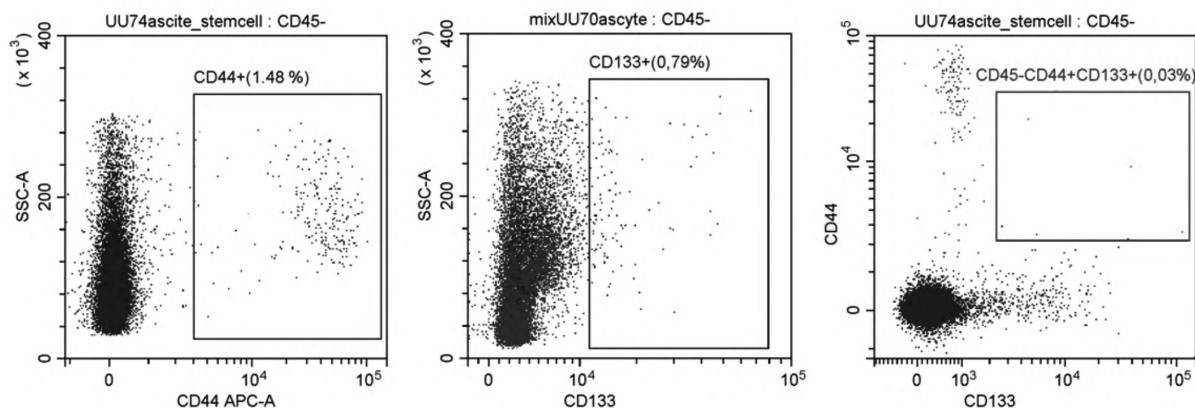


Рис. 2. Идентификация клеток CD44+, CD133+, CD44+CD133+ среди CD45- в асците РЯ в ходе проточной цитометрии.

Таблица 2

Число опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры стволовости, в асците пациенток с РЯ, на 1 млн выделенных клеток

Популяция	Фенотип клеток	Количество выделенных клеток/млн, медиана (Q1-Q3)
I	CD45-/CD44+	371,58 (220,10-782,06)
II	CD45-/CD133+	330,49 (3,19-634,37) $p_{1,2}=0,612$
III	CD45-/CD44+/CD133-	326,60 (149,65-434,66) $p_{1,3}=0,108; p_{2,3}=0,017$
IV	CD45-/CD44-/CD133+	14,76 (2,36-631,09) $p_{1,4}=0,612; p_{2,4}=0,108; p_{3,4}=0,646$
V	CD45-/CD44+/CD133+	0,68 (0-11,427) $p_{1,5}=0,018; p_{2,5}=0,027; p_{3,5}=0,050; p_{4,5}=0,007$

Корреляций между числом клеток стволового фенотипа и стадией болезни, уровнем СА-125 сыворотки крови выявлено не было.

При сравнении содержания цитокинов в сыворотке крови женщин из различных групп было обнаружено, что уровни всех исследуемых показателей при РЯ выше, чем у здоровых женщин. У пациенток с РЯ в сравнении с больными доброкачественными опухолями яичников были достоверно повышены уровни IL-18, IL-1 и VEGF. В группах здоровых добровольцев и пациенток с доброкачественными опухолями отличался только уровень IL-10 (табл.3). Содержание IL-18 в сыворотке крови пациенток с РЯ коррелировало со стадией заболевания ($r=0,71, p=0,014$). Уровни других изучаемых цитокинов в сыворотке при РЯ не коррелировали ни со стадией, ни с показателями крови (СА-125, количество лейкоцитов, СОЭ). Также не было корреляций уровней цитокинов сыворотки при РЯ между собой. При доброкачественных опухолях не наблюдалось взаимосвязей концентраций цитокинов в сыворотке крови и в асцитической жидкости.

Экспрессия VEGF и IL-10 в асците пациенток с РЯ значимо выше, чем в асците при доброкачественной патологии (см.табл.3). Уровни цитокинов в асците при РЯ не коррелировали между собой.

Как следует из данных табл.3, уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-4 в асците пациенток с РЯ значимо не отличался от такового в контроле. Интересно, что наблюдалась сильная отрицательная корреляция между содержанием VEGF в асците и сыворотке

пациенток с РЯ ($r=-0,85, p=0,0008$). Также наблюдалась корреляция между содержанием IL-4 в сыворотке крови и IL-1 в асците при РЯ ($r=0,72, p=0,012$).

При этом уровень VEGF сыворотки крови положительно коррелировал с числом CD45-CD133+ клеток в асците ($r=0,78, p=0,036$). При анализе методом простой линейной регрессии повышение уровня VEGF сыворотки было связано с ростом числа CD45-CD44-CD133+ клеток в асците ($p=0,030$). Уровень ИЛ-18 в асците при РЯ отрицательно коррелировал с уровнем СА-125 сыворотки крови ($r=-0,70, p<0,05$). Число клеток CD45-CD44+CD133- в асците при РЯ сильно положительно коррелировало с содержанием в асците IL-10 ($r=0,84, p=0,010$).

Обсуждение. Мы обнаружили стволово-подобные клетки во всех исследованных образцах асцита. Нами было оценено 5 популяций клеток, экспрессирующих маркеры стволовости. Наиболее многочисленной была популяция, экспрессирующая CD44. Согласно данным литературы, CD44 способствует формированию сфероидных колоний клетками РЯ, адгезии к мезотелию и орган-специфическому метастазированию [32]. Нами также установлено, что популяция с фенотипом CD45-/CD133+, клетки которой обладают повышенной способностью к сфероидообразованию [33], составляет порядка 32% от всех клеток асцита, экспрессирующих маркеры стволовости.

Значение VEGF (фактора роста эндотелия сосудов) в прогрессии рака яичников трудно переоценить, ведь анти-VEGF терапия является одним из немногих эф-

Цитокиновый профиль асцитической жидкости и сыворотки крови пациенток с доброкачественными опухолями и раком яичников

Группы пациенток	Me (Q1-Q3), пг/мл				
	IL-18	IL-1 β	VEGF	IL-4	IL-10
Асцитическая жидкость пациенток с доброкачественной опухолью (контрольная группа), n=8	12,328 (10,347-16,865)	5,257 (4,560-6,454)	74,422 (70,303-115,019)	1,789 (1,567-1,919)	193,425 (143,599-244,505)
Асцитическая жидкость пациенток с РЯ, n=11	20,560 (13,037-27,138)	5,428 (3,921-6,401)	3145,487 (2835,346-3430,026)	1,823 (1,564-2,057)	411,661 (355,644-540,201)
p_1	0,267	0,844	0,005	0,844	0,026
Сыворотка крови здоровых женщин, n=22	299,900 (0-874,858)	1,811 (1,259-2,334)	48,940 (41,229-52,629)	1,248 (0,249-2,366)	1,475 (0,450-5,260)
Сыворотка крови пациенток с доброкачественной опухолью (контрольная группа), n=8	214,235 (189,231-238,301)	1,163 (0,836-1,377)	166,715 (109,225-272,211)	1,992 (1,741-2,290)	5,174 (3,894-6,905)
p_2	0,999	0,393	0,749	0,831	0,009
Сыворотка крови пациенток с РЯ, n=11	464,166 (397,643-510,969)	2,425 (2,218-2,597)	834,178 (390,558-1264,822)	7,436 (1,568-8,143)	8,971 (4,500-16,407)
p_1	0,039	0,001	0,039	0,556	0,170
p_2	0,018	0,002	0,0001	0,002	0,0002

Примечание. n – число пациенток; p_1 – по сравнению с группой доброкачественных опухолей; p_2 – по сравнению с аналогичными показателями у здоровых.

фективных методов его лечения [2]. Экспрессия VEGF, однако, не является предиктивным биомаркером при назначении данной терапии [34]. Мы обнаружили, что уровень VEGF в сыворотке пациенток с РЯ повышен относительно уровней здоровых женщин и пациенток с доброкачественным асцитом; его уровень в асците пациенток с РЯ также повышен в сравнении с асцитом доброкачественной этиологии. При этом содержание VEGF в крови пациенток с РЯ было тем выше, чем ниже была его концентрация в асците. Низкая концентрация в асците также коррелировала с более распространенной стадией болезни; высокая концентрация в сыворотке была связана с большим числом клеток CD45-CD44-CD133+ в асците. Можно предположить, что соотношение концентрации VEGF в асците и крови динамически изменяется в ходе канцерогенеза. Стоит отметить, что VEGF участвует в процессе васкулогенной мимикрии [35] – формировании стенок кровеносных сосудов из СОК, а анти-VEGF препараты блокируют дифференцировку СОК в клетки эндотелия [36]. Мимикрия, однако, может протекать и независимо от VEGF [37], а функции VEGF многогранны и не ограничиваются ангиогенезом [38].

Уровень IL-10 в крови пациенток с РЯ выше, чем у женщин с доброкачественной патологией, а у последних – выше, чем у здоровых женщин. Содержание IL-10 в злокачественном асците больше, чем в доброкачественном, и тем больше, чем выше стадия болезни. Эти результаты согласуются с данными литературы [39], причем IL-10 стимулирует миграцию клеток линий РЯ. Уровень данного цитокина в асците исследованной выборки коррелировал с числом клеток CD45-CD44+CD133-. Учитывая иммуносупрессивную роль IL-10 при РЯ [40], можно предположить, что нарастание его содержания способствует прогрессии заболевания. Кроме того, большое количество IL-10 секретируется макрофагами, входящими в состав сфероидных колоний вместе с СОК РЯ [41].

Содержание IL-18, IL-4, IL-1 β в асците и крови не было связано с числом стволово-подобных клеток. Наблюдались, однако, корреляции со стадией РЯ для IL-18 в крови и асците и для IL-4 в асците; с СА-

125 сыворотки крови для IL-18 в асците. Кроме того, уровни IL-4 в сыворотке и IL-1 в асците коррелировали между собой. Содержание всех цитокинов в сыворотке пациенток с РЯ было выше, чем в контроле. В сравнении с показателями крови при доброкачественных опухолях при РЯ были повышены концентрации IL-18, IL-1. Очевидно, что эти изменения связаны локальным и системным воспалением, сопровождающим развитие РЯ [42;43] и формирование выпота в брюшной полости. Известно, что, как злокачественные, так и доброкачественные опухоли яичников экспрессируют рецепторы к IL-18 [44]; злокачественные, однако, отличаются высоким содержанием IL-18-связывающего белка в опухолевом микроокружении [45]. Клиническая значимость изменений содержания этих цитокинов подлежит уточнению в дальнейших исследованиях.

Заключение. Полученные результаты предполагают взаимосвязь между уровнями VEGF, IL-10 и стволовых опухолевых клеток в асците при РЯ. Стволово-подобные клетки в асците РЯ гетерогенны и присутствуют уже на ранней стадии заболевания. Представляется крайне перспективным исследование клеточных популяций и цитокинового статуса асцита в комплексе для оценки их биомаркерного потенциала.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90011.

Благодарности. Авторы благодарят АНО «Научно-исследовательский центр ДНК» за возможность проведения научного исследования на проточном цитометре Cytoflex S на безвозмездной основе.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-22, 24-45 см. REFERENCES)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2019. ISBN 978-5-85502-227-8.

23. Кайгородова Е.В., Федуллова Н.В., Очиров М.О., Дьяков Д.А., Молчанов С.В., Часовских Н.Ю. Различные популяции опухолевых клеток в асцитической жидкости пациенток с раком яичников. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020;19(1): 50-8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-50-58>.

