

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.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ И ДИАГНОСТИКА

Том 66

6 • 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

ИЮНЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 24.05.2021.

Подписано в печать 06.06.2021.

Формат 60 × 88%.

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 издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, 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-ef.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2021. № 6. 321–384.

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), Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск), А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), А.Р. МАВЗЮТОВ (Уфа), В.Н. МАЛАХОВ (Москва), Е.Н. ОВАНЕСОВ (Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ (Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕНКО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕШЕВ (Алматы), Л.А. ХОРОВСКАЯ (Санкт-Петербург), С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Москва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 66
6 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JUNE

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*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), 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*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*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*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Шароян Ю.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Зуева Е.В., Валеева Л.Л.*
Гендерные особенности параметров липидного профиля и маркеров сосудистого воспаления у пациентов со стабильной стенокардией в группах с наличием и отсутствием сахарного диабета 2 типа 325
- Колесникова Г.С., Малышева Н.М., Никанкина Л.В., Зураева З.Т.*
Автоматизированные системы VITROS 3600 и COBAS 6000: сравнительный анализ результатов определения пролактина ... 333
- Сафроненко А.В., Косенко В.А., Демидова А.А., Нажева М.И.*
Лабораторный контроль остеорезорбтивного действия глюкокортикоидов у больных язвенным колитом 340

ИММУНОЛОГИЯ

- Почтарь Е.В., Луговская С.А., Наумова Е.В., Дмитриева Е.А., Костин А.И., Долгов В.В.*
Особенности Т- и НК-клеточного звена иммунитета при хроническом лимфолейкозе 345
- Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Хомяков А.Е., Миронова Р.И., Мокриевич А.Н., Бикетов С.Ф.*
Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител и иммуномагнитных частиц для детекции клеток *F. tularensis* 353
- Арзуманян В. Г., Фошина Е. П., Ожован И. М., Иксанова А. М., Колыганова Т. И., Миронов А. Ю.*
Метод определения гистатинов слюны 358

ЦИТОЛОГИЯ

- Сметанина С.В., Славнова Е.Н., Сметанина О.В., Головин С.Т., Еремин Н.В.*
Особенности дифференциальной цитологической диагностики первичных и метастатических карцином печени 364

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Люцова Е.Д., Господинова М.Д., Бочева Я.Д.*
Функции и возможности липокалина-2 как фекального биомаркера при острых кишечных инфекциях (обзор литературы) .. 371
- Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шепелин А.П., Миронов А.Ю.*
Эффективность проведения контроля качества бактериологических транспортных сред 374

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Столяр М.А., Горбенко А.С., Ольховский И.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Комаровский Ю.Ю.*
Разработка метода определения мРНК гена JAK2 в венозной крови и оценка его диагностического значения в онкогематологии 379

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Sharoyan Yu.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Valeeva L.L.
Gender features of lipid profile parameters and vascular inflammation markers in patients with stable angina
in groups with presence and absence of type 2 diabetes 325

Kolesnikova G.S., Malysheva N.M., Nikankina L.V., Zuraeva Z.T.
Analytical platforms VITROS 3600 and COBAS 6000: comparative analysis of prolactin measurement 333

Safronenko A.V., Kosenko V.A., Demidova A.A., Nazheva M.I.
Laboratory control of the osteoresorptive effects of glucocorticoids in patients with purpose collitis 340

IMMUNOLOGY

Pochtart E.V., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Dmitrieva E.A., Kostin A.I., Dolgov V.V.
Specific features of T- and NK-cellular immunity in chronic lymphocytic leukemia 345

Vetchinin S.S., Shevyakov A.G., Khomyakov A.E., Mironova R.I., Mokrievich A.N., Biketov S.F.
Development of an immunoassay test system based on monoclonal antibodies and immunomagnetic particles for the detection
of *F.tularensis* cells. 353

Arzumanyan V.G., Foshina E.P., Ojovan I.M., Iksanova A.M., Kolyganova T.I., Mironov A.Yu.
Method of salivary histatins detection 358

CYTOLOGY

Smetanina S.V., Slavnova E.N., Smetanina O.V., Golovin S.T., Eremin N.V.
Features of differential cytological diagnosis of primary and metastatic liver carcinoma 364

MICROBIOLOGY

Lyutsova E.D., Gospodinova M.D., Bocheva Y.D.
Functions and potential of lipocalin-2 as fecal biomarker for acute gastrointestinal infections (review of literature) 371

Domotenko L.V., Morozova T.P., Shepelin A.P., Mironov A.Yu.
Efficiency of bacteriological transport media quality control 374

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Stolyar M.A., Gorbenko A.S., Olkhovskiy I.A., Bakhtina V.I., Mikhalev M.A., Olkhovik T.I., Komarovskiy Yu.Yu.
Development of a method for the determination of the JAK2 gene mRNA in venous blood
and assessment of its diagnostic value in oncohematology 379

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Шароян Ю.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Зуева Е.В., Валеева Л.Л.

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ ЛИПИДНОГО ПРОФИЛЯ И МАРКЕРОВ СОСУДИСТОГО ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ В ГРУППАХ С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

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

Исследование параметров липидного профиля и маркеров воспалительной реакции сосудистой стенки у больных стабильной стенокардией при наличии или отсутствии сахарного диабета 2 типа (СД2) имеет большое значение для выявления гендерных особенностей патофизиологических механизмов развития и течения заболеваний, разработки вторичной профилактики осложнений и определения прогноза. Обследованы 194 пациента со стабильной стенокардией (СС), односторонним поражением коронарных артерий, средний возраст 60,3±7,8 лет. Пациенты были распределены на две группы: 1-я группа – больные СС без СД2 (n=152), 2-я группа – СС с СД2 (n=42). В каждой группе выделены подгруппы мужчин и женщин. Исследование биомаркеров проводилось при поступлении в стационар на фоне терапии, принимаемой в амбулаторных условиях. Исследование включало комплекс параметров липидного спектра, маркеров воспалительной реакции, эндотелиальной дисфункции и углеводного обмена. Сравнительный анализ биомаркеров выявил превышение референсных значений атерогенных фракций липидов в обеих группах пациентов независимо от пола пациентов. При этом в 1-й группе пациентов, в подгруппе женщин зарегистрировано значимое превышение уровня ОХ, ЛП(а), ApoA-1 по сравнению с подгруппой мужчин. Во 2-й группе значимых различий параметров между мужской и женской подгруппой не зарегистрировано. Оценка параметров воспалительной реакции выявила в подгруппе женщин с СД2 устойчивую тенденцию к превышению уровня вч-СРБ, ФНО-α, гомоцистеина по сравнению как с мужчинами, так и женщинами в группе СС без СД2. Методом логистической регрессии выявлены основные биохимические маркеры, влияющие на отягощение течения ИБС у женщин с СД2: это уровень мочевой кислоты более 380 ммоль/л – ОШ 11,5 (95% ДИ 1,71-77,69), уровень ФНО-α более 8 пг/мл – ОШ 7,5 (95% ДИ 1,07-52,46) и увеличение уровня ТГ – ОШ 3,33 (95% ДИ 1,073-10,335). Таким образом, женщины 2-й группы с СС и СД2 характеризуются максимально повышенным уровнем атерогенных фракций липидов, маркеров сосудистого воспаления, глюкозы и HbA1c, что может свидетельствовать о наибольшем потенциале развития атеротромботических осложнений в данной подгруппе пациентов.

Ключевые слова: стабильная стенокардия; одностороннее поражение; сахарный диабет 2 типа; женщины.

Для цитирования: Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Авдеева К.С., Шароян Ю.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Зуева Е.В., Валеева Л.Л. Гендерные особенности параметров липидного профиля и маркеров сосудистого воспаления у пациентов со стабильной стенокардией в группах с наличием и отсутствием сахарного диабета 2. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (6): 325-332. DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-325-332>

Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Sharoyan Yu.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Valeeva L.L.

GENDER FEATURES OF LIPID PROFILE PARAMETERS AND VASCULAR INFLAMMATION MARKERS IN PATIENTS WITH STABLE ANGINA IN GROUPS WITH PRESENCE AND ABSENCE OF TYPE 2 DIABETES

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk 625026, Russia

The study of the parameters of the lipid profile and markers of the inflammatory reaction of the vascular wall in patients with stable angina pectoris in the presence or absence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) is of great importance for revealing the gender characteristics of the pathophysiological mechanisms of the development and course of diseases, developing secondary prevention of complications and determining the prognosis. 194 patients with stable angina pectoris (SA), single-vessel coronary artery disease, mean age 60.3 ± 7.8 years were examined. Patients were divided into two groups: group 1 – patients with SA without diabetes 2 (n = 152), group 2 – with SA and diabetes 2 (n = 42). In each group, subgroups of men and women are distinguished. The study of biomarkers was carried out upon admission to the hospital on the background of therapy, taken on an outpatient basis. The study included a complex of parameters of the lipid spectrum, markers of the inflammatory response, endothelial dysfunction, and carbohydrate metabolism parameters. A comparative analysis of biomarkers revealed an excess of reference values of atherogenic lipid fractions in both groups of patients, regardless of patient gender. Moreover, in the first group of patients, in the subgroup of women, a significant excess of the level of TC, PL (a), and ApoA-1 was registered compared with the subgroup of men. In the second group, there were no significant differences in parameters between the male and female subgroups. Evaluation of the parameters of the inflammatory reaction revealed in the subgroup of women with T2DM a steady tendency to exceed the level of hs-CRP, TNF-α, homocysteine compared with both men and women in the SA group without T2DM. The logistic regression revealed the main biochemical markers that affect the aggravation of the course of IHD in women with T2DM: this is a uric acid level of more than 380 mmol / l – OS 11.5 (95% CI 1.71-77.69), TNF-α more 8 pg / ml – OR 7.5 (95% CI 1.07-52.46) and an increase in TG – OR 3.33 (95% CI 1.073-10.335). Thus, women of the 2nd group with the presence of T2DM are characterized by the highest level of atherogenic fractions of lipids, markers of

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

vascular inflammation, glucose and HbA1c, which may indicate the greatest potential for the development of atherothrombotic complications in this subgroup of patients.

Key words: *stable angina pectoris; single-vascular lesion; type 2 diabetes; women.*

For citation: Petelina T.I., Musikhina N.A., Avdeeva K.S., Sharoyan Yu.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Valeeva L.L. Gender characteristics of lipid profile parameters and markers of vascular inflammation in patients with stable angina pectoris in groups with presence and absence of type 2 diabetes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (6): 325-332 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-325-332>

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

Information about the authors:

Petelina T.I., <http://orcid.org/0000-0001-6251-4179>;
Musikhina N.A., <http://orcid.org/0000-0001-9607-7245>;
Avdeeva K.S., <http://orcid.org/0000-0002-2134-4107>;
Sharoyan Yu.A., <http://orcid.org/0000-0001-9998-5409>;
Gapon L.I., <http://orcid.org/0000-0002-3620-0659>;
Gorbatenko E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0858-2933>;
Zueva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6108-811X>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.02.2021
Accepted 25.02.2021

Сахарный диабет (СД) – одно из самых частых коморбидных состояний пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), определяющее тяжесть течения заболевания, выбор стратегии ведения и прогноз пациента [1]. Эксперты ВОЗ называют СД одной из наиболее опасных неинфекционных эпидемий XXI века, а эксперты Международной диабетической Федерации (МДФ) – «общемировой социальной катастрофой» [2]. Ситуация в России по эпидемиологическим показателям распространенности и смертности от СД и его осложнений, в целом, повторяет таковую в экономически развитых странах. Общая численность пациентов с СД 2 типа (СД2) на 2016 г. составила 4,348 млн человек (2,97% населения России), из них 92% – пациенты с СД2. Доля смертности от СД2 в возрасте менее 60 лет в РФ в 2017 г. составила 20-40% [2].

Основными причинами высокой смертности больных СД2 являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в том числе, способствуя развитию атеросклероза, СД2 повышает частоту и тяжесть ИБС. Риск развития ИБС у больных с СД2 в 2-4 раза выше, а риск развития инфаркта миокарда (ИМ) в 6-10 раз выше, чем в общей популяции [2, 3]. Согласно данным Американской ассоциации сердца в США 32 млн женщин страдают ИБС (по сравнению с 30 млн мужчин). В России у каждой восьмой женщины в возрасте 45–54 лет выявляется клиническая картина ИБС, а после 65 лет клинические признаки ИБС отмечаются уже у 30% женщин [3]. На долю ССЗ приходится 55% случаев смерти женщин и 43% у мужчин в мире.

По данным крупнейшего мета-анализа, который объединил 698 782 пациентов (средний возраст пациентов составляет 52 года, 43% женщины) из 102 проспективных исследований, выявлено, что риск ИМ у пациентов без СД2 составил 20,2%, у пациентов с СД – 45% [4]. СД2 повышает риск сердечно-сосудистой смертности в 2 раза у мужчин и в 4 раза у женщин [4,5]. Установлено, что развитие бессимптомного выраженного стеноза коронарных артерий у пациентов с СД2 и предиабетом было достоверно выше, чем без нарушения углеводного обмена – 16,8% и 7%, соответственно [5].

По данным мета-анализа 37 проспективных когортных исследований, охвативших 447 064 человек в воз-

расте 45-98 лет (45% женщины), выявлено, что распространенность фатальной ИБС была существенно выше у пациентов с СД2, чем у лиц без СД – 5,4% и 1,6%, соответственно [6]. ИБС начинает встречаться в более позднем возрасте у женщин по сравнению с мужчинами (10 лет спустя). Исследование FAST-MI показало, что за последние 15 лет профиль женщин с ИБС изменился, они стали моложе, с сохраненной менстуральной функцией, страдают ожирением, обычно курят. Независимо от возраста, прогноз у женщин, как правило, хуже, чем у мужчин, несмотря на более высокую частоту острого коронарного синдрома (ОКС) с ангиографически нормальными коронарными артериями.

При сравнении пациентов с диабетом и без него, было выявлено, что у женщин всех возрастов были более низкие абсолютные показатели МАСЕ-HF (24,9 против 19,9 на 1000 человеко-лет) и более высокие относительные показатели МАСЕ-HF, чем у мужчин [2,8 (доверительный интервал, ДИ 2,9-2,9)] [6].

Учитывая большую распространенность СД среди населения и высокую смертность больных СД2, связанную с сердечно-сосудистой патологией, изучение механизмов развития макрососудистых осложнений у пациентов с СД, а также гендерных особенностей течения заболевания остается одной из наиболее актуальных задач кардиологии и диабетологии. В последние десятилетия активно обсуждается роль хронического воспалительного процесса (хронического воспаления низкой интенсивности, англ. low-grade inflammation) в развитии СД 2 типа и его сердечно-сосудистых осложнений [7– 10].

По данным научных исследований, пациенты с диабетом отличаются от пациентов без нарушений углеводного обмена более интенсивным внутрисосудистым воспалением: именно провоспалительные цитокины и другие биологически активные вещества запускают процесс дестабилизации атеросклеротической бляшки, прогрессирование атеросклеротического процесса на ранее не пораженных участках сосудистой стенки [11–13]. При гистологическом исследовании коронарных артерий у больных СД отмечается повреждение эндотелиального слоя, депозиты фибрина-фибриногена и иммуноглобулина G в интиме и меди. Также отмечено снижение плот-

ности тучных клеток и повышение объемной плотности мононуклеарных клеток [14]. Гипергликемия может привести к эндотелиальной дисфункции через сокращение уровня оксида азота, ключевого регулятора сосудистого тонуса, и увеличение окислительного стресса.

Особенности поражения коронарных сосудов при СД2 и их связь с лабораторными параметрами были неоднократно представлены нами в научных публикациях [13,15]. Однако, степень активности системного воспаления у пациентов как наиболее важную характеристику процессов, приводящих к развитию деструктивных изменений атеросклеротической бляшки при гендерном рассмотрении вопроса у больных ИБС с наличием и отсутствием СД2, хотелось бы выделить отдельно.

Цель исследования: изучить особенности лабораторных параметров липидного профиля и маркеров воспалительной реакции в группах мужчин и женщин со стабильной стенокардией, с наличием или отсутствием СД 2 типа, при одностороннем обструктивном поражении коронарных артерий.

Материал и методы. В статье использованы данные регистра чрескоронарных вмешательств (ЧКВ), сформированного на базе отделения неотложной кардиологии и блока интенсивной терапии Тюменского кардиологического научного центра Томского НИМЦ (2012–2013 гг.). В группу исследования включены 333 пациента со стабильной стенокардией (СС), средний возраст $57,41 \pm 8,32$ лет, из них мужчин 265 (79,6%), женщин 68 (20,4%). Коронарная ангиография (КАГ) проведена в 100% случаев.

Диагностика форм ИБС и сопутствующей патологии проводилась в соответствии с действующими рекомендациями РКО, ESC и EASD. Объем диагностических мероприятий включал: клиническое обследование, лабораторные и инструментальные методы оценки состояния коронарного кровообращения (селективную КАГ). Группы пациентов равноценно представлены стабильной стенокардией напряжения в рамках II и III функционального класса (ФК).

Критерии исключения: наличие в анамнезе перенесенного в течение последних 6 мес острого коронарного синдрома (ОКС) или острого нарушения мозгового кровообращения; хроническая сердечная недостаточность (ХСН) функционального класса (ФК) III-IV (по NYHA); декомпенсация сахарного диабета; наличие онкологических заболеваний.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом учреждения. Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов обследования, в том числе, забранных биологических образцов крови в научных целях. Все пациенты подписали форму информированного согласия для участия в исследовании.

Коронарную ангиографию выполняли из феморального доступа по стандартной методике М. Judkins (1967 г.) с помощью ангиографических комплексов «Diagnost ARC A», «Poly diagnost C», «Integris Allura»-Phillips-Голландия. Оценивали максимальный процент стенозирования пораженных коронарных артерий (КА).

Взятие крови осуществляли из периферической вены локтевого сгиба при поступлении пациентов перед проведением КАГ.

Лабораторное исследование включало комплекс параметров липидного спектра, маркеров воспалительной ре-

акции, эндотелиальной дисфункции, углеводного обмена.

Биохимический спектр параметров липидного обмена определяли в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Швейцария). Определяли уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), липопротеинов высокой, низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП) энзиматическим колориметрическим методом; концентрации аполипопротеинов А-I (Апо А-I), аполипопротеинов В (Апо В), липопротеинов а (Лп а) – методом иммунотурбидиметрии с помощью аналитических наборов и контрольных материалов «Roche Diagnostics GmbH» (Германия). Расчетным путем был вычислен коэффициент атерогенности (КА) = АпоВ/АпоА-I.

В качестве маркеров воспаления исследовали концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (hs-СРБ) иммунотурбидиметрическим методом, с использованием аналитических наборов «C-reactive protein hs» (BioSystem, Испания) на полуавтоматическом анализаторе открытого типа «Clima MC-15» (Испания). Интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-8 (ИЛ-8), фактор некроза опухоли – α (ФНО α), гомоцистеин определяли на аналитических наборах: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- α , гомоцистеин на анализаторе «IMMULITE 2000» (Siemens Diagnostics, США); растворимый лиганд CD40L исследовали методом «иммуноферментного сэндвича» с использованием наборов Human sCD40L Elisa Bender MedSystems (Австрия); рецептор CD40 и матриксная металлопротеиназа-9 (ММР-9) – Bender MedSystems an eBioscience company (Австрия); тканевой ингибитор металлопротеиназы -1 (TIMP-1) – Human TIMP-1 Elisa K.t Invitrogen (США) на анализаторе Stat Fax (США).

Уровень нитритов определяли на биохимическом анализаторе «Humalyzer 2000 Human» (Германия) и эндотелина-1 – на иммуноферментном полуавтоматическом анализаторе «Stat Fax» (США).

Углеводный обмен оценивали по содержанию глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA_{1c}). Концентрацию глюкозы крови определяли гексокиназным методом на биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus. Гликированный гемоглобин определяли хроматографическим методом с помощью анализатора Bio-Rad D10 (США).

Статистическая обработка данных. Анализ полученных данных проводился с использованием статистической программы SPSS for Windows. Нормальность распределения количественных показателей определяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$) или медианой и интерквартильным размахом ($Me [25\%; 75\%]$). При нормально распределенных данных сравнение групп проводили с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок. Если данные не подчинялись нормальному закону распределения, использовали U-критерий Манна-Уитни. Качественные данные сравнивали критерием χ^2 или точным критерием Фишера. Корреляционный анализ проводили, используя критерии Спирмена или Пирсона, в зависимости от распределения данных. Для определения параметров, влияющих на отягощение сахарного диабета у женщин с ИБС, использовали множественную логистическую регрессию с вычислением отношением шансов. За уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты. Из общих данных пациентов, включенных в исследование, на первом этапе мы проанализировали особенности клинико-anamnestических и лабораторных маркеров пациентов с ИБС, стабильной стенокардией при наличии обструктивного однососудистого поражения коронарных артерий (75% и более), с наличием и отсутствием СД2, в группах женщин и мужчин.

По представленным характеристикам из всех пациентов регистра для статистического анализа выделена общая группа в количестве 194 пациентов, средний возраст $60,3 \pm 7,8$ лет. Пациенты распределены на две группы: 1-я группа – больные ИБС, стабильной стенокардией без СД2 ($n=152$), 2-я группа – ИБС, стабильной стенокардией с СД2 ($n=42$). В каждой группе выделены подгруппы мужчин и женщин. Исследование лабораторных параметров сыворотки крови проводилось при поступлении в стационар перед проведением КАГ на фоне терапии, принимаемой в амбулаторных условиях.

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов со стабильной стенокардией, однососудистым пора-

жением коронарных артерий в группах женщин и мужчин представлена в таблице.

Согласно представленным в таблице данным, мы определили, что количество пациентов с СД2, вошедших в регистр, составляет 27%, при этом в группе мужчин СД2 выявлен у 24%, в группе женщин у 39% пациентов. Зарегистрирована достоверная разница пациентов по возрасту, пациентки как без СД2, так и с СД2 были старше мужчин в соответствующих подгруппах. У мужчин в подгруппах с наличием СД2 было выявлено превышение процента пациентов с отягощенной наследственностью по АГ ($p=0,041$) и повышенным ИМТ ($p=0,002$) по сравнению с мужчинами без СД. В подгруппе женщин с СД2 зарегистрировано достоверное превышение ($p=0,032$) процента пациенток, имеющих в анамнезе ОНМК ($p=0,032$) и более высокий ИМТ ($p=0,034$), по сравнению с подгруппой без СД2.

По характеристике поражения коронарного русла выявлено, что при однососудистом обструктивном поражении коронарных артерий (75% и более) максимальный процент поражения определяется в передней меж-

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов со стабильной стенокардией, однососудистым обструктивным поражением коронарных артерий в группах женщин и мужчин при отсутствии и наличии СД2

Пациенты со стабильной стенокардией	Мужчины		<i>p</i>	Женщины		<i>p</i>
	без СД2	с СД2		без СД2	с СД2	
Количество больных, <i>n</i>	119	29		33	13	
Возраст, годы	$54,61 \pm 7,99$	$57,17 \pm 5,93$		$62,85 \pm 7,45^*$	$61,69 \pm 7,12^*$	
Наследственность по ИБС:						
да	26 (21,8%)	3 (10,3)		9 (27,3%)	3 (23,1%)	
нет	93 (78,2)	26 (89,7%)		24 (72,7%)	10 (76,9%)	
Наследственность по АГ:			0,041			
да	27 (22,7%)	12 (41,4%)		7 (21,2%)	4 (30,8%)	
нет	92 (77,3%)	17 (58,6%)		26 (78,8%)	9 (69,2%)	
Наследственность по СД:						
да	2 (1,7%)	2 (6,9%)		1 (3,0%)	2 (15,4%)	
нет	117 (98,3%)	27 (93,1%)		32 (97%)	11 (84,6%)	
Стаж ИБС, годы	3,15 [0,08;20]	2,42 [0,13;9,20]		4,55 [0,08;17]	4,54 [0,17;15]	
Стаж СД, годы	0	7,51[0,1;40]		0	8,0±6,96	
АГ в анамнезе:						
да	113 (95%)	29 (100%)		32 (97%)	13 (100%)	
нет	6 (5%)			1 (3%)		
Стаж АГ, годы	$8,49 \pm 7,59$	$8,83 \pm 5,14$		$13,08 \pm 7,78^*$	$15,65 \pm 12,25^*$	
САД, мм рт.ст	$130,32 \pm 14,74$	$137,24 \pm 19,08$		$136,82 \pm 20,87$	$145,46 \pm 20,73$	
ДАД, мм рт.ст	$82,75 \pm 8,06$	$84,10 \pm 8,77$		$83,48 \pm 9,72$	$84,08 \pm 10,54$	
ПАД, мм рт.ст	$47,99 \pm 9,76$	$53,14 \pm 13,28$		$53,33 \pm 14,67$	$61,38 \pm 17,65$	
Инсульт в анамнезе:						
да	5 (4,2%)			1 (3%)	3 (23,1%)	0,032
нет	114 (95,8%)	29 (100%)		32 (97%)	10 (76,9%)	
ИМТ, кг/м ²	$30,26 \pm 4,28$	$33,07 \pm 4,42$	0,002	$32,94 \pm 4,54$	$36,29 \pm 6,91$	0,034

Примечание. % – процент от общего числа; * – критерий достоверности различий $p < 0,05$ между мужчинами и женщинами в подгруппах; *p* – критерий достоверности различий в группе мужчин и женщин со СС при наличии и отсутствии сахарного диабета 2 типа.

желудочковой ветви (ПМЖВ). У мужчин с ИБС без СД2 однососудистое поражение ПМЖВ выявлено в 56,1% случаев, при ИБС с СД2 – в 54,7% случаев. У женщин максимальный процент стенозов был также зарегистрирован в ПМЖВ: при ИБС в 67,3% случаев, при ИБС с СД2 в 68,4%. Вторым и третьим сосудом по значимости поражения у мужчин и женщин с ИБС стали огибающая ветвь левой коронарной артерии (ЛКА) и правая коронарная артерия (ПКА) соответственно.

Особенности биомаркеров в группах пациентов со стабильной стенокардией с наличием и отсутствием СД2 могут определять характер течения стенокардии и развития нежелательных сосудистых осложнений при наличии обструктивного поражения коронарных артерий.

Сравнительный анализ лабораторных параметров липидного профиля на исходном этапе выявил превышение референсных значений атерогенных фракций в обеих группах пациентов независимо от пола пациентов. При этом, в 1-й группе пациентов без СД2 в подгруппе женщин зарегистрировано значимое превышение уровня ОХ ($p=0,027$), ЛПВП ($p=0,0001$), ЛП(а) ($p=0,003$), Апо-А-1 ($p=0,003$) по сравнению с подгруппой мужчин. В группе с СД2 значимых различий параметров между

мужской и женской подгруппой не зарегистрировано. Однако следует отметить, что у женщин в подгруппе с СД2 уровень триглицеридов превышает, а уровень ЛПВП и Апо-А-1 значимо снижен по сравнению с данными в группе СС без СД2 ($p<0,05$), рис. 1, а, б.

Клиническая оценка параметров липидного профиля при поступлении свидетельствует об исходном отсутствии целевых значений параметров липидного профиля в группах исследуемых пациентов, что говорит о дефектах либо назначения, либо приема статинов пациентами в амбулаторных условиях.