REFERENCES

1. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. Moscow: Moscow Cancer Research Institute (MCRI) named after P.A. Herzen-Federal State Budgetary Institution National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2019. ISBN 978-5-85502-227-8. (in Russian)
2. Ledermann J.A., Raja F.A., Fotopoulou C., Gonzalez-Martin A., Colombo N., Sessa C., on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol* 2013; 24 (6): 24-32.
3. Hoppenot C., Eckert M.A., Tienda S.M., Lengyel E. Who are the long-term survivors of high grade serous ovarian cancer? *Gynecol. Oncol.* 2018 Jan;148(1):204-12. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.10.032.
4. Ahmed N., Abubaker K., Findlay J.K. Ovarian cancer stem cells: Molecular concepts and relevance as therapeutic targets. *Mol. Aspects Med.* 2014 Oct;39:110-25. doi: 10.1016/j.mam.2013.06.002.
5. Mazzoldi E.L., Pastò A., Pilotto G., Minuzzo S., Piga I., Palumbo P. et al. Comparison of the Genomic Profile of Cancer Stem Cells and Their Non-Stem Counterpart: The Case of Ovarian Cancer. *J. Clin. Med.* 2020;9(2): 368. doi: 10.3390/jcm9020368.
6. Mitra T., Prasad P., Mukherjee P., Chaudhuri S.R., Chatterji U., Roy S.S. Stemness and chemoresistance are imparted to the OC cells through TGFβ1 driven EMT. *J. Cell Biochem.* 2018; 119(7):5775-87. doi: 10.1002/jcb.26753.
7. Jiang Y.X., Siu M.K., Wang J.J., Mo X.T., Leung T.H., Chan D.W. et al. Ascites-derived ALDH+CD44+ tumour cell subsets endow stemness, metastasis and metabolic switch via PDK4-mediated STAT3/AKT/NF-κB/IL-8 signalling in ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* 2020;123(2):275-87. doi: 10.1038/s41416-020-0865-z.
8. Sato M., Kawana K., Adachi K., Fujimoto A., Yoshida M., Nakamura H. et al. Detachment from the primary site and suspension in ascites as the initial step in metabolic reprogramming and metastasis to the omentum in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* 2018;15(1):1357-61. doi: 10.3892/ol.2017.7388.
9. Latifi A., Luwor R.B., Bilandzic M., Nazaretian S., Stenvers K., Pyman J. et al. Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PLoS One.* 2012;7(10):e46858. doi: 10.1371/journal.pone.0046858.
10. Bapat S.A., Mali A.M., Koppikar C.B., Kurrey N.K. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2005;65(8):3025-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3931.
11. Pagotto A., Pilotto G., Mazzoldi E.L., Nicoletto M.O., Frezzini S., Pastò A., Amadori A. Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death Dis.* 2017; 8(7):e2943. doi: 10.1038/cddis.2017.327.
12. Worzfeld T., Pogge von Strandmann E., Huber M., Adhikary T., Wagner U., Reinartz S., Müller R. The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Front Oncol.* 2017; 7:24. doi: 10.3389/fonc.2017.00024.
13. Matte I., Lane D., Laplante C., Rancourt C., Piché A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am. J. Cancer Res.* 2012;2(5):566-80.
14. Lane D., Matte I., Garde-Granger P., Laplante C., Carignan A., Rancourt C., Piché A. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer.* 2015; 15:492. doi: 10.1186/s12885-015-1511-7
15. de Lima C.A., Silva Rodrigues I.S., Martins-Filho A., Cobo Micheli D., Martins Tavares-Murta B., Candido Murta E.F., Simões Nomelini R. Cytokines in peritoneal fluid of ovarian neoplasms. *J. Obstet. Gynaecol.* 2020; 40(3):401-5. doi: 10.1080/01443615.2019.1633516.
16. Roy L., Bobbs A., Sattler R., Kurkewich J.L., Dausinas P.B., Nalathamby P., Cowden Dahl K.D. CD133 Promotes Adhesion to the Ovarian Cancer Metastatic Niche. *Cancer Growth Metastasis.* 2018; 11:1179064418767882. doi: 10.1177/1179064418767882.
17. Nakamura K., Sawada K., Kinose Y., Yoshimura A., Toda A., Nakatsuka E. et al. Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Mol. Cancer Res.* 2017; 15(1):78-92. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0191.
18. Long H., Xie R., Xiang T., Zhao Z., Lin S., Liang Z., Chen Z., Zhu B. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF-κB-mediated MMP-9 upregulation. *Stem Cells.* 2012; 30(10):2309-19. doi: 10.1002/stem.1194.
19. House C.D., Jordan E., Hernandez L., Ozaki M., James J.M., Kim M. et al. NFκB Promotes Ovarian Tumorigenesis via Classical Pathways That Support Proliferative Cancer Cells and Alternative Pathways That Support ALDH+ Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2017; 77(24):6927-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0366.
20. You Y., Li Y., Li M., Lei M., Wu M., Qu Y. et al. Ovarian cancer stem cells promote tumor immune privilege and invasion via CCL5 and regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2018; 191(1): 60-73. doi: 10.1111/cei.13044.
21. Yin M., Li X., Tan S., Zhou H.J., Ji W., Bellone S. et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(11):4157-73. doi: 10.1172/JCI87252.
22. Nagaraj A.B., Joseph P., Kovalenko O., Singh S., Armstrong A., Redline R. et al. Critical role of Wnt/β-catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget.* 2015; 6(27): 23720-34. doi: 10.18632/oncotarget.4690.
23. Kaigorodova E.V., Fedulova N.V., Ochirov M.O., Dyakov D.A., Molchanov S.V., Chasovskikh N.Yu. Dissimilar tumor cell populations in ascitic fluid of ovarian cancer patients. *Bulleten' sibirskoy meditsiny.* 2020;19(1):50-8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-50-58>. (in Russian)
24. Zhang J., Guo X., Chang D.Y., Rosen D.G., Mercado-Urbe I., Liu J. CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Mod. Pathol.* 2012; 25(3):456-64. doi:10.1038/modpathol.2011.170; 19; 20.
25. Kryczek I., Liu S., Roh M., Vatan L., Szeliga W., Wei S. et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* 2012;130:29-9.
26. Ferrandina G., Bonanno G., Pierelli L., Perillo A., Procoli A., Mariotti A. et al. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2008;18(3):506-14. doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.01056.x.
27. Reymond N., d'Água B.B., Ridley A.J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2013;13(12): 858-70. doi: 10.1038/nrc3628.
28. Bourguignon L.Y., Peyrollier K., Xia W., Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J. Biol. Chem.* 2008;283:17635-51.
29. Shi Y.Y., Jiang H. Prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* 2016; 15(3). doi: 10.4238/gmr.15038325.
30. Alvero A.B., Chen R., Fu H.H., Montagna M., Schwartz P.E., Rutherford T. et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle.* 2009;8(1):158-66. doi: 10.4161/cc.8.1.7533.
31. Vera N., Acuña-Gallardo S., Grünenwald F., Caceres-Verschae A., Realini O., Acuña R. et al. Small Extracellular Vesicles Released from Ovarian Cancer Spheroids in Response to Cisplatin Promote the Pro-Tumorigenic Activity of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(20):4972. doi: 10.3390/ijms20204972.
32. Sacks Suarez J., Gurler Main H., Muralidhar G.G., Elfituri O., Xu H.L., Kajdacsy-Balla A.A., Barbolina M.V. CD44 Regulates Formation of Spheroids and Controls Organ-Specific Metastatic Colonization in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 2019;17(9):1801-14. doi: 10.1158/1541-7786.

33. Nam E.J., Lee M., Yim G.W., Kim J.H., Kim S., Kim S.W., Kim Y.T. MicroRNA profiling of a CD133(+) spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. *BMC Med. Genomics*. 2012;5:18. doi: 10.1186/1755-8794-5-18.
34. Monk B.J., Minion L.E., Coleman R.L. Anti-angiogenic agents in ovarian cancer: past, present, and future. *Ann. Oncol.* 2016; 27(1):i33-i39. doi: 10.1093/annonc/mdw093.
35. Salinas-Vera Y.M., Gallardo-Rincón D., García-Vázquez R., Hernández-de la Cruz O.N., Marchat L.A., González-Barrios J.A. et al. HypoxamiRs Profiling Identify miR-765 as a Regulator of the Early Stages of Vasculogenic Mimicry in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Front Oncol.* 2019;9:381. doi: 10.3389/fonc.2019.00381.
36. Krishnapriya S., Sidhanth C., Manasa P., Sneha S., Bindhya S., Nagare R.P. et al. Cancer stem cells contribute to angiogenesis and lymphangiogenesis in serous adenocarcinoma of the ovary. *Angiogenesis*. 2019;22(3):441-55. doi: 10.1007/s10456-019-09669-x.
37. Alvero A.B., Fu H.H., Holmberg J., Visintin I., Mor L., Marquina C.C. et al. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells*. 2009; 27(10):2405-13. doi:10.1002/stem.191.
38. Caporarello N., Lupo G., Olivieri M., Cristaldi M., Cambria M.T., Salmeri M., Anfuso C.D. Classical VEGF, Notch and Ang signaling in cancer angiogenesis, alternative approaches and future directions (Review). *Mol. Med. Rep.* 2017; 16(4):4393-4402. doi: 10.3892/mmr.2017.7179.
39. Lane D., Matte I., Garde-Granger P., Bessette P., Piché A. Ascites IL-10 Promotes Ovarian Cancer Cell Migration. *Cancer Microenviron.* 2018; 11(2-3):115-24. doi: 10.1007/s12307-018-0215-3.
40. Lamichhane P., Karyampudi L., Shreeder B., Krempski J., Bahr D., Daum J. et al. IL10 Release upon PD-1 Blockade Sustains Immunosuppression in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(23):6667-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0740.
41. Raghavan S., Mehta P., Xie Y., Lei Y.L., Mehta G. Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the WNT pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3D engineered microenvironments. *J. Immunother. Cancer.* 2019 19;7(1):190. doi: 10.1186/s40425-019-0666-1.
42. Luborsky J., Barua A., Edassery S., Bahr J.M., Edassery S.L. Inflammasome expression is higher in ovarian tumors than in normal ovary. *PLoS One.* 2020; 15(1):e0227081. doi: 10.1371/journal.pone.0227081.
43. Nie D., Gong H., Mao X., Li Z. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: A retrospective study. *Gynecol. Oncol.* 2019 Feb;152(2):259-64. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.11.034.
44. Browne A., Sriraksa R., Guney T., Rama N., Van Noorden S., Curry E. et al. Differential expression of IL-8 and IL-8 receptors in benign, borderline and malignant ovarian epithelial tumours. *Cytokine*. 2013; 64(1):413-21. doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.006.
45. Carbotti G., Barisione G., Orenco A.M., Brizzolara A., Airoldi I., Bagnoli M. et al. The IL-18 antagonist IL-18-binding protein is produced in the human ovarian cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19(17): 4611-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0568.

Поступила 27.08.20

Принята к печати 20.02.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Тапальский Д.В.¹, Тимошкова Е.В.¹, Петровская Т.А.¹, Осипкина О.В.¹, Карпов И.А.²

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИЙ ИЗ ДВУХ КАРБАПЕНЕМОВ В ОТНОШЕНИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹УО Гомельский государственный медицинский университет Минздрава Республики Беларусь, 246050, Гомель, Беларусь;

²УО Белорусский государственный медицинский университет Минздрава Республики Беларусь, 220116, Минск, Беларусь

Комбинированная антибиотикотерапия широко используется при инфекциях, вызванных карбапенеморезистентными штаммами K. pneumoniae. Цель работы – выявление синергидной активности комбинаций из двух карбапенемов в отношении множественно- и экстремально-антибиотикорезистентных штаммов K. pneumoniae, продуцирующих карбапенемазы различных типов. Для 60 антибиотикорезистентных штаммов K. pneumoniae, выделенных в 8 городах Беларуси, методом последовательных микроразведений определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) колистина и карбапенемов, выполнена детекция генов карбапенемаз и фосфоэтаноламинтрансфераз. Методом «шахматной доски» определена чувствительность к комбинации эртапенема и дорипенема. Выявлены высокие значения МПК карбапенемов для штаммов – продуцентов карбапенемазы NDM (МПК₅₀ меропенема 64 мг/л, МПК₅₀ дорипенема 64 мг/л). Дорипенем проявлял большую активность, МПК дорипенема ≤ 16 мг/л (низкий уровень резистентности) определялась у 28 (46,7%) штаммов, МПК меропенема ≤ 16 мг/л – у 8 (13,3% штаммов). Эффект потенцирования активности дорипенема эртапенемом в фиксированной фармакокинетической / фармакодинамической концентрации наблюдали в отношении 20,0% штаммов, продуцирующих карбапенемазу KPC и 29,0% штаммов, продуцирующих карбапенемазу OXA-48. Потенцирующий эффект не зависел от наличия устойчивости к колистину. Таким образом, подтверждена способность эртапенема потенцировать антимикробную активность дорипенема и меропенема в отношении части штаммов, продуцирующих сериновые карбапенемазы (KPC и OXA-48). Показана необходимость рутинного определения истинных значений МПК карбапенемов для оптимизации режимов их дозирования и выбора схем комбинированной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; антибиотикорезистентность; карбапенемазы; эртапенем; меропенем; дорипенем; синергидная активность.

Для цитирования: Тапальский Д.В., Тимошкова Е.В., Петровская Т.А., Осипкина О.В., Карпов И.А. Микробиологическая эффективность комбинаций из двух карбапенемов в отношении антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (5): 304-309. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>

Tapalski D.V.¹, Timoshkova E.V.¹, Petrovskaya T.A.¹, Osipkina O.V.¹, Karpov I.A.²

MICROBIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE COMBINATIONS OF TWO CARBAPENEMS AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS

¹Gomel State Medical University, 246050, Gomel, Belarus;

²Belarusian State Medical University, 220116, Minsk, Belarus

Combined antibiotic therapy is widely used for infections caused by carbapenem-resistant K. pneumoniae. The objective of this work was to identify the synergistic activity of combinations of two carbapenems against multidrug- and extensively drug-resistant K. pneumoniae strains producing various types of carbapenemases. For 60 antibiotic-resistant K. pneumoniae strains isolated in 8 cities of Belarus, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of colistin and carbapenems were determined by subsequent broth microdilution method, and the genes of carbapenemases and phosphoethanolamine transferases were detected. The checkerboard method was used to determine the sensitivity to the combination of ertapenem and doripenem. High MIC values of carbapenems were revealed for NDM carbapenemase-producing strains (MIC₅₀ of meropenem 64 mg/L, MIC₅₀ of doripenem 64 mg/L). Doripenem was more active; MIC of doripenem ≤ 16 mg/L (low level of resistance) was determined in 28 (46.7%) strains, MIC of meropenem ≤ 16 mg/L — in 8 (13.3% of strains). The effect of potentiating the activity of doripenem with ertapenem at a fixed pharmacokinetic / pharmacodynamic concentration was observed for 20.0% of the strains producing KPC carbapenemase and 29.0% of the strains producing OXA-48 carbapenemase. The potentiating effect was independent of the presence of colistin resistance. Thus, the ability of ertapenem to potentiate the antimicrobial activity of doripenem and meropenem against some of the strains producing serine carbapenemases (KPC and OXA-48) was confirmed. The necessity of routine determination of the true MIC values of carbapenems was shown to optimize their dosage regimens and select the combination antibiotic therapy regimens.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; antimicrobial resistance; carbapenemases, ertapenem; meropenem; doripenem; synergistic activity.

For citation: Tapalski D.V., Timoshkova E.V., Petrovskaya T.A., Osipkina O.V., Karpov I.A. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 304-309 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>

For correspondence: *Tapalski D.V.*, PhD of medical Sciences, Head of Department of Microbiology, Virology and Immunology; e-mail: tapalskiy@gsmu.by

Information about authors:

Tapalski D.V., <http://orcid.org/0000-0002-9484-7848>;
Timoshkova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-3952-6187>;
Petrovskaya T.A., <http://orcid.org/0000-0001-6580-3603>;
Osipkina O.V., <http://orcid.org/0000-0002-1931-4224>;
Karpov I.A., <http://orcid.org/0000-0001-5816-2166>.

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of the budget theme №20200311.*

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

Received 03.11.2020
Accepted 13.11.2020

Введение. *Klebsiella pneumoniae* с множественной и экстремальной устойчивостью к антибиотикам в последние годы становится лидирующим и наиболее опасным госпитальным патогеном во многих регионах мира [1]. Устойчивость клебсиелл к карбапенемам в Беларуси, как правило, опосредована продукцией карбапенемаз различных типов и ассоциирована с устойчивостью к большинству β-лактамовых и не β-лактамовых антибиотиков [2]. В лечении инфекций, вызванных карбапенеморезистентными штаммами, широко использовали полимиксины, что закономерно привело к формированию и распространению устойчивости к ним [3, 4]. Так, по данным многоцентрового исследования «МАРАФОН 2015-2016», у 14,4% нозокомиальных штаммов энтеробактерий обнаружена продукция карбапенемаз, 21,2% карбапенемазопродуцирующих штаммов имели устойчивость к колистину [5]. Особого внимания заслуживает горизонтальное распространение плазмидно-опосредованных генов фосфоэтанолламинтрансферазы *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, способствующее быстрому накоплению устойчивости к полимиксинам в бактериальных популяциях энтеробактерий [6].

Комбинированная антибиотикотерапия с включением карбапенемов и полимиксинов широко используется при инфекциях, вызванных карбапенеморезистентными штаммами *K. pneumoniae*. Участвовавшие случаи выделения штаммов *K. pneumoniae* с устойчивостью высокого уровня одновременно к антибиотикам каждой из этих групп требует поиска альтернативных комбинаций, активных в отношении штаммов с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью [7]. Исследования, выполненные *in vitro*, а также на животных моделях, показали эффективность комбинаций из двух карбапенемов в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* [8, 9]. Теоретическое обоснование использования комбинаций из двух карбапенемов, главным образом эртапенема с другими карбапенемами, заключается в «суицидальном ингибировании» активного центра карбапенемазы эртапенемом за счет его более высокой аффинности. В результате такого ингибирования предотвращается ферментативный гидролиз молекул второго карбапенема [10]. Комбинацию эртапенема с меропенемом и дорипенемом с успехом применяли для лечения вентилятор-ассоциированной пневмонии, инфекций мочевыводящих путей, бактериемии, вызванных колистинорезистентными карбапенемазопро-

дуцирующими штаммами *K. pneumoniae* [11]. Показана клиническая эффективность комбинации меропенем – эртапенем в лечении инфекций кровотока, вызванных карбапенеморезистентными штаммами *K. pneumoniae* – продуцентами карбапенемазы КРС [12]. Данные о микробиологической и клинической эффективности комбинаций из двух карбапенемов в отношении продуцентов карбапенемаз других типов крайне ограничены. Это может быть связано со значительным преобладанием карбапенемазы КРС в странах, где были выполнены исследования [13]. Вместе с тем, в Республике Беларусь и Российской Федерации устойчивость *K. pneumoniae* к карбапенемам обусловлена главным образом продукцией карбапенемазы ОХА-48, реже NDM [2, 5].

Цель исследования – выявление синергидной активности комбинаций из двух карбапенемов в отношении множественно- и экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы различных типов.

Материал и методы. В исследование включено 60 штаммов *K. pneumoniae* с множественной либо экстремальной антибиотикорезистентностью. Все штаммы были выделены в 2016-2019 гг. в 20 организациях здравоохранения 8 городов Беларуси (Минск – 16 штаммов, Витебск – 17 штаммов, Гомель – 19 штаммов, районные центры Гомельской области – 9 штаммов). Все штаммы имели устойчивость к карбапенемам (МПК меропенема > 8 мг/л), обусловленную продукцией карбапенемаз. Детекция генов карбапенемаз выполнена методом ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR КРС/ОХА-48-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация. Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) меропенема, дорипенема, колистина выполнено методом последовательных микроразведений в бульоне Мюллер-Хинтон (BD, США) в стерильных круглодонных 96-луночных полистироловых планшетах в соответствии с ISO 20776-1:2006 [14].

Для штаммов с устойчивостью к колистину (МПК > 2 мг/мл) выполнен поиск генов фосфоэтанолламинтрансферазы *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* методом ПЦР с электрофоретической детекцией [15]. В качестве позитивных контролей использовали *mcr*-позитивные штаммы *Escherichia coli* из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Российская Федерация.

Для оценки способности эртапенема потенцировать активность других карбапенемов выполнено определение МПК меропенема и дорипенема в присутствии фиксированной концентрации эртапенема 0,5 мг/л. Используемая концентрация эртапенема соответствует его фармакокинетической/фармакодинамической (ФК/ФД) концентрации, рекомендованной EUCAST [16]. Фактор потенцирования (ФП) рассчитывали как соотношение МПК меропенема (дорипенема) к МПК меропенема (дорипенема) в присутствии фиксированной ФК/ФД концентрации эртапенема.

Дополнительно оценивали чувствительность к комбинации дорипенема с эртапенемом для 15 штаммов *K. pneumoniae* с использованием метода «шахматной доски» [17]. Рассчитывали фракционные подавляющие концентрации (ФПК) для каждого из антибиотиков в комбинации:

$$\text{ФПК}_A = \text{МПК}_{AB} / \text{МПК}_A$$
$$\text{ФПК}_B = \text{МПК}_{BA} / \text{МПК}_B$$

где МПК_{AB} – минимальная подавляющая концентрация антибиотика А в присутствии антибиотика В, МПК_A – минимальная подавляющая концентрация антибиотика А без добавления второго антибиотика.

Индекс ФПК (ΣФПК) рассчитывался как сумма ФПК каждого из антибиотиков в комбинации:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{ФПК}_A + \text{ФПК}_B$$

При $\Sigma\text{ФПК} \leq 0,5$ эффект комбинации антибиотиков оценивался как синергидный, при $0,5 < \Sigma\text{ФПК} \leq 1$ – как аддитивный.

Контроль качества всех исследований по определению чувствительности к антибиотикам и их комбинациям выполняли с использованием референсных штаммов Американской коллекции типовых культур. После приготовления рабочих растворов антибиотиков параллельно с выполнением основного исследования готовили последовательные микроразведения рабочих растворов в бульоне Мюллер-Хинтон и определяли МПК референсных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Результаты. Продукция карбапенемазы КРС обнаружена у 15 штаммов *K. pneumoniae* из 3 городов, карбапенемазы ОХА-48 – у 31 штамма из 5 городов, металло-β-лактамазы (МБЛ) NDM – у 14 штаммов из 5 городов. Только 33 штамма (55,0%) сохраняли чувствительность к колистину (МПК ≤ 2 мг/л, см. рисунок). Колистинорезистентные штаммы выявлены среди продуцентов карбапенемаз всех трех типов. Из 16 штаммов *K. pneumoniae* с высокими уровнями резистентности к колистину (МПК 32-64 мг/л) 14 были продуцентами карбапенемазы ОХА-48.

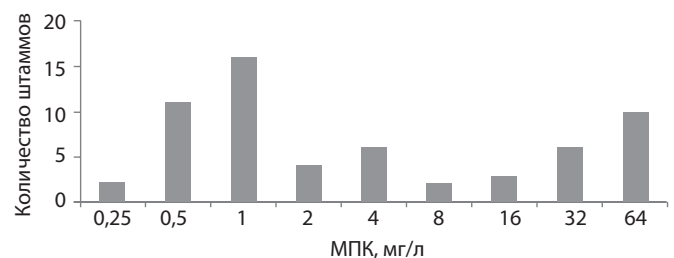
Фрагменты генов фосфоэтаноламинтрансферазы *mcr-1* (502 п.н.), *mcr-2* (379 п.н.), *mcr-3* (296 п.н.) амплифицированы у соответствующих *mcr*-позитивных контрольных штаммов *E. coli*, но не обнаружены среди включенных в исследование колистинорезистентных штаммов *K. pneumoniae*.

Для всех штаммов подтверждена устойчивость к меропенему (МПК > 8 мг/л) и дорипенему (МПК > 2 мг/л). Штаммы, продуцирующие карбапенемазу ОХА-48, в целом имели менее выраженную устойчивость к карбапенемам (для меропенема МПК₅₀ – 32 мг/л, МПК₉₀ – 64 мг/л, для дорипенема МПК₅₀ – 64 мг/л, МПК₉₀ – 128 мг/л) по сравнению с продуцентами карбапенемаз КРС и NDM (табл. 1). Уровни устойчивости к дорипенему были максимальными у продуцентов МБЛ NDM (МПК₅₀ – 64 мг/л, МПК₉₀ – 256 мг/л).

Известно, что стандартный режим дозирования меропенема (внутривенное введение 1000 мг в течение 1 ч каждые 8 часов) обеспечивает его адекватную экспозицию (поддержание концентрации выше значения МПК в течение ≥40% интервала дозирования) для штаммов с МПК ≤ 4 мг/л. Увеличение разовой дозы до 2000 мг и ее введение в виде продленной 3-часовой инфузии позволяет выдержать адекватную экспозицию для штаммов с МПК меропенема ≤ 16 мг/л. Стандартный режим дозирования дорипенема (внутривенное введение 500 мг в течение 1 ч каждые 8 часов) эффективен в отношении штаммов с МПК ≤ 1 мг/л, увеличение разовой дозы до 1000 мг и ее введение в виде продленной 4-часовой инфузии позволяет воздействовать на штаммы с МПК дорипенема ≤ 8 мг/л [18]. Гуманизированные режимы терапии высокими дозами дорипенема в мышинных моделях, аналогичные 4-часовой инфузии 1000 мг каждые 8 ч, показали микробиологическую эффективность в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* с МПК дорипенема до 16 мг/л [19].

Только 8 из 60 исследуемых штаммов (13,3%) имели МПК меропенема ≤ 16 мг/л. Все они продуцировали карбапенемазу ОХА-48. В присутствии фиксированной концентрации эртапенема 0,5 мг/л отмечено снижение МПК меропенема в 2-4 раза только у 5 штаммов *K. pneumoniae* (8,3%). Дорипенем являлся более активным карбапенемом, МПК дорипенема ≤ 16 мг/л определена у 28 (46,7%) штаммов. Эффект потенцирования активности дорипенема эртапенемом в ФК/ФД-концентрации был отмечен только для штаммов, продуцирующих карбапенемазу КРС (в отношении 20,0% таких штаммов) и карбапенемазу ОХА-48 (в отношении 29,0% штаммов). Потенцирующий эффект не зависел от наличия устойчивости к колистину и отмечался в отношении 18,2% колистиночувствительных и 22,2% колистинорезистентных штаммов. Не выявлено штаммов, для которых эффект комбинаций меропенема или дорипенема с 0,5 мг/л эртапенема был бы антагонистическим.

Для количественной оценки фармакодинамических взаимодействий проведено исследование комбинации дорипенема с эртапенемом методом «шахматной доски». В него включены 15 штаммов (по 3 штамма – продуцента карбапенемаз КРС и ОХА-48 с выявленным в предварительном эксперименте эффектом потенцирования эртапенемом антибактериальной активности дорипенема, и по 3 штамма – продуцента карбапенемаз КРС, ОХА-48 и NDM, для которых указанный эффект не наблюдали). Полученные методом «шахматной доски» результаты дополняют результаты определения МПК дорипенема в присутствии фиксированной ФК/ФД-концентрации эр-



Гистограмма распределения минимальных подавляющих концентраций колистина для штаммов *K. pneumoniae*.

тапенема, и в целом согласуются с ними (табл. 2). Так, для 5 из 6 штаммов – продуцентов карбапенемаз КРС и ОХА-48, у которых в предварительном эксперименте выявлен эффект потенцирования для комбинации дорипенем-эртапенем, методом «шахматной доски» подтвержден синергидный эффект данной комбинации (ΣФПК 0,31–0,50). Еще для одного штамма эффект взаимодействия аддитивный (ΣФПК 1,00). Аддитивный эффект комбинации дорипенем-эртапенем выявлен также для 2 из 3 штаммов – продуцентов карбапенемазы КРС и 2 из 3 штаммов – продуцентов карбапенемазы ОХА-48, для которых в предварительном эксперименте с фиксированной концентрацией эртапенема потенцирующий эффект отсутствовал. Вместе с тем, эффект комбинации дорипенем-эртапенем был нейтральным в отношении всех протестированных штаммов, продуцирующих МБЛ NDM (ΣФПК 1,50–2,00).

Для всех штаммов – продуцентов карбапенемазы ОХА-48, а также для 3 из 6 штаммов – продуцентов карбапенемазы КРС методом «шахматной доски» выявлено снижение МПК дорипенема с исходных 16-64 мг/л до 2-8 мг/л в присутствии эртапенема.

Обсуждение. Эффективность бактерицидного действия β-лактамных антибиотиков зависит от времени поддержания их концентрации в очаге инфекции на

уровне, превышающем значение МПК для возбудителя ($t > \text{МПК}$) [20]. Полученные результаты о распределении МПК карбапенемов важны для оптимизации режимов дозирования. Показано, что изменение режима дозирования позволяет в некоторых случаях преодолевать устойчивость к карбапенемам низкого уровня без подключения препаратов резерва [21]. Полученные результаты обосновывают возможность эффективного антимикробного воздействия на карбапенеморезистентные штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы ОХА-48 и КРС, путем оптимизации режима дозирования карбапенемов (увеличение разовой дозы, использование продленных инфузий). Поскольку дорипенем является наиболее устойчивым из всех карбапенемов в растворенном состоянии при комнатной температуре (стабилен в течение 8 ч, меропенем и имипенем – 4 ч, эртапенем – 6 часов) выбор его для использования в виде пролонгированных инфузий более предпочтителен [22].