Оценка параметров сосудистой воспалительной реакции также показала превышение референсных значений при достоверно более высоком уровне ИЛ-1 β ($p=0,45$), уровня мочевой кислоты ($p=0,0001$) и низком уровне ИЛ-6 ($p=0,043$) у мужчин с СС по сравнению с женщинами 1-й группы (рис. 2, 3). В группе женщин с СД2 зарегистрировано превышение уровня вч-СРБ, ФНО- α , ИЛ-1 β , гомоцистеина, ИЛ6 ($p<0,05$) по сравнению как с мужчинами, так и женщинами в группе без СД2 и уровня мочевой кислоты ($p<0,05$) по сравнению с 1-й группой женщин. (рис.4). Уровень параметров углеводного обмена был закономерно значимо выше у пациентов 2-й группы.

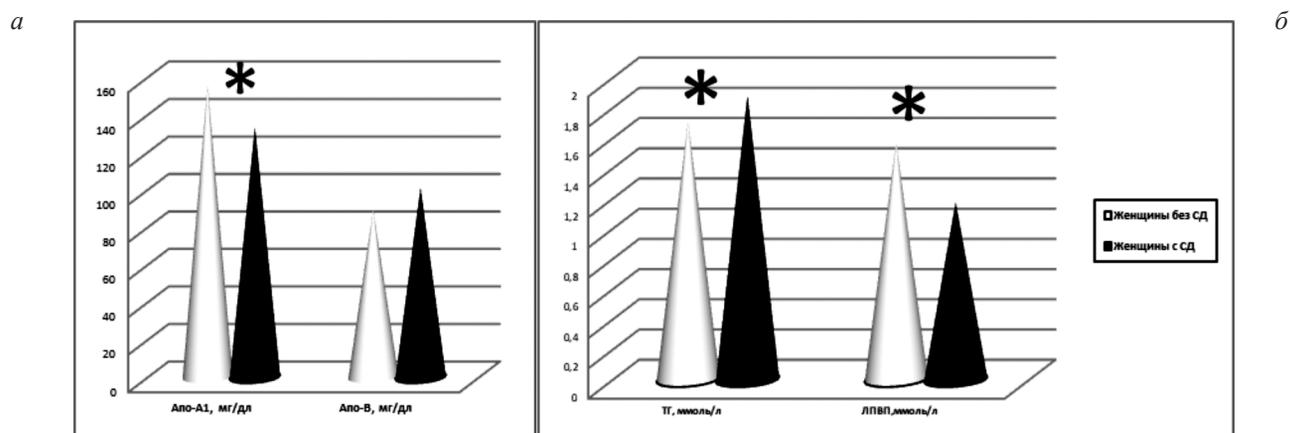


Рис. 1. Сравнительная характеристика показателей липидного профиля в подгруппах женщин со стабильной стенокардией при отсутствии и наличии СД2. а – уровень Апо-А1 и Апо-В; б – уровень ТГ и ЛПВП.

Примечание. Здесь и на рис. 2, 4: * – критерий достоверности различий между подгруппами $p < 0,05$.

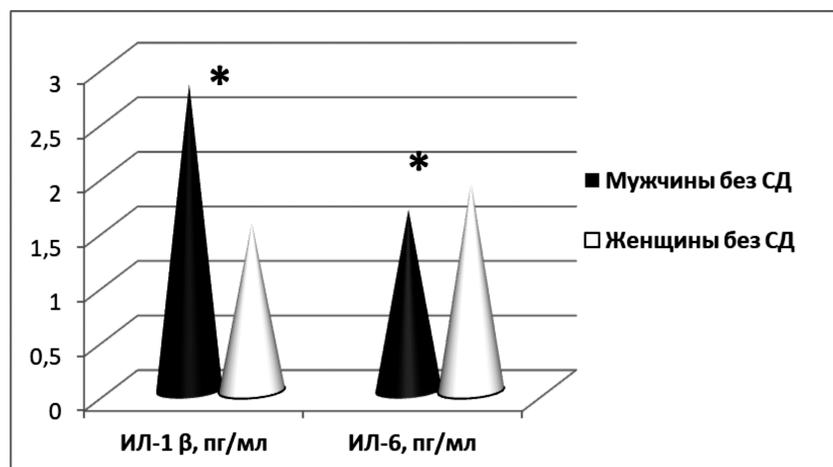


Рис. 2. Сравнительная характеристика маркеров воспаления в группах мужчин и женщин со стабильной стенокардией при отсутствии СД2.

Таким образом, из представленных маркеров сосудистого воспаления женщины с наличием СС и СД2 характеризуются максимально повышенными уровнями атерогенных липидов – ТГ, Апо-В; маркеров сосудистого воспаления- вч-СРБ, ФНО- α , гомоцистеина, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8; параметров глюкозы и HbA1c при минимальном уровне ЛПВП и Апо-А1, что, независимо от наличия в обеих группах пациентов равноценно выраженного однососудистого обструктивного поражения коронарных артерий, может свидетельствовать о наибольшем потенциале развития сосудистых осложнений в данной подгруппе пациенток.

Полученные нами результаты в общей группе пациентов с ИБС согласуются с результатами клинических и экспериментальных исследований, которые показали, что воспалительные маркеры, в частности, вч-СРБ, гипергомоцистеинемия, гиперцитокинемия ускоряют развитие атеросклероза и его осложнений в основном из-за токсического воздействия на эндотелий сосудов, усиления адгезии тромбоцитов, неблагоприятного воздействия на факторы свертывающей системы крови [17]. Зарегистрированные корреляционные взаимосвязи повышенного уровня мочевой кислоты с концентрацией вч-СРБ ($p=0,036$, $r=0,298$), уровнем Апо-В ($p=0,017$,

$r=0,209$); ИЛ-1 β с ОХС ($p=0,024$, $r=0,347$) и с ТГ ($p=0,01$, $r=0,478$); ИЛ8 с ТГ ($p=0,017$, $r=0,346$) и глюкозой ($p=0,024$, $r=0,478$) подтверждают данные о взаимосвязи маркеров воспаления с процессом атеросклероза. Согласно данным литературы, именно пациенты с СД обладают более выраженной степенью эндотелиальной дисфункции и повышенным риском прогрессирования стеноза коронарных артерий и развития рестеноза у пациентов, перенесших ЧКВ [14]. Оценка корреляционных взаимосвязей между исследуемыми параметрами во 2-й группе пациентов выявила наличие прямых корреляций между достоверно высокими показателями атерогенных липидов и повышенным уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c и мочевой кислоты ($p=0,001$, $r=0,790$), HbA1c и апо-В ($p=0,021$, $r=0,433$), HbA1c и ТГ ($p=0,049$, $r=0,376$), HbA1c с ОХС и ЛПНП ($p=0,06$, $r=0,503$ и $p=0,042$, $r=0,407$), что свидетельствует о важном значении нарушения углеводного обмена в патогенезе коронарного атеросклероза. Взаимосвязь между HbA1c и ИЛ 1b ($p=0,046$, $r=0,521$) и HbA1c с sCD40L ($p=0,0001$, $r=0,628$) подтверждает данные о роли интерлейкинов и тромбогенных маркеров в прогрессировании функционального повреждения не только эндотелия сосудистой стенки, но и деструкции β -клеток поджелудоч-



Рис. 3. Сравнительная характеристика уровня мочевой кислоты в группах мужчин и женщин со стабильной стенокардией при отсутствии СД2.

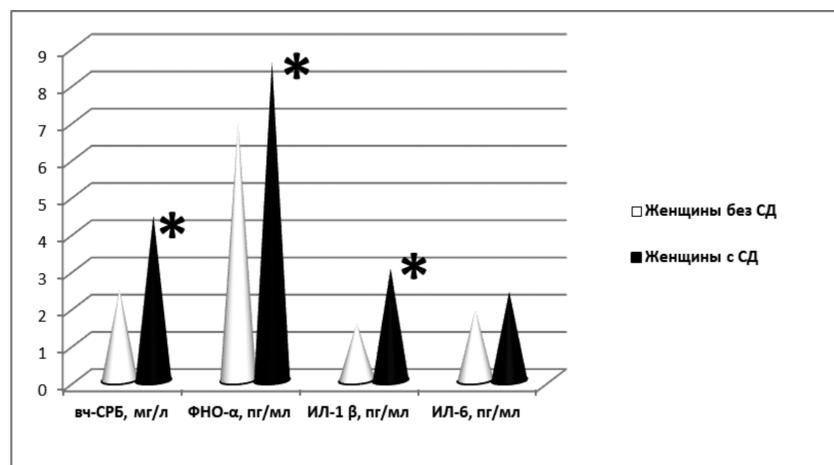


Рис. 4. Сравнительная характеристика маркеров воспаления в подгруппах женщин со стабильной стенокардией при отсутствии и наличии СД2.

ной железы при СД2, которые, секретировав ИЛ 1 β в ответ на повышение глюкозы, вызывают дальнейшее повреждение клеток путем аутокринного воздействия, нарушая чувствительность к инсулину.

В группе женщин с СД2 зарегистрированы корреляционные взаимосвязи уровня вч-СРБ с наследственной предрасположенностью к АГ и наличием ОНМК в анамнезе, связь уровня глюкозы с ФНО α ($p=0,02$, $r=0,448$) и связь уровня HbA1c с мочевой кислотой, ИЛ -1 β , уровнем нитритов и уровнем сердечного белка, связанного с жирными кислотами – СБСЖК ($p=0,05-0,01$, $r=0,608-0,797$), что обуславливает дополнительную вероятность развития у женщин нежелательных сердечно-сосудистых осложнений при наличии стенотического поражения коронарных артерий.

Методом логистической регрессии выявлены основные биохимические маркеры, влияющие на отягощение СД2 у пациенток с ИБС: это уровень мочевой кислоты более 380 ммоль/л – ОШ 11,5 (95% ДИ 1,71-77,69), уровень ФНО- α более 8 пг/мл – ОШ 7,5 (95% ДИ 1,07-52,46) и увеличение уровня ТГ более 1,7 ммоль/л – ОШ 3,33 (95% ДИ 1,073-10,335). Рассчитанные ОШ показывают, что у пациенток с СД2 вероятность повышения уровня мочевой кислоты выше референсных значений увеличивается в 11,5 раза, уровня ФНО- α в 7,5 раза, а вероятность повышения уровня ТГ на 1 ммоль/л увеличивается в 3,3 раза.

Кроме этого, наличие СД2 у женщин обеспечивает более высокую, чем у мужчин вероятность повышения уровня ИЛ-6 (более референсных значений) в 19,2 раза (ОШ 19,2; 95% ДИ 1,9-196,5), определяя высокий риск развития сердечно-сосудистых осложнений, т.к. известно, что ИЛ-6 обладает сильным провоспалительным сосудистым эффектом.

Обсуждение. Проведенное исследование уровня биомаркеров у пациентов СС в группах с отсутствием и наличием СД показало, что для пациентов как в 1-й, так и во 2-й группе характерно повышение уровня атерогенных параметров липидного профиля, активности маркеров сосудистого воспалительного ответа и дезорганизации эндотелиновой системы, что определяет клиническую картину заболевания, согласуясь с данными литературных источников [14,15]. Использование гендерного подхода в изучении лабораторных параметров предоставило возможность проанализировать и выделить их особенности в группах мужчин и женщин. Включение пациентов в регистровое исследование в условиях режима реального времени дало возможность оценить клинико-анамнестические данные пациентов, сопоставить их с данными других исследований. Нами было зарегистрировано, что женщины, включенные в исследование, были старше мужчин, у них был больше выражен процент наследственной предрасположенности к ИБС, СД, больше стаж гипертонии в анамнезе, что согласуется с литературными данными [16]. В нашем исследовании у женщин, особенно в подгруппе с СД2, были выше уровни АД, атерогенных параметров липидного профиля, параметров локальной и системной сосудистой воспалительной реакции, в частности. ММП9, гомоцистеина, вч-СРБ, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, мочевой кислоты и выраженность абдоминального ожирения. Повышенный уровень маркеров локальной воспалительной реакции может являться одним из факторов, определяющих особенности формирования и повреждения имеющихся атеросклеротических бляшек в подгруппе женщин с СД2.

Кроме этого, необходимо отметить, что выраженность лабораторных параметров при поступлении в стационар в обеих группах пациентов во многом могла определяться проводимой на амбулаторном этапе терапией. Женщины с СД получали статины в 39% случаев реже по сравнению с женщинами без СД, а ацетилсалициловую кислоту в 3 раза реже мужчин с СД2. По нашему мнению, это может являться провоцирующим фактором не только для роста, но и для дестабилизации имеющихся уже атеросклеротических бляшек с развитием острых коронарных событий, в частности, атеротромбоза.

Проблеме женской ИБС всегда уделялось недостаточно внимания. Особенности развития ИБС у женщин определяются более поздним манифестированием ИБС при наличии физиологического течения климакса, достоверным увеличением случаев ИБС при раннем наступлении менопаузы, более частыми эпизодами безболевого ишемии миокарда, атипичным течением стенокардии и становятся причиной несвоевременной диагностики ИБС, приводя к большему проценту распространенности заболевания [16].

Проведенная нами работа позволила уточнить основные патогенетические звенья коморбидной патологии у женщин. Методом логистической регрессии выявлены основные биохимические маркеры, влияющие на отягощение течения ИБС при СД2 во 2 группе пациенток: это уровень мочевой кислоты, ФНО- α , ТГ и ИЛ-6.

Заключение. Проведенная работа позволила показать, что использование лабораторных биомаркеров, являясь надежным объективным средством, дает возможность проследить особенности патогенетических механизмов развития и течения коморбидных состояний с учетом гендерных особенностей. Данное исследование показало, что женщины со стабильной стенокардией и СД2 характеризуются максимально повышенным уровнем отдельных атерогенных фракций липидов и маркеров сосудистого воспаления, что может свидетельствовать о наибольшем потенциале развития у них нежелательных сердечно-сосудистых осложнений. Компетентное отношение клиницистов к такой категории пациенток позволит обеспечить оптимизацию инвазивной и консервативной терапии, адекватность диспансерного наблюдения, улучшив качество вторичной профилактики и отдаленного прогноза заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 2-9, 11,13, 15, 18, 19
см. REFERENCES)

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2017;1(20):13-41.
10. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Фазуллина О.Н., Мьякина Н.Е., Лыков А.П., Коненков В.И. Клинические и метаболические факторы ассоциированные с хроническим воспалением низкой интенсивности у больных сахарным диабетом 2 типа. *Сахарный диабет*. 2016;(19)4: 295-302.
12. Безбородова Т.А., Тарасов А.А., Резникова Е.А., Аекарева И. В., Захарьина О. А., Бабаева А.Р. Диагностическое использование новых патогенетических маркеров поражения сосудистой стенки у больных сахарным диабетом. *Цитокины и воспаление*. 2014;13(1):28-33.

14. Остроумова О.Д., Голобородова И.В., Фомина В.М. Сердечно-сосудистые риски у больных сахарным диабетом 2 типа. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018;17(4):81–94. <http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2018-4-81-94>.
15. Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Еменева И.В., Шароян Ю.А. и др. Проспективная оценка маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного профиля у больных ишемической болезнью сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2 типа, перенесших ангиопластику со стентированием коронарных артерий. *Цитокины и воспаление*. 2019;1: 27-35.
16. Скибицкий В.В., Медведева Ю.Н., Шухардина Е.Л., Скибицкая С.В. Факторы риска и структура кардиоваскулярной патологии у женщин в климаксе различного генеза. *Проблемы женского здоровья* 2007; 3(2): 21–8.
8. Kluppelholz B., Thorand B., Koenig W. Association of subclinical inflammation with deterioration of glycaemia before the diagnosis of type 2 diabetes: the KORA S4 study. *Diabetologia*.2015; 58(10):2269-77. doi:10.1007/s00125-015-3679-4.
9. Grossmann V., Schmitt V.H., Zeller T., M.Panova-Noeva., A.Schulz, D. Laubert-Reh. Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and type 2 Diabetes. *Diabetes Care*.2015;38(7):1356-64. doi:10.2337/dc14-3008.
10. Klimontov V.V., Tyan N.V., Fazullin O.N., Mykina N.E., Lykov A.P., Kononenkov V.I. Clinical and metabolic factors associated with chronic inflammation of low intensity in patients with diabetes mellitus type 2. *Sakharnyi diabet*. 2016; 19 (4): 295-302. (in Russian)
11. Kengne A.P., Batty G.D., Hamer M. Association of C-reactive protein with cardiovascular disease mortality according to diabetes status: pooled analyses of 25,979 participants from four U.K. prospective cohort studies. *Diabetes Care*.2012;35(2):3960403. doi:102337/dc11-1588.

REFERENCES

1. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Epidemiology of diabetes in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the Federal register of diabetes. *Sakharnyi diabet* . 2017;1(20):13-41. (in Russian)
2. IDF Diabetes Atlas, 8th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2017. Available from: <https://www.idf.org/e-library/epidemiologyresearch/diabetesatlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition>.
3. Nwaneri C., Cooper H., Bowen-Jones D. Mortality in type 2 diabetes mellitus: magnitude of the evidence from a systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. 2013;4(13):192-207. doi:10.1177/1474651413495703.
4. Sarwar N., Gao P., Seshasai S.R. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375:2215-22. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
5. Huxley R., Barzi F., Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *British Medical Journal*. 2006;332:73-8. doi:10.1136/bmj.38678.389583.7C.
6. Malmborg M.L., Schmiegelow MDS., Nørgaard C.H., Munch A., Gerds T.L., Schou M. et al.. Does type 2 diabetes confer higher relative rates of cardiovascular events in women compared with men? *Eur. Heart J*. 2020 Apr 1;41(13):1346-53. doi: 10.1093/eurheartj/ehz913.
7. Hameed I., Massodi S.R., Mir S.A. Type2 diabetes mellitus: Erom a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J. Diabetes*.2015;6(4):598-612. doi:10.4239/wjd.v6.i4.598.
12. Bezborodova T.A., Tarasov A.A., Reznikov E.A., Aekareva I.V., Zacharina O.A., Babaeva A. P. Diagnostic use of new pathogenic markers of vascular lesions in diabetic patients. *Tsitokiny i vospaleniye*. 2014;13 (1):28-33.(in Russian)
13. Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Kuznetsov V.A., Gorbatenko E.A., Emeneva I.V. Specific parameters of lipid spectrum and markers of vascular inflammation in patients with stable angina and significant coronary artery stenosis with or without diabetes mellitus type 2. A prospective follow-up after angioplasty. *Integrative Obesity and Diabetes*. 2017; 3(2): 1-8. doi: 10.15761/IOD.1000175.
14. Ostroumova O.D., Goloborodova I.V., Fomina V.M. Cardiovascular risks in patients with type 2 diabetes. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2018; 17 (4): 81–94. (in Russian)
15. Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Emeneva I.V., Sharoyan Yu.A. et al. E.V. Prospective assessment of vascular inflammatory response markers and lipid profile parameters in patients with coronary heart disease in the presence and absence of type 2 diabetes mellitus who underwent angioplasty with stenting of the coronary arteries. *Tsitokiny i vospaleniye* . 2019; 1:27-35. (in Russian)
16. Skibitsky V.V., Medvedeva Yu.N., Shukhardina E.L., Skibitskaya S.V. Risk factors and structure of cardiovascular pathology in women in menopause of various genesis. *Problemy zhenskogo zdorov'ya*. 2007; 3(2): 21–28. (in Russian)

Поступила 15.02.21
Принята к печати 25.02.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Колесникова Г.С., Малышева Н.М., Никанкина Л.В., Зураева З.Т.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ VITROS 3600 И COBAS 6000: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЛАКТИНА

ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ, 117036, Москва, Россия

Пролактин – полипептидный гормон, который секретируется лактотрофными клетками передней доли гипофиза, и обладает широким спектром биологического действия в организме человека. Точные измерения концентрации пролактина имеют важное значение при получении биохимических данных для поддержки клинических решений при диагностике, лечении и профилактике заболеваний гипофиза, репродуктивной, иммунной и других систем организма. Целью работы было проведение сравнительного анализа результатов определения пролактина в сыворотке крови на анализаторах Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics, Великобритания) и Cobas 6000 (Roche, Швейцария). Для исследования были использованы образцы сыворотки крови 664 пациентов, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Сравнительный анализ результатов определения пролактина, полученных с использованием различных технологий (Vitros ECi 3600 и Cobas 6000), показал, что результаты согласуются между собой с высокой степенью ($r = 0,89, p < 0,05$). При первичной диагностике пациента очень важным является выбор метода определения биохимических параметров, однако ещё более важным является использование одного и того же метода при лечении и долгосрочном наблюдении пациента.

Ключевые слова: пролактин; автоматизированные системы; гиперпролактинемия; Cobas 6000 (Roche); Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics).

Для цитирования: Колесникова Г.С., Малышева Н.М., Никанкина Л.В., Зураева З.Т. Автоматизированные системы Vitros ECi 3600 и Cobas 6000: сравнительный анализ результатов определения пролактина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (6): 333-339. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-333-339>

Kolesnikova G.S., Malysheva N.M., Nikankina L.V., Zuraeva Z.T.

ANALYTICAL PLATFORMS VITROS 3600 AND COBAS 6000: COMPARATIVE ANALYSIS OF PROLACTIN MEASUREMENT

Endocrinology Research Centre, 117036, Moscow, Russia

Prolactin is a polypeptide hormone secreted by the lactotrophic cells of the anterior pituitary gland and has a wide range of biological effects in the human body. Accurate measurements of prolactin concentration are essential in obtaining biochemical data to support clinical decisions in the diagnosis, treatment and prevention of diseases of the pituitary gland, reproductive, immune and other body systems. The aim of our study is to carry out a comparative analysis of the serum prolactin measurement determined by the two analytical platforms Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics) and Cobas 6000 (Roche). Serum samples from 664 patients undergoing examination at the Endocrinology Research Center were included in the study. Comparative analysis of serum prolactin measurement showed that results obtained by the two analytical systems are consistent with each other ($r = 0.89, p < 0.05$). Clinically accuracy of prolactin measurement and to a large extent using the same method is of particular importance in primary diagnosis, treatment and long-term follow-up of the patient.

Key words: prolactin; immunoassay; hyperprolactinemia; Cobas 6000 (Roche); Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics).

For citation: Kolesnikova G.S., Malysheva N.M., Nikankina L.V., Zuraeva Z.T. Analytical platforms Vitros ECi 3600 and Cobas 6000: comparative analysis of prolactin measurement. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 333-339 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-333-339>

For correspondence: Malysheva N.M., PhD, senior researcher of clinical diagnostic laboratory; e-mail: Malysheva.Natalya@endocrincentr.ru

Information about authors:

Kolesnikova G.S., <https://orcid.org/0000-0002-4266-2171>;

Malysheva N.M., <https://orcid.org/0000-0001-7321-9052>;

Nikankina L.V., <https://orcid.org/0000-0001-8303-3825>;

Zuraeva Z.T., <https://orcid.org/0000-0001-6953-6928>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 20.01.2021
Accepted 23.03.2021

Введение. Одним из основных полипептидных гормонов, секретируемых лактотрофными клетками передней доли гипофиза является пролактин. Он играет важную роль в регуляции метаболизма в организме человека [1 - 5]. Под контролем пролактина находятся:

– репродуктивная функция (функция желтого тела и процесс лактации у женщин, сперматогенез и продукция тестостерона у мужчин);
– иммунная система (пролиферация Т- и В-лимфоцитов);

Для корреспонденции: Малышева Наталья Михайловна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. клинико-диагностической лаборатории; e-mail: Malysheva.Natalya@endocrincentr.ru

- водно-солевой обмен (регуляция осмолярности);
- углеводный и жировой обмен (ферментативная активность гепатоцитов);
- психологическое поведение (устойчивость к стрессам).

Повышение концентрации пролактина в крови, отражающее усиление секреции его лактотрофами, может свидетельствовать о различных физиологических (физическая нагрузка, беременность или стресс) или патологических процессах (опухоль гипофиза, синдром поликистозных яичников и т.д.).

Клинико-диагностические лаборатории располагают различными диагностическими системами для определения биохимических показателей крови, в частности, пролактина. Каждая компания-производитель разрабатывает свой вариант тест-системы, что затрудняет их стандартизацию. Это одна из причин расхождения в результатах определения гормонов. Важное значение имеет наличие метод-специфичных референсных интервалов, которые следует валидировать в лаборатории. Различия между методами анализа приводят к необходимости при первичной диагностике и последующем наблюдении пациента проводить измерения с использованием одной и той же автоматизированной системы.

В настоящей работе проведено сравнение результатов определения пролактина в сыворотке крови женщин, мужчин и детей различных возрастных групп, полученных с помощью автоматизированных систем Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics, Великобритания) и Cobas 6000 (Roche, Швейцария).

Материал и методы. В ретроспективное одноцентровое исследование было включено 664 образца сывороток условно здоровых субъектов, направленных для обследования в НМИЦ эндокринологии Минздрава РФ. Были отобраны результаты пациентов с нормальными показателями биохимических, гематологических и гормональных анализов, то есть находившиеся в стадии пол-

ной клинической ремиссии. Выборка была произведена произвольным способом. Уровень пролактина был проанализирован в 355 сыворотках пациентов женского пола (от 5 до 83 лет) и 309 сыворотках пациентов мужского пола (от 5 до 80 лет). Сбор крови проводили стандартным способом: из локтевой вены утром натощак (8.00-10.00). У девушек и женщин образцы крови были взяты в фолликулиновую фазу цикла. Затем кровь центрифугировали (3000 об/мин и 4°C) и сыворотку хранили при -20°C до измерения в ней содержания пролактина.

Концентрацию пролактина определяли тест-системой для количественного определения пролактина в сыворотке и плазме крови человека VITROS Immunodiagnostic Products Prolactin для автоматического анализатора Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics) методом конкурентного усиленного хемилюминесцентного иммуноанализа [6].

Для сравнения в тех же образцах сыворотки определяли содержание пролактина тест-системой Elecsis Prolactin II для автоматического анализатора Cobas 6000 (Roche) методом двухступенчатого («сэндвич») электрохемилюминесцентного анализа на микрочастицах [7].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерной программы STATISTICA 13.3 (StatSoft, IncUSA) непараметрическим методом. Достоверность различий между показателями рассчитывалась с помощью теста Манна-Уитни, корреляция данных, полученных двумя методами, оценивалась по методу Спирмена ($p < 0.05$). Данные представлены в виде медианы и интерперцентильного размаха между 5% и 95 % процентилями.