Потенцирующий эффект фиксированной ФК/ФД концентрации эртапенема проявлялся преимущественно в комбинации с дорипенемом и отмечен в отношении штаммов, продуцирующих карбапенемазы ОХА-48 и КРС. Для меропенема эффект потенцирования антибактериальной активности эртапенемом в ФК/ФД концентрации значительно менее выражен. Он обнаруживался

Таблица 1

Чувствительность к меропенему и дорипенему карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*

Антибиотик	Тип продуцируемой карбапенемазы	% изолятов со значением МПК, мг/л								МПК, мг/л	
		4	8	16	32	64	128	256	512	50%	90%
Меропенем	КРС (n=15)	0,0	0,0	0,0	46,7	26,7	26,7	0,0	0,0	64	128
	ОХА-48 (n=31)	0,0	0,0	25,8	58,1	16,1	0,0	0,0	0,0	32	64
	NDM (n=14)	0,0	0,0	0,0	21,4	64,3	0,0	7,1	7,1	64	256
Дорипенем	КРС (n=15)	0,0	0,0	20,0	46,7	33,3	0,0	0,0	0,0	32	64
	ОХА-48 (n=31)	6,5	9,7	64,5	19,4	0,0	0,0	0,0	0,0	16	32
	NDM (n=14)	0,0	0,0	0,0	21,4	57,1	7,1	14,3	0,0	64	256

Таблица 2

Чувствительность карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* к дорипенему, эртапенему и их комбинации, метод «шахматной доски»

Штамм	Город	Карбапенемаза	Потенцирование (предварительный эксперимент)	МПК		ФПК		ΣФПК	Эффект
				ДОР	ЭРТ	ДОР/ЭРТ	ЭРТ/ДОР		
В-387	Витебск	КРС	Есть	16	64	4	8	0,38	Синергидный
В-388	Витебск	КРС	Есть	64	128	8	32	0,38	Синергидный
МК-021	Минск	КРС	Есть	64	128	32	64	1,00	Аддитивный
БК-079	Жлобин	КРС	Нет	64	128	64	128	2,00	Нейтральный
В-644	Витебск	КРС	Нет	32	128	16	8	0,56	Аддитивный
В-074	Витебск	КРС	Нет	16	128	8	32	0,75	Аддитивный
БК-164	Жлобин	ОХА-48	Есть	16	64	4	4	0,31	Синергидный
БК-039	Гомель	ОХА-48	Есть	16	128	4	16	0,38	Синергидный
БК-051	Гомель	ОХА-48	Есть	16	64	4	16	0,50	Синергидный
БК-044	Петриков	ОХА-48	Нет	16	64	2	64	1,13	Нейтральный
БК-074	Гомель	ОХА-48	Нет	16	64	8	16	0,75	Аддитивный
37221	Минск	ОХА-48	Нет	16	64	8	16	0,75	Аддитивный
БК-060	Гомель	NDM	Нет	256	128	128	128	1,50	Нейтральный
БК-080	Жлобин	NDM	Нет	64	64	64	64	2,00	Нейтральный
БК-117	Светлогорск	NDM	Нет	32	32	16	32	1,50	Нейтральный

Примечание. ДОР – дорипенем, ЭРТ – эртапенем, ДОР/ЭРТ – дорипенем в присутствии эртапенема, ЭРТ/ДОР – эртапенем в присутствии дорипенема.

среди отдельных штаммов, продуцирующих карбапенемазы ОХА-48 и КРС, и не приводил к формальному восстановлению их чувствительности к меропенему (падение МПК меропенема до уровня ≤ 8 мг/л).

Эртапенем является наименее активным *in vitro* карбапенемом в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, что может быть связано с наиболее высокой аффинностью к нему карбапенемаз [23]. В настоящем исследовании у 9 из 15 штаммов, тестированных методом «шахматной доски», МПК эртапенема в 4-8 раз превышала МПК дорипенема. Эффект потенцирования дорипенема эртапенемом (синергидный либо аддитивный эффект) выявлялся только для штаммов – продуцентов сериновых карбапенемаз (КРС и ОХА-48), и отсутствовал у штаммов – продуцентов МБЛ NDM. Это может быть связано с различиями в строении активных центров карбапенем-гидролизующих ферментов и в целом соответствует литературным данным [24]. Потенцирующий эффект был обнаружен как в отношении колистиночувствительных, так и в отношении колистинорезистентных штаммов. Для продуцентов сериновых карбапенемаз степень выраженности потенцирующего эффекта комбинации из дорипенема и эртапенема была штаммоспецифичной, поскольку вероятно он обусловлен не только типом карбапенемазы, но и другими фенотипическими и генотипическими характеристиками. Это согласуется с результатами большинства опубликованных исследований синергизма антибиотиков *in vitro* и подчеркивает необходимость рутинного использования методов определения чувствительности к комбинациям антибиотиков.

Проведенное исследование показало микробиологическую эффективность комбинаций из двух карбапенемов (главным образом комбинации дорипенем-эртапенем) в отношении карбапенеморезистентных штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазу ОХА-48, и, в меньшей степени, в отношении продуцентов карбапенемазы КРС. Необходимо отметить, что в Республике Беларусь и Российской Федерации ОХА-48 является самым распространенным типом карбапенемаз среди энтеробактерий, а карбапенемаза КРС встречается только у единичных штаммов [2, 5]. Определение типа карбапенемазы возможно не только с использованием молекулярно-генетических тестов, доступных в специализированных научно-исследовательских лабораториях, но и простыми фенотипическими методами. Так, присутствие у штамма МБЛ NDM как правило проявляется высокими значениями МПК карбапенемов и может быть подтверждено достаточно простым методом комбинированных дисков, основанным на ингибировании этого фермента металлохелаторами [25].

Кроме того, для оптимизации режимов антибиотикотерапии, позволяющих преодолеть устойчивость к карбапенемам низкого уровня, и эмпирического назначения комбинаций антибиотиков при инфекциях, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными грамотрицательными возбудителями, требуется знание истинных значений МПК основных антибиотиков (карбапенемов, аминогликозидов, полимиксинов), а не только категорий чувствительности к ним (чувствителен/умеренно-устойчив/устойчив). Таким образом, широкое внедрение методов определения МПК антибиотиков в рутинную работу микробиологических лабораторий становится насущной потребностью практического здравоохранения.

Заключение. Подтверждена способность эртапенема потенцировать антимикробную активность дорипенема и меропенема в отношении штаммов, продуцирующих сериновые карбапенемазы (КРС и ОХА-48). Показана необходимость рутинного определения истинных значений МПК карбапенемов для оптимизации режимов их дозирования и выбора схем комбинированной антибиотикотерапии.

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 20200311.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6-20, 22-24 см. REFERENCES)

1. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020; 22(1): 4-19.
2. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О., Савельева А.К., Козловская И.В., Козик А.П. и др. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных *Klebsiella pneumoniae*: распространение в Беларуси. *Здравоохранение*. 2017; 3: 40-7.
5. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2015–2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 147-59.
22. Стецок О.У., Андреева И.В., Козлов Р.С. Новый карбапенемный антибиотик дорипенем: перспективы применения в клинической практике. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008; 10(3): 245-59.

REFERENCES

1. Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigrora I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2020; 22(1): 4-19. (in Russian)
2. Tapalski D.V., Osipov V.A., Yevseyenko E.O., Savelyeva A.K., Kozlovskaya I.V., Kozik A.P., et al. Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extreme antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: occurrence in Belarus. *Zdravookhranenie*. 2017; 3: 40-7. (in Russian)
3. Stefaniuk E.M., Tyski S. Colistin resistance in Enterobacterales strains – a current view. *Pol. J. Microbiol.* 2019; 68(4): 417-27. DOI: 10.33073/pjm-2019-055.
4. Rojas L.J., Salim M., Cober E., Richter S.S., Perez F., Salata R.A. et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(6): 711-8. DOI: 10.1093/cid/ciw805.
5. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shajdullina E.R., Azyov I.S. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multi-center epidemiological study MARATHON 2015–2016. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 147-59. (in Russian)
6. Elbediwi M., Li Y., Paudyal N., Pan H., Li X., Xie S. et al. Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980-2018). *Microorganisms*. 2019; 7(10): 461. DOI: 10.3390/microorganisms7100461.
7. Petrosillo N., Giannella M., Lewis R., Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013; 11(2): 159-77. DOI: 10.1586/eri.12.162.
8. Galani I., Nafplioti K., Chatzikonstantinou M., Souli M. *In vitro* evaluation of double-carbapenem combinations against OXA-

- 48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates using time-kill studies. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(5): 662-8. DOI: 10.1099/jmm.0.000725.
9. Cancelli F., Oliva A., De Angelis M., Mascellino M.T., Mastroianni C.M., Vullo V. Role of double-carbapenem regimen in the treatment of infections due to carbapenemase producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a single-center, observational study. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 2785696. DOI: 10.1155/2018/2785696.
 10. Cprek J.B., Gallagher J.C. Ertapenem-containing double-carbapenem therapy for treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 60(1): 669-673. DOI: 10.1128/AAC.01569-15.
 11. Mashni O., Nazer L., Le J. Critical review of double-carbapenem therapy for the treatment of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Ann. Pharmacother.* 2019; 53(1): 70-81. DOI: 10.1177/1060028018790573.
 12. White B.P., Patel S., Tsui J., Chastain D.B. Adding double carbapenem therapy to the armamentarium against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bloodstream infections. *Infect. Dis.* 2019; 51(3): 161-7. DOI: 10.1080/23744235.2018.1527470.
 13. De Pascale G., Martucci G., Montini L., Panarello G., Cutuli S.L., Di Carlo D. et al. Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study. *Crit. Care.* 2017; 21(1): 173. DOI: 10.1186/s13054-017-1769-z.
 14. ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1 : Reference method for testing the in vitro, 2006. Available at: www.iso.org/standard/41630.html. Accessed October 01, 2020.
 15. Rebelo A.R., Bortolaia V., Kjeldgaard J.S. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 2018; 23(6): 17-00672. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
 16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 10.0., 2020. Available at: www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Accessed October 01, 2020.
 17. Laishram S., Pragasam A.K., Bakthavatchalam Y.D., Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J. Med. Microbiol.* 2017; 35(4): 445-68. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_17_189.
 18. Ikawa K., Morikawa N., Uehara S., Monden K., Yamada Y., Honda N., Kumon H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic target attainment analysis of doripenem in infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009; 33(3): 276–9. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.08.031.
 19. Van Wart S.A., Andes D.R., Ambrose P.G., Bhavnani S.M.. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling to support doripenem dose regimen optimization for critically ill patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 63(4): 409–14. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.027.
 20. Mouton R.W., Punt N. Use of the $t > MIC$ to choose between different dosing regimens of β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 47(4): 500-1. DOI: 10.1093/jac/47.4.500.
 21. O'Donnell J.N., Miglis C.M., Lee J.Y., Tuvell M., Lertharakul T., Scheetz M.H. Carbapenem susceptibility breakpoints, clinical implications with the moving target. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2016; 14(4): 389-401. DOI: 10.1586/14787210.2016.1159131.
 22. Stetsiouk O.U., Andreeva I.V., Kozlov R.S. Doripenem: a new carbapenem antimicrobial. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2008; 10(3): 245-9. (in Russian)
 23. Anderson K.F., Lonsway D.R., Rasheed J.K., Biddle J., Jensen B., McDougal L.K., Carey R.B. et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(8): 2723-5. DOI: 10.1128/JCM.00015-07.
 24. Poirel L., Kieffer N., Nordmann P. *In vitro* evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(1): 156-61. DOI: 10.1093/jac/dkv294.
 25. Bialvaei A.Z., Kafil H.S., Asgharzadeh M., Yousef Memar M., Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J. Chemother.* 2016; 28(1): 1-19. DOI: 10.1179/1973947815Y.0000000063.

Поступила 03.11.20

Принята к печати 13.11.20

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© АКАЙЗИН Э.С., АКАЙЗИНА А.Э., 2021

Акайзин Э. С., Акайзина А. Э.

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТАЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФИЦИРОВАННОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА, ОСЛОЖНЁННОГО ФЛЕГМОНЫ ЗАБРЮШИННОЙ КЛЕТЧАТКИ

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153012, Иваново, Россия

Цель исследования – оценка информативности показателей летучих жирных кислот для дифференциальной диагностики инфицированного панкреонекроза (ИПН), осложнённого флегмоны забрюшинной клетчатки. Работа основана на результатах обследования и лечения 44 больных с инфицированным панкреонекрозом, осложнённым флегмоны забрюшинной клетчатки. Проведён анализ концентраций летучих жирных кислот: уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой на автоматизированном газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «HP-FFAP» и пламенно-ионизационным детектором. Показатели уксусной кислоты и суммы летучих жирных кислот статистически значимо выше у больных с инфицированным панкреонекрозом с тотальными забрюшинными флегмонами по сравнению с показателями летучих жирных кислот больных инфицированным панкреонекрозом с параколическими флегмонами и по сравнению с показателями летучих жирных кислот больных инфицированным панкреонекрозом с парапанкреатическими флегмонами. Показатели уксусной кислоты и суммы ЛЖК можно использовать в качестве дополнительных критериев для дифференциальной диагностики ИПН, осложнённого флегмоны забрюшинной клетчатки.

Ключевые слова: инфицированный панкреонекроз; диагностика; летучие жирные кислоты.

Для цитирования: Акайзин Э. С., Акайзина А. Э. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике инфицированного панкреонекроза, осложнённого флегмоны забрюшинной клетчатки. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (5): 310-314. DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-310-314>

Akayzin E. S., Akayzina A. E.

INDICATORS OF VOLATILE FATTY ACIDS IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF INFECTED PANCREONECROSIS COMPLICATED BY RETROPERITONEAL PHLEGMON

Ivanovo State Medical Academy, 153012, Ivanovo, Russian Federation

The aim of the study was to assess the informative value of volatile fatty acid parameters for the differential diagnosis of infected pancreatic necrosis (IPN), complicated by retroperitoneal cellulitis. The work was based on the results of examination and treatment of 44 patients with infected pancreatic necrosis. The analysis of concentrations of volatile fatty acids: acetic, propionic, butyric and isovaleric was carried out on a Kristallux-4000 automated gas chromatograph with an HP-FFAP capillary column and a flame ionization detector. The indicators of acetic acid and the amount of volatile fatty acids were statistically significantly higher in patients with infected pancreatic necrosis with total retroperitoneal phlegmons in comparison with the indicators of volatile fatty acids in patients with infected pancreatic necrosis with paracolic phlegmons and in comparison with indicators of volatile fatty acids in patients with infected pancreatic necrosis phlegmons. The indicators of acetic acid and the amount of VFA can be used as additional criteria for the differential diagnosis of IPN complicated by phlegmons of the retroperitoneal tissue.

Key words: infected pancreatic necrosis; diagnostics; volatile fatty acids.

For citation: Akayzin E.S., Akayzina A.E. Indicators of volatile fatty acids for differential diagnostics of infected of pancreatic necrosis complicated by retroperitoneal phlegmon. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 310-314 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-310-314>

For correspondence: Akayzin E. S., Doctor of Medical Sciences, Professor; e-mail: ed.s.a@mail.ru

Information about authors:

Akayzin E. S., <https://orcid.org/0000-0002-4600-8054>;

Akayzina A. E., <https://orcid.org/0000-0001-9805-1188>.

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 01.09.2020

Accepted 01.10.2020

Введение. Поздняя диагностика осложнений остро-го панкреатита, неадекватный выбор консервативного и хирургического лечения ведут к высокой летальности больных. Доля гнойных осложнений среди причин

смертности у больных с панкреонекрозом достигает 80%. Эта категория пациентов – наиболее сложная в силу тяжести состояния, их диагностика и лечение требуют значительных финансовых затрат [1-8]. Для

Для корреспонденции: Акайзин Эдуард Семенович, д-р мед. наук, проф.; e-mail: ed.s.a@mail.ru

деструктивного панкреатита характерна закономерная трансформация стерильных форм в инфицированные. Основным источником инфекции является эндогенная транслокация микробов. Условно-патогенные бактерии и дрожжеподобные грибы, колонизирующие кишечник, способны транслоцироваться в некротические ткани [4]. Наиболее опасным гнойно-септическим осложнением остро некротического панкреатита являются флегмоны забрюшинной клетчатки – инфицирование клетчатки вокруг поджелудочной железы. У больных с инфицированным панкреонекрозом (ИПН) диагностируют парапанкреатическую флегмону, параколическую флегмону, тотальную забрюшинную флегмону. Ультразвуковое сканирование и рентгеновская компьютерная томография позволяют дифференцировать жидкостные образования от мягкотканых воспалительно-некротических масс [3, 4], но не позволяют на ранних сроках выявлять наличие флегмон забрюшинной клетчатки у пациентов с деструктивным панкреатитом. Для диагностики флегмон забрюшинной клетчатки используют лейкоцитоз со сдвигом влево, воспалительные маркеры: повышение фибриногена, С-реактивного белка, прокальцитонина и др. [3].

Новые технологии лабораторной диагностики позволяют выявить метаболиты микробов в биологических жидкостях для оптимизации лечения заболеваний человека. Летучие жирные кислоты (ЛЖК) – органические кислоты являются метаболитами облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий [9-14]. К ним относятся уксусная, пропионовая, изомаляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая, капроновая кислоты. ЛЖК используют для диагностики дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта [17, 18], для экспресс-диагностики анаэробной инфекции путём обнаружения в патологическом материале больного ЛЖК, которые являются специфическими продуктами метаболизма облигатно-анаэробных бактерий [12, 14-16].

Для оптимизации диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний необходимо быстрое обнаружение возбудителей, их классификация как аэробов или факультативных анаэробов или облигатных анаэробов для выбора оптимального лечения [19-30]. Изучение содержания ЛЖК в биоптатах поджелудочной железы и периферической крови методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-спектрометрией (МС), позволило установить роль анаэробной неклостридиальной инфекции в развитии инфицированного панкреонекроза [2].

Значение анаэробной микрофлоры и её метаболитов – ЛЖК для диагностики ИПН до настоящего времени изучено недостаточно [2, 5-8, 29]. Дифференциальная диагностика ИПН, осложнённого флегмонами забрюшинной клетчатки, разработана недостаточно. Ни один из используемых в настоящее время лабораторных методов диагностики в полной мере не удовлетворяет запросам хирургов, так как не позволяет провести дифференциальную диагностику флегмон забрюшинной клетчатки.

Цель исследования – оценка информативности показателей ЛЖК для дифференциальной диагностики ИПН, осложнённого флегмонами забрюшинной клетчатки.

Материал и методы. Работа основана на результатах обследования и лечения 44 больных ИПН, осложнённым флегмонами забрюшинной клетчатки, находившихся в хирургическом отделении Ивановской областной клинической больницы (ретроспективное исследова-

ние). Диагноз ИПН устанавливали на основании клинических данных, результатов ультразвукового исследования, мультиспиральной компьютерной томографии, общепринятых лабораторных показателей. На основании выполненных исследований выделены три группы пациентов. В 1-ю группу включены 16 больных с ИПН, осложнённым парапанкреатическими флегмонами, 2-ю группу составили 14 пациентов с ИПН, осложнённым параколическими флегмонами; в 3-ю группу включены 14 пациентов с ИПН, осложнённым тотальными забрюшинными флегмонами. Всем больным проведено интенсивное консервативное лечение, выполнены различные оперативные вмешательства, эффективность которых оценена на основании клинико-лабораторных данных и инструментальных методик обследования.

После установления диагноза ИПН всем пациентам проведён анализ концентраций ЛЖК: уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой в крови ГХ методом. Подготовка образцов крови для ГХ выполнена методом жидкостной экстракции диэтиловым эфиром. ГХ для количественного определения уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот выполнена на автоматизированном газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «HP-FFAP» Agilent Technologies (длина – 50 м; диаметр – 0,32 мм; толщина фазы – 0,5 мкм) и пламенно-ионизационным детектором; газ-носитель – гелий [13, 16]. Идентификацию и количественное определение концентраций ЛЖК осуществляли при помощи аналитических стандартов и программного комплекса для обработки хроматографических данных «МультиХром». Продолжительность ГХ анализа ЛЖК составляет 40-60 мин с момента доставки исследуемого материала в лабораторию. Рассчитывали сумму ЛЖК.

Статистический анализ данных проведён с использованием программы STATISTICA 7.0 (StatSoft. Inc). Накопление, корректировка и систематизация полученных результатов осуществлены в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2007. Используются следующие методы анализа: расчёт размера выборки на основе статистической мощности; проверка нормальности распределения количественных данных с использованием критерия Шапиро-Уилка; оценка значимости различий количественных данных в независимых выборках с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Расчёт объема выборки исследования, необходимого для достижения требуемой мощности, выполнен по показателям уксусной кислоты и суммы ЛЖК. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описаны при помощи значений медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Результаты. При обследовании у пациентов диагностировали различной степени распространённости ИПН, осложнённый флегмонами забрюшинной клетчатки.

Для достижения 90% мощности исследования при уровне ошибки первого рода в 5% требуемый объём выборки составил от 4 до 8 пациентов. Распределение концентраций ЛЖК отличается от нормального, поэтому для описания данных использованы непараметрические статистические показатели, для оценки значимости различий количественных признаков в независимых выборках использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Содержание уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и сумма ЛЖК в крови у больных ИПН с флегмонами забрюшинной клетчатки представлено в табл. 1-3.

Показатели уксусной, пропионовой кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с параколическими флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК больных с парапанкреатическими флегмонами. По показателям масляной и изовалериановой кислот статистически значимых различий между группами нет.

Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК выше у больных ИПН с тотальными забрюшинными флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК больных ИПН с парапанкреатическими флегмонами. По показателю изовалериановой кислоты статистически значимого различия между группами не обнаружено.

Показатели уксусной, масляной кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с тотальными забрюшинными флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК больных с параколическими флегмо-

нами. По показателям пропионовой и изовалериановой кислот статистически значимого различия между группами нет.

Обсуждение. Хирургам необходима быстрая дифференциация забрюшинных флегмон для выбора оптимального консервативного и оперативного лечения.

ГХ анализ ЛЖК в крови отражает не только факт инфицирования панкреонекроза, но и распространённость патологического процесса [14, 29]. Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК у больных с ИПН, осложнённым тотальными забрюшинными флегмонами, превышают показатели больных с ИПН, осложнённым парапанкреатическими и параколическими флегмонами, что отражает более выраженную распространённость гнойно-воспалительного процесса у больных с ИПН, осложнённым тотальными забрюшинными флегмонами. Из показателей для дифференциации забрюшинных флегмон ЛЖК наиболее информативны показатели уксусной кислоты и суммы ЛЖК.

Таблица 1

Содержание ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с парапанкреатическими и параколическими флегмонами

Показатели, ммоль/л	Больные инфицированным панкреонекрозом с флегмоной					
	парапанкреатической (n=16)			параколической (n=14)		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Уксусная кислота*	0,32000	0,28500	0,38500	0,43000	0,42000	0,47000
Пропионовая кислота**	0,00835	0,00710	0,01700	0,03100	0,00870	0,04600
Масляная кислота	0,00320	0,00300	0,00365	0,00365	0,00310	0,00450
Изовалериановая кислота	0,00010	0,00008	0,00031	0,00035	0,00010	0,00051
Сумма ЛЖК*	0,34148	0,30082	0,40255	0,47251	0,44208	0,49011

Примечание. Различия значимы: * - $p < 0,00001$; ** - $p = 0,022$. U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Содержание ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с парапанкреатическими и тотальными забрюшинными флегмонами

Показатели, ммоль/л	Больные инфицированным панкреонекрозом с флегмоной					
	парапанкреатической (n=16)			тотальной забрюшинной (n=14)		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Уксусная кислота*	0,32000	0,28500	0,38500	0,58500	0,56000	0,62000
Пропионовая кислота**	0,00835	0,00710	0,01700	0,02600	0,01800	0,05800
Масляная кислота***	0,00320	0,00300	0,00365	0,00470	0,00390	0,00560
Изовалериановая кислота	0,00010	0,00008	0,00031	0,00014	0,00010	0,00031
Сумма ЛЖК*	0,34148	0,30082	0,40255	0,62767	0,58370	0,65665

Примечание. Различия значимы: * - $p < 0,00001$; ** - $p = 0,001$; *** - $p = 0,008$. U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 3

Содержание ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с тотальными забрюшинными и параколическими флегмонами

Показатели, ммоль/л	Больные инфицированным панкреонекрозом с флегмоной					
	Параколической (n=14)			тотальной забрюшинной (n=14)		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Уксусная кислота*	0,43000	0,42000	0,47000	0,58500	0,56000	0,62000
Пропионовая кислота	0,03100	0,00870	0,04600	0,02600	0,01800	0,05800
Масляная кислота**	0,00365	0,00310	0,00450	0,00470	0,00390	0,00560
Изовалериановая кислота	0,00035	0,00010	0,00051	0,00014	0,00010	0,00031
Сумма ЛЖК*	0,472510	0,442082	0,490110	0,62767	0,58370	0,65665

Примечание. Различия значимы: * - $p < 0,00001$; ** - $p = 0,046$. U-критерий Манна-Уитни.

Статистически значимые отличия показателей ЛЖК больных ИПН с парапанкреатическими флегмонами, больных ИПН с параколическими флегмонами и больных ИПН с тотальными забрюшинными флегмонами позволяют рекомендовать показатели ЛЖК крови для дифференциальной диагностики ИПН, осложнённого тотальными забрюшинными флегмонами, ИПН, осложнённого параколическими флегмонами и ИПН, осложнённого парапанкреатическими флегмонами.

Показатели ЛЖК позволяют установить диагноз панкреонекроза [6], дифференцировать инфицированный панкреонекроз и стерильный панкреонекроз [5, 15], дифференцировать ИПН, осложнённый абсцессами, от ИПН, осложнённого флегмонами [14, 29], дифференцировать ИПН, осложнённый флегмонами забрюшинной клетчатки.

Выводы:

1. Показатели уксусной, пропионовой кислот и суммы ЛЖК выше у больных инфицированным панкреонекрозом с параколическими флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с парапанкреатическими флегмонами.

2. Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК выше у больных инфицированным панкреонекрозом с тотальными забрюшинными флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с парапанкреатическими флегмонами.

3. Показатели уксусной, масляной кислот и суммы ЛЖК выше у больных инфицированным панкреонекрозом с тотальными забрюшинными флегмонами по сравнению с показателями ЛЖК у больных инфицированным панкреонекрозом с параколическими флегмонами.

4. Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК можно использовать в качестве критериев для дифференциальной диагностики инфицированного панкреонекроза, осложнённого флегмонами забрюшинной клетчатки.