Результаты. Сравнительное изучение результатов определения пролактина в сыворотке женщин и мужчин, полученных с помощью автоматизированных систем Vitros и Cobas, показало систематический сдвиг: уровень пролактина при всех интервалах концентраций был ниже при использовании Cobas (рис. 1, 2). Диапа-

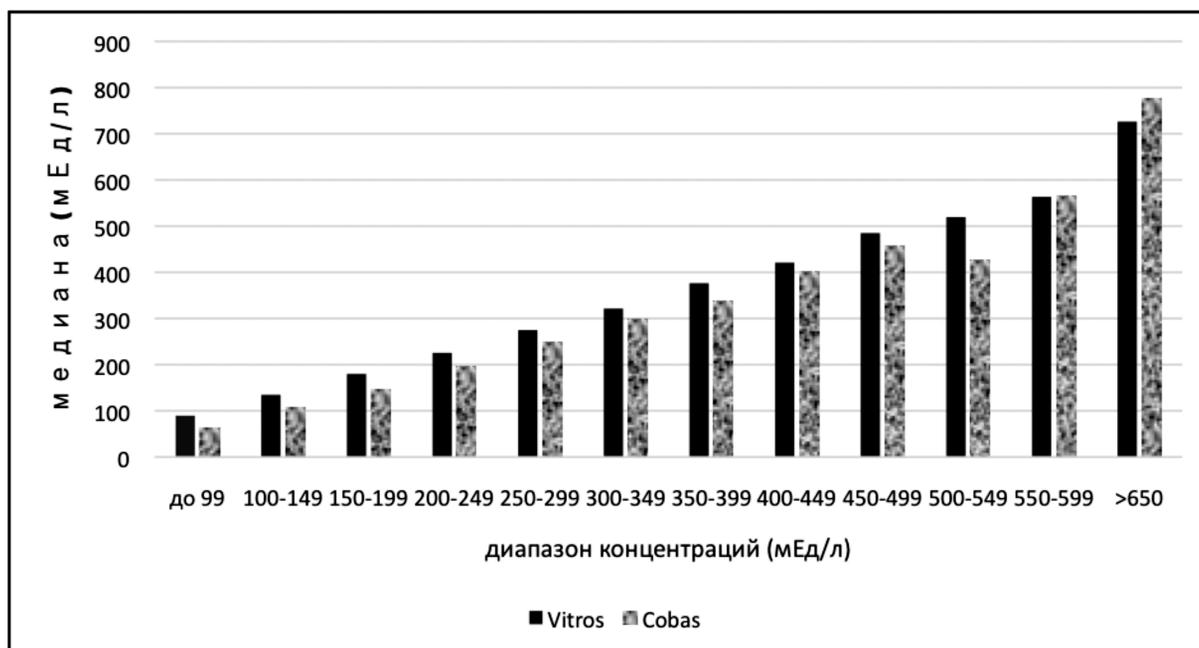


Рис. 1. Сравнение показателей определения пролактина у женщин разного возраста (от 5 до 83 лет).

зоны концентраций устанавливались по результатам, полученным с помощью Vitros. Исключение составлял интервал высоких концентраций (более 550 мЕд/л), когда уровни пролактина были сравнимы между собой при определении двумя методами или превышали при определении системой Cobas.

Гистограммы распределения количества пациентов в зависимости от полученных концентраций (рис.3, 4) также показали, что наблюдается систематическое уменьшение показателей при определении системой

Cobas. Содержание пролактина почти у трети женщин приходилось на интервал 100-199 мЕд/л при определении Cobas и на интервал 200-299 мЕд/л при определении Vitros (33,5% и 34,9%, соответственно). Такое же соотношение и у мужчин (45,3% и 35,8%, соответственно).

Были сформированы возрастные интервалы, отражающие изменения физиологического развития пациентов на протяжении жизни [8,9]. У девочек и женщин было выделено 7 интервалов: детство (5-6 лет), период адре-

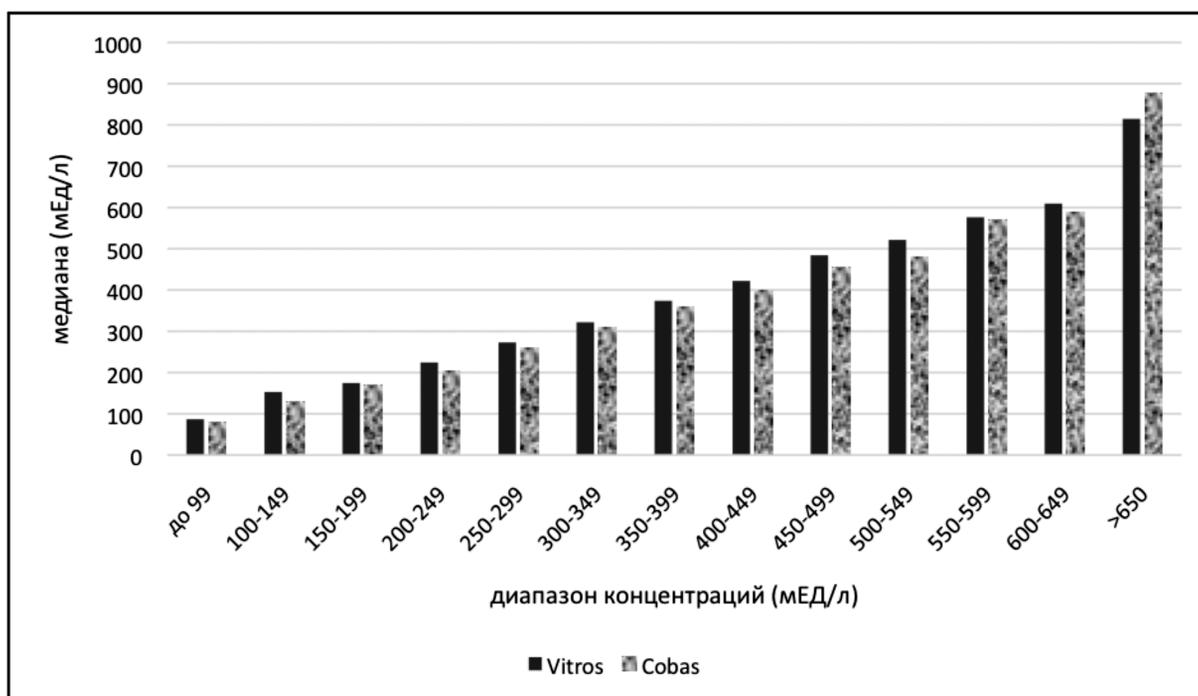


Рис. 2. Сравнение показателей определения пролактина у мужчин разного возраста (от 5 до 80 лет).

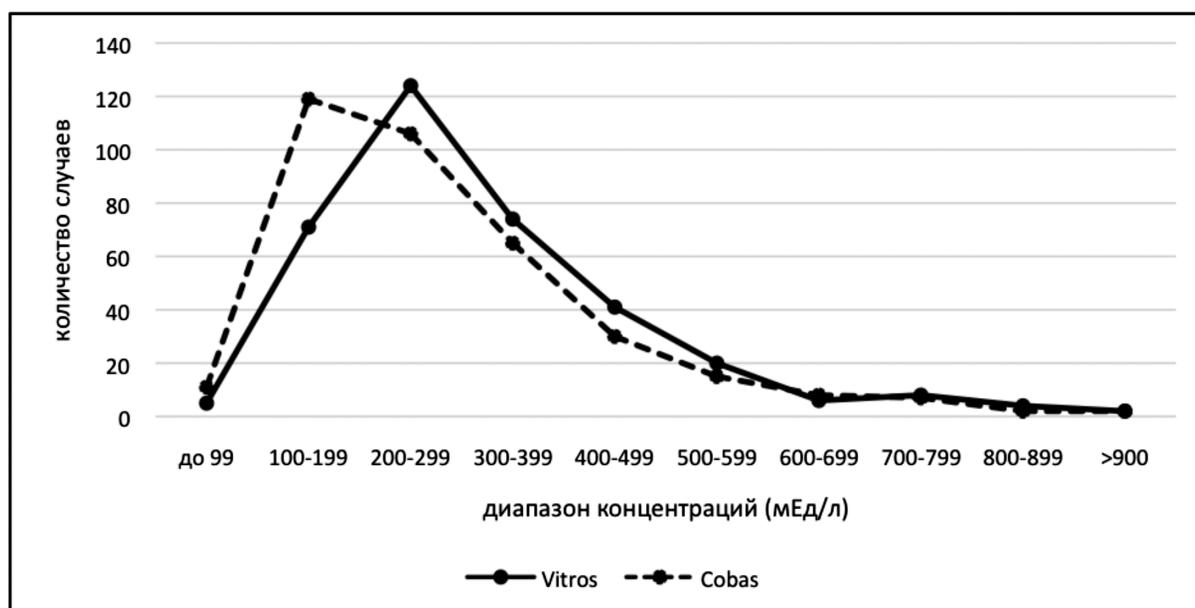


Рис. 3. Гистограмма распределения содержания пролактина по концентрациям в сыворотке девочек и женщин.

нархе (7-9 лет), начало полового созревания (препубертат, 10-13 лет), становление половой функции (пубертат, 14-17 лет), репродуктивный возраст (18-45 лет), пременопауза (46-55 лет), постменопауза (старше 55 лет). Хорошо заметно, что во всех возрастных интервалах показатели, полученные с помощью Cobas, ниже, чем аналогичные показатели, полученные с помощью Vitros (табл. 1).

У мальчиков и мужчин было выделено 6 интервалов: детство (5-7 лет), период адренархе (8-9 лет), начало полового созревания (препубертат, 10-12 лет), становление половой функции (пубертат, 13-16 лет), репродуктивный возраст (17-60 лет), пожилые (старше 60 лет). Как и у женщин, у мужчин показатели, полученные с помощью Cobas, ниже, чем аналогичные показателя, полученные с помощью Vitros (табл. 2).

В зависимости от диапазонов нормальных значений уровня пролактина (табл. 3) нами было рассчитано распределение показателей для мужчин и женщин репродуктивного возраста (рис. 5, 6). Оказалось, что у женщин это распределение практически одинаково для обоих методов: около 90% случаев находилось в преде-

лах нормальных значений. Вместе с тем, количество мужчин с нормальным содержанием пролактина было меньше, а с повышенным уровнем пролактина больше при определении с помощью системы Cobas. Такая разница обусловлена установленными производителем диапазонами нормальных концентраций для собственной выборки. Производители аналитических систем рекомендуют каждой лаборатории устанавливать свой референсный диапазон на своей выборке.

При сравнительном анализе показателей уровня пролактина, определенных с использованием различных технологий (Vitros ECi 3600 и Cobas 6000), оказалось, что результаты согласуются между собой с высокой степенью ($r = 0,89, p < 0,05$) (рис. 7).

Обсуждение. Лабораторные исследования являются неотъемлемой частью процесса принятия клинических решений. Поэтому точность измерений и правильность интерпретации приобретает особое значение. Большинство предлагаемых для практического применения методов основаны на принципе антиген-антитело, однако, все они различаются по участкам распознавания молекул, источникам полу-

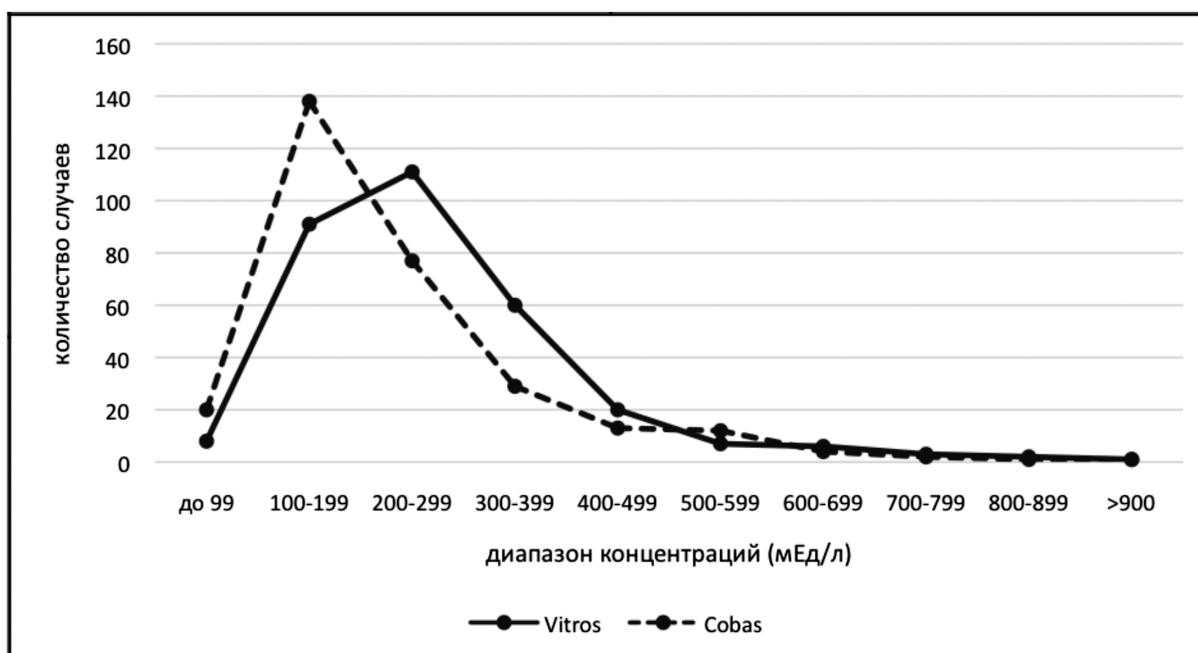


Рис. 4. Гистограмма распределения содержания пролактина по концентрациям в сыворотке мальчиков и мужчин.

Таблица 1

Сравнение результатов определения пролактина в различные возрастные периоды у девочек и женщин (данные представлены в виде медианы (мЕд/л) и 5%-95% просентилями)

Возраст, годы	n	Vitros	Cobas	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность различий, p
Детство, 5-6	24	237,7 [139;2537,1]	193,7 [112,6;485,0]	0,96	< 0,001
Адренархе, 7-9	48	267,6 [121,2;680,8]	225,2 [101,8;784,9]	0,93	< 0,001
Препубертат, 10-13	50	249,6 [149,1;536,5]	213,8 [109,6;490,1]	0,93	< 0,001
Пубертат, 14-17	45	324,5 [161,3;563,3]	286,6 [125,6;613,7]	0,92	0,011
Репродуктивный возраст, 18-45	131	307,1 [154,2;652,9]	281,2 [119,6;737,8]	0,91	< 0,001
Пременопауза, 46-55	26	269,8 [134,7;717,8]	226,4 [89,5;612,6]	0,92	0,015
Постменопауза, старше 55	31	193,8 [102,9;503,8]	171,3 [95,0;425,4]	0,99	< 0,001

чения антител, характеру используемой метки и т.д. В связи с этим, предлагаемые разными производителями методы имеют различную специфичность и чувствительность. Следовательно, сравнение показателей определения биомаркеров в одних и тех же сыворотках, полученных разными системами, показывает

заметный систематический сдвиг, что мы и наблюдаем в нашем исследовании. Более низкие средние значения пролактина, полученные на анализаторе Cobas и наблюдаемая систематическая разница (см. рис. 1, 2) могут быть объяснены разными аффинными свойствами антител, выбранных производителями. Кроме

Таблица 2

Сравнение результатов определения пролактина в различные возрастные периоды у мальчиков и мужчин (данные представлены в виде медианы (мЕд/л) и 5%-95% процентилями)

Возраст, годы	<i>n</i>	Vitros	Cobas	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность различий, <i>p</i>
Детство, 5-7	29	249,0 [118,9;424,9]	188,9 [94,6;504,7]	0,96	0,002
Адренархе, 8-9	20	196,0 [61,4;329,8]	148,6 [34,6;306,8]	0,94	< 0,001
Препубертат, 10-12	30	220,3 [117,9;671,0]	163,7 [94,4;647,2]	0,93	< 0,001
Пубертат, 13-16	62	310,0 [169,9;664,3]	248,1 [132,8;603,9]	0,92	< 0,001
Репродуктивный возраст, 17-60	144	224,9 [128,3;489,9]	195,0 [92,4;434,5]	0,90	< 0,001
Пожилые, Старше 60	24	199,9 [123,4;446,1]	175,0 [100,4;503,6]	0,86	0,027

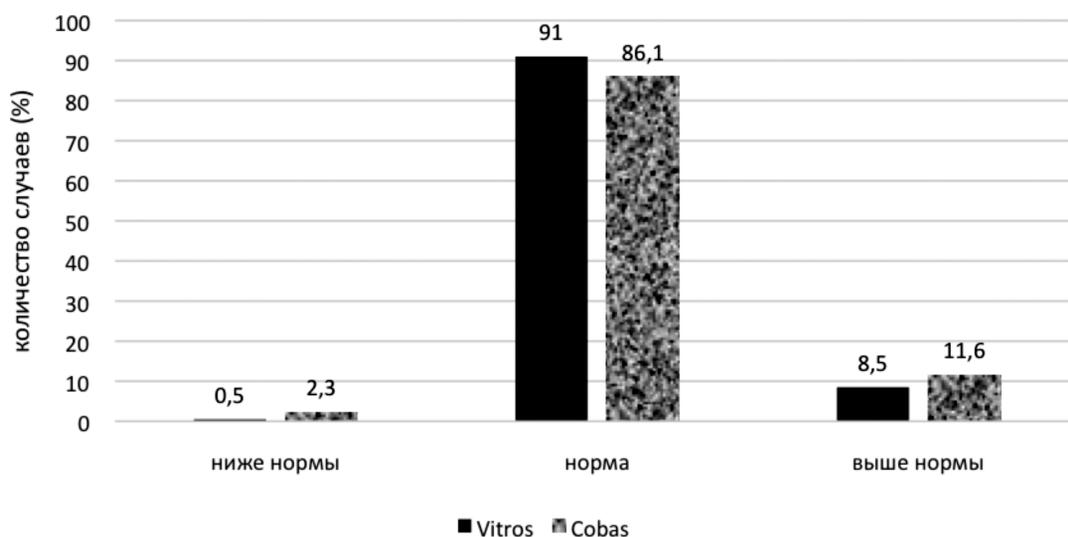


Рис. 5. Распределение уровней пролактина в сыворотке крови женщин репродуктивного возраста, в %.

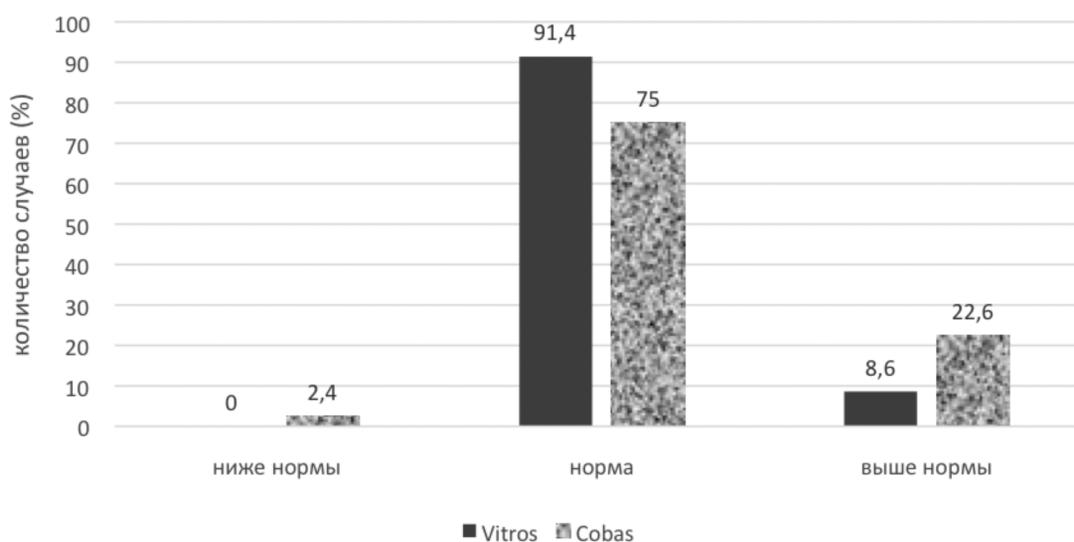


Рис. 6. Распределение уровней пролактина в сыворотке крови мужчин репродуктивного возраста, в %.

Диапазон ожидаемых значений уровня пролактина у здоровых людей для используемых методов, мЕд/л

Группы	Vitros	Cobas
Женщины	64 - 395	102 - 496
Мужчины	78 - 380	86 - 324

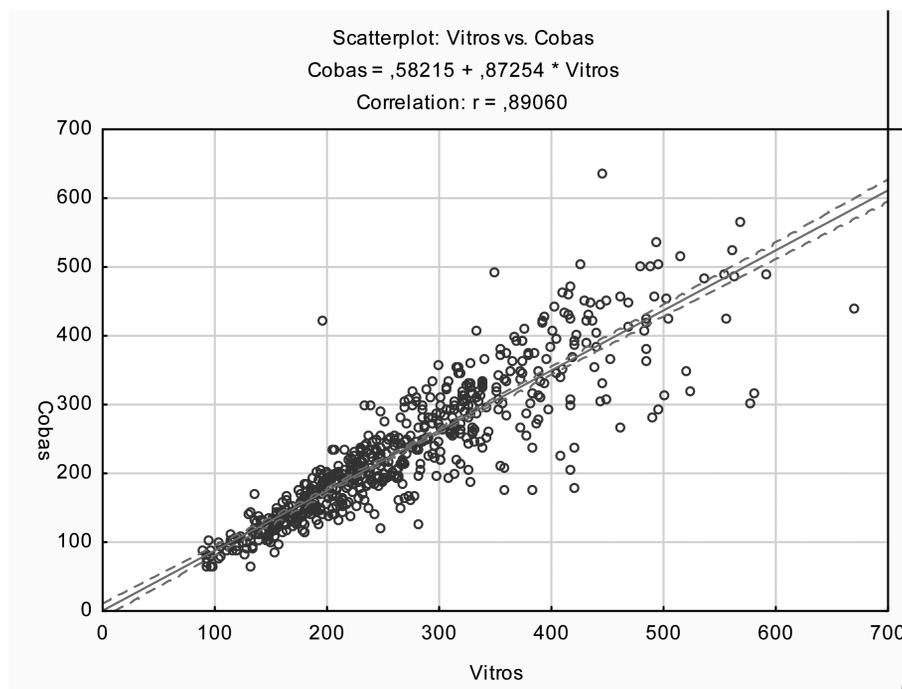


Рис. 7. Корреляция показателей содержания пролактина в сыворотках крови, полученных с помощью различных технологий.

того, разная кинетика реакций и применяемые методы регистрации сигнала, использованные при разработке двух процедур анализа, сами по себе объясняют разные референсные диапазоны для каждой системы наборов (табл.3). Более высокое значение верхней границы референсного диапазона системы Cobas для женщин объясняет тот факт, что около 90% случаев распределения показателей пролактина (см. рис. 5) находится в пределах нормальных значений для обоих методов. Для мужчин производители Cobas установили более низкое значение верхней границы референсного диапазона, чем установлено для Vitros, поэтому при анализе распределения показателей количество мужчин с нормальным содержанием пролактина оказалось меньше для анализатора Cobas (см. рис. 6).

Не вызывает сомнений правильность и точность определения пролактина обоими автоматическими анализаторами. Сравнительный анализ показателей уровня пролактина, определенных с использованием различных технологий (Vitros ECi 3600 и Cobas 6000), показал высокую степень корреляции методов ($r = 0,89, p < 0,05$) (см. рис.7). Однако, правильная интерпретация получаемых результатов полностью зависит от метод-специфичных референсных диапазонов, обязательно валидируемых в лаборатории. Производители рекомендуют устанавливать свои референсные интервалы на своей популяции.

Исходя из полученных данных, важно отметить, что при мониторинге лечения пациента обязательным усло-

вием является использование одного и того же метода определения пролактина. Результаты, получаемые с помощью любой тест-системы, носят вспомогательный характер и интерпретируются врачом в совокупности с клиническими симптомами болезни.

Заключение. По результатам исследования обе автоматизированные системы, Cobas 6000 (Roche) и Vitros ECi 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics) 6000, могут быть рекомендованы для определения уровня пролактина. Необходимым условием является наличие метод-специфичных референсных интервалов, а также использование одного и того же метода при длительном наблюдении пациента.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3 – 5 см. REFERENCES)

1. Гончаров Н.П., Кацяя Г.В., Колесникова Г.С. Ключевые гормоны в эндокринологии и методы их определения. М: АдамантЪ; 2014.
2. Мельниченко Г.А., Дзеранова Л.К., Пигарова Е.А., Воронникова С.Ю., Рожинская Л.Я., Дедов И.И. Федеральные клинические рекомендации по клинике, диагностике, дифференциальной диагностике и методам лечения гиперпролактинемии. *Проблемы эндокринологии*. 2013; 59(6): 19-26.
6. Инструкция к набору реагентов для количественного определения пролактина в сыворотке и плазме крови человека VITROS Immunodiagnostic Products Prolactin REF 184 9793.

7. Инструкция к набору реагентов для количественного определения пролактина в сыворотке и плазме крови человека Elecsys Prolactin II.
8. Антонова О.А. Возрастная анатомия и физиология. Хочу все знать – учебное пособие. Москва: Высшее образование; 2018.
9. Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. Половое развитие детей: норма и патология. Москва: Колор Ит Студио; 2002.
3. Soliman V.J., Esawy A.M. Rhashba S.A. Role of prolactin in activity of systemic lupus erythematosus. *Dermatology Venerology and Andrology*. 2018; 38(1): 23-8.
4. Saleem M., Martin H., Coates P. Prolactin biology and laboratory measurement: an update on physiology and current analytical issues. *Clin. Biochem. Rev.* 2018; 39(1): 3-16.
5. Li J., Rice M.S., Huang T., Hankinson S.E. et al. Circulating prolactin concentrations and risk of type 2 diabetes in US women. *Diabetologia*. 2018; 61(12): 2549-60.
6. Kit for the quantitative measurement of prolactin in human serum and plasma VITROS Immunodiagnostic Products Prolactin (instruction) REF 184 9793.
7. Kit for the quantitative measurement of prolactin in human serum and plasma Elecsys Prolactin II (instruction).
8. Antonova O.A. Age anatomy and physiology. Want to know everything – Study guide. Moscow: Vyshee obrazovanie; 2018. (in Russian)
9. Dedov I.I., Semicheva T.V., Peterkova V.A. Sexual development of children: norm and pathology. Moscow: Kolor It Studio; 2002. (in Russian)

REFERENCES

1. Goncharov N.P., Katsiya G.V., Kolesnikova G.S. Key hormones in endocrinology and methods of their determination. Moscow: Adamant; 2014. (in Russian)
2. Mel'nichenko G.A., Dzeranova L.K., Pigarova E.A., Vorotnikova S.Yu., Rozhinskaya L.Ya., Dedov I.I. Federal clinical guidelines on the clinic, diagnosis, differential diagnosis and treatment of hyperprolactinemia. *Problemy endokrinologii*. 2013; 59(6): 19-26. (in Russian)

Поступила 20.01.21

Принята к печати 23.03.21

Сафроненко А.В., Косенко В.А., Демидова А.А., Нажева М.И.

ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ОСТЕОРЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

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

Целью исследования являлась разработка информативного способа лабораторного контроля остеорезорбтивного действия при системном приеме глюкокортикоидов у больных язвенным колитом. Обследованы 54 пациента с язвенным колитом в возрасте от 18 до 44 лет: 35 (64,8%) мужчин и 19 (35,2%) женщин. У пациентов клинической группы до и после проведения первого, второго, третьего курса глюкокортикостероидов, а также при формировании стероидной зависимости в сыворотке крови и десневой жидкости одновременно определяли концентрацию маркера остеорезорбции катепсина К методом иммуноферментного анализа. Концентрацию остеомаркера сопоставляли с параметрами денситометрической плотности поясничных позвонков L1-L4 при рентгенологическом исследовании. Установлено, что при системном применении глюкокортикоидов у больных язвенным колитом концентрация катепсина К в десневой жидкости повышалась раньше, чем в сыворотке крови. Выявлено, что при повышении концентрации катепсина К в десневой жидкости более 2,6 пмоль/л в условиях системного приема глюкокортикостероидов, риск развития остеопороза повышался с диагностической чувствительностью 81,8% и специфичностью 74,4% ($p=0,0001$). Диагностическая точность составила 78,1%. При повышении концентрации катепсина К в десневой жидкости выше дифференциального разделительного уровня (2,6 пмоль/л) риск развития остеопороза возрастал в 3,2 раза ($p=0,0001$). По итогам исследования разработан методический и информационный алгоритм по неинвазивному контролю стероидного остеопороза у больных язвенным колитом при системном применении глюкокортикоидов путем оценки концентрации катепсина К в десневой жидкости.

Ключевые слова: катепсин К; сыворотка крови; десневая жидкость; остеорезорбция; глюкокортикоиды.

Для цитирования: Сафроненко А.В., Косенко В.А., Демидова А.А., Нажева М.И. Лабораторный контроль остеорезорбтивного действия глюкокортикоидов у больных язвенным колитом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 340-344. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-340-344>

Safronenko A.V., Kosenko V.A., Demidova A.A., Nazheva M.I.

LABORATORY CONTROL OF THE OSTEORESORPTIVE EFFECTS OF GLUCOCORTICOIDS IN PATIENTS WITH PURPOSE COLLITIS

Rostov state medical university of Ministry of Health of the Russian Federation, 344022, Rostov-on-Don, Russia

The aim of the work was to develop an informative method for laboratory monitoring of osteoresorbent action during systemic administration of glucocorticoids in patients with ulcerative colitis. The study included 54 patients with ulcerative colitis aged 18 to 44 years: 35 (64,8%) men and 19 (35,2%) women. In patients of the clinical group before and after the first, second, third courses of glucocorticosteroids, as well as during the formation of steroid dependence, the concentration of the osteoresorption marker cathepsin K was determined simultaneously in the blood serum and gingival fluid by enzyme immunoassay. The concentration of the osteomarker was compared with the parameters of the densitometric density of the lumbar vertebrae L1-L4 during X-ray examination. It was found that with the systemic use of glucocorticoids in patients with ulcerative colitis, the concentration of cathepsin K in the gingival fluid increased earlier than in the blood serum. It was found that with an increase in the concentration of cathepsin K in the gingival fluid of more than 2,6 pmol/l in conditions of systemic administration of glucocorticosteroids, the risk of osteoporosis increased with a diagnostic sensitivity of 81,8% and a specificity of 74,4% ($p=0,0001$). The diagnostic accuracy was 78,1%. With an increase in the concentration of cathepsin K in the gingival fluid above the differential separation level (2,6 pmol/l), the risk of developing osteoporosis increased 3,2 times ($p=0,0001$). The study developed a methodological and informational algorithm for the non-invasive control of steroidal osteoporosis in patients with ulcerative colitis with systemic use of glucocorticoids by assessing the concentration of cathepsin K in the gingival fluid.

Key words: cathepsin K; blood serum; gingival fluid; osteoresorption; glucocorticoids.

For citation: Safronenko A.V., Kosenko V.A., Demidova A.A., Nazheva M.I. Laboratory control of the osteoresorptive effects of glucocorticoids in patients with purpose colitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 340-344 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-340-344>

For correspondence: Demidova A.A., candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Medical and Biological Physics; e-mail: alald@inbox.ru

Information about authors:

Safronenko A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6186>;

Kosenko V.A., <https://orcid.org/0000-0002-7609-0626>;

Demidova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-3545-9359>;

Nazheva M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7613-5337>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 29.01.2021
Accepted 15.02.2021

Введение. Больные с воспалительными заболеваниями кишечника имеют повышенный риск развития остеопороза по сравнению с населением в целом. Распространенность остеопороза у пациентов с язвенным колитом составляет от 13% до 42% [1]. Генез снижения минеральной плотности костной ткани у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника считается многофакторным и связан с хроническим воспалением, использованием кортикостероидов при лечении, дефектами питания больных и изменением всасывания в кишечнике [2]. При изменении минеральной плотности костной ткани на одно стандартное отклонение от средней величины нормы относительный риск перелома увеличивается в 1,6-2,6 раз [3].

Согласно современным клиническим рекомендациям по лечению язвенного колита и болезни Крона разработаны принципы скрининга пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника на остеопению/остеопороз [4 – 6]. Тем не менее, во многих исследованиях констатируется, что соблюдение вышеупомянутых рекомендаций по скринингу остеопороза соблюдается недостаточно часто, что приводит к осложненному течению остеопороза ввиду развития переломов [7, 8].

При системном и длительном приеме глюкокортикоидов при аутоиммунных заболеваниях, включая язвенный колит, у 50% больных развивается стероидассоциированный остеопороз [9], механизм которого опосредуется глюкокортикоидными рецепторами, экспрессирующимися в остеокластах и остеобластах [10]. При остеопорозе, индуцированном приемом глюкокортикоидов, страдает не только прочность кости, обусловленная ее минеральной плотностью, что хорошо визуализируется при проведении остеоденситометрии, но и качество костной ткани. Это связано с развитием дисбаланса в функционировании остеокластов и остеобластов [11]. Глюкокортикоиды подавляют адгезивные свойства остеобластов и их способность прикрепляться к структурам костного матрикса, что ведет к снижению активности синтеза коллагена типа I и ослаблению минерализации кости. Угнетение экспрессии молекул адгезии остеобластов, лейкоцитов, эпителиальных клеток является одним из следствий приема глюкокортикоидов [12]. Между тем, именно от качества реализации адгезивных процессов и прочности прикрепления клеток зависит межклеточная кооперация, взаимодействие с тканевыми элементами и реализация функций клеток, в том числе и лейкоцитов [13]. Кроме того, под воздействием кортикостероидов усиливается активность остеокластов и их способность разрушать коллаген за счет протеолитических ферментов [12]. В результате этого в костной ткани остеорезорбтивные процессы начинают преобладать над синтетическими. Развитие остеопороза при применении глюкокортикоидов представляет опасность для пациентов и требует разработки действенных мер профилактики этого нежелательного побочного эффекта. Клиническая практика нуждается в неинвазивном лабораторном контроле остеорезорбтивного действия глюкокортикоидов путем определения остеомаркеров деструкции костной ткани в легко доступных биологических жидкостях.

Целью исследования явилась разработка информативного способа лабораторного контроля остеорезорбтивного действия при системном приеме глюкокортикоидов у больных язвенным колитом.

Материал и методы. Обследованы 54 пациента с язвенным колитом в возрасте от 18 до 44 лет: 35 (64,8%)

мужчин и 19 (35,2%) женщин. Критериями включения в исследование явились: подтвержденный эндоскопически диагноз левостороннего или тотального язвенного колита средней степени активности; рецидив заболевания; длительность заболевания не менее 12 месяцев; наличие в анамнезе не менее двух рецидивов; показание для системного введения глюкокортикоидов (отсутствие эффективности двухнедельного применения 5-аминосалициловой кислоты). Критерии исключения: декомпенсация сопутствующих соматических заболеваний, постменопауза у женщин, заболевания пародонта. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие для участия в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Ростовского государственного медицинского университета.

Больным язвенным колитом первый курс преднизолона в дозе 60 мг перорально назначали в период ремиссии заболевания с постепенным поэтапным снижением до 5 мг и последующей отменой. При снижении дозы глюкокортистероидов, эквивалентной 30-40 мг преднизолона, дополнительно подключали месалазин с последующим переходом на поддерживающую терапию этим препаратом. При рецидиве язвенного колита средней тяжести на фоне поддерживающей терапии месалазином, 25 больным повторно назначали глюкокортистероиды вторым курсом в сочетании с азатиоприном/6-меркаптопурином. Поэтапное снижение дозы и отмена преднизолона аналогичны тактике при первой атаке. При рецидиве, возникшем на фоне поддерживающей терапии тиопуринами, повторно назначали глюкокортикоиды третьим курсом. Стероидозависимую подгруппу больных составили 20 пациентов, у которых согласно стандартным критериям при снижении дозы преднизолона ниже 10 мг/сут наблюдали обострение заболевания или рецидив в течение 3 мес после прекращения гормонального лечения [14].

У пациентов клинической группы до и после проведения первого, второго и третьего курса глюкокортистероидов, а также при формировании стероидной зависимости в сыворотке крови и десневой жидкости (512 проб биологического материала) одновременно определяли концентрацию маркера остеорезорбции катепсина К. Концентрацию остеомаркера сопоставляли с параметрами денситометрической плотности поясничных позвонков L1-L4 при рентгенологическом исследовании. Рентгеновскую остеоденситометрию проводили на двухэнергетическом рентгеновском костном денситометре «Lunar Prodigy» (США). Согласно критериям ВОЗ, значения минеральной плотности костной ткани, отклоняющиеся от возрастной нормы по T-критерию, менее чем на -1 SD (стандартное отклонение), расценивали как норму, от -1 SD до $-2,5$ SD – остеопению, превышающие $-2,5$ SD – остеопороз.

Для получения десневой жидкости в зубодесневую борозду пинцетом помещали бумажный эндодонтический штифт размером №25 для впитывания содержимого на 10 секунд. Определяли разницу веса эндодонтического штифта до и после сорбции жидкости путем взвешивания. Штифт вносили в пробирку с фосфатно-солевым буферным раствором и путем центрифугирования выделяли супернатант, который переливали в полипропиленовые пробирки с последующим хранением при температуре -80°C до двух месяцев. Перед исследованием пробирки выдерживали 20 мин при комнатной температуре и разводили в 200 раз. Образцы сыворотки

крови получали стандартным способом. Катепсин К в десневой жидкости и сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов Cathpsin K (CTSK) (Human) ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., США). Учет результатов проводили с помощью иммуноферментного анализатора Lisa («Эрба Лахема с.р.о.», Чехия).

Статистический анализ результатов осуществляли с применением программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Размер выборки рассчитывали для статистической мощности 80%, нормальность распределения вариантов оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представляли в виде медианы и межквартильного диапазона, доверительного интервала с 95% вероятностью. Использовали методы описательной статистики, корреляционного анализа и ROC-анализа.

Результаты. У пациентов при ремиссии заболевания до проведения 1 курса лечения медиана катепсина К в сыворотке крови составила 4,8 пмоль/л, а в десневой жидкости – 1,7 пмоль/л (табл. 1).

После проведения 1 курса лечения преднизолоном колебания содержания катепсина К в биологических жидкостях были несущественными. После 2 курса – статистически значимое отличие изучаемого лабораторного показателя в сыворотке крови отсутствовало (5,1 пмоль/л), а в десневой жидкости статистически значимо повышалось до 2,7 пмоль/л. После проведения 3 курса терапии глюкокортикостероидами возрастание концен-

трации катепсина К наблюдали как в сыворотке крови (6,3 пмоль/л), так и в десневой жидкости (3,1 пмоль/л). При формировании стероидной зависимости выявили повышенные концентрации катепсина К в сыворотке крови (6,3 пмоль/л) и в десневой жидкости (4,2 пмоль/л).

Остеоденситометрические параметры у больных язвенным колитом при системном приеме глюкокортикостероидов поэтапно снижались по мере повышения кратности курсов приема глюкокортикостероидов с формированием статистической значимости различий уже после 2 курсового приема преднизолона (табл. 2).

Исходно среди пациентов клинической группы число больных с остеопенией составило 4/54 (7,4%). После проведения 1 курса лечения глюкокортикостероидами доля пациентов с остеопенией и остеопорозом соответствовала 6/54 (11,1%) и 2/54 (3,7%), после 2 курса – 13/54 (24,1%) и 7/54 (13%), после 3 курса – 21/54 (38,9%) и 11/54 (20,4%) соответственно. В стероидозависимой подгруппе выявили 9/20 (45%) больных с остеопенией и 7/20 (35%) – с остеопорозом.

У пациентов с язвенным колитом корреляция между концентрацией катепсина К в десневой жидкости и денситометрической плотностью костной ткани (коэффициент корреляции 0,81, $p=0,003$) более выражена по сравнению с теснотой связи содержания катепсина К в сыворотке крови и плотностью костной ткани поясничных позвонков L1-L4 (коэффициент корреляции 0,61, $p=0,007$).

Таблица 1

Концентрация катепсина К в сыворотке крови и десневой жидкости у больных язвенным колитом при системном приеме глюкокортикостероидов

Период	Сыворотка крови, пмоль/л		Десневая жидкость, пмоль/л	
	Ме [25;75]	ДИ	Ме [25;75]	ДИ
Исходно ($n=54$)	4,8 [4,4;5,2]	4,1-5,5	1,7 [1,5;2,0]	1,3-2,2
После 1 курса ($n=54$)	5,1 [4,7;5,5]	4,3-5,8	2,2 [1,8;2,4]	1,6-2,8
После 2 курса ($n=54$)	5,3 [4,9;5,7]	4,7-6,1	2,7 [2,4;3,1]	2,2-3,5
После 3 курса ($n=54$)	6,3 [5,8;6,6]	5,2-6,9	3,1 [2,8;3,6]	2,5-3,9
Стероидозависимая подгруппа ($n=20$)	6,4 [6,0;6,9]	6,0-7,4	4,2 [3,7;4,6]	3,5-5,7
p	$p_1=0,74$ $p_2=0,17$ $p_3=0,03$ $pc3-исх=0,01$		$p_1=0,65$ $p_2=0,04$ $p_3=0,008$ $pc3-исх=0,002$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – число больных; p_1 – уровень доверительной вероятности различий после 1 курса лечения по сравнению с исходными величинами, p_2 – после 2 курса, p_3 – после 3 курса, между параметрами стероидозависимой подгруппы и исходных величин. p_1 - p_3 – по критерию Вилкоксона, $pc3$ -исх – по критерию Манна-Уитни. Ме – медиана, [25;75] – межквартильный диапазон, ДИ – доверительный интервал.

Таблица 2

Параметры остеоденситометрии у больных язвенным колитом при системном приеме глюкокортикостероидов

Период	L2-L4	
	Т-критерий Ме [25;75]	ДИ
Исходно ($n=54$)	-0,92 [-0,72;-1,14]	-0,63;-1,28
После 1 курса ($n=54$)	-1,08 [-0,81;-1,47]	-0,76;-1,63
После 2 курса ($n=54$)	-1,44 [-1,25;-1,75]	-1,13;-1,97
После 3 курса ($n=54$)	-1,57 [-1,34;-1,90]	-1,20;-2,36
Стероидозависимая подгруппа ($n=20$)	-1,72 [-1,53;-2,36]	-1,35;-2,68
p	$p_1=0,47$ $p_2=0,04$ $p_3=0,02$ $pc3-исх=0,004$	

На следующем этапе исследования устанавливали диагностическую информативность определения концентрации катепсина К в десневой жидкости для оценки риска развития остеопороза при системном приеме глюкокортикоидов. Больные с диагностированным остеопорозом по результатам остеоденситометрии получали ранг 1, а без остеопороза – 0. Поскольку корреляция между минеральной плотностью костной ткани была более тесной с концентрацией катепсина К в десневой жидкости, то учитывали содержание изучаемого фермента именно в этой биологической жидкости. Анализ проводили непосредственно после проведения 2 курса лечения глюкокортикоидами, когда зафиксировано статистически значимое изменение показателя. В результате установлено, что при повышении концентрации катепсина К в десневой жидкости более 2,6 пмоль/л в условиях системного приема глюкокортистероидов, риск развития остеопороза повышался с диагностической чувствительностью 81,8% и специфичностью 74,4% ($z=4,78$, $p=0,0001$). Диагностическая точность составила 78,1%. При повышении концентрации катепсина К в десневой жидкости выше установленного дифференциального разделительного уровня (2,6 пмоль/л) риск развития остеопороза возрастал в 3,2 раза ($p=0,0001$).

Величины диагностической чувствительности и специфичности для прогноза развития остеопороза при различных уровнях катепсина К в десневой жидкости у больных язвенным колитом при системном приеме глюкокортикоидов представлены в табл. 3.

Таким образом, в исследовании разработан методический и информационный алгоритм по неинвазивному контролю стероидного остеопороза у больных язвенным колитом при системном применении глюкокортикоидов путем оценки концентрации катепсина К в десневой жидкости и сопоставления индивидуальных значений концентрации с критической величиной лабораторного показателя.

Обсуждение. В диагностике остеопороза на современном этапе клинической практики центральное место занимает остеоденситометрическое ультразвуковое или рентгенологическое исследование. Однако, при стероидном остеопорозе страдает не только минеральная плотность костной ткани, но и межклеточный органический матрикс кости [11]. Следствием данного обстоятельства

является развитие переломов костей у лиц с аутоиммунными заболеваниями при формировании стероидной зависимости уже при показателях денситометрии, соответствующих остеопении и потере костной массы всего на 10-12% [10]. В связи с этим клиницисты нуждаются в информативной неинвазивной лабораторной поддержке для контроля остеорезорбтивного побочного действия глюкокортикостероидов. Перспективным в этом отношении может явиться определение протеолитического потенциала ферментов органического матрикса кости в доступных биологических жидкостях.

Основным поставщиком катепсина К являются активированные остеокласты. Катепсин К могут секретировать также активированные макрофаги, поскольку остеокласты постоянно образуются из макрофагов с последующим приобретением функции разрушения костного матрикса путем образования лакун. Остеокласты способны закислить среду в прелакунарном пространстве до pH 3 всего за несколько минут [12]. Закисление среды в резорбционной лакуне способствует растворению кристаллов гидроксиапатита и протеолизу белков матрикса кости. После закисления среды в резорбционную лакуну остеокластами секретировываются протеолитические ферменты. Одним из ферментов, играющих ключевую роль в резорбции костной ткани, и является катепсин К [15]. Катепсин К вызывает деградацию коллагеновой составляющей кости. Активность катепсина К очень высока и превосходит активность катепсина L и панкреатической эластазы. В результате действия катепсина К из зоны резорбции кости в кровоток попадают большие фрагменты коллагена. Секрета и синтез катепсина К остеокластами стимулируются воспалительными цитокинами, которые высвобождаются из зоны воспаления и тканевого повреждения [15].

В исследовании установлено, что при системном применении глюкокортикоидов у больных язвенным колитом концентрация катепсина К в десневой жидкости повышалась ранее, чем в сыворотке крови. Это связано с тем, что костная ткань пародонта и десневая жидкость находятся в тесном взаимоотношении. Нарушение костного метаболизма, включая альвеолярные отростки челюстей, приводит к изменению биохимического состава десневой жидкости с более коротким латентным периодом, чем изменения сыворотки крови. Активация

Таблица 3

Результаты ROC-анализа прогностической значимости концентрации катепсина К в десневой жидкости у больных язвенным колитом для развития остеопороза при системном приеме глюкокортикоидов

Катепсин К в десневой жидкости, пмоль/л	ДЧ, %	ДИ ДЧ, %	ДС, %	ДИ ДС, %	ОШ
>2,2	100,00	71,5 - 100,0	30,23	17,2 - 46,1	1,43
>2,3	90,91	58,7 - 99,8	37,21	23,0 - 53,3	1,45
>2,5	90,91	58,7 - 99,8	65,12	49,1 - 79,0	2,61
>2,6 *	81,82	48,2 - 97,7	74,42	58,8 - 86,5	3,20
>2,7	72,73	39,0 - 94,0	81,40	66,6 - 91,6	3,91
>2,8	54,55	23,4 - 83,3	86,05	72,1 - 94,7	3,91
>2,9	45,45	16,7 - 76,6	86,05	72,1 - 94,7	3,26
>3	27,27	6,0 - 61,0	90,70	77,9 - 97,4	2,93
>3,1	18,18	2,3 - 51,8	97,67	87,7 - 99,9	7,82
>3,2	9,09	0,2 - 41,3	97,67	87,7 - 99,9	3,91
>3,3	0,00	0,0 - 28,5	100,00	91,8 - 100,0	3,78

Примечание. ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОШ – отношение шансов, * – дифференциально разделительный уровень показателя.

остеокластов под воздействием глюкокортикоидов приводит к усилению синтеза протеолитических ферментов [11]. Безусловно, повышение функциональной активности остеокластов наступает раньше, чем изменение остеоденситометрических показателей. В связи с этим развитие остеопороза можно прогнозировать ранее по изменению протеолитического потенциала десневой жидкости и активации остеорезорбтивных процессов в кости. Повышение концентрации катепсина К – одного из мощных ферментов активированных остеокластов в десневой жидкости и сыворотке крови как предиктора развития остеопороза ранее в медицинских исследованиях не рассматривалось, что свидетельствует об актуальности проведенного исследования. Повышение концентрации катепсина К в содержимом зубодесневого желобка выше дифференциального разделительного уровня является предиктором последующего развития остеопороза при системном приеме глюкокортикоидов. Высокий риск развития изучаемого осложнения ставит под сомнение целесообразность дальнейшего курсового назначения глюкокортикоидов при лечении язвенного колита и является основанием для назначения альтернативных способов подавления воспалительного аутоиммунного процесса в кишечнике, например препаратами генной инженерии. Таким образом, оценка концентрации катепсина К в десневой жидкости имеет как диагностическую, так и клиническую значимость при лечении язвенного колита.

Заключение. Для лабораторного контроля остеорезорбтивного действия при системном приеме глюкокортикоидов у больных язвенным колитом рекомендуется определять активность катепсина К иммуноферментным методом в десневой жидкости. При концентрации катепсина К в десневой жидкости более 2,6 пмоль/л после проведения 2 курса системного приема глюкокортикоидов риск развития остеопороза у больных язвенным колитом повышается в 3,2 раза с диагностической точностью 78,1% ($p=0,0001$). Таким образом, в результате исследования разработан методический и информационный алгоритм по неинвазивному контролю стероидного остеопороза у больных язвенным колитом при системном применении глюкокортикоидов путем оценки концентрации катепсина К в десневой жидкости.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8, 11, 12 см. REFERENCES)

- Иськова И.А. Остеопороз при хронических воспалительных заболеваниях кишечника и целиакии. *Крымский терапевтический журнал*. 2012; 2: 34-9.
- Танковский В.Э., Иванов А.Н. Неспецифический язвенный колит. *Российский общенациональный офтальмологический форум*. 2018; 2: 591-3.
- Салухов В.В., Ковалевская Е.А. Глюкокортикоид – индуцированный остеопороз: современное состояние проблемы. *Российский биомедицинский журнал*. 2018; 4(19): 832-60.
- Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Алиева А.А. Подавление бактериальной адгезии: современные подходы, проблемы и перспективы. *Успехи современной биологии*. 2019. 139(5): 506-15. doi: 10.1134/S0042132419050065.

- Халиф И.Л., Шапина М.В., Головенко А.О., Белоусова Е.А., Чашкова Е.Ю., Лахин А.В. и др. Течение хронических воспалительных заболеваний кишечника и методы их лечения, применяемые в Российской Федерации (результаты многоцентрового популяционного одномоментного наблюдательного исследования). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018; 3(28): 54-62.
- Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е. Биохимические маркеры метастазирования в кости. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015; 1: 61-75.

REFERENCES

- Lima C.A., Lyra A.C., Rocha R., Santana G.O. Risk factors for osteoporosis in inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2015; 6(4): 210-8.
- Tsai M.S., Lin C.L., Tu Y.K., Lee P.H., Kao C.H. Risks and predictors of osteoporosis in patients with inflammatory bowel diseases in an Asian population: a nationwide population-based cohort study. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69: 235-41. doi: 10.1111/ijcp.12526.
- Wehbeh A., Phatharacharukul P., Fayad N. Improvement of osteoporosis screening among inflammatory bowel disease patients at gastroenterology fellows' clinics. *Advances in Preventive Medicine*. 2020. Article ID 7128932. <https://doi.org/10.1155/2020/7128932>.
- American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*. 2003; 124: 791-4.
- Farraye F.A., Melmed G.Y., Lichtenstein G.R., Kane S.V. ACG clinical guideline: preventive care in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2017; 112(2): 241-58.
- Cosman F., de Beur S.J., Le Boff M.S. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2014; 25(10): 2359-81.
- Iskova I.O. Osteoporosis in chronic inflammatory bowel disease and celiac disease. *Krymskiy terapevticheskiy zhurnal*. 2012; 2: 34-7. (in Russian)
- Etzel J.P., Larson M.F., Anawalt B.D., Collins J., and J. A. Dominitz A. Assessment and management of low bone density in inflammatory bowel disease and performance of professional society guidelines. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011; 17(10): 2122-9.
- Tankovskiy V.E., Ivanov A.N. Nonspecific ulcerative colitis. *Rossiyskiy obshchenatsional'nyi oftalmologicheskii forum*. 2018; 2: 591-3. (in Russian)
- Salukhov V.V., Kovalevskaya E.A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: the current state of the problem. *Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal*. 2018; 4(19): 832-60. (in Russian)
- Schule S., Rossel J.-B., Frey D. Widely differing screening and treatment practice for osteoporosis in patients with inflammatory bowel diseases in the Swiss IBD cohort study. *Medicine*. 2017. 96(22): e6788.
- Zupan J., Jeras M., Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem. Med.* 2013; 23(1): 43-63.
- Kharseeva G.G., Mironov A.Yu., Alieva A.A. Suppression of bacterial adhesion: modern approaches, problems and prospects. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2019. 139(5): 506-15. doi: 10.1134/S0042132419050065. (in Russian)
- Halif I.L., Shapina M.V., Golovenko A.O., Belousova E.A., Chashkova E.Yu., Lahin A.V. et al. The course of chronic inflammatory bowel diseases and the methods of their treatment used in the Russian Federation (results of a multicenter population simultaneous observational study). *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2018; 3(28): 54-62. (in Russian)
- Lyubimova N.V., Kushlinskiy N.E. Biochemical markers of bone metastasis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2015; 1: 61-75. (in Russian)

Поступила 29.01.21

Принята к печати 15.02.21

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Почтарь Е.В.¹, Луговская С.А.¹, Наумова Е.В.¹, Дмитриева Е.А.², Костин А.И.³, Долгов В.В.¹

ОСОБЕННОСТИ Т- И НК-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

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

²ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы, 125284, Москва, Россия;

³ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, 129090. Москва, Россия

Гематологические и иммунофенотипические исследования проведены у 30 пациентов с первично выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), 122 больных – на фоне терапии ибрутинибом и 20 доноров. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов (Th, Tcyt, Treg, T-NK, наивные Т-хелперы, Т-хелперы памяти, TCRγδ клетки, активированные Т-лимфоциты) и НК-клеток оценивали на проточном цитометре (FACSCanto II (BD)) с использованием следующей панели моноклональных антител: CD45, CD19, CD3, CD4, CD5, CD8, TCRγδ, CD127, CD16, CD56, CD57, CD45RA, CD45R0, HLA-DR, CD25. Анализ изучаемых клеточных популяций показал увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций, Т-хелперов (преимущественно за счет Т-клеток памяти), цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, TCRγδ-Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов, повышение цитотоксического потенциала НК-клеток у пациентов с первично выявленным ХЛЛ по сравнению с показателями доноров. У пациентов на терапии ибрутинибом регистрировалась положительная динамика восстановления субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток. При ХЛЛ отмечаются как количественные, так и функциональные изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток, что свидетельствует о дисрегуляции иммунного ответа, высоком риске развития инфекций. Мониторинг иммунологических показателей при терапии ибрутинибом позволит оценить действие препарата на адаптивный иммунный ответ при ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; субпопуляции лимфоцитов; инфекции; ибрутиниб.