Благодарность. Авторы выражают благодарность врачу-хирургу хирургического отделения ОБУЗ «Ивановская областная клиническая больница» Метелеву А. С. за оказанную помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 9-11, 14 см. REFERENCES)

1. Ермолов А.С., Иванов П.А., Благовестнов Д.А., Гришин А.А. Диагностика и лечение острого панкреатита. М.: Видар; 2013.
2. Буткевич А. П., Истратов В. Г., Бровкин А. Е., Наливайский А. А., Рябов М. Г., Клычникова Е. В. Комплексная оценка тяжести и эффективности интенсивной терапии панкреонекроза. *Московский хирургический журнал*. 2014; 3: 28-32.
3. Абдуллаев Э. Г., Бабышин В. В., Гусев А. В. Неотложная хирургия (Протоколы клинических рекомендаций по диагностике и лечению ОХЗ органов брюшной полости). Владимир: Изд-во ВлГУ; 2015.
4. Затевахин И.И., Кириенко А.И., Кубышкин В.А., ред. Абдоминальная хирургия. Национальное руководство: краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
5. Гагуа А.К., Метелев А.С., Акайзин Э.С. Клиническое значение показателей летучих жирных кислот для дифференциальной диагностики инфицированного и стерильного панкреонекроза. *Хирургическая практика*. 2018; 3: 16-20.
6. Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Метелев А.С. Клиническое значение показателей летучих жирных кислот крови для диагностики

- панкреонекроза. *Московский хирургический журнал*. 2018; 4: 20-4.
7. Метелев А.С., Акайзин Э.С., Гагуа А.К. Сравнительное исследование летучих жирных кислот в крови и в отделяемом панкреатических свищей при панкреонекрозе. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2018; 4: 232-6.
8. Гагуа А.К., Мохов Е.М., Акайзин Э.С., Метелев А.С. Значение летучих жирных кислот в оценке эффективности комплексного лечения панкреонекроза. *Верхневолжский медицинский журнал*. 2019; 3: 16-20.
13. Акайзин Э.С., Акайзина А.Э. Летучие жирные кислоты у детей с дисфункцией билиарного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 2: 112-5.
14. Акайзин Э. С., Гагуа А. К., Метелев А. С., Воробьев П. Ю. Способ диагностики абсцесса брюшной полости и забрюшинной флегмоны у больных с панкреонекрозом. Патент РФ № 2694097; 2019.
15. Акайзин Э.С., Метелев А.С., Акайзина А.Э. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике инфицированного и стерильного панкреонекроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 11: 644-8.
16. Акайзин Э.С., Кулагин В.Ф. Анализ количественного содержания летучих жирных кислот в диагностике гнойной инфекции у больных с осложненной травмой и в оценке эффективности лечения. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2017; 4: 57-8.
17. Алёшкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Алёшкин А.В. и др. Микробиоценозы и здоровье человека. М.: Династия; 2015.
18. Алёшкин В.А., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Миронов А.Ю., Волчецкий А.Л., Гудова Н.Н. Федеральные клинические рекомендации. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье; 2016.
19. Герасименко С.С., Шильяев Р.Р., Акайзин Э.С. Диагностика омфалитов у новорожденных, протекающих с участием анаэробной микрофлоры. *Вестник новых медицинских технологий*. 2008. 15(2): 112-3.
20. Миронов А.Ю. Газовая хроматография и масс-спектрометрия в диагностике анаэробов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 26: 45-51.
21. Покровский Е.Ж., Станкевич А.М., Акайзин Э.С. Диагностическое значение содержания летучих жирных кислот в крови и экссудате брюшной полости при распространенном перитоните. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2012; 2: 45-7.
22. Урсу Т. Н., Чемоданов В. В., Шниткова Е. В., Акайзин Э. С. Особенности моторно-эвакуаторной функции пищеварительного тракта у новорожденных детей. *Практическая медицина*. 2012. 5(60): 62-4.
23. Миронов А.Ю., Митрохин С.Д., Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н. Диагностическое и прогностическое значение метаболитов микрофлоры в различных биосубстратах у больных раком лёгкого и ХОБЛ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 9: 83-4.
24. Миронов А.Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: ООО Тираж; 2013.
25. Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н., Феданков И.Н., Митрохин С.Д., Миронов А.Ю. и др. Метаболиты микрофлоры различных биотопов при заболеваниях бронхолегочной системы. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 103(3):46-54.
26. Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Вальков К.С. Использование летучих жирных кислот для экспресс-диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции при гнойном холангите у больных механической желтухой. *Московский хирургический журнал*. 2016; 2: 23-7.
27. Вальков К.С., Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Алексахина Е.Л. Динамика показателей летучих жирных кислот, цитруллин и малонового диальдегида в комплексной оценке печёночной недостаточности у больных механической желтухой с гнойным холангитом. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2016; 2: 40-5.

GENERAL CLINICAL METHODS

28. Затевалов А.М., Селькова Е.П., Афанасьев С.С., Алёшкин А.В., Миронов А.Ю., Гусарова М.П. и др. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 117-21.
29. Акайзин Э.С., Гагуа А.К., Метелев А.С. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике гнойных осложнений панкреонекроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 12: 750-5.
30. Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селькова Е.П., Миронов А.Ю., Гречишников О.Г. Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(3): 153-7.

REFERENCES

1. Yermolov A.S., Ivanov P.A., Blagovestnov D.A., Grishin A.A. Diagnosis and treatment of acute pancreatitis. [Diagnostika i lecheniye ostrogo pankreatita]. Moscow: Vidar; 2013. (in Russian)
2. Butkevich A. T.S., Istratov V. G., Brovkin A. E., Nalivayskiy A. A., Ryabkov M.G., Klychnikova E.V. Comprehensive assessment of the severity and the effectiveness of intensive therapy of pancreatic necrosis. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 3: 28-32. (in Russian)
3. Abdullayev E.G., Babyshin V.V., Gusev A.V. Emergency surgery (Protocols of clinical guidelines for the diagnosis and treatment of TSS abdominal organs) [Neotlozhnaya khirurgiya (Protokoly klinicheskikh rekomendatsiy po diagnostike i lecheniyu OKHZ organov bryushnoy polosti)]. Vladimir: Izd-vo VIGU; 2015. (in Russian)
4. Zatevakhin I.L., Kiriyenko A.I., Kubyshkin V.A., eds. Abdominal surgery. National Leadership: Short Edition [Abdominal'naya khirurgiya. Natsional'noye rukovodstvo: kratkoye izdaniye]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
5. Gagua A.K., Metelev A.S., Akayzin E.S. Clinical value of indicators of volatile fatty acids for differential diagnostics of infected and sterile pancreatic necrosis. *Khirurgicheskaya praktika*. 2018; 3: 5-9. (in Russian)
6. Gagua A.K., Akayzin E.S., Metelev A.S. The clinical significance of volatile fatty acids for the diagnosis of pancreatic necrosis. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2018; 4: 20-4. (in Russian)
7. Metelev A.S., Akayzin E.S., Gagua A.K. Comparative study of volatile fatty acids in the blood and in the separated pancreatic fistula in pancreatic necrosis. *Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii*. 2018; 4: 232-6. (in Russian)
8. Gagua A.K., Mokhov E.M., Akayzin E.S., Metelev A.S. The value of volatile fatty acids in assessing the effectiveness of complex treatment of pancreatic necrosis. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 3: 16-20. (in Russian)
9. Garg P.K., Sharma M., Madan K., Sahni P., Banerjee D., Goyal R. Primary conservative treatment results in mortality comparable to surgery in patients with infected pancreatic necrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2010; 8 (12):1089-94.
10. Dellinger E. P., Forsmark C. E., Layer P., Levy P., Maravi-Poma E., Petrov M.S. et al. Determinant-based classification of acute pancreatitis severity: an international multidisciplinary consultation. *Ann. Surg.* 2012; 256 (6): 875-80. doi: 10.1097/SLA.0b013e318256f778.
11. Sarr M.G., Banks P. A., Bollen T. L., Dervenis C., Gooszen H. G., Johnson C. D., Vege S. S. The New Revised Classification of Acute Pancreatitis 2012. *Surgical Clinics of North America*, 2013; 93 (3):549-62. DOI: 10.1016/j.suc.2013.02.012.
12. Den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54 (9): 2325-40. doi: 10.1194/jlr.R036012.
13. Akaizin E.S., Akaizina A.E. The volatile fatty acids in children with dysfunction of biliary tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 2: 112-5. (in Russian)
14. Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S., Vorobiev P.Yu. Method for the diagnosis of abdominal abscess and retroperitoneal phlegmon in patients with pancreatic necrosis. Patent RF № 2694097; 2019. (in Russian)
15. Akayzin E.S., Metelev A.S., Akayzina A.E. Indicators of volatile fatty acids for differential diagnostics of infected and sterile of pancreatic necrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 11: 644-8. (in Russian)
16. Akaizin E.S., Kulagin V.F. Clinical significance of volatile fatty acids examination in wound discharge in patients with complicated trauma and in assessing the effectiveness of treatment. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2017; 4: 57-8. (in Russian)
17. Aleshkin V.A., Afanas'yev S.S., Karaulov A.V., Voropayeva E.A., Afanas'yev M.S., Aleshkin A.V. et al. Microbiocenosis and human health. [Mikrobiotsenozy i zdorov'ye cheloveka]. Moscow: Dinastiya; 2015. (in Russian)
18. Aleshkin V.A., Sel'kova E.P., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu., Volchetskiy A.L., Gudova N.N. Federal clinical guidelines. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents. [Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii. Opredeleniye disbioticheskikh izmeneniy zheludochno-kishechnogo trakta po markeram soderzhimogo kishechnika]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'ye; 2016. (in Russian)
19. Gerasimenko S.S., Shilyayev R.R., Akaizin E.S. Diagnosis of omphalites in newborns taking an anaerobic microflora. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2008. 15(2): 112-3. (in Russian)
20. Mironov A.Yu. Gas chromatography and mass spectrometry in diagnosis anaerobes. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 26: 45-51. (in Russian)
21. Pokrovskiy E.Zh., Stankevich A.M., Akaizin E.S. Diagnostic significance of volatile fatty acids content in blood and abdominal cavity exudate in disseminated peritonitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2012; 2: 45-7. (in Russian)
22. Ursu T.N., Chemodanov V.V., Shnitkova E.V., Akaizin E.S. The peculiarities of motor and evacuator function of digestive tract in neonates. *Prakticheskaya meditsina*. 2012; 5(60): 62-4. (in Russian)
23. Mironov A.Yu., Mitrokhin S.D., Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N. Diagnostic and prognostic value of various metabolites biosubstrates microflora in patients with lung cancer and COPD. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 9: 83-4. (in Russian)
24. Mironov A.Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. [Molekulyarnyye markery patogenov]. M.: OOO Tirazh; 2013. (in Russian)
25. Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N., Fedankov I.N., Mitrokhin S.D., Mironov A.Yu. et al. Metabolites of microflora of different habitats at the diseases of respiratory system. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2014; 103 (3):46-54 2014; 103(3):46-54. (in Russian)
26. Gagua A.K., Akayzin E.S., Val'kov K.S. The use of volatile fatty acids for the rapid diagnosis of anaerobic non-clostridial infection with purulent cholangitis in patients with obstructive jaundice. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2016; 2: 23-7. (in Russian)
27. Val'kov K.S., Gagua A.K., Akaizin E.S., Aleksakhina E.L. The dynamics of the indices of volatile fatty acids, citrulline and malondialdehyde in the complex evaluation of hepatic insufficiency in patients with mechanical jaundice and purulent cholangitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2016; 2: 40-5. (in Russian)
28. Zatevalov A.M., Sel'kova E.P., Afanas'yev S.S., Alyoshkin A.V., Mironov A.Yu., Gusarova M.P. et al. Assessment of microbiological disorders oropharyngeal and intestinal microflora using methods of mathematical modeling. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 117-21. (in Russian)
29. Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S. Indicators of volatile fatty acids in the differential diagnosis of purulent complications of pancreatic necrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 12: 750-5. (in Russian)
30. Zatevalov A.M., Gudova N.V., Oganesyana A.S., Selkova E.P., Mironov A.Yu., Grechishnikova O.G. Reference values of short-cellular fatty acids in saliva in intensive care unit patients without respiratory pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(3): 153-7. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Курочкин Д.В.¹, Маслюкова И.Е.¹, Субботина Т.Н.^{1,2}, Хазиева А.С.³, Васильев Е.В.³, Михалёв М.А.⁴, Дунаева Е.А.⁵, Миронов К.О.⁵

СКРИНИНГ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *JAK2* И *CALR* МЕТОДОМ АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ

¹Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, Россия;

²Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России, 660037, Красноярск, Россия;

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница», 660022, Красноярск, Россия;

⁴КГБУЗ «Городская клиническая больница №7», 660003, Красноярск, Россия;

⁵ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

*Ассоциированные с онкологическими заболеваниями, в том числе с Ph-миелопролиферативными новообразованиями (Ph-MPN), соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки. Поэтому, на начальном этапе выполнения молекулярно-генетических диагностических процедур желательно иметь возможность проведения в лаборатории скрининговых тестов. Это особенно важно, когда проводится анализ редких и разнообразных мутаций. В ряде работ для анализа Ph-MPN-ассоциированных мутаций в генах *JAK2* и *CALR* предлагается анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, high resolution melting), который имеет высокую чувствительность и подходит для скрининга всех типов мутаций. В большинстве просмотренных нами литературных источниках авторы для анализа соматических мутаций используют амплификаторы «LightCycler» (Roche) и гораздо реже амплификатор «CFX96» (Bio-Rad), который в свою очередь чаще представлен в Российских научно-практических и медицинских организациях.*

*Цель работы – скрининг соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM-анализа при использовании амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США) для пациентов с диагнозом Ph-MPN.*

*В настоящем исследовании HRM-анализ проводился на образцах ДНК от пациентов с мутациями в гене *JAK2* или в гене *CALR*. Программа «Precision Melt Analysis» выявила все варианты анализируемых мутаций, как однонуклеотидной замены в гене *JAK2* (с уровнем аллельной нагрузки в диапазоне 5-40%), так и разнообразных indel мутаций в гене *CALR* (с уровнем аллельной нагрузки в диапазоне 40-50%).*

*Таким образом, HRM-анализ, выполненный на приборе «CFX96» позволяет проводить скрининг высокоспецифичных для диагноза Ph-MPN мутаций в 14 экзоне гена *JAK2* и в 9 экзоне гена *CALR*. Включение данного скринингового исследования в алгоритм лабораторного тестирования позволяет повысить эффективность и доступность молекулярно-генетических технологий при диагностике Ph-MPN.*

Ключевые слова: *JAK2*; *CALR*; Ph-миелопролиферативные новообразования; анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM high resolution melting); пироквенирование.