Для цитирования: Почтарь Е.В., Луговская С.А., Наумова Е.В., Дмитриева Е.А., Костин А.И., Долгов В.В. Особенности Т- и НК-клеточного звена иммунитета при хроническом лимфолейкозе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 345-352. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-345-352>

Pochtar E.V.¹, Lugovskaya S.A.¹, Naumova E.V.¹, Dmitrieva E.A.², Kostin A.I.³, Dolgov V.V.¹

SPECIFIC FEATURES OF T- AND NK-CELLULAR IMMUNITY IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

¹Russian Medical Academy of professional continuous education, 125284, Moscow, Russian Federation;

²SP Botkin Municipal Clinical Hospital, 125284, Moscow, Russian Federation;

³Research Institute of emergency by Sklifosovsky, 129090, Moscow, Russian Federation

Profound immunological dysfunction is the key factor determining the development of infectious complications in chronic lymphocytic leukemia (CLL). The aim of this work is to assess the features of the subpopulation composition of T-lymphocytes (T-helpers (Th), cytotoxic T-lymphocytes (Tcyt), T regulatory cells (Treg), T-NK cells, naive Th, Th-memory, activated T-lymphocytes, TCRγδ cells) and NK cells in peripheral blood of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia (CLL) and receiving ibrutinib therapy.

Hematological and immunophenotypic studies have been performed in 30 patients with previously untreated CLL, 122 patients on ibrutinib therapy and 20 healthy donors. The subpopulation composition of T-lymphocytes (Th, Tcyt, Treg, T-NK, naive T-helpers, memory T-helpers, TCRγδ cells, activated T-lymphocytes) and NK cells has been assessed on flow cytometer (FACSCanto II (BD)) using the following panel of monoclonal antibodies: CD45, CD19, CD3, CD4, CD5, CD8, TCRγδ, CD127, CD16, CD56, CD57, CD45RA, CD45R0, HLA-DR, CD25. Compared to controls all CLL samples were found to have higher the absolute number of T-lymphocytes, NK cells and their subpopulations, T-helpers (especially of memory T-cells), cytotoxic T-cells, regulatory T-cells, TCRγδ T-cells, activated T-lymphocytes, increased cytotoxic potential of NK cells in previously untreated CLL patients. Patients who received ibrutinib therapy have registered a positive trend towards recovery of the subpopulation composition of T-lymphocytes and NK-cells. CLL patients have been found to have quantitative and functional changes in the subpopulations of T-lymphocytes and NK cells, indicating dysregulation of the immune response, and a high risk of developing infections. Monitoring of immunological parameters for ibrutinib therapy make possible to estimate impact of ibrutinib on the adaptive anti-CLL immune response.

Key words: chronic lymphocytic leukemia; lymphocyte subpopulations; infections, ibrutinib.

For citation: Pochtar E.V., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Dmitrieva E.A., Kostin A.I., Dolgov V.V. Specific features of T- and NK-cellular immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 345-352 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-345-352>

For correspondence: Pochtar Evgeniy Vladimirovich, MD, postgraduate student department of clinical laboratory diagnostics; e-mail: pochtar_ev@mail.ru

Information about authors:

Pochtar E.V., <https://orcid.org/0000-0002-3743-3040>;
Lugovskaya S.A., <https://orcid.org/0000-0002-6405-3422>;
Naumova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6048-5746>;
Dmitrieva E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3866-4510>;
Kostin A.I., <https://orcid.org/0000-0001-7542-851X>;
Dolgov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-1537-7444>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 29.03.2021
Accepted 25.04.2021

Введение. Иммунологическая дисфункция является ключевым фактором, определяющим развитие инфекционных осложнений при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ), являющихся основной причиной в структуре смертности этих пациентов. По данным датского регистра, который включал 10 455 пациентов с ХЛЛ в течение почти 50-летнего периода наблюдения, инфекции являлись основной причиной смерти у 10-20% больных [1]. По данным других исследований она колеблется от 30 до 50% [2 – 4]. Восприимчивость к инфекционным заболеваниям при ХЛЛ выявляется на ранних стадиях заболевания, еще до развития значительной инфильтрации органов и тканей клетками ХЛЛ, гипогаммаглобулинемии и проведения химиотерапии. Частота тяжелых инфекций у пациентов рефрактерных к иммунохимиотерапии высокая и достигает около 80% [5]. Характер инфекционных осложнений может быть разным – бактериальный, вирусный, грибковый и смешанный [2, 6].

При ХЛЛ клеточно-опосредованный иммунитет всегда нарушен, а частота и тяжесть инфекций коррелируют с прогрессирующей иммунологической дисфункцией. Ключевым фактором, определяющим эту дисфункцию, является влияние клеток ХЛЛ на стромальное микроокружение, которое с одной стороны поддерживает пролиферацию опухолевых клеток, с другой – изменяет функции нормальных В- и Т-лимфоцитов, макрофагов и других клеток стромы [7]. Очевидно, этим же обусловлены многочисленные дефекты, как со стороны специфической (Т- и В-лимфоциты), так и неспецифической иммунной системы (НК-клетки, дисфункция нейтрофилов и моноцитов, активность системы комплемента).

Введение моноклональных антител в терапию ХЛЛ, в частности ритуксимаба, дополнительно увеличивает иммуносупрессию, повышая риск возникновения инфекций, которые чаще возникали у пациентов с персистирующей нейтропенией [8 – 10]. В последние годы одним из ведущих препаратов в лечении ХЛЛ является ибрутиниб – ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК). ВТК является центральным звеном передачи сигнала через В-клеточный рецептор (BCR) и активирует множество других сигнальных путей, включая NFκB (транскрипционный фактор каппа би). Ибрутиниб связывается необратимо с ВТК за счет формирования ковалентной связи с цистеином 481 около активного сайта ВТК. При ХЛЛ ибрутиниб подавляет жизнеспособность клеток в клеточных культурах, независимо от присутствия стромальных клеток и цитокинов. Он также снижает

содержание хемокинов CCL3 и CCL4 в плазме крови, повышение которых, как предполагают, есть результат активной передачи сигналов через BCR в клетках ХЛЛ, находящихся в микроокружении лимфатических узлов. Ингибирование ВТК ибрутинибом блокирует поступление клеток ХЛЛ в пролиферативные центры лимфатических узлов и способствует их выходу в циркуляцию, что объясняет временный лимфоцитоз в крови после назначения ибрутиниба [11, 12]. В последующих исследованиях было установлено, что ибрутиниб ингибирует пролиферацию и индуцирует каспазозависимый апоптоз опухолевых клеток ХЛЛ *ex vivo* [13]. Терапия ибрутинибом вызывает вопросы, касающиеся его воздействия на уже имеющийся иммунодефицит – происходит ли дальнейшая иммуносупрессия или наоборот, ибрутиниб частично восстанавливает иммунный дефект при ХЛЛ. В соответствии с этим, изучение субпопуляционного состава клеток специфической и неспецифической иммунной защиты у нелеченых пациентов ХЛЛ и в динамике лечения ибрутинибом является актуальным для выявления дефектов иммунной системы и установления влияния таргетной терапии на изменения показателей иммунной системы.

Материал и методы. Материалом исследования служила цельная венозная кровь, стабилизированная антикоагулянтом K₂-ЭДТА. Взятие крови осуществлялось после подписания пациентами добровольного информированного согласия. Все образцы исследовались в течение двух часов после взятия крови.

В исследование включены 152 пациента с ХЛЛ, наблюдавшихся с января 2018 г. по декабрь 2020 г. в дневном стационаре «Московского городского гематологического центра» ДЗ г. Москвы. Диагноз ХЛЛ установлен в соответствии с рекомендациями ВОЗ (2016 г.) [14].

Среди 152 обследованных пациентов с ХЛЛ нелеченные больные с первично установленным диагнозом составили 30 человек (I группа). Во II группу включены 122 пациента, получавших ибрутиниб, с длительностью заболевания от 1 до 20,5 лет. Число предшествующих линий терапии (разные флюдарабин-содержащие схемы, лейкеран и др.) во II группе пациентов составляло от 0 до 12 (медиана – 2,5), длительность приема ибрутиниба – от 8 до 58 недель (медиана – 28,9 нед). Контрольную группу составили 20 доноров.

Всем пациентам проводилось исследование общего анализа крови на гематологическом анализаторе BC6800 (фирма Mindray). Среди пациентов I-й группы

(не получавших терапию) число лейкоцитов колебалось в диапазоне от $8,5 \cdot 10^9/\text{л}$ до $153,0 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана – $21,1 \cdot 10^9/\text{л}$), абсолютное число лимфоцитов составило от $5,6 \cdot 10^9/\text{л}$ до $145,3 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана – $16,4 \cdot 10^9/\text{л}$). Для пациентов II-й группы (на терапии ибрутинибом) колебания числа лейкоцитов составили от $2,3 \cdot 10^9/\text{л}$ до $87,2 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана – $8,1 \cdot 10^9/\text{л}$), абсолютного числа лимфоцитов – от $0,8 \cdot 10^9/\text{л}$ до $81,2 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана – $3,9 \cdot 10^9/\text{л}$). У доноров значения лейкоцитов были от $4,6 \cdot 10^9/\text{л}$ до $9,1 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана $6,7 \cdot 10^9/\text{л}$), абсолютного числа лимфоцитов – от $1,1 \cdot 10^9/\text{л}$ до $2,6 \cdot 10^9/\text{л}$ (медиана $1,9 \cdot 10^9/\text{л}$). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выполнялось с использованием 8-цветной панели моноклональных антител на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, США). Панель моноклональных антител включала: CD19 PE, CD3 FITC, CD4 PerCP-Cy5-5, CD8 PerCP-Cy5-5, TCR $\gamma\delta$ FITC, CD127 APC, CD16 PE-Cy7, CD56 PE, CD57 Pacific Blue, CD45RA PE-Cy7, CD45R0 APC, HLA-DR PE, CD25 PE-Cy7, CD45 APC производства BD Biosciences и Beckman Coulter. В ходе данного исследования определяли субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы (Th), цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt), Т-регуляторные клетки (Treg), Т-НК-клетки (Т-NK), Т-хелперы наивные и памяти, активированные Т-лимфоциты и НК-клетки по экспрессии антигенов (табл. 1).

Пересчет абсолютного числа субпопуляций лимфоцитов осуществлялся двух-платформенным методом, исходя из абсолютного количества лимфоцитов в гемограмме и относительного числа субпопуляций лимфоцитов, определяемого методом многоцветной проточной цитометрии.

Обработка статистических данных выполнялась с использованием программы GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США). Для каждого массива данных проводилась оценка нормальности распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных использовались параметрические методы (среднего значения, стандартного отклонения и 95% доверительного интервала). В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более – статистический критерий ANOVA повторных измерений. Распределение данных по субпопуляциям Т-лимфоцитов и НК-клеток не соответствовало нормальному закону распределения. В этом случае результаты исследования представлялись в виде медианы, 10% и 90% процентиль и для анализа значимости различий использовались непараметрические методы. В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более применялся статистический анализ с использованием теста Краскела-Уоллиса. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы принимался равным 0,05.

Результаты. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови показала, что в дебюте ХЛЛ (I группа пациентов), несмотря на заметное снижение относительного числа Т-лимфоцитов и НК-клеток, отмечается достоверное значительное увеличение по сравнению с донорами абсолютного количества как Т-лимфоцитов ($p < 0,0001$), так и НК-клеток ($p = 0,0007$), а также субпопуляций НК-клеток ($p = 0,0142$ и $p = 0,0345$, соответственно) (табл. 2, 3). Абсолютное число Т-НК-клеток существенно не менялось и оставалось в пределах нормальных значений.

У пациентов II группы, получавших терапию ибрутинибом, происходит снижение по сравнению с пациентами I группы абсолютного числа Т-лимфоцитов ($p = 0,0006$), НК-клеток ($p < 0,0001$), цитолитических НК-клеток ($p < 0,0001$), цитокинпродуцирующих НК-клеток ($p < 0,0001$) и увеличение абсолютного количества субпопуляций Т-НК-клеток ($p = 0,0007$) (см. табл. 2, 3). При этом значения вышеперечисленных субпопуляций достоверно не отличаются от показателей доноров (рис. 1).

Увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов у пациентов I группы происходило как за счет повышения числа цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,0001$), так и за счет Т-хелперов ($p = 0,0044$). Более выраженное увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с Т-хелперами привело к снижению иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Субпопуляционный состав Т-хелперов отличался повышением числа Т-клеток памяти ($p = 0,023$), в то время как абсолютные значения наивных Т-хелперов достоверно не отличались от таковых у доноров. У пациентов II группы по сравнению с пациентами I группы наблюдалось снижение общего числа Т-хелперов ($p < 0,0001$), значения которых приближались к нормальным (различия с донорами недостоверны), при этом показатели наивных Т-хелперов достоверно снижались ниже нормы ($p = 0,0003$). Количество цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов II группы недостоверно снижались по сравнению с пациентами I группы, оставаясь выше показателей доноров ($p = 0,0003$), приводя к инверсии ИРИ ($p < 0,0001$) (рис. 2).

Проведенные нами исследования указывают на достоверное увеличение числа Т-регуляторных клеток ($p < 0,0001$), субпопуляции TCR $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов ($p = 0,0128$) в I группе пациентов по сравнению с донорами, в то время как во II группе больных наблюдалось достоверное снижение по отношению к пациентам I группы числа Т-регуляторных клеток ($p < 0,0001$) и TCR $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов ($p = 0,0215$). Различия по данным

Таблица 1
Иммунофенотипическая характеристика исследуемых субпопуляций лимфоцитов

Субпопуляции лимфоцитов	CD-маркеры
Т-лимфоциты	CD3+
Т-НК-клетки	CD3+CD16,56+
Т-хелперы/индукторы	CD3+CD4+
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+
Иммунорегуляторный индекс	CD3+CD4+/CD3+CD8+
Наивные Т-хелперы	CD3+CD4+CD45RA+
Т-хелперы памяти	CD3+CD4+CD45R0+
Регуляторные Т-лимфоциты	CD4+CD25+CD127 ^{dim-to-neg}
Активированные Т-лимфоциты (поздняя активация)	CD3+HLA-DR+
Активированные Т-лимфоциты (ранняя активация)	CD3+CD25+
TCR $\gamma\delta$ Т-клетки	CD3+TCR $\gamma\delta$ +
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD8+клеток	CD3-CD8+CD57+
НК-клетки:	CD3-CD16,56+
НК-клетки цитолитические	CD3-CD16+CD56-
НК-клетки цитокинпродуцирующие	CD3-CD56+CD16-
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD16+клеток	CD3-CD16+CD57+

показателям по сравнению с донорами являются статистически недостоверными. Кроме того, в I группе пациентов нами выявлено достоверное повышение абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов с маркером ранней активации (CD3+CD25+, $p < 0,0001$), и поздней активации (CD3+HLA-DR+, $p < 0,0001$), а также увеличение цитотоксического потенциала НК-клеток ($p = 0,0167$). Во II группе пациентов отмечалось достоверное снижение по сравнению с I группой Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации ($p < 0,0001$), но при этом значения этих популяций оставались достоверно выше

показателей у доноров ($p = 0,0007$ – для CD3+CD25+-клеток и $p = 0,0079$ – CD3+HLA-DR+-клеток). Изменение ЦТП НК-клеток в данной группе пациентов статистически значимо не отличалось от нормы (рис. 3).

Обсуждение. ХЛЛ – В-клеточная опухоль, характеризующаяся выраженной иммунной дисрегуляцией в клеточном и гуморальном звене иммунитета, включая дисфункцию Т-лимфоцитов. Степень подавления иммунитета у нелеченых пациентов ХЛЛ повышается со временем после установления диагноза и связана с прогрессированием заболевания.

Таблица 2

Сравнение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в исследуемых группах пациентов ХЛЛ и доноров

Субпопуляции лимфоцитов	Абсолютное число клеток (*10 ⁹ /л)			p
	ХЛЛ (I группа) (n=30) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	ХЛЛ (II группа) (n=122) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	Доноры (n=20) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	
Т-лимфоциты (CD3+)	3,59 (1,35-5,23)	1,85 (0,74-4,05)	1,48 (1,02-1,88)	I/II – 0,0006 I/Д < 0,0001 II/Д – NS
Т-НК-клетки (CD3+CD16,56+)	0,13 (0,03-1,02)	0,44 (0,10-1,62)	0,195 (0,02-0,47)	I/II = 0,0007 I/Д – NS II/Д = 0,0018
НК-клетки (CD3-CD16,56+)	0,65 (0,29-1,79)	0,23 (0,07-0,82)	0,28 (0,09-0,47)	I/II < 0,0001 I/Д = 0,0007 II/Д – NS
НК-клетки цитолитические (CD3-CD16+CD56-)	0,48 (0,16-1,72)	0,17 (0,04-0,69)	0,25 (0,05-0,38)	I/II < 0,0001 I/Д – 0,0142 II/Д – NS
НК-клетки цитокинпродуцирующие (CD3-CD56+CD16-)	0,37 (0,18-1,06)	0,20 (0,04-0,57)	0,22 (0,07-0,43)	I/II < 0,0001 I/Д – 0,0345 II/Д – NS
Т-хелперы/индукторы (CD3+CD4+)	1,54 (0,75-4,13)	0,77 (0,34-1,98)	0,83 (0,61-1,19)	I/II < 0,0001 I/Д – 0,0044 II/Д – NS
Т-хелперы наивные (CD3+CD4+CD45RA+)	0,53 (0,18-1,96)	0,13 (0,04-0,45)	0,31 (0,21-0,58)	I/II < 0,0001 I/Д – NS II/Д – 0,0003
Т-хелперы памяти (CD3+CD4+CD45R0+)	0,89 (0,41-2,11)	0,57 (0,27-1,31)	0,49 (0,41-0,74)	I/II – 0,0235 I/Д – 0,0230 II/Д – NS
цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	1,43 (0,38-2,54)	1,05 (0,35-2,92)	0,53 (0,33-0,84)	I/II – NS I/Д < 0,0001 II/Д – 0,0003
ИРИ (CD3+CD4+/CD3+CD8+)	1,36 (0,60-3,11)	0,79 (0,41-1,62)	1,65 (0,89-2,88)	I/II – 0,0003 I/Д – NS II/Д < 0,0001
Т-регуляторные (CD4+CD25+CD127 ^{dim-to-neg})	0,33 (0,05-1,08)	0,01 (0,0-0,08)	0,01 (0,0-0,05)	I/II < 0,0001 I/Д < 0,0001 II/Д – NS
Активированные Т-лимфоциты (CD3+CD25+)	0,56 (0,16-1,3)	0,12 (0,04-0,34)	0,04 (0,02-0,13)	I/II < 0,0001 I/Д < 0,0001 II/Д – 0,0007
Активированные Т-лимфоциты (CD3+HLA-DR+)	0,56 (0,21-1,71)	0,21 (0,07-0,48)	0,11 (0,05-0,21)	I/II < 0,0001 I/Д < 0,0001 II/Д – 0,0079
CD3+TCRγδ+	0,16 (0,04-1,09)	0,07 (0,001-0,38)	0,07 (0,02-0,16)	I/II – 0,0215 I/Д – 0,0128 II/Д – NS
В-лимфоциты (CD19+)	29,7 (3,59-75,72)	6,82 (0,1-19,02)	0,27 (0,098-0,52)	I/II < 0,0001 I/Д < 0,0001 II/Д – 0,0055

Примечание. Данные представлены в виде: Me-медиана, P₁₀ – 10% процентиль, P₉₀ – 90% процентиль, n – объем выборки; p – уровень значимости отличий; «I/II» – между показателями пациентов I-й и II-й групп, I/Д – между показателями пациентов I-й группы и донорами; II/Д – между показателями пациентов II-й группы и донорами; NS – отличия статистически незначимы.

При ХЛЛ отмечается увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, среди которых регистрируются изменения как в субпопуляционном составе, так и функциональной активности. Роль Т-лимфоцитов в патогенезе ХЛЛ остается до конца не изученной. С одной стороны, Т-клетки способны продуцировать сигналы, способствующие пролиферации и выживаемости опухолевых В-лимфоцитов, с другой стороны они имеют признаки активации и «истощения», включая сверхэкспрессию

ингибирующих молекул, подобных PD-1, CTLA-4 [15].

Согласно нашим данным, у первичных пациентов с ХЛЛ в периферической крови отмечается увеличение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, что может быть вызвано разными факторами, в том числе и реакцией на аутоантигена, продуцируемых патологическим клоном ХЛЛ [16 – 19]. При ХЛЛ как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты отличаются повыше-

Таблица 3

Оценка цитотоксического потенциала цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток

Субпопуляции лимфоцитов	Абсолютное число клеток (*10 ⁹ /л)			p
	ХЛЛ (I группа) (n=30) Mean (SD)	ХЛЛ (II группа) (n=122) Mean (SD)	Доноры (n=20) Mean (SD)	
Цитотоксический потенциал CD8+клеток (CD3-CD8+CD57+)	0,057 (0,056)	0,059 (0,092)	0,038 (0,07)	I/II – NS I/Д – NS II/Д – NS
Цитотоксический потенциал CD16+клеток (CD3-CD16+CD57+)	0,153 (0,169)	0,094 (0,130)	0,023 (0,018)	I/II – NS I/Д – 0,0167 II/Д – NS

Примечание. Данные представлены в виде: Mean-среднее значение, SD- стандартное отклонение, n- объем выборки. p – уровень значимости отличий: I/II – между показателями пациентов I-й и II-й группы; I/Д – между показателями пациентов I-й группы и донорами; II/Д – между показателями пациентов II-й группы и донорами; NS – отличия статистически незначимы.

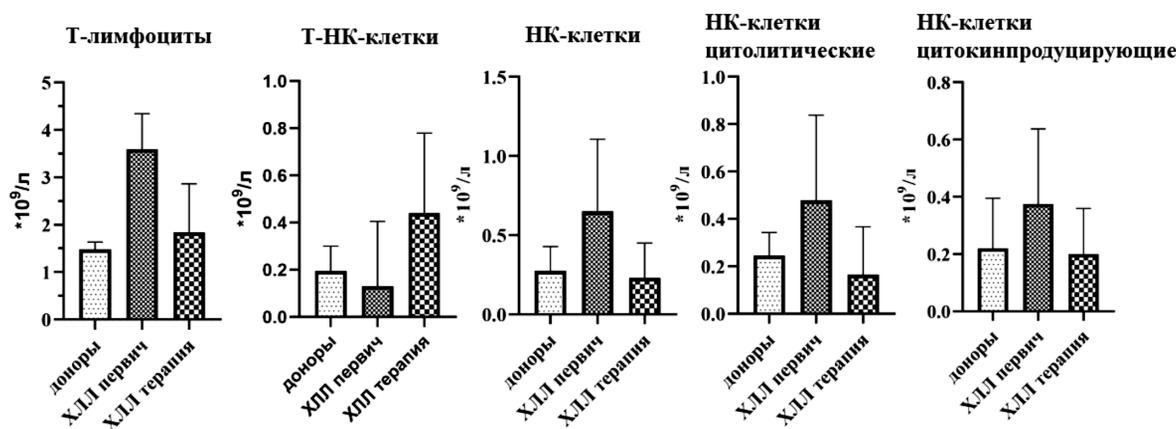


Рис. 1. Соотношение Т-лимфоцитов, Т-НК-клеток, НК-клеток и их субпопуляций в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха от 24-го до 75-го процентиля.

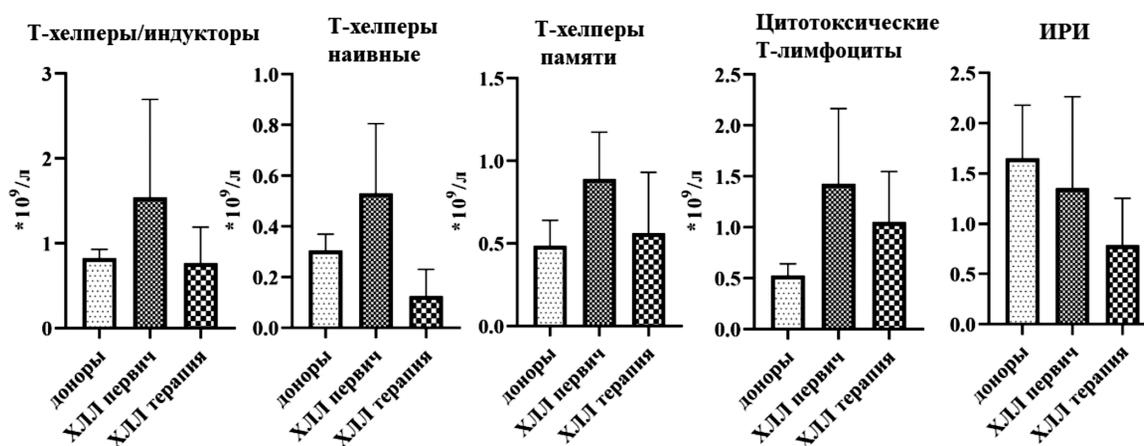


Рис. 2. Соотношение Т-хелперов, Т-хелперов наивных, Т-хелперов памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов и ИРИ (иммунорегуляторный индекс) в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха от 24-го до 75-го процентиля.

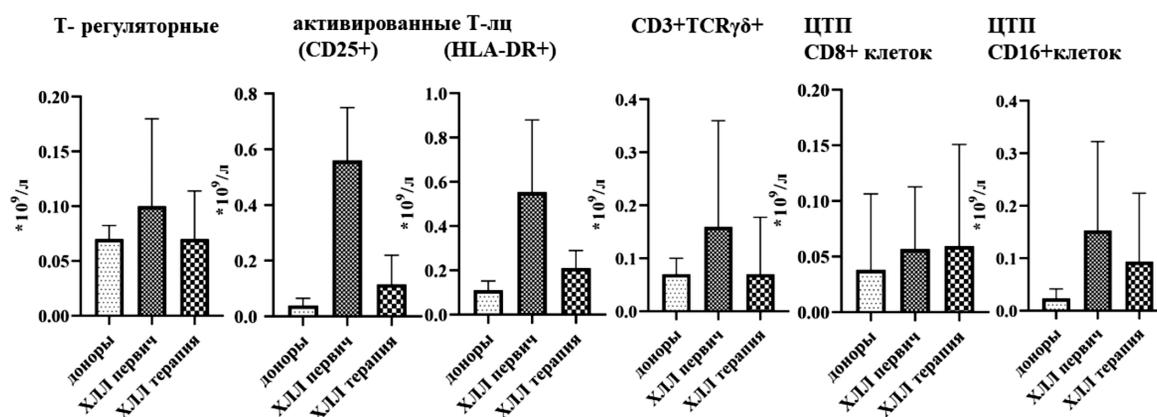


Рис. 3. Соотношение Т-регуляторных клеток, активированных Т-лимфоцитов (CD25+ и HLA-DR+), TCRγδ-клеток и ЦТТ CD8+ и CD16+ лимфоцитов. Данные представлены для 1-4 графиков в виде медианы и размаха от 24-го до 75-го перцентиля, для 5 и 6 в виде среднего значения и стандартного отклонения.