Для цитирования: Курочкин Д.В., Маслюкова И.Е., Субботина Т.Н., Хазиева А.С., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Дунаева Е.А., Миронов К.О. Скрининг соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом анализа кривых плавления с высоким разрешением. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (5): 315-320. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-315-320>

Kurochkin D.V.¹, Maslyukova I.E.¹, Subbotina T.N.^{1,2}, Khazieva A.S.³, Vasiliev E.V.³, Mikhalev M.A.⁴, Dunaeva E.A.⁵, Mironov K.O.⁵

SCREENING OF SOMATIC MUTATIONS IN THE *JAK2* AND *CALR* GENES BY HIGH-RESOLUTION MELTING CURVE ANALYSIS

¹Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia;

²The Federal Siberian Research Clinical Center under FMBA of Russia, 660037, Krasnoyarsk, Russia;

³Regional Clinical Hospital, 660022, Krasnoyarsk, Russia;

⁴City Clinical Hospital No. 7, 660003, Krasnoyarsk, Russia;

⁵Central Research Institute of Epidemiology Rospotrebnadzor, 111123, Moscow, Russia

*Somatic mutations associated with oncological diseases, including Ph-myeloproliferative neoplasms (Ph-MPN), are very diverse, occur with different frequencies and different allelic burden levels. Therefore, at the initial stage of performing molecular-genetic diagnostic procedures, it is desirable to be able to conduct screening tests in the laboratory. This is especially important when analyzing rare and diverse mutations. Analysis of high resolution melting curves (HRM analysis), which has high sensitivity and is suitable for screening all types of mutations, in a number of studies is proposed for the analysis of Ph-MPN associated mutations in the *JAK2* and *CALR* genes. For analysis of somatic mutations in the majority of literature sources that we reviewed, the authors use the LightCycler (Roche) thermocycler and much rarely the CFX96 (Bio-Rad), which is often presented in Russian scientific and practical and medical organizations.*

Для корреспонденции: Субботина Татьяна Николаевна, канд.биол.наук, доц. каф. медицинской биологии СФУ, науч. сотр. ФСНКЦ ФМБА; e-mail: stn.25@mail.ru

The aim of the study was to screen the somatic JAK2 and CALR mutations by HRM analysis using the CFX96 thermocycler and the Precision Melt Analysis software (Bio-Rad, USA) for patients with Ph-MPN. In the present research, HRM analysis was conducted on the DNA samples from patients with mutations in the JAK2 or in the CALR gene. The Precision Melt Analysis software identified all variants of the analyzed mutations, both a single nucleotide substitution in the JAK2 gene (with allelic burden level in the range of 5-40%), and various indel mutations in the CALR gene (with allelic burden level in the range of 40-50%). Therefore, the HRM analysis that was conducted on the CFX96 allows screening of highly specific mutation for the diagnosis of Ph-MPN in the exon 14 of the JAK2 gene and in the exon 9 of the CALR gene. The inclusion of this screening research in the laboratory testing algorithm improves the efficiency and accessibility of molecular genetic technologies in the diagnosis of Ph-MPN.

Key words: JAK2; CALR; Ph-myeloproliferative neoplasms; high-resolution melt curve analysis; pyrosequencing.

For citation: Kurochkin D.V., Maslyukova I.E., Subbotina T.N., Khazieva A.S., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A., Dunaeva E.A., Mironov K.O. Screening of somatic mutations in the JAK2 and CALR genes by high-resolution melting curve analysis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (5): 315-320 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-315-320>

For correspondence: Subbotina T.N., Ph. Sci. Biol., Associate Professor at the Department of Medical Biology SFU, Research Officer of FSFI FSRCC FMBA of Russia; e-mail: stn.25@mail.ru

Information about authors:

Subbotina T.N.: <http://orcid.org/0000-0001-7790-5033>;
Kurochkin D.V.: <http://orcid.org/0000-0003-1063-7702>;
Maslyukova I.E.: <http://orcid.org/0000-0003-1323-2612>;
Khazieva A.S.: <http://orcid.org/0000-0001-7525-6981>;
Vasiliev E.V.: <http://orcid.org/0000-0003-3780-3758>;
Mikhalev M.A.: <http://orcid.org/0000-0003-3769-3405>;
Dunaeva E.A.: <http://orcid.org/0000-0002-4477-8506>;
Mironov K.O.: <http://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.01.2021
Accepted 02.02.2021

Введение. Ph-миелопролиферативные новообразования (Ph-МПП) относят к клональным заболеваниям, характеризующимся аномальной пролиферацией одной или нескольких клеточных линий миелопоэза в костном мозге [1]. Соматические мутации в генах JAK2 и CALR являются драйверными и выявляются практически у 90% больных с Ph-МПП. Встречаемость мутации V617F в гене JAK2 среди пациентов с истинной полицитемией составляет 95%, с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) – 50-70%, с миелофиброзом (МФ) – 40-75%, распространенность мутаций в гене CALR среди пациентов с МФ и ЭТ составляет 20-30% [2-4]. В соответствии с последними клиническими рекомендациями ВОЗ наличие указанных мутаций является одним из основных диагностических критериев при диагностике Ph-МПП [5,6].

Продуктом экспрессии гена JAK2 является Янус-киназа 2 – тирозинкиназа, участвующая в JAK-STAT сигнальном пути, ответственном за пролиферацию клеток. В норме, в отсутствие цитокинового лиганда, псевдокиназный домен фермента ингибирует активность киназного домена. Однуклеотидная соматическая замена G на T в 1849 позиции 14 экзона в гене JAK2 приводит к нарушению аутоингибирования, что, в свою очередь, вызывает цитокин-независимую активацию самого JAK-STAT пути и, как следствие, активную пролиферацию клеток [7].

Многофункциональный белок кальретикулин выступает в роли транспортера ионов кальция внутрь клетки, поддерживая, таким образом, внутриклеточный гомеостаз кальция, принимает участие в механизмах адгезии и апоптоза клеток, а также в передаче клеточного сигнала через JAK-STAT путь. В 2013 году две исследовательские группы одновременно обнаружили и описали наличие различных вариантов соматических мутаций в

гене CALR у JAK2- и MPL-негативных пациентов с ЭТ и МФ [8, 9]. Все обнаруженные варианты генетических перестроек представлены инсерциями и делециями в 9 экзоне гена, кодирующего кальретикулин. На протяжении всего 9 экзона выявлено более 50 разных мутаций, среди которых выделяют 2 основных типа [3]. При 1 типе происходит делеция 52 нуклеотидов, при 2 типе происходит инсерция 5 нуклеотидов. Встречаемость этих двух мутаций составляет 88% от всех мутаций в гене CALR.

В настоящее время для выявления соматических мутаций, используется большое количество разнообразных молекулярно-генетических методов. Среди наиболее распространенных можно отметить следующие: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) [10], высокопроизводительное секвенирование (NGS) [11], секвенирование по Сэнгеру (Sanger sequencing) [11], фрагментный анализ (fragment analysis) [12], аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR) [10] и анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, high resolution melting) [13]. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки при выявлении соматических мутаций. Например, аллель-специфическая ПЦР, имеет ограниченные возможности в тех случаях, когда более одной мутации располагаются на исследуемом участке гена. Секвенирование по Сэнгеру и фрагментный анализ имеют ограниченную чувствительность в диапазоне 10-25% и 5-10%, соответственно [11]. Технология NGS обеспечивает наименьший порог обнаружения (1-1.5%), но все еще остается дорогостоящей и длительной процедурой [12].

Поскольку ассоциированные с онкологическими заболеваниями, соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем

аллельной нагрузки, то в начале проведения молекулярно-генетических диагностических процедур в лаборатории желательнее иметь возможность проведения скрининговых исследований. HRM-анализ подходит для обнаружения всех типов мутаций на небольшом фрагменте ДНК, метод обладает высокой чувствительностью (от 2.5% мутантного аллеля), а также не требует больших временных затрат [13]. Подавляющее большинство исследований по поиску мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM проводились на амплификаторах линейки «LightCycler» (Roche) и прилагающейся к нему программе [14-16]. Публикаций об использовании «CFX96» (Bio-Rad) для обнаружения мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM значительно меньше [17].

Цель работы – скрининг соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM-анализа при использовании амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США) для пациентов с диагнозом Ph-МПН.

Материал и методы. Работа выполнена на базе научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» (Красноярск). Для проведения скринингового исследования соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM-анализа использовались образцы ДНК от 10 пациентов с диагнозом Ph-МПН и ранее выявленными методами пиросеквенирования и ПЦР-РВ мутациями V617F (пациенты №1-5) и с различными мутациями в гене *CALR* (пациенты №6-10). [18, 19]. В качестве контролей использовали два образца ДНК без мутаций в анализируемых участках генов *JAK2* и *CALR*. Отсутствие каких-либо мутаций и полиморфизмов в исследуемых областях было подтверждено секвенированием по методу Сэнгера.

ДНК была выделена из лейкоцитов венозной крови с помощью набора реагентов «ДНК-Сорб-В» (АмплиСенс, Россия). HRM-анализ проводили с использованием набора реагентов «Precision Melt Supermix» в присутствии красителя Eva Green dye (Bio-Rad, США). Праймеры для HRM-анализа были заимствованы из статей и представлены в табл. 1.

Количество реагентов, вносимых в одну пробу (общий объем – 10 мкл), составляло: Precision Melt

Supermix – 5 мкл; праймеры forward, reverse – по 0.5 мкл (с начальной концентрацией 2 мкМ каждого); образец ДНК – 4 мкл (5 нг/мкл). ПЦР с дополнительным этапом плавления высокого разрешения проводилась на приборе «CFX96» (Bio-Rad, США) по следующей программе: денатурация при 95°C в течение 2 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 10 с, 57°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Программа плавления с высоким разрешением включала денатурацию при 95°C в течение 30 с, ренатурацию при 60°C в течение 1 мин и плавление при температуре от 65°C до 95°C с градиентом 0.2°C в 10 с.

Результаты и обсуждение. Анализ падения уровня флуоресценции с повышением температуры на этапе плавления проводился с использованием программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США). Для облегчения визуальной идентификации кластеров программа генерирует так называемые «кривые различия» (они же дифференциальные графики) каждого анализируемого образца. Кривые указывают на различия флуоресценции между каждым исследуемым образцом и кластером референсных кривых, полученных от контрольных образцов без мутаций. Помимо этого, сигналы флуоресценции нормализуются до относительных значений 1 и 0, что способствует устранению различий фоновой флуоресценции и повышению способности детектирования незначительных профилей плавления.

Для анализа мутации *JAK2* V617F были отобраны образцы ДНК от 5 пациентов (№1-5) с диагнозом Ph-МПН и ранее выявленной методами пиросеквенирования [21] и ПЦР-РВ соответствующей мутацией. Уровень аллельной нагрузки находился в диапазоне 5-40% (табл. 2).

Результаты анализа образцов с мутацией V617F в гене *JAK2* после обработки в программе «Precision Melt Analysis» представлены на рис. 1.

Представленные на рис.1 кривые плавления продуктов амплификации образцов ДНК, полученных от пациентов с V617F мутацией, четко делятся на пять кластеров относительно образцов без мутаций. При этом можно отметить, что чем выше уровень аллельной нагрузки в исследуемом образце ДНК, тем более выражено отклонение дифференциального графика от кривых, соответствующих образцам без мутации. Дифференциальный

Таблица 1

Праймеры для амплификации участков генов *JAK2* и *CALR*

Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер фрагмента	Источник
<i>JAK2</i> forward primer	TTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGA	179 bp	[14]
<i>JAK2</i> reverse primer	CTGACACCTAGCTGTGATCC		
<i>CALR</i> forward primer	GGCAAGGCCCTGAGGTGT	265 bp	[20]
<i>CALR</i> reverse primer	GGCCTCAGTCCAGCCCTG		

Таблица 2

Уровень аллельной нагрузки мутацией V617F в гене *JAK2*, определенный методами пиросеквенирования и ПЦР-РВ для 5 пациентов с Ph-МПН

№ пациента	Уровень аллельной нагрузки, % (пиросеквенирование)	Уровень аллельной нагрузки, % (ПЦР-РВ)
1	7	5
2	20	15
3	20	20
4	22	28
5	40	35

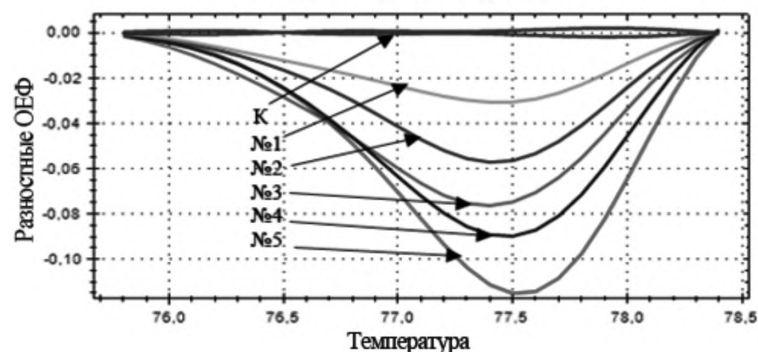


Рис. 1. Дифференциальные графики плавления фрагмента гена *JAK2*. К – кластер, включающий дифференциальные графики, полученные при анализе контрольных образцов ДНК (без мутации); № 1-5 – дифференциальные графики (в данном случае они же отдельные кластеры) от образцов ДНК с мутацией V617F и разным уровнем аллельной нагрузки. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

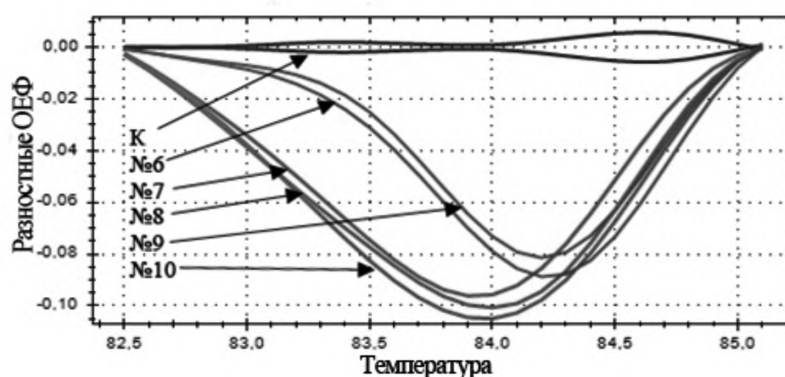


Рис. 2. Дифференциальные графики плавления фрагмента гена *CALR*. К – кластер, полученный при анализе контрольных образцов ДНК (без мутации); №6-10 – дифференциальные графики от образцов ДНК с *CALR* мутациями. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

Таблица 3

Типы мутаций и уровень аллельной нагрузки *CALR* мутаций определенным методом пиросеквенирования для 5 пациентов с диагнозом Ph-МПН.