нием эффекторной дифференцировки со снижением числа наивных Т-клеток и экспансией эффекторных субпопуляций Т-клеток памяти вне зависимости от активации Т-клеток антигенами. Показано, что при ХЛЛ происходит увеличение всех субпопуляций Т-хелперов – Th1, Th2, Tfh, Treg. Увеличение Th2 коррелирует с прогрессированием ХЛЛ, что предположительно свидетельствует о их значении в поддержании пролиферации опухолевых клеток [18,21]. Изменение фенотипической дифференцировки Т-лимфоцитов обусловлено прямым влиянием на них опухолевых клеток, так же, как и изменения в экспрессии генов, которые индуцируются при культивировании нормальных Т-лимфоцитов с клетками ХЛЛ [18 – 22].

Результаты нашего исследования показали, что субпопуляционный состав Т-хелперов изменялся у первичных больных ХЛЛ за счет повышения как наивных Т-хелперов, так и Т-хелперов памяти по сравнению с контрольной группой. В этой же группе пациентов отмечалось увеличение абсолютного числа Т-регуляторных клеток, которые играют важную роль в снижении противоопухолевого иммунитета, а также субпопуляции TCRγδ-Т-лимфоцитов [22 – 28]. Сходные изменения были получены другими авторами, изучавшими регуляторные Т-клетки в крови и лимфатических узлах больных ХЛЛ, которые отметили их увеличение, что коррелировало с опухолевой нагрузкой [22 – 28].

Количество активированных Т-лимфоцитов, имеющих маркеры ранней и поздней активации, а также цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивалось у нелеченых пациентов ХЛЛ, что приводило к снижению иммунорегуляторного индекса. Цитотоксический потенциал этих клеток был также повышен. Несмотря на повышение числа CD3+CD8+ клеток при ХЛЛ, многочисленными исследованиями показано, что эти клетки не способны формировать иммунологический синапс с таргетными клетками, характеризуются снижением пролиферативной и секреторной активности. Показано, что CD3+CD8+ клетки при ХЛЛ имеют повышенную экспрессию ряда ингибирующих молекул на своей мембране, таких как PD-1, CD160, CD244 и других молекул, которые вовлечены в нарушение формирования иммунологического синапса. Дисфункция Т-лимфоцитов, вызванная влиянием опухолевых клеток ХЛЛ, приводит к

подавлению Т-клеточного иммунного ответа и неадекватному контролю за опухолью [15].

Оценка НК-клеточного звена неспецифического иммунитета при ХЛЛ показала, что у всех исследованных пациентов отмечалось повышение абсолютного числа НК-клеток. Эта популяция лимфоцитов выполняет важные функции в противоопухолевой и противовирусной защите. Данные по изучению НК-клеток при ХЛЛ немногочисленны. Известно, что их повышение коррелировало с хорошим прогнозом течения ХЛЛ, в то же время есть данные, согласно которым клетки ХЛЛ способны избегать цитотоксического эффекта НК-клеток. Клетки ХЛЛ могут также нарушать баланс между активирующими и ингибирующими сигнальными молекулами, продуцируемыми НК-клетками, что приводит к ускользанию и снижению противоопухолевого ответа. Однако, по сравнению с нарушенной функциональной активностью Т-лимфоцитов, цитотоксическая функция НК-клеток, как считают ряд авторов, не изменена [18]. При изучении субпопуляций НК-клеток нами было показано повышение как НК-клеток с цитолитической, так и цитокинпродуцирующей активностью, что свидетельствует о повышенной функциональной активности НК-клеток при ХЛЛ. Полученные нами результаты могут свидетельствовать об активации иммунной системы в ответ на опухолевую экспансию клеток при ХЛЛ. Несмотря на это, эффективность активации иммунного ответа может быть нарушена в результате снижения экспрессии костимулирующих антигенов на опухолевых клетках (CD28, CD80/CD86). Имеются данные, что при ХЛЛ нарушение функции Т-клеток является следствием не только нарушения формирования иммунного синапса, но и приобретения клетками «истощенного» фенотипа [15].

Ибрутиниб – ингибитор ВТК, применяется преимущественно у пациентов с рефрактерным ХЛЛ, делецией 17p, а также со значительным числом предшествующих линий терапии. Известно, что ибрутиниб способен также подавлять, индуцируемую ИЛ-2 тирозинкиназу в Т-лимфоцитах, которая имеет большое значение в развитии и функционировании Т-клеток [29]. В ряде работ показано позитивное влияние ибрутинива на Т-клеточные компартменты, в том числе снижение регуляторных Т-клеток и «псевдо-истощенных» эффек-

торных Т-лимфоцитов, восстановление пролиферативной Т-клеточной активности, снижение ингибирующих молекул, таких как PD-1, CTLA-4, повышение активности популяции Th1. В результате терапии ибрутинибом восстанавливалось формирование иммунологического синапса, цитотоксичность Т-лимфоцитов по отношению к клеткам ХЛЛ *in vitro* [18]. Согласно данным I. G. Solman и соавт. [30] улучшение эффекторных функций Т-лимфоцитов при лечении ибрутинибом может приводить к снижению частоты инфекций при ХЛЛ и/или поддержке адаптивного иммунного ответа. Полученные нами данные показали, что терапия ибрутинибом приводила не только к снижению числа В-лимфоцитов, но одновременно наблюдались значительные изменения в субпопуляционном составе Т- и НК-клеток. Отмечалось достоверное снижение общего числа Т-лимфоцитов, абсолютного числа Т-хелперов, в особенности наивных Т-хелперов, которые снижались ниже нормальных значений. Абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов имело тенденцию к снижению, тем не менее, оставаясь выше, чем в контрольной группе. На фоне приема ибрутиниба наблюдалось снижение активации Т-лимфоцитов, резкое увеличение числа Т-НК-клеток и значительное снижение ИРИ. Такие же изменения регистрировались и в популяции НК-клеток, абсолютное число которых, также, как и их субпопуляций, приближалось к показателям доноров. Анализ изменений со стороны регуляторных Т-клеток показал положительную динамику в сторону снижения их абсолютного числа, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа при терапии ибрутинибом.

Заключение. Таким образом, эффективное лечение ибрутинибом устраняет имеющийся при ХЛЛ иммунологический дисбаланс, что подтверждается нормализацией показателей клеточного и неспецифического иммунитета, а, следовательно, снижает число инфекционных осложнений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 10, 11, 13,14, 18-28, 30 см. REFERENCES)

- Семенова Н.Ю., Бессемельцев С.С., Ругаль В.И. Роль дефектов кроветворной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2016; 9(2):176-90. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190.
- Зотина Е.Н., Малых О.В., Загоскина Т.П. Инфекционные осложнения у больных хроническим лимфолейкозом на фоне лечения алектузумабом. *Фундаментальные исследования*. 2011; 9: 404-7.
- Козак Д.М. Неоптерин: иммунологический маркер инфекционных осложнений у больных с хроническим лимфолейкозом. *Медицина, ветеринария и фармацевтика*. 2018; 4: 109-12.
- Никитин Е.А. Передача сигнала через В-клеточный рецептор: механизмы и ингибиторы. *Клиническая онкогематология*. 2014; 7(3): 251-63.
- Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. Роль иммунологического синапса в биологии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2018;11(4):313-8.
- Исаева Н.В., Зайцева Г.А., Докшина И.А. Характеристики иммунокомпетентных клеток у больных хроническим лимфолейкозом на этапе диагностики. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(6): 573-8.
- Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2012; 5(2): 85-95.

- Дмитриева Е.А., Никитин Е.А., Маркова Е.Е., Дмитриева Н.Ю., Птушкин В.В. Частота и факторы, предрасполагающие к инфекциям, у больных хроническим лимфолейкозом, получающих ибрутиниб. *Клиническая онкогематология*. 2019; 12(4): 438-48.

REFERENCES

- da Cunha-Bang, C.Simonsen j., Geisler C et al. Improved survival for patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia in the era of chemo-immunotherapy: a Danish population-based study of 10455 patients. *Blood Cancer J*. 2016; 6(11): e499.
- Nosari A. Infectious Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterranean J. of Hematology and Infection Diseases*. 2012; 4(1): www.mjhid.org ISSN 2035-3006.
- Lee J.S., Dixon D., Kantarjian H., Keating M.J., Talpaz P. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*. 1987;69: 929-36. PMID:3814821.
- Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia : risks factors and impact on survival and treatment. *Leuk. Lymphoma*. 1994; 13: 203-14. <http://dx.doi.org/10.3109/10428199409056283> PMID:8049645.
- Perkins J.G., Flynn J.M., Howard R.S., Byrd J.C. Frequency and type of serious infections in fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: implications for clinical trials in this patient population. *Cancer*. 2002; 94 (7): 2033-9.
- Sudhoff T, Arning M and Schneider W. Prophylactic strategies to meet infectious complications in fludarabine-treated CLL. *Leukemia*. 1997; 11: suppl. 2, P38-41 – PMID:9179282
- Семенова Н.Ю., Бессемельцев С.С., Ругаль В.И. Роль Дефектов Hematopoietic and Lymphoid Niches in Genesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2016;9(2):176-90. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190. (in Russian)
- Zotina E.N., Malykh O.V., Zagoskina T.P. The patients' infectious complications with chronic lymphocytic leukemia during the treatment with alemtuzumab. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; 9: 404-7. (in Russian)
- Kozak D.M. Neopterin: an immunological marker of infections complications in patient with chronic lymphocytic leukemia. *Meditsina. Vetiinariya I farmatsevtika*. 2018; 4: 109-12. DOI: 10.30889/2523-4692.2018-04-03-052. (in Russian)
- Andersen M.A., Moser C.E., Lundgren J., Niemann C.U. Epidemiology of bloodstream infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: a longitudinal nation-wide cohort study. *Leukemia*. 2018. Published online:13 December 2018. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0316-5>.
- Ponader S., Chen Sh.-Sh., Buggy J.J., Balakrishnan K., Gandhi V., Wierda W.G. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing *in vitro* and *in vivo*. *Blood*. 2012;119(5):1182-9.
- Nikitin E.A.. B-Cell Receptor Signaling Pathway: Mechanisms and Inhibitors. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014; 7(3): 251-63. (in Russian)
- Nisar A. Amin, Sriram Balasubramanian, Kamlai Saiya-Cork, Kerby Shedden, Nan Hu, Sami N. Malek. Cell-intrinsic determinants of ibrutinib-induced apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2017; 23(4):1049-59. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2921.
- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer.Lyon; 2008.
- Badmazhapova D.S., Gal'tseva I.V., Zvonkov E.E. Immunological Synapse in the Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2018;11(4):313-8. (in Russian)
- Isaeva N.V., Zaitseva G.A., Dokshina I.A.. Features of immunocompetent cells in the patients with chronic lymphocytic leukemia at primary diagnosis. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2015;17(6): 573-8. (in Russian)
- Kazansky D.B. T-lymphocytes in development of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 5(2): 85-95. (in Russian)
- Hoffland T, Eldering E., Arnon P, Tonino K. and S. Engaging Cytotoxic T and NK Cells for Immunotherapy in Chronic Lymphocytic

IMMUNOLOGY

- Leukemia. *International Journal of Molecular Science*. 2019; 20: 4315. doi:10.3390/ijms20174315; www.mdpi.com/journal/ijms.
19. Pourgheysari B., Bruton R., Parry H., Billingham L., Fegan C., Murray J., Moss P. The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire. *Blood*. 2010; 116: 2968–74.
 20. te Raa G.D., Pascutti M.F., Garcia-Vallejo J.J., Reinen E., Remmerswaal E.B.M., ten Berge I.J.M. et al. CMV-specific CD8+ T-cell function is not impaired in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123:717–24.
 21. Palma M., Gentilcore G., Heimersson K., Mozaari F., Nasman-Glaser B., Young E. et al. T- cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*. 2017; 102: 562–72.
 22. Gorgun G., Holderried T.A., Zahrieh D., Neuberg D., Gribben J.G. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J. Clin. Investig.* 2005; 115: 1797–805.
 23. Catakovic K., Gassner F.J., Ratswohl C., Zaborsky N., Rebhandl S., Schubert M. et al. TIGIT expressing CD4+T cells represent a tumor-supportive T cell subset in chronic lymphocytic leukemia. *Oncimmunology*. 2017; 7:e1371399.
 24. Qiu L., Zhou Y., Yu Q., Zheng S., Wang Z., Huang Q. Elevated levels of follicular T- helper cells and their association with therapeutic effects in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunol. Lett.* 2018; 197: 15–28.
 25. D’Arena G., Laurenti L., Minervini M.M., Deaglio S., Bonello L., De Martino L. et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk. Res.* 2011; 35: 363–8.
 26. De Matteis S., Molinari C., Abbati G., Rossi T., Napolitano R., Ghetti M. et al. Immunosuppressive Treg cells acquire the phenotype of effector-T cells in chronic lymphocytic leukemia patients. *J. Transl. Med.* 2018; 6: 172.
 27. Piper K.P., Karanth M., Mc Larnon A., Kalk E., Khan N., Murray J. et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 166: 154–63.
 28. Beyer M., Kochanek M., Darabi K., Popov A., Jensen M., Endl E. et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005; 106:2018–25; PMID:15914560. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0642>.
 29. Dmitrieva E.A., Nikitin E.A., Markova E.E., Dmitrieva N.Yu., Ptushkin V.V. Infections in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated with Ibrutinib: Incidence and Predisposing Factors. *Klinicheskaya onkologematologiya*. 2019;12(4):438–48. (in Russian)
 30. Solman I., Taylor M., You H., O’Brien S., Mulligan S., Byrd J. et al. Ibrutinib Treatment Improves T-Cell Proliferative Ability and Effector Function in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients. *Blood*. 2018; 132:3114. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110848>.

Поступила 29.03.21

Принята к печати 25.04.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Ветчинин С. С., Шевяков А. Г., Хомяков А. Е., Миронова Р. И., Мокриевич А. Н., Бикетов С. Ф.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ИММУНОМАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ КЛЕТОК *F. TULARENSIS*

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

Туляремия – особо опасное заболевание, вызываемое грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*. Заболевание относится к природно-очаговым инфекциям, и находится под постоянным контролем со стороны карантинных служб. При осуществлении своей деятельности они используют целый спектр диагностических средств. Цель работы – разработка иммуноферментной тест-системы на основе высоко специфичных моноклональных антител и иммуномагнитных частиц для мониторинга возбудителя туляремии. Для получения гибридом мышей иммунизировали клетками вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. После слияния иммунных спленоцитов и миеломных клеток отбор гибридом проводили в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием липополисахарида (ЛПС) туляремийного микроба. Получены две гибридомы 1С2 и 3F5. Нарработку асцитной жидкости гибридом проводили в мышах линии BALB/c, очищали МКАт с помощью аффинной хроматографии на белок А сефарозе. Моноклональные антитела использовали для конъюгирования с магнитными частицами и биотинилирования с последующим подбором пары для создания ИФА-теста. Наилучшие результаты при детекции туляремийных клеток показала пара ИМЧ с МКАт 3F5 и биотинилированные МКАт FB11-х. Использование этой пары МКАт в ИФА тесте позволяло выявлять 10^5 микробных клеток/мл в образце объемом 4 мл и 5×10^3 микробных клеток/мл в образце объемом 45 мл. Взаимодействие с клетками *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 отсутствовало.

Ключевые слова: туляремия; иммуномагнитные частицы; магнитная сепарация; моноклональные антитела; ИФА.

Для цитирования: Ветчинин С. С., Шевяков А. Г., Хомяков А. Е., Миронова Р. И., Мокриевич А. Н., Бикетов С. Ф. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител и иммуномагнитных частиц для детекции клеток *F. tularensis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(6): 353-357. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357>

Vetchinin S. S., Shevyakov A. G., Khomyakov A. E., Mironova R. I., Mokrievich A. N., Biketov S. F.

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOASSAY TEST SYSTEM BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES AND IMMUNOMAGNETIC PARTICLES FOR THE DETECTION OF *F. TULARENSIS* CELLS

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Russian Federation

For correspondence: *Shevyakov Anton Georgievich*, junior researcher; e-mail: shevyakov@obolensk.org

Tularemia is an especially dangerous infection caused by the gram-negative bacterium Francisella tularensis. It belongs to natural focal infections, and therefore is under continuous control by quarantine services. When carrying out their activities they use a whole range of diagnostic tools. The objective of this research is to develop an enzyme immunoassay based on highly specific monoclonal antibodies and immunomagnetic particles for monitoring the tularemia pathogen. To produce hybridomas mice were immunized with cells of the vaccine strain F. tularensis subsp. holarctica 15 NIEG. After cell fusion hybridomas were selected by a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) using lipopolysaccharide (LPS) of the tularemia microbe. As a result, two hybridomas, 1C2 and 3F5, were produced. MABs of the hybridomas were obtained by using BALB / c mice. The MABs were purified by sepharose A affinity chromatography and used for conjugation with magnetic particles, and for biotinylation followed by matching a pair for ELISA. The pair of IMPs and MABs 3F5 as well as biotinylated FB11-x MABs was the best in detecting tularemia cells. The use of this MAB pair in ELISA allowed the identification of 10^5 microbial cells/ml in a 4 ml sample and 5×10^3 microbial cells/ml in a 45ml sample. Interaction with F. tularensis subsp. novicida Utah112 cells was absent.

Key words: *tularemia; immunomagnetic particles; magnetic separation; monoclonal antibodies; ELISA.*

For citation: *Vetchinin S. S., Shevyakov A. G., Khomyakov A. E., Mironova R. I., Mokrievich A. N., Biketov S. F.* Development of an immunoassay test system based on monoclonal antibodies and immunomagnetic particles for the detection of *F. tularensis* cells. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 353-357 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357>

Information about authors:

Vetchinin S.S., www.orcid.org/0000-0002-6547-3365;
Shevyakov A.G., www.orcid.org/0000-0002-0504-7073;
Khomyakov A.E., www.orcid.org/0000-0002-0935-6981;
Mironova R.I., www.orcid.org/0000-0001-8318-4156;
Mokrievich A.N., www.orcid.org/0000-0003-3675-8780;
Biketov S.F., www.orcid.org/0000-0003-1179-6895.

Для корреспонденции: Шевяков Антон Георгиевич, мл. науч. сотр. отд. иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: shevyakov@obolensk.org

Acknowledgment. *The work was carried out as part of the sectoral research program of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for 2016-2020: "Problem-oriented research in the field of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases."*

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

Received 12.01.2021
Accepted 21.01.2021

Введение. Туляремия относится к карантинным природно-очаговым инфекциям и встречается практически на всей территории Российской Федерации. Вызывающая туляремию грамотрицательная бактерия *Francisella tularensis*, благодаря высокой вирулентности и контагиозности, отнесена в группу особо опасных инфекций. Среди подвидов *F. tularensis* наибольшей вирулентностью обладает подвид *F. tularensis* subsp. *tularensis*, подвиды *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *mediasiatica* обладают меньшей вирулентностью, *F. tularensis* subsp. *novicida* мало вирулентна для человека [1]. Инфицирующая доза *F. tularensis* subsp. *tularensis* для человека составляет около 10 бактерий. Возбудитель туляремии остается одним из вероятных агентов для использования в качестве рецептуры для биологического оружия и средств биотерроризма.

Обеспечение отечественными высокочувствительными диагностикумами санитарно-эпидемиологических служб и лабораторий лечебных учреждений позволит эффективно контролировать не только эпидемиологическую обстановку природного очага туляремии, но и своевременно выявлять заболевших в зоне риска.

За последние десятилетия разработан целый ряд иммунологических и молекулярных методов диагностики патогенов с высоким уровнем чувствительности и специфичности, основанных на использовании иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммунобиосенсоров, масс-спектрометрии, петлевой изотермической амплификации, геномного секвенирования [2].

Из современных методических подходов в диагностике туляремии можно выделить три основных направления разработки тест-систем: ПЦР-анализ [3-5], ИФА – для выявления специфических антител [6], иммунохроматография для выявления специфических антител [7-9]. Представляется актуальной разработка методов, использующих концентрирование туляремийных бактерий из исследуемых образцов с применением иммуномагнитных частиц (ИМЧ), обеспечивающее повышение чувствительности диагностики [10, 11]. Применение поликлональных ИМЧ для выделения возбудителя туляремии из крови инфицированных мышей ускорило на два дня получение результатов исследования чувствительности к антибиотикам [12]. Описана биосенсорная система на основе усиленного поверхностью Рамановского рассеивания (SERS) с использованием двойных флуоресцентных зондов, позволяющая выявлять *F. tularensis* с пределом обнаружения до 10^2 клеток/мл [13].

Исследования по комплексному использованию иммуномагнитной сепарации ряда бактерий и их маркеров описаны для ряда современных методов диагностики, в частности ИФА [14-16], иммунохроматографии [17], изотермической амплификации [18], ПЦР [19].

Цель работы – разработка иммуноферментной тест-системы на основе высоко специфичных моноклональных антител и иммуномагнитных частиц для мониторинга возбудителя туляремии.

Материал и методы. Штаммы бактерий. Вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и природный штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ (п. Оболенск, Московская обл.).

Условия культивирования. Культуры микроорганизмов выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде состава: эритрит-агар – 3,8%, высушенная кровь крупного рогатого скота – 1%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,05%, тиамин хлорид – 0,0025%, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). Стандартные суспензии клеток (5×10^9 КОЕ/мл для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 1×10^9 КОЕ/мл для штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112) готовили в забуференном физиологическом растворе: 0,15 М натрия хлористого и 0,015 М калий-натриевого фосфатного буфера, pH 7,4 (ЗФР) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012, Научный центр экспертизы средств медицинского применения – НЦЭСМП). Обеззараживание микробных клеток проводили прогреванием бактериальных суспензий на кипящей водяной бане в течение 30 минут.

ЛПС *F. tularensis* получали водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля (W-экстракция) [20].

Иммунизацию мышей линии BALB/c шестинедельного возраста проводили убитыми нагреванием клетками *F. tularensis* (штамм 15 НИИЭГ) по следующей схеме: подкожное введение мышам по 10^9 клеток *F. tularensis* в несколько точек в неполном адьюванте Фрейнда; через 28 сут – повторное введение мышам по 10^9 клеток *F. tularensis* в несколько точек в неполном адьюванте Фрейнда; через 28 сут – внутривенная инъекция мышам по 10^7 клеток *F. tularensis* в физиологическом растворе.

Через 3 суток после последней инъекции проводили проверку титров сывороток мышей с использованием ИФА с ЛПС туляремийного микроба. Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, одобрены комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Гибридизация клеток и выделение гибридом-продуцентов МКАт. Гибридизацию иммунных селезеночных лимфоцитов и клеток мышинной миеломы линии P3-X63-Ag8.653 проводили по стандартной методике [21] при помощи 50% полиэтиленгликоля 4000 (Merk, США). После слияния клеточную суспензию перенесли в лунки пяти 96-ти луночных планшетов с фидерным слоем макрофагов на селективную среду DMEM с 20% фетальной сыворотки телёнка, 2 мМ L-глутамина, 27,22 мкг/мл гипоксантина, 7,6 мкг/мл тимидина и 0,352 мкг/мл аминоптерина (двукратная ГАТ-среда). В течение следующих двух недель культивирование гибридных клеток осуществляли на однократной ГАТ-среде. Каждые 3-4 дня проводили замену 1/2 объёма питательной среды в каждой лунке. Начиная с 14-х суток культивирования, ГАТ-среду заменяли на ГТ-среду (без аминоптерина), а с 21-х сут – на обычную питательную среду.

Скрининг гибридных клеток проводили в твёрдофазном ИФА. Клетки из положительно работающих лунок клонировали методом лимитирующих разведений на планшетах с макрофагальным питающим слоем.

Наработка МКАт к возбудителю туляремии. Для наработки МКАт гибридомы культивировали *in vitro* в 720 мл флаконах на среде DMEM с 10% сыворотки плода коровы в течение 5 сут при температуре 37° С и 5% CO₂. Клетки из культуральной жидкости осаждали на центрифуге (Eppendorf 5810 R, ротор А-4-62) при 300g 15 мин, ресуспендировали в физиологическом растворе и вводили внутривенно мышам линии BALB/c, предварительно обработанным пристаном (Sigma, США). Асцитную жидкость мышей, содержащую МКАт, отбирали через 7-10 суток. Клетки из асцитной жидкости удаляли на центрифуге (Eppendorf 5810 R, ротор F-34-6-38) при 10 000 об./15 минут. Иммуноглобулины из супернатанта высаливали сульфатом аммония 50% насыщения и осаждали на центрифуге (Eppendorf 5810 R, ротор F-34-6-38) при 10 000 об./15 минут. Осадок растворяли в 0,1 М ФБ рН 8,6 и удаляли сульфат аммония гель-фильтрацией на колонке PD-10 с сефадексом G-25, уравновешенной 0,1 М ФБ рН 8,6 с 0,02 % NaN₃. Очистку МКАт проводили на колонке с белок-А сефарозой объёмом 7 мл. Колонку уравновешивали 0,1 М ФБ рН 8,6, содержащую иммуноглобулины фракцию наносили на колонку со скоростью 10 мл/час. Иммуноглобулины элюировали 0,1 М лимонной кислотой рН 3.0 и сразу же переводили в 0,1 М ФБ рН 7,4 с 0,2% NaN₃ на колонке PD-10 с сефадексом G-25. Концентрацию полученных иммуноглобулинов рассчитывали по формуле $C=A_{280} \times 0,77$. Титр очищенных МКАт определяли в твёрдофазном ИФА. Для определения изотипа МКАт использовали коммерческий набор «IsoQuick» (Sigma, США).

Твёрдофазный ИФА. Липополисахарид туляремийного микроба в концентрации 10 мкг/мл сорбировали в лунки 96-луночного планшета (Sigma, США) в объёме 100 мкл на лунку в 0,1 М фосфатном буферном растворе рН 7,2 при температуре 4° С в течение ночи. Оставшиеся места неспецифической сорбции планшета убирали инкубированием с 1% раствором БСА в 0,1 М фосфатном буферном растворе рН 7,2 при температуре 37° С в течение 30 мин (объём 150 мкл на лунку). Культуральные жидкости при скрининге гибридом и препараты антител в серийных разведениях с двукратным шагом в фосфатно-солевым буфером рН 7,2 с добавлением 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т) вносили по 100 мкл в лунки планшетов и инкубировали 1 ч при температуре 37° С. В отмытый трёхкратно ФСБ-Т планшет добавляли конъюгат антимышиных кроличьих иммуноглобулинов с пероксидазой хрена в рабочем разведении в объёме 100 мкл и инкубировали при температуре 37° С в течение 60 минут. После пятикратной отмытки ФСБ-Т в лунки вносили раствор тетраметилбензидина (Sigma, США). Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски через 5 мин добавлением 0,5 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при $\lambda=450$ нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

Индекс аддитивности МКАт определяли в твёрдофазном ИФА с ЛПС туляремийного микроба и рассчитывали по формуле:

$$[(2A_{1+2}/(A_1+A_2))-1] \times 100\%,$$

где A_1 , A_2 и A_{1+2} – оптическое поглощение при $\lambda=450$ нм при насыщающих концентрациях двух МКАт по отдельности и в смеси [22].

Получение иммуномагнитных частиц. Для получения ИМЧ использовали карбоксилированные магнитные частицы диаметром 400 нм производства «Magsphere» (США). Карбоксильные группы активировали карбодиимидным методом с использованием 10 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и 20 мМ N-гидроксисукцинимид (Sigma, США). К 100 мкл исходной суспензии МЧ, содержащей 2,5% по массе твёрдой фазы, добавляли 1 мл 10 мМ карбодиимида в 0,1 М буферном растворе натриевой соли 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты рН 6,0 (MES). Активацию вели при комнатной температуре с постоянным перемешиванием 30 мин. Затем частицы трижды отмывали и добавляли 1 мл раствора 20 мМ N-гидроксисукцинимид в буферном растворе MES. Выдерживали при комнатной температуре с перемешиванием 30 минут. После активации и отмытки на магнитном штативе к 100 мкл суспензии частиц в MES добавляли растворы МКАт по 50 мкг каждого антитела в 900 мкл ФСБ и инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием два часа. Для блокирования оставшихся активных групп к суспензии частиц добавляли 100 мкл 1% раствора БСА в ФСБ и продолжали инкубирование ещё 30 минут. Готовые суспензии ИМЧ трижды отмывали на магнитном штативе и переводили в 1 мл ФСБ с 0,1% Triton X-100 и 0,01% азида натрия.

Биотинилирование МКАт проводили с использованием N-гидроксисукцинимидного эфира биотина (Sigma, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Раствор антител переводили в 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер рН 9,6 гель-фильтрацией на колонке с сорбентом Сефадекс G-25. Конечная концентрация антител 2 мг/мл. Готовили раствор сукцинимидного эфира биотина (Sigma, H1759, США), растворяли в ДМСО (AppliChem, Германия) с концентрацией 22 мг/мл. К 1 мл раствора антител добавляли 100 мкл раствора эфира биотина. Инкубировали в темноте при комнатной температуре 4 часа. Для нейтрализации оставшегося активного эфира биотина к раствору антител добавляли 100 мкл 0,5 М трис-глицинового буферного раствора рН 7,4. Инкубировали 30 минут. Биотинилированные МКАт отделяли от непрореагировавших остатков эфира биотина с помощью гель-фильтрационной хроматографии на носителе сефадекс G-25 с переводом в ФСБ.

«Сэндвич» ИФА с моноклональными ИМЧ. В пробирках на 5 и 50 мл с завинчивающейся крышкой готовили разведения клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ с концентрациями 10², 10³, 10⁴ и 10⁵ микробных клеток на мл в объёме 4 и 45 мл ФСБ-Т. К готовым суспензиям добавляли по 10 и 30 мкл ИМЧ соответственно. Инкубировали с перемешиванием на программируемом ротор-миксере «Multi Bio RS 24» (BioSan, Латвия) 13 оборотов/мин при комнатной температуре в течение 60 минут. Пробирки помещали на магнитный штатив, осаждали ИМЧ и переносили их в микропробирку объёмом 1,5 мл. Промывали четырёхкратно ФСБ-Т по 1 мин с использованием ротора-миксера и магнитного штатива, добавляли биотинилированные МКАт в рабочем разведении. Пробирки инкубировали на ротор-миксере 30 минут. Иммуномагнитные частицы отмывали четырёхкратно и вносили по 1 мл рабочего разведения конъюгата стрептавидина с пероксидазой в ФСБ-Т. После 30 мин инкубации на ротор-миксере ИМЧ отмывали 5 раз, переносили в лунки 96 луночного планшета, установленного на планшетный магнитный штатив, и добавляли раствор пероксидазного субстрата 3,3',5,5'-те-

траметилбензидина (Sigma, США). Ферментативную реакцию останавливали через 5 мин добавлением 0,5 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при $\lambda=450$ нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

Результаты и обсуждение. Для гибридизации использовали спленоциты мышей с титрами иммунной сыворотки в ИФА с ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ не менее 1:10000. При проверке в твёрдофазном ИФА культуральной жидкости из 165 лунок гибридизации в десяти лунках с хорошим ростом гибридов обнаружена положительная активность взаимодействия с ЛПС *F. tularensis*. В результате клонирования и реклонирования клеток из положительно реагирующих лунок методом предельных разведений отобраны и криоконсервированы стабильные гибридомы 1С2 (IgG₁) и 3F5 (IgG₂), продуцирующие моноклональные антитела к ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Полученные МКАт не взаимодействовали в твёрдофазном ИФА с клетками *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112.

Моноклональные антитела 1С2 конкурировали с высокоспецифичными МКАт FB11-х [23] за места связывания на ЛПС. Индекс аддитивности для МКАт FB11-х и МКАт 3F5 составлял 53%, что, вероятно, свидетель-

ствует о том, что эпитопы, к которым они направлены, частично перекрываются.

Диагностически значимые МКАт 1С2 и 3F5 против ЛПС возбудителя туляремии использовали для получения ИМЧ и биотинилированных антител (БАТ). Моноклональные антитела FB11-х применяли в качестве контрольных в ИФА-тестах для детекции возбудителя туляремии.

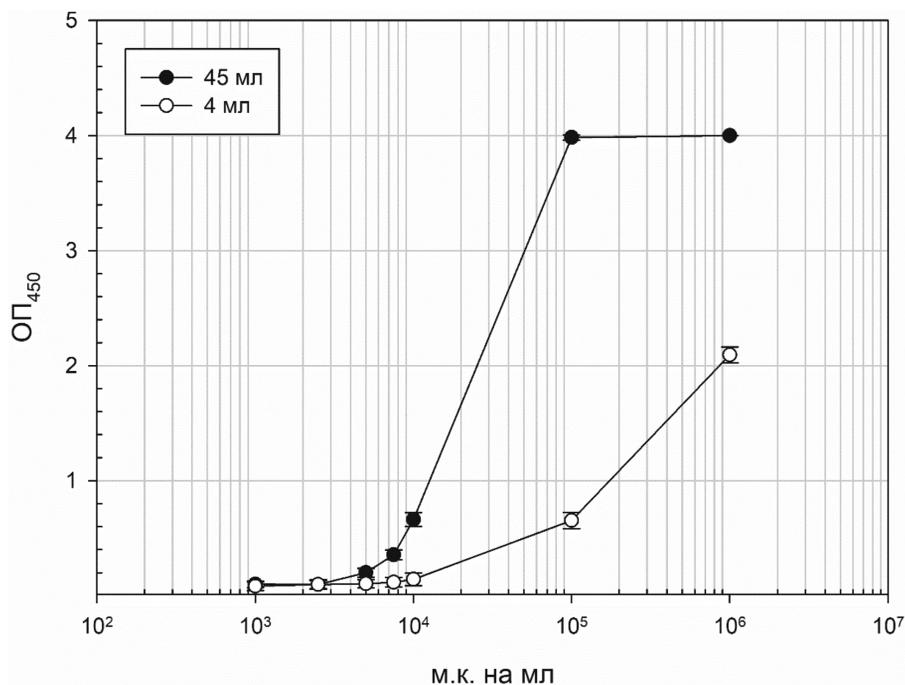
В ИФА определены оптимальные пары МКАт в системе клетки *F. tularensis* (10^5 и 10^6 микробных клеток на мл) – ИМЧ (10 мкл) – биотинилированные антитела (в рабочем разведении). Наилучшие результаты показали пары: ИМЧ 3F5 – БАТ 3F5, ИМЧ FB11-х – БАТ FB11-х, ИМЧ 3F5 – БАТ FB11-х, ИМЧ FB11-х – БАТ 3F5. Значения OD_{450} превышало 3,0. При этом OD_{450} контрольных образцов (отсутствие бактериальных клеток *F. tularensis*) находились в пределах 0,19-0,25 (см.таблицу).

Определение клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в системе ИМЧ 3F5 и БАТ FB11-х в объемах 4 и 45 мл. OP_{450} – оптическое поглощение при $\lambda=450$ нм.

На рисунке представлены результаты определения в ИФА клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в системе ИМЧ 3F5 и БАТ FB11-х. В качестве контрольных образцов ис-

Отбор оптимальной пары МКАт для детекции клеток *F. tularensis*

ИМЧ	10^6 клеток на мл <i>F. tularensis</i>			10^5 клеток на мл <i>F. tularensis</i>		
	OD_{450} (БАТ 1С2)	OD_{450} (БАТ 3F5)	OD_{450} (БАТ FB11-х)	OD_{450} (БАТ 1С2)	OD_{450} (БАТ 3F5)	OD_{450} (БАТ FB11-х)
1С2	1,201 ($\pm 0,097$)	0,889 ($\pm 0,079$)	2,726 ($\pm 0,089$)	1,759 ($\pm 0,105$)	0,603 ($\pm 0,097$)	1,017 ($\pm 0,093$)
3F5	1,811 ($\pm 0,086$)	3,301 ($\pm 0,107$)	3,433 ($\pm 0,096$)	1,289 ($\pm 0,083$)	3,255 ($\pm 0,092$)	3,349 ($\pm 0,099$)
FB11-х	0,728 ($\pm 0,093$)	3,276 ($\pm 0,095$)	3,276 ($\pm 0,098$)	0,717 ($\pm 0,091$)	3,139 ($\pm 0,088$)	2,121 ($\pm 0,113$)
Контроль						
1С2	0,246 ($\pm 0,059$)					
3F5	0,191 ($\pm 0,063$)					
FB11-х	0,229 ($\pm 0,051$)					



Пара МКАт 3F5 и FB11-х имели наибольший индекс аддитивности, они отобраны для разработки ИФА тест-системы (МКАт ИМЧ 3F5 – БАТ FB11-х).

пользовали клетки *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 в концентрации 10^6 клеток на мл. Предел чувствительности ИФА для образца объемом 4 мл составил 10^5 клеток на мл, для образца объемом 45 мл – 5×10^3 клеток на мл. Контрольные образцы в ИФА показали значения на уровне фона. Увеличение времени инкубации ИМЧ с образцом объемом 45 мл с 60 мин до 120 мин не показало увеличения чувствительности определения.

Разработанная ИФА тест-система на основе МКАт ИМЧ 3F5 и БАт FB11-х проста в применении, не требует дорогостоящего оборудования. Использование МКАт в тест-системе обеспечивает высокую специфичность выявления возбудителя туляремии в образцах и стандартность основных её компонентов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп 1-3, 5-7,9, 11-21 см. REFERENCES)

- Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербаклова С.А. Разработка амплификационных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2015; 2: 54-7.
- Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Царева Н.С., Остапович В.В., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н. Применение иммунохроматографических тест-систем для экспресс-выявления липополисахарида *Francisella tularensis* при мониторинге природных очагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;(1):78-80.
- Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербаклова С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 1(99): 5-10.
- Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилов Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа; 1991.
- Ветчинин С.С., Копылов П.Х., Николаева О.Г., Гаврюшкин А.В. Получение иммуномагнитных частиц для определения клеток *Francisella tularensis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 109: 50-3.

REFERENCES

- Kingry L.C., Petersen J. M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014; 4:35.
- Sande M.G., Çaykara T., Silva C.J., Ligia R., Rodrigues I. New solutions to capture and enrich bacteria from complex samples. *Medical Microbiology and Immunology*. 2020; 209: 335-41.
- Banada P.P., Deshpande S., Chakravorty S., Russo R., Occi J., Meister G., Jones K.J., Gelhaus C.H., Valderas M.W., Jones M., Connell N., Alland D. Sensitive Detection of *Francisella tularensis* Directly from Whole Blood by Use of the GeneXpert System. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55(1): 291-301.
- Osina N.A., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. Development of amplification test-systems for tularemia agent detection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015;(2): 54-7. (in Russian)
- Buse H.Y., Morris B.J., Rice E.W. Early detection of viable *Francisella tularensis* in environmental matrices by culture-based PCR. *BMC microbiology*. 2020; 20(1): 66.
- Schmitt P.W., Spletstoesser M.P., Finke E.J., Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularaemia. *Epidemiology and Infection*. 2005;133(4): 759-66.

- Spletstoesser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an Immunochromatographic Test for Rapid and Reliable Serodiagnosis of Human Tularemia and Detection of *Francisella tularensis*-Specific Antibodies in Sera from Different Mammalian Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(5): 1629-34.
- Zaitsev A.A., Gнусарева О.А., Тсарева Н.С., Остапович В.В., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н. Immuno-Chromatographic Test System Application for Rapid Detection of *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide in Monitoring of Natural Foci. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013;(1):78-80. (in Russian)
- Hua F., Zhang P., Zhang F., Zhao Y., Li C., Sun C., Wang X., Yang R., Wang C., Yu A., Zhou L. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *Scientific reports*. 2015; 5: 17178.
- Onischenko G.G., Kouzkin B.P., Kutyrev V.V., Scherbakova S.A., Paksina N.D., Toporkov A.V. Current Trends of Perfection of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2009;(1(99)): 5-10. (in Russian)
- Chen Y.-T., Kolhatkar A.G., Zenasni O., Xu S., Lee T.R. Biosensing Using Magnetic Particle Detection Techniques. *Sensors*. 2017; 17: 2300.
- Aloni-Grinstein R., Schuster O., Yitzhaki S., Aftalion M., Maoz S., Steinberger -Levy I., Ber R. Isolation of *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* from Blood Cultures by Plasma Purification and Immunomagnetic Separation Accelerates Antibiotic Susceptibility Determination. *Frontiers Microbiology*. 2017; 8:312.
- Jang H., Hwang E.Y., Kim Y., Choo J., Jeong J., Lim D.W. Surface-enhanced Raman scattering and fluorescence-based dual nanoprobe for multiplexed detection of bacterial pathogens. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2016; 12(10): 1938-51.
- Yatsomboon A., Sermswan R.W., Wongratanaheewin S. Development of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2018; DOI: 10.12932/AP-080518-0307.
- Zhang M., Li Y., Jing H., Wang N., Wu S., Wang Q., Lin X. Development of polyclonal-antibody-coated immunomagnetic beads for separation and detection of koi herpesvirus in large-volume samples. *Archives of Virology*. 2020; 165:973-6.
- Wang Z., Yue T., Yuan Y., Cai R., Niu C., Guo C. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 166(1): 28-33.
- Singh S., Upadhyay M., Sharma J., Gupta S., Vivekanandan P., Elangovan R. A portable immunomagnetic cell capture system to accelerate culture diagnosis of bacterial infections. *Analyst*. 2016; 141: 3358-66.
- Kaur A., Kapil A., Elangovan R., Jha S., Kalyanasundaram D. Highly-sensitive detection of *Salmonella typhi* in clinical blood samples by magnetic nanoparticle-based enrichment and in-situ measurement of isothermal amplification of nucleic acids. *PLoS ONE*. 2018; 13(3): e0194817.
- Garrido-Maestu A., Azinheiro S., Carvalho J., Espiña B., Prado M. Evaluation and implementation of commercial antibodies for improved nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR for faster detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science and Technology*. 2020; 57:4143-51.
- Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in carbohydrate chemistry*. 1965; 5: 83-91.
- Nowinski R.C., Lstrom M.E., Tam M.R., Stone M.R., Burnette W.N. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses. *Virology*. 1979; 93: 111-26.
- Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilov E.M. [Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
- Vetchinin S.S., Kopylov P.K., Kiseleva N.V., Nikolaeva O.G., Gavryushkin A.V. Obtainment of the Immunomagnetic Particles for *Francisella tularensis* Cells Detection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2011;(3(109)):50-3. (in Russian)

Поступила 12.01.21

Принята к печати 21.01.21

Арзуманян В.Г.¹, Фошина Е.П.¹, Ожован И.М.¹, Иксанова А.М.¹, Колыганова Т.И.^{1,2}, Миронов А.Ю.³

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТАТИНОВ СЛЮНЫ

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;

²ГАОУВ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Гистатины являются наиболее значимыми антимикробными пептидами (АМП) слюны человека, их насчитывается 12 видов. Молекулы гистатинов содержат относительно высокий процент остатков гистидина и тирозина. Это свойство позволяет применить известную из органической химии реакцию Паули для определения уровня связанных с белком остатков гистидина и тирозина (СГТ), что, по сути, характеризует суммарное содержание всех гистатинов в слюне. Цель работы – сравнение этого показателя с антимикробной активностью фракции АМП слюны при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей (ВЗВДП). Обследованы 28 человек с диагнозами: хронический фарингит ($n=11$), хронический тонзиллит ($n=7$), назофарингит ($n=5$), поллиноз ($n=5$). Степень выраженности клинических признаков воспаления оценивали в баллах. Алгоритм проведения анализа СГТ включал следующие стадии: замораживание-оттаивание слюны; удаление микрочастиц осаждением; получение фракции ниже 100 кДа; диализ – удаление свободных аминокислот; проведение реакции Паули. Антимикробную активность цельной слюны и её низкомолекулярных фракций оценивали в отношении культуры *Candida albicans* методом спектрофотометрии. Анализ осадков слюны на наличие кокковой микрофлоры проводили методом ПЦР. Впервые метод Паули адаптирован для оценки уровней гистатинов слюны у пациентов с ВЗВДП. Уровень гистатинов (СГТ) коррелировал с выраженностью воспалительного процесса ($r=0,975$) и активностью низкомолекулярной фракции слюны (АМП) ($r=0,824$), содержащей АМП. Соотношение АМП/СГТ, т. е. противомикробная активность, приходящаяся на «единицу» гистатинов, снижалась по мере роста выраженности клинических признаков воспаления ($r=-0,944$). Значительных различий по частоте встречаемости кокковой микрофлоры в зависимости от диагноза не выявлено. Частота встречаемости *S. aureus* не связана ни с выраженностью воспалительного процесса ($r=0,118$), ни с концентрацией гистатинов (СГТ) в слюне ($r=0,318$). Частоты встречаемости *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* находились в обратной взаимосвязи по отношению к данным показателям ($r=-0,627/-0,614$) и ($r=-0,827/-0,864$). Возможно при острых формах течения ВЗВДП рост *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* сдерживается за счет высоких уровней гистатинов.

Ключевые слова: гистатины; слюна; реакция Паули; антимикробная активность; воспалительные заболевания верхних дыхательных путей.

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Фошина Е.П., Ожован И.М., Иксанова А.М., Колыганова Т.И., Миронов А.Ю. Метод определения гистатинов слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 358-363. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-358-363>

Arzumanyan V.G.¹, Foshina E.P.¹, Ojovan I.M.¹, Iksanova A.M.¹, Kolyganova T.I.^{1,2}, Mironov A.Yu.³

METHOD OF SALIVARY HISTATINS DETECTION

¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²Sechenov University, Moscow, Russia;

³G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiologyµbiology, Moscow, Russia

Histatins are the most significant antimicrobial peptides (AMP) of saliva and there are 12 types of such AMP. Histatin molecules contain relatively high percent of histidine and tyrosine residues. This property allows to use well known from organic chemistry Pauly reaction for detection of protein bounded histidine and tyrosine residues (BHT), which are in fact characterize the summary content of all histatins in saliva. Aim of the present study was comparison of BHT with antimicrobial activity of salivary AMP fraction in patients with inflammatory diseases of upper airways (IDUA). Group of examined persons include 28 patients with different diagnoses: chronic pharyngitis ($n=11$), chronic tonsillitis ($n=7$), nasopharyngitis ($n=5$), pollinosis ($n=5$). Degree of intensity of inflammatory symptoms was estimated in balls. The algorithm of BHT analysis include following steps: freezing – thawing of saliva; removal of microparticles by centrifugation; separation of fraction lower than 100 kDa; dialysis for free amino acids removal; Pauly reaction carrying out. Antimicrobial activities of saliva and its low molecular fractions were estimated towards *Candida albicans* cells by the spectrophotometric method with bromocresol purpur. Analysis of saliva sediments for coccoid microbiota was carried out by PCR method. Pauly reaction for histatins estimation in saliva of IDUA patients use here for the first time. The histatins levels (BHT) were significantly correlated with the intensity of inflammatory symptoms ($r=0,975$) and activity of low molecular salivary fraction (AMP activity) ($r=0,824$). The AMP activity/ BHT ratio, i.e. antimicrobial activity of histatin unit, decreased together with growth of inflammatory symptoms intensity ($r=-0,944$). Any considerable differences in coccoid microbiota frequency of finding at different diagnoses were not detected. The *S. aureus* frequency of occurrence was connected neither with inflammatory symptoms intensity ($r=0,118$), nor with BHT concentration ($r=0,318$). However *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* frequencies of occurrence demonstrated the invert correlation towards these indexes: ($r=-0,627/-0,614$) and ($r=-0,827/-0,864$). Probably at the exacerbation forms of IDUA the *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* growth controlled by high levels of histatins.

Key words: histatins; saliva; Pauly reaction; antimicrobial activity; inflammatory diseases of upper airways.

For citation: Arzumanyan V. G., Foshina E. P., Ojovan I. M., Iksanova A. M., Kolyganova T. I., Mironov A. Yu. Method of salivary histatins determination. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 358-363 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-358-363>

Для корреспонденции: Арзуманян Вера Георгиевна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. физиологии грибов и бактерий; e-mail: veraar@mail.ru

For correspondence: *Arzumanyan V.G.*, Sc.D., professor, head of laboratory of fungal and bacterial physiology; e-mail: veraar@mail.ru

Information about authors:

Arzumanyan (Arzumanyan) V.G., <https://orcid.org/0000-0001-9769-1634>;
Foshina E. P., <https://orcid.org/0000-0001-7295-8072>;
Ojovan I. M., <https://orcid.org/0000-0002-8129-0817>;
Iksanova (Iksanova) A.M., <https://orcid.org/0000-0002-8841-910X>;
Kolyganova T. I., <https://orcid.org/0000-0002-9065-9786>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

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

Funding. *The study had no sponsorship.*

Acknowledgement. *Authors express their thanks to Tamara Artemieva and Liubov Butovchenko for technical support and permanent care.*

Received 25.02.2021
Accepted 25.03.2021

Введение. Антимикробные пептиды и белки (АМП) содержатся практически во всех биологических жидкостях человека и животных. В организме человека насчитывают порядка 15 классов АМП, 14 из которых содержатся в слюне [1]. В значимых концентрациях в слюне представлены следующие АМП: гистатины, лизоцим, кальпротектин, псориазин, лактоферрин. Гистатины впервые обнаружены именно в слюне, причём эта группа АМП насчитывает 12 видов гистатинов [2]. Гистатины, в отличие от прочих АМП, содержат высокий процент аминокислот гистидина (отсюда и их название) и тирозина. К гистатинам относят и статерины. Три гистатина составляют 70-80% от всего гистатинового пула – гистатин 1, гистатин 3, гистатин 5 [3]. Эти АМП активны против оппортунистических дрожжевых грибов разных видов, что дало толчок к разработке антифунгальных препаратов на их основе [4]. Изучается роль гистатинов при заболеваниях полости рта, однако, нет публикаций, касающихся их значения при заболеваниях верхних дыхательных путей [1]. Методы определения гистатинов позволяют оценить уровень только гистатинов определённого типа, тогда как в реальных условиях эти АМП действуют совокупно, нарушая целостность мембран микроорганизмов. Известный из органической химии метод Паули позволяет определять связанные гистидин и тирозин в составе белков [5]. Использование данного метода для оценки суммарного количества этих аминокислот во фракции АМП слюны и соотнесение этого показателя с антимикробной активностью фракции может дать информацию об относительной активности гистатинов при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей (ВЗВДП) с различной степенью выраженности симптомов.

Материал и методы. Пациенты. Группа пациентов с ВЗВДП состояла из 28 человек в возрасте от 7 до 62 лет, обследованных в КДЦ при ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, со следующими диагнозами: хронический фарингит (ХФ код заболевания по МКБ10 J31.2, $n=11$), хронический тонзиллит (ХТ, j35.0, $n=7$), острый назофарингит (НФ, j00, $n=5$), поллиноз, аллергический ринит, вызванный пылью растений, в качестве группы сравнения (П, j34.1, $n=5$). Постановка диагноза осуществлялась врачом-специалистом на основании стандартов обследования. Разработана шкала оценки активности локального воспалительного процесса ротоглотки. Для этой оценки использовали следующие критерии: гиперемия слизистой оболочки задней стенки глотки и небных миндалин, патологический налёт на слизистой оболочке глотки, реакция регионарных лимфатических

узлов, гипертрофия небных миндалин. Каждый критерий оценивали по балльной системе: 0 баллов – отсутствие изменений, 1 балл – незначительные изменения, 2 балла – умеренные; 3 балла – выраженные. Активность местного воспаления рассчитывали по сумме баллов для каждого пациента.

Критерии включения: наличие диагноза, поставленного впервые или имевшегося в анамнезе; информированное согласие пациента или его родителей на участие в исследовании; отсутствие тяжёлых психических и соматических заболеваний.

Критерии исключения: участие в иных медицинских исследованиях, приём топических и системных противовоспалительных, антибактериальных препаратов менее 7 сут, иммуностропных препаратов в анамнезе менее 28 сут до включения в исследование.

Сбор проб слюны. Слюну собирали в стеклянные флаконы и замораживали порциями при -25°C . Перед проведением анализа слюну размораживали и отделяли от макрочастиц путём центрифугирования при 16 тыс. об/мин в течение 5 мин. Осадки использовали для ПЦР анализа на кокковую микробиоту. Получение низкомолекулярных фракций проводили путём центрифугирования супернатантов со скоростью 16 тыс. об/мин в течение 10 мин с использованием фильтрующих насадок («Amicon ultra», фирмы «Merck», Германия) с размером пор 10 кДа и 100 кДа.

Определение противомикробной активности фракций слюны. Метод разработан ранее [6]. В качестве модели использовали *Candida albicans* № 927 из коллекции Лаборатории физиологии грибов и бактерий ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Клеточную суспензию готовили из 20-ти часовой культуры *Candida albicans* № 927, выращенной на плотной глюкозо-пептон-дрожжевой среде с антибиотиком. 300 мкл образцов слюны (общей фракции, полученной в результате удаления микрочастиц, или низкомолекулярных фракций) соединяли с 50 мкл суспензии клеток дрожжей плотностью 10^{10} КОЕ/мл и инкубировали при 32°C на шейкере в течение 2 час, после чего центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 16 тыс. об/мин. Полученный осадок инкубировали с 300 мкл бромкрезолового пурпурного, рН 4,6 в тех же условиях, после чего клетки отделяли центрифугированием в течение 5 мин со скоростью 16 тыс. об/мин. Супернатант разбавляли калий-фосфатным буфером (рН 4,6) в 50 раз и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» (США) при длине волны 440 нм. Активность АМП выражали как процент красителя, поглощенного убитыми

клетками тест-культуры *S. albicans*, по следующей формуле:

$A = (OP_{\text{контр}} - OP_{\text{опыт}}) * 100 / OP_{\text{контр}}, \%$ где:
 $OP_{\text{контр}}$ – ОП в контрольном варианте с физ. раствором вместо слюны;

$OP_{\text{опыт}}$ – ОП в варианте со слюной.