№ пациента	Тип <i>CALR</i> мутации	Уровень аллельной нагрузки, % (пиросеквенирование)
6	c.1128_1129insCTTTGCTT c.1131_1133delAGA	40
7	c.1092_1143del (52)	48
8	c.1092_1143del (52)	50
9	c.1154_1155insTTGTC	46
10	c.1092_1143del (52)	45

график от образца №1 с наименьшим уровнем аллельной нагрузки имеет наименьшее отклонение, а график, полученный при анализе образца №5 – максимальное.

Для скрининга мутаций в гене *CALR* использовали образцы ДНК от других 5 пациентов с диагнозом Ph-МПН (№6-10) и ранее выявленными методом пиросеквенирования разными типами мутаций в гене *CALR*. Уровень аллельной нагрузки находился в диапазоне 40-50% (табл. 3).

Результаты анализа образцов с *CALR* мутациями после обработки в программе «Precision Melt Analysis» представлены на рис. 2.

Согласно рис. 2, все кривые плавления продуктов амплификации образцов ДНК, полученные от пациен-

тов с *CALR* мутациями четко делятся на два кластера относительно образцов без мутаций. В первый кластер программа отнесла 2 образца, это образец №9 с классической мутацией типа 2 (инсерция 5 нуклеотидов), а также образец №6 с сочетанной мутацией (инсерция 8 и делеция 3 нуклеотидов). Во второй кластер программа отнесла образцы №7, №8 и №10, имеющие мутацию типа 1 – делецию 52 нуклеотидов.

Ассоциированные с онкологическими заболеваниями, в том числе с Ph-МПН, соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки. Поэтому, на начальном этапе выполнения молекулярно-генетических диагностических процедур по выявлению мутаций, же-

лательно иметь возможность проведения в лаборатории скрининговых методов. Это особенно важно, когда проводится анализ редких и разнообразных мутаций, например, таких как мутации в гене *CALR*. HRM-анализ позиционируется как быстрый, надежный и высокочувствительный метод для скрининга как однонуклеотидных замен, так и инсерций и делеций. Кроме того, он не требует больших временных затрат. В настоящее время для скрининга мутаций в гене *CALR* в нашей лаборатории проводится гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в ПААГ, который по сравнению с HRM-методом более трудоемок и длителен по времени [22, 23]. Для анализа мутации V617F в гене *JAK2* кроме коммерческих наборов, позволяющих проводить анализ в количественном формате, также желательно иметь в арсенале предварительный скрининговый тест.

В соответствии с общими правилами для проведения HRM-анализа, точность результатов может варьировать в зависимости от конкретной исследуемой последовательности [24]. Для амплификации рекомендуется выбирать участок ДНК размером 50-200 пар оснований, так как с увеличением длины ампликона точность анализа падает [25]. По этой причине для анализа однонуклеотидных замен предпочтительнее выбирать праймеры, фланкирующие небольшой фрагмент ДНК. Так, для амплификации участка гена *JAK2* с целью анализа мутации V617F в данной работе были использованы праймеры, ограничивающие участок ДНК длиной 179 пар оснований, что входит в рекомендуемый диапазон. Для амплификации участка гена *CALR* были использованы праймеры, фланкирующие участок ДНК длиной 265 пар оснований, что превышает рекомендуемый диапазон, но полученный ампликон позволяет провести анализ всех возможных (известных из литературных источников) мутаций в 9 экзоне гена *CALR*.

В результате проведенной нами работы по скринингу соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* методом HRM с использованием амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» были выявлены все варианты анализируемых мутаций, как однонуклеотидной замены в гене *JAK2* (с уровнем аллельной нагрузки в диапазоне 5-40%), так и разнообразных инсерций и делеций мутаций в гене *CALR* (с уровнем аллельной нагрузки в диапазоне 40-50%). По результатам анализа мутации в гене *JAK2* можно отметить, что даже образец с минимальным из исследуемых образцов уровнем аллельной нагрузки в 5% был выявлен программой и дифференцирован в отдельный кластер по сравнению с кластером образцов дикого типа и кластерами образцов с *JAK2* V617F мутацией и отличными вариантами уровней аллельной нагрузки. При анализе *CALR* мутаций используемый подход позволил дифференцировать мутации таким образом, что в одном кластере оказались три образца (№7, №8, №10) с делецией 52 нуклеотидов, в другом кластере – два образца (№6 и №9) с разными мутациями. При этом образец №9 имеет классическую мутацию 2 типа – инсерцию 5 нуклеотидов (с.1154_1155insTTGTC), а образец №6 – сочетанную мутацию, при которой происходит инсерция 8 и делеция 3 нуклеотидов (с.1128_1129insCTTTGCTT; с.1131_1133delAGA). Объединение образцов №9 и №6 в единый кластер, вероятно, обусловлено тем, что суммарное количество встроенных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в обоих случаях одинаково (3 пуриновых и 2 пиримидиновых), соответственно GC со-

став ампликонов не меняется, что объясняет их сходные свойства плавления [11]. Этот случай подтверждает, что любая мутация, выявленная при использовании скринингового теста, обязательно должна быть идентифицирована и подтверждена с помощью секвенирования.

Таким образом, HRM-анализ, выполненный на приборе «CFX96», позволяет проводить скрининг высокоспецифичных для диагноза Ph-MПН мутаций в 14 экзоне гена *JAK2* и в 9 экзоне гена *CALR*.

Заключение. В настоящем исследовании показана возможность использования HRM-анализа, выполняемого на приборе «CFX96» для выявления мутации V617F в 14 экзоне гена *JAK2* и различных вариантов мутаций в 9 экзоне гена *CALR*. Включение данного подхода в качестве скринингового теста в алгоритм лабораторного тестирования позволяет повысить эффективность и доступность молекулярно-генетических технологий диагностики Ph-MПН. Но результаты HRM-анализа, как и других скрининговых тестов, должны быть обязательно подтверждены с помощью других молекулярно-генетических методов, основанных на секвенировании.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-5, 7-17, 19-21 см. REFERENCES)

1. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелопролиферативных новообразований. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2016; 9(3): 314-25.
6. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Шуваев В. А., Афанасьев Б. В., Агеева Т. А. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (редакция 2018 г.). *Гематология и трансфузиология.* 2018; 63(3): 275-315.
18. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т. Н., Башмакова Е.Е., Ольховский И.А. и др. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика;* 2014; 59(11): 60-3.
22. Миронов К. О., Дунаева Е. А., Дрибноходова О. П., Шипулин Г. А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. *Справочник заведующего КДЛ.* 2016; 5: 33-43.
23. Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Васильев Е.В., Михалёв М.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена *JAK2*. *Лабораторная служба.* 2017; 6(1): 29-33. DOI: 10.17116/labs20176129-33.

REFERENCES

1. Melikyan A.L., Subortseva I.N. Biology of Myeloproliferative Malignancies. *Clinical Onkologematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i praktika.* 2016; 9(3): 314-25. (in Russian)
2. Campbell P.J., Scott L.M., Buck G., Wheatley K., Eastetal C.L., Marsden J.T. et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2* V617F mutation status: a prospective study. *Lancet.* 2005; 366(9501): 1945-53. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67785-9.
3. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic J.D. et al. Somatic mutations of *calreticulin* in myeloproliferative neoplasms. *The new England journal of medicine.* 2013; 369(25): 2379-89. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.

4. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J., Nice F.L., Gundem G., Wedge D.C. et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(25): 2391–2405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
5. Barbui T., Thiele J., Gisslinger H., Kvasnicka H.M., Vannucchi A.M., Guglielmelli P. et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J.* 2018; 8(2): 15. DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y.
6. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Shuvaev V. A., Afanasiev B. V., Ageeva T. A. et al. National clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (ed. 2018). *Gematologiya i transfuziologiya.* 2018; 63(3): 275-315. (in Russian)
7. Levine R.L., Wadleigh M., Coolsetal J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J. et al. Activating mutation in the tyrosinekinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7(4): 387–97.
8. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J., Nice F.L., Gundem G., Wedge D.C. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *American Journal of Hematology.* 2014; 89(8): 2392-2405.
9. Merlinsky T.R., Levine R.L., Pronier E. Unfolding the Role of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasm Pathogenesis. *Clinical Cancer Research.* 2018; 18: 3777. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3777.
10. Didone A, Nardinelli L, Marchiani M, Ruiz A., de Lima Costa A. L., Lima I.S. et al. Comparative study of different methodologies to detect the JAK2 V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Pract. Lab. Med.* 2015; 4: 30-7. DOI: 10.1016/j.plabm.2015.12.004.
11. Jones A.V., Ward D., Lyon M., Leung W., Callaway A., Chase A. et al. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *LeukRes.* 2015; 39(1): 82-7. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.11.019.
12. Luo W, Zhongxin Yu Z. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem. Cell Investig.* 2015; 2(16). DOI: 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.08.01.
13. Ono A. Okuhashi Y., Takahashi Y., Takahashi Y., Itoh M., Nara N., Tohda S. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncol Lett.* 2012; 4(2): 205-8. DOI: 10.3892/ol.2012.741.
14. Rapado I., Grande S., Albizua E., Ayala R., Hernández J.A., Gallardo M. et al. High resolution melting analysis for JAK2 Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J. Mol. Diagn.* 2009; 11(2): 155–61. DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080110.
15. Moradabadi A., Farsinejad A., Khansarinejad B., Fatemi A. Development of a high resolution melting analysis assay for rapid identification of JAK2 V617F missense mutation and its validation. *Exp. Hematol. Oncol.* 2019; 8(10). DOI: 10.1186/s40164-019-0134-0.
16. Bilbao-Sieyro C., Santana G., Moreno M., Torres L., Santana-Lopez G., Rodriguez-Medina C. et al. High resolution melting analysis: a rapid and accurate method to detect CALR mutations. *PLoS One.* 2014; 9(7): e103511. DOI: 10.1371/journal.pone.0103511.
17. Lim K., Lin H., Chen C., Wang W., Chang Y., Chiang Y. et al. Rapid and sensitive detection of CALR exon 9 mutations using high-resolution melting analysis. *International journal of clinical chemistry.* 2015; 440: 133-9. DOI: 10.1016/j.cca.2014.11.011.
18. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova T.E. Subbotina T.N., Bashmakova E.E, Olhovskii A. et al. The quantitative testing of V617F mutation in gen JAK2 using pyrosequencing technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2014; 59(11): 60-3. (in Russian)
19. Larsen T.S., Christensen J.H., Hasselbalch H.C. Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 2007; 136(5): 745-51. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06497.x.
20. Rozovski U., Verstovsek S., Manshoury T., Dembitz V., Bozinovic K., Newberry K., et al. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2, CALR, and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2017; 102(1): 79-84. DOI: 10.3324/haematol.2016.149765.
21. Subbotina T., Karnyushka A., Dunaeva E., Mironov K., Vasiyliyev E., Mikhalev M. et al. Application of heteroduplex analysis for CARL mutation detection. *HemaSphere.* 2019; 3(S1): 1002-3.
22. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Opytispol'zovaniya sistem geneticheskogo analiza na osnove tekhnologii pirosekvenirovaniya. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2016;(5): 33-43. (in Russian)
23. Subbotina T.N., Kharsekina A.E., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Vasiyliyev E.V., Mikhalev M.A. et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with JAK2 exon 12 mutations. *Laboratornaya sluzhba.* 2017; 6(1): 29-33. DOI: 10.17116/labs20176129-33. (in Russian)
24. Precision Melt Analysis™ Software Instruction Manual, Available at: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lst/literature/10000080911.pdf> (accessed 27 January 2020).
25. Sean T., Scott R., Kurtz R., Fisher C., Patel. V., Bizouam F. A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping. Bio-Rad Laboratories, Available at: https://www.helicon.ru/news/hrm_analiz_vse_o_metode_v_udobnoy_metodichke/ (accessed 26 January 2020).

Поступила 19.01.21

Принята к печати 02.02.21