Определение СГТ в низкомолекулярных фракциях слюны. Для удаления свободного гистидина фракции слюны с содержанием белков массой ниже 100 кДа (500 мкл) диализовали против дистиллированной воды на холоду в течение 20 час в диализных пробирках EasyDial-M объёмом 800 мкл (Orange Scientific, Бельгия). Затем в полученных диализатах определяли СГТ по диазореакции Паули [5]: к 600 мкл свежеприготовленного диазореактива (1% раствор сульфаниловой кислоты в 2% растворе соляной кислоты и равный объём 5% раствора нитрита натрия) добавляли 400 мкл диализата слюны и 400 мкл дистиллированной воды, после перемешивания вносили 500 мкл 10% раствора карбоната натрия. Смесь выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» (США) при длине волны 425 нм. Калибровочную кривую строили по гистидину (хч). Фоновую концентрацию свободных гистидина/тирозина вычитали из полученных для каждой пробы значений. Аналогично определяли содержание СГТ во фракциях с содержанием белков массой ниже 10 кДа.

Идентификация кокковой микрофлоры слюны методом ПЦР. Экстракцию ДНК из образцов осадков проводили с помощью ДНК-экспресс (Литех, Россия). В пробирку с осадком вносили 100 мкл реагента, тщательно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 сек, помещали пробирку в твёрдотельный термостат и инкубировали при температуре +95° С в течение 5 мин. После завершения инкубации пробирку центрифугировали со скоростью 13 тыс. об/мин при комнатной температуре (+18...+25° С) в течение 1 мин. Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации. Очищенную ДНК хранили при температуре –20° С.

Обнаружение ДНК *S. pneumoniae* в клиническом материале проводили методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с помощью набора реагентов «АмплиСенс *N. meningitidis* / *H. influenzae* / *S.*

pneumoniae-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции к набору. Амплификацию ДНК и визуализацию результатов проводили на приборе «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия).

Обнаружение ДНК *S. pyogenes* и *S. aureus* проводили с помощью набора формата Флуоропол-КТ (Литех, Россия) согласно инструкции к набору. После окончания амплификации переносили пробирку в детектор и проводили измерения по соответствующим пороговым значениям.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы, вложенной в Microsoft Excell. Для оценки значимости различий между выборками проводили расчет U-критерия Манна-Уитни [7].

Результаты. Данные литературы по наиболее представленным АМП слюны и основанном на этих данных расчёте содержания в этих АМП связанных гистидина и тирозина представлены в табл. 1. Для сравнения приведены данные по амилазе – самому обильному полипептиду с молекулярной массой 60 кДа, который очевидно должен содержаться во фракции слюны ниже 100 кДа. Именно гистатины должны вносить наибольший вклад в развитие окраски при проведении реакции по методу Паули: вклад не гистатиновых полипептидов в гистидин-тирозиновую долю составляет всего 6,8%.

Очевидно, что использование данного метода для определения суммарного содержания гистатинов оправдано.

Пациентов разделили на 4 группы в зависимости от концентрации СГТ во фракции слюны ниже 100 кДа. Медианы содержания СГТ, общей антимикробной активности слюны и активности её низкомолекулярной фракции во взаимосвязи со степенью выраженности воспалительного процесса представлены в табл. 2. Все четыре показателя менялись согласованно. Если общая активность показала умеренную положительную корреляцию с выраженностью воспаления, то АМП активность и СГТ – высокую. Имела место заметная положительная корреляция между СГТ и общей активностью, высокая – между СГТ и АМП активностью. Отношение между АМП активностью и концентрацией СГТ снижалось по мере увеличения тяжести течения заболевания.

Из 100 кДа фракций слюны собраны 2 пула – один с минимальной концентрацией СГТ, другой – с максимальной, после чего в них определена антимикробная активность. Часть этих пулов фильтровали через мем-

Таблица 1

Сравнение содержания гистидина и тирозина в наиболее представленных АМП слюны и амилазе

АМП	Мол. масса, кДа	Число аминокислот на 1 молекулу [17]	Число гистидиновых остатков на 1 молекулу	% гистидина	Число тирозиновых остатков на 1 молекулу	% тирозина	Максимальное содержание данного АМП в слюне, мкг/мл	Соответствующее содержание гистидина, мкг/мл	Соответствующее содержание тирозина, мкг/мл
Гистатин 1	4,9	57	7	12,3	5	8,8	88 [4]	19,5	16,3
Гистатин 3	4,0	51	7	13,7	4	7,8	191 [4]	51,8	34,6
Гистатин 5	3,0	24	7	28	2	8	106 [4]	38,3	12,8
Статерин	5,4	62	0	0	7	11,3	1 [11]	0	0,24
Псориазин	11,5	101	3	3,0	3	3,0	15 [12]	0,61	0,71
Лизоцим	14,5	148	1	0,7	4	2,7	13 [13]	0,14	0,65
Кальпротектин	36,0	93	4	4,3	3	3,2	41 [14]	0,71	0,62
Лактоферрин	80,0	711	8	1,1	19	2,67	8 [15]	0,12	0,34
Амилаза	60,0	511	9	1,8	18	3,5	100 [16]	2,3	5,4

брану с размером пор 10 кДа, собирая таким образом фракции, содержащие только гистатины; в них также определили активность (рис. 1). Различия в активности 100 кДа фракций между 1 и 2 пулом достоверны ($p \leq 0.01$), как и различия между активностями 10 кДа фракций пулов ($p \leq 0.01$). Величины активности 100 кДа и 10 кДа фракций каждого пула незначительно различаются между собой ($p > 0.05$), как и величины общей активности и соответствующей активности 100 кДа фракции ($p > 0.05$) (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что вклад 100 кДа фракции в общую активность весьма значителен, причём активность данной фракции обусловлена именно активностью гистатинов, сосредоточенных во фракции ниже 10 кДа.

На основании данных ПЦР рассчитана частота встречаемости трёх представителей кокковой микробиоты – *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* – в осадках, полученных при центрифугировании цельной слюны (табл. 2). В случае обнаружения указанных микроорганизмов их обилие одинаково высоко. Носительство *S. aureus* не связано ни с выраженностью воспалительного процесса ВЗВДП, ни с концентрацией гистатинов в слюне. Частота встречаемости *S. pyogenes* находилась в заметной обратной корреляции, *S. pneumoniae* – в значимой обратной корреляции по отношению к данным показателям. Частота встречаемости данных микроорганизмов при различных диагнозах показана на рис. 2. Значимые различия имели место только в отношении *S. aureus* в группе пациентов с хроническим тонзиллитом по отношению к прочим группам. Более важную роль играет степень выраженности клинических признаков воспаления ВЗВДП, а не диагноз.

Обсуждение. В научной литературе публикации о гистатинах касаются одного или нескольких из них [3, 8], тогда как в организме функционирует целый спектр этих АМП.

Из данных табл. 1 следует, что СГТ более чем на 90% принадлежат гистатиновому пулу. Имея метод определения суммы СГТ, можно с большой долей вероятности определять пул гистатинов. Такой метод найден среди известных в органической химии методов оценки гистидина и тирозина, входящих в состав белков [5]. Метод

Паули прост в исполнении, но для его осуществления требуется удаление из слюны соответствующих свободных аминокислот. Алгоритм проведения анализа на сумму гистатинов включал следующие стадии: 1) замораживание-оттаивание слюны; 2) удаление микрочастиц осаждением; 3) получение из супернатанта фракции ниже 100 кДа; 4) диализ – удаление свободных аминокислот; 5) проведение реакции Паули. Самым обильным белком (гликопротеином) слюны является муцин (мол. масса свыше 200 кДа), от которого избавлялись на 2 и 3 стадиях. Самым представленным белком фракции ниже 100 кДа является амилаза, которая не вносит значительного вклада в СГТ. Проводя данный анализ, можно определить сумму связанных гистидина и тирозина, принадлежащих в основном гистатинам.

Проведение анализа на 28 образцах слюны пациентов с ВЗВДП показало следующее: несмотря на то, что ранжирование образцов проводили по концентрации СГТ, отмечена прямая взаимосвязь этого показателя с выраженностью воспалительного процесса (см. табл. 2). Активности фракций ниже 100 кДа и ниже 10 кДа пря-

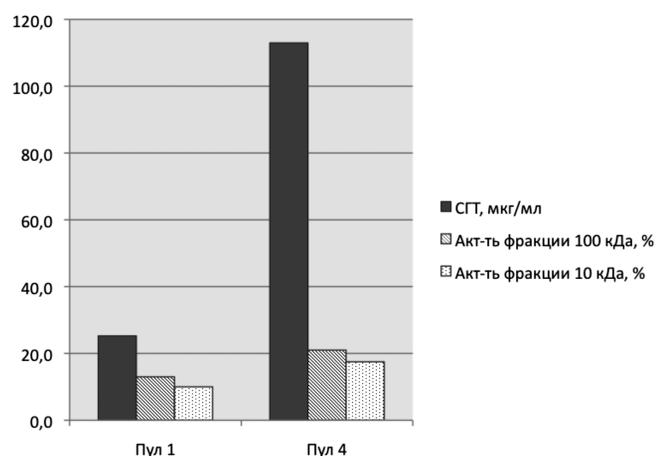


Рис. 1. Антимикробная активность во фракциях пулов слюны с крайними значениями СГТ.

Таблица 2

Связь между выраженностью клинических признаков воспаления, антимикробной активностью фракций слюны и содержанием СГТ.

Группы	Число обследованных, n	Степень выраженности клинических признаков воспаления, баллы (медиана)	Активность общая, % (медиана)	Активность фракции ниже 100 кДа (АМП), % (медиана)	СГТ, мкг/мл (медиана)	Отношение: АМП /СГТ	Частота встречаемости, %		
							<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>
1	7	1,5	13,7	13,0	26,8	0,429	28,6	42,9	85,7
2	7	2	24,5	16,1	51,5	0,312	42,9	14,3	85,7
3	7	3	19,7	14,4	62,9	0,183	14,3	0	85,7
4	7	4	21,7	21,0	98,7	0,154	42,9	14,3	42,9
r_1		-	0,420	0,824	0,975	-0,944	0,118	-0,627	-0,827
r_2		0,975	0,569	0,917	-	-0,914	0,318	-0,614	-0,864

Примечание. r_1 – коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя со степенью выраженности клинических признаков воспаления; r_2 – коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с СГТ.

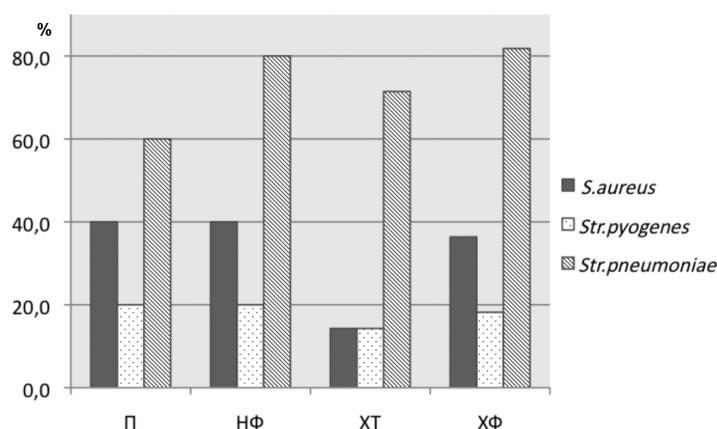


Рис. 2. Частота встречаемости кокковой микрофлоры в группах с разным диагнозом: П – поллиноз, НФ – назофарингит, ХТ – хронический тонзиллит, ХФ – хронический фарингит.

мо связаны с концентрацией СГТ (см. рис. 1). Соотношение между АМП активностью и концентрацией СГТ снижалось по мере увеличения степени воспалительной реакции. На основании этих данных можно заключить, что общее количество гистатинов растёт по мере увеличения остроты ВЗВДП, тогда как их удельная активность, т. е. активность, приходящаяся на «единицу» этих АМП, снижается. Организм пытается нивелировать воспалительный процесс выработкой дополнительных количеств гистатинов, но сами они менее активны, чем в норме.

Преобладающими обитателями ротоглотки являются *S. aureus* (57,7%), *Enterococcus spp.* (49,2%), *S. agalactiae* (32,8%), *Neisseria spp.* (14,3%), *S. pyogenes* (13,8%) [9]. Бактерии рода *Enterococcus spp.* являются нормальными обитателями ротоглотки, а *S. pyogenes*, можно отнести к оппортунистическим видам, выделяемым при респираторных инфекционно-воспалительных заболеваниях (РИВЗ) [10]. При этом значимой корреляции между тяжестью течения РИВЗ и встречаемостью *S. aureus* не обнаружено, что подтвердилось и в настоящем исследовании. К числу изучаемых в работе видов добавлен *S. pneumoniae*, поскольку, несмотря на относительно редкую высеваемость (2,65%), этот вид часто детектируют методом ПЦР. Полученные данные подтвердили этот тезис – частота встречаемости среди изученной группы пациентов *S. pneumoniae* варьирует от 42,9% до 85,7%. Частоты встречаемости *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* обратно коррелируют со степенью выраженности воспалительного процесса и концентрацией гистатинов (СГТ). На основании полученных результатов можно заключить, что при острой форме воспаления слизистой оболочки глотки развитие *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* сдерживается в определённой степени благодаря высоким уровням гистатинов.

Выводы:

1. Метод определения связанных гистидина и тирозина (СГТ) с помощью реакции Паули адаптирован для оценки уровней гистатинов слюны у пациентов с ВЗВДП.

2. Уровень гистатинов (СГТ) коррелирует со степенью воспаления слизистой оболочки верхних дыхательных путей, общей противомикробной активностью слюны и активностью её низкомолекулярной фракции, содержащей антимикробные пептиды.

3. Противомикробная активность, приходящаяся на «единицу» гистатина (т. е. АМП/СГТ), снижается по мере роста выраженности клинических признаков воспаления.

4. Значительных различий в частоте встречаемости кокковой микрофлоры в зависимости от диагноза не выявлено; при острых формах течения ВЗВДП рост *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* сдерживался, по-видимому, из-за высоких уровней гистатинов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физиологии грибов и бактерий НИИВС им. И. И. Мечникова Артемьевой Т. А. и Бутовченко Л. М. за помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР № 0525-2019-0040 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 8, 11-17 см. REFERENCES)

- Ганеева Л.А., Зайнуллин Л.И., Абрамова З.И., Тенишева Н.Х. Биохимия. Практикум: Учебное пособие по курсу «Медицинская биохимия». Казань: ИСБ: 2015.
- Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Варганова Н.О. Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей. Патент РФ № 2602298; 2015.
- Математические методы обработки данных (он-лайн расчёт). Доступно на: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>.
- Арзуманян В.Г., Варганова Н.О., Мальчевская М.А., Ерофеева Т.В., Фошина Е.П., Магаршак О.О., и др. Микробиота ротоглотки при респираторных инфекционных воспалительных заболеваниях. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2017; 7(2): 22-8.
- Арзуманян В.Г., Фошина Е.П., Варганова Н.О., Мальчевская М.А., Ерофеева Т.В. Активность фракции антимикробных пептидов слюны при респираторных инфекционных воспалительных. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2018; 8(1): 33-41.

REFERENCES

- Khurshid Z., Naseem M., Sheikh Z., Najeeb S., Shahab S., Zafar M.S. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm J.* 2016; 24(5): 515-24.

2. Khurshid Z., Najeeb S., Mali M., Moin S. F., Raza S. Q., Zohaib S., et al. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. *Saudi Pharm J.* 2017; 25(1): 25-31.
3. Sun X., Salih E., Oppenheim F.G., Helmerhorst E.J. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *FASEB J.* 2009; 23(8): 2691-701.
4. Tsai H., Bobek L.A. Human salivary histatins; promising antifungal therapeutic agents. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1998; 9(4): 480-97.
5. Ganeeva L.A., Zaynullin L.I., Abramova Z.I., Tenisheva N.K. Biokhimiya. [Praktikum: Meditsinskaya biokhimiya. Uchebnoe posobie], Kazan: ISB; 2015. (in Russian)
6. Arzumaniyan V.G., Malbakhova E.T., Foshina E.P., Artemieva T.A., Butovchenko L. M., Vartanova N. O. Method of estimation of total antimicrobial peptides activity as marker of local immunity of different epithelial tissues. Patent RF N 2602298; 2015. (in Russian)
7. Mathematical methods of data processing (on-line calculation). Available at: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>. (in Russian)
8. Campese M., Sun X., Bosch J.A., Oppenheim F.G., Helmerhorst E.J. Concentration and Fate of Histatins and Acidic Proline-rich Proteins in the Oral Environment. *Arch. Oral Biol.* 2009; 54(4): 345-53.
9. Arzumaniyan V.G., Vartanova N.O., Malchevskaya M.A., Erofeeva T.V., Foshina E.P., Magarshak O.O. et al. Oropharyngeal microbiota in respiratory. *Epidemiologia i Infektsionnyye Bolezni. Aktual'nye Voprosy.* 2017; 7(2): 22-8. (in Russian)
10. Arzumaniyan V.G., Foshina E.P., Vartanova N.O., Malchevskaya M.A., Erofeeva T.V. Activity of salivary antimicrobial peptide fraction in respiratory infectious inflammatory diseases. *Epidemiologia i Infektsionnyye Bolezni. Aktual'nye Voprosy.* 2018; 8(1): 33-41. (in Russian)
11. Pateel D.G.S., Gunjal S., Math S.Y., Murugesappa D.G., Nair S.M. Correlation of Salivary Statherin and Calcium Levels with Dental Calculus Formation: A Preliminary Study. *Hindawi International Journal of Dentistry.* 2017. Article ID 2857629. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ijd/2017/2857629/>.
12. Giusti L., Sernissi F., Donadio E., Ciregia F., Giacomelli C., Giannaccini G. et al. Salivary psoriasin (S100A7) correlates with diffusion capacity of carbon monoxide in a large cohort of systemic sclerosis patients. *Journal of Translational Medicine.* 2016; 14: 262.
13. Jenzano J. W., Hogan S.L., Lundblad R. L. Factors Influencing Measurement of Human Salivary Lysozyme in Lysoplate and Turbidimetric Assays. *Journal of clinical microbiology.* 1986; 24(6): 963-7.
14. Jonsson R., Cuida M., Brun J., Tynning T.R. Tynning Roland. Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection. *Wiley Online Library.* 1995; 103(1):8-10.
15. Berlutti F., Pilloni A., Pietropaoli M., Polimeni A., Valenti P. Lacroferrin and oral diseases: current status and perspective in periodontitis. *Annali di Stomatologia.* 2011; 2(3-4): 10-8.
16. Yang Z.-M., Chen L.-H., Zhang M., Lin J., Zhang J., Chen W.-W., et al. Age Differences of Salivary Alpha-Amylase Levels of Basal and Acute Responses to Citric Acid Stimulation Between Chinese Children and Adults. *Front Physiol.* 2015; 6: 340.
17. The UniProt Knowledgebase (UniProtKB) is the central hub for the collection of functional information on proteins <https://www.uniprot.org/uniprot/>

Поступила 25.02.21
Принята к печати 09.04.21

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сметанина С.В.¹, Славнова Е.Н.², Сметанина О.В.³, Головин С.Т.⁴, Еремин Н.В.⁵

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ КАРЦИНОМ ПЕЧЕНИ

¹ГБУЗ НО «Нижегородский областной онкологический диспансер» 603163, г. Нижний Новгород, Россия;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им.П.А.Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия;

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

⁴Клинический госпиталь ФКУЗ «Медико-санитарная часть Министерства внутренних дел России по г.Москве», 127521, Москва, Россия;

⁵ГБУЗ Волгоградский областной клинический центр медицинской реабилитации, 400005, г. Волгоград, Россия

Целью работы явилась оценка возможности цитологического метода в диагностике эпителиальных опухолей печени и определение цитоморфологических критериев в дифференциальной диагностике карцином печени. Авторами проанализированы данные 106 тонкоигольных аспирационных биопсий и 167 мазков-отпечатков при сор-биопсии объемных образований печени у пациентов, проходивших обследование в поликлинике онкологического диспансера г. Нижнего Новгорода в 2016 – 2017 годах. В результате полноценный материал для цитологического исследования в виде мазков-отпечатков с сор-биопсии и тонкоигольных аспирационных биопсий был получен в 75,4% и 95,2%, соответственно. Показаны большие возможности цитологического метода: утвердительный диагноз о наличии первичных или метастатических поражений печени поставлен в 88,8% по материалу мазков отпечатков сор-биопсии и в 87,1% при тонкоигольных аспирационных биопсиях. Характерные цитоморфологические критерии первичных и метастатических карцином печени позволили в 56,6% наблюдений определить происхождение первичной опухоли (n=98).

Ключевые слова: цитологическая диагностика; карциномы печени; тонкоигольная аспирационная биопсия; сор-биопсия.

Для цитирования: Сметанина С.В., Славнова Е.Н., Сметанина О.В., Головин С.Т., Еремин Н.В. Особенности дифференциальной цитологической диагностики первичных и метастатических карцином печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 364-370. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-364-370>

Smetanina S.V., Slavnova E.N., Smetanina O.V., Golovin S.T., Eremin N.V.

FEATURES OF DIFFERENTIAL CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF PRIMARY AND METASTATIC LIVER CARCINOMA

¹GBUZ NO «Nizhny Novgorod Regional Oncological Dispensary» 603163, Nizhny Novgorod, Russia;

²Moscow Research Oncological Institute named after P.A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia;

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

⁴Clinical Hospital Federal State Healthcare Institution «Medical and Sanitary Unit of the Ministry of Internal Affairs of Russia in Moscow» 127521, Moscow, Russia;

⁵GBUZ Volgograd Regional Clinical Center for Medical Rehabilitation, 400005, Volgograd, Russia

The aim of the work was to assess the possibility of the cytological method in the diagnosis of epithelial liver tumors and to determine the cytomorphological criteria in the differential diagnosis of liver carcinomas. The authors analyzed the data of 106 fine-needle aspiration biopsies and 167 smears-prints during cor-biopsy of masses of the liver in patients who were examined at the polyclinic of the oncological dispensary in Nizhny Novgorod in 2016. – 2017 As a result, full-fledged material for cytological examination in the form of smears-prints from cor-biopsy and fine-needle aspiration biopsies was obtained in 75.4% (n=126) and 95.2% (n=101), respectively. The great possibilities of the cytological method are shown: an affirmative diagnosis of the presence of primary or metastatic liver lesions was made in 88.8% (n=112) based on smears of sorbiopsy prints and in 87.1% (n = 88) with fine-needle aspiration biopsies. Typical cytomorphological criteria for primary and metastatic liver carcinomas made it possible to determine the origin of the primary tumor in 56.6% of cases (n=98).

Key words: cytological diagnostics; liver carcinomas; fine-needle aspiration biopsy; cor-biopsy.

For citation: Smetanina S.V., Slavnova E.N., Smetanina O.V., Golovin S.T., Eremin N.V. Features of differential cytological diagnosis of primary and metastatic liver carcinoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 364-370 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-364-370>

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

Information about authors:

Smetanina S.V., <https://orcid.org/0000-0002-7000-5910>;
Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Smetanina O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3141-0267>;
Golovin S.T., <https://orcid.org/0000-0001-5904-1526>;
Eremin N.V., <https://orcid.org/0000-0003-01539211>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 16.02.2021
Accepted 26.04.2021

Введение. На долю первичных злокачественных эпителиальных опухолей печени у взрослых приходится 85% гепатоцеллюлярных карцином (ГЦК) [1], метастатические поражения печени превышают в 30 раз первичные случаи рака данной локализации. Они встречаются у каждого третьего пациента с онкопатологией независимо от локализации первичного очага и составляют до 95% от всех злокачественных опухолей [2,3].

При обследовании больных с опухолями печени в первую очередь используют методы визуализации, преимущественно лучевые: рентгеновская компьютерная томография (РКТ), магниторезонансная томография (МРТ) и ультразвуковое исследование (УЗИ) [4]. Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТИАБ) очаговых образований печени под контролем УЗИ стала незаменимой в первичной морфологической верификации патологического процесса, что экономически оправдано ввиду доступности данного метода для большинства лечебных учреждений и низкой себестоимости исследования [5]. На сегодняшний день отмечен большой интерес к цитологическому методу как малоинвазивному, способному предоставить дополнительную информацию в диагностическом поиске, особенно в тех случаях, когда возможности гистологического исследования ограничены [6-9].

По данным литературы информативность образцов ТИАБ при цитологическом исследовании колеблется от 50% до 98%. В работе, выполненной в 1999-2003 гг. в ГБУЗ «ОКД №1 ДЗМ» г. Москвы, отмечена высокая частота получения информативного цитологического материала при ТИАБ очаговых образований печени 330 пациентов – 95,4% [10].

В работе Л.С.Болговой и соавт. [11] при изучении диагностической ценности 1015 ТИАБ печени было показано, что только в 55,1% наблюдений материал был информативен для цитологического исследования. Авторы отмечали, что при наличии информативного материала цитологическое исследование имело высокую чувствительность – 81%. Однако четких критериев адекватности цитопрепаратов в литературе не представлено.

В 2007 г. Норвежскими учеными были опубликованы данные пятилетней работы хирургического отделения клиники г. Берген, где были обследованы 175 пациентов с новообразованиями печени. Неинформативный материал для цитологического исследования при ТИАБ очаговых поражений печени был получен в 13,5% ($n=26$). В случае информативного материала правильный диагноз карциномы печени цитологически был выставлен в 80,2% ($n=89$). Общая точность в цитологической верификации карцином печени составила 87,5%, чувствительность – 79,5%, специфичность – 100%. Прогностические значения положительных и отрицательных результатов были соответственно 100% и 75,8% [12].

Цель работы – оценить возможности цитологического метода в диагностике эпителиальных опухолей печени, определить цитоморфологические критерии в дифференциальной диагностике карцином печени.

Материал и методы. В 2016-2017 гг. в ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» было проведено 551 цитологическое исследование 273 пациентам с объемными образованиями печени. Материал был получен из узловых образований печени, подозрительных по результатам УЗИ в отношении злокачественного поражения. Гендерное распределение было следующим: мужчин 138 (50,5%), женщин – 135 (49,5%). Возраст пациентов варьировал от 26 до 84 лет (возрастной интервал от 60 до 69 лет наблюдался в большинстве случаев и составил 39%).

Материал получали двумя способами: ТИАБ и соге-биопсия. В случае ТИАБ пункционный материал распределяли на 2 обезжиренных предметных стекла и готовили тонкие традиционные мазки, фиксируя их высушиванием. Остаток материала путем многократной аспирации шприца помещали в центрифужную или Эппендорф – пробирку с транспортной средой (10% раствор спирта на среде Хенкса) в $V=2-4$ мл для последующего приготовления клеточного блока. При получении соге-биопсии материал распределяли на предметные стекла в виде мазков-отпечатков, а оставшуюся порцию столбика ткани отправляли на гистологическое исследование.

Общее число цитологических препаратов, приготовленных традиционным способом – 420, приготовленных методом жидкостной цитологии (ЖЦ) на цитоцентрифуге Cellspin II – 131. Критериями адекватности цитологического материала в препаратах были условно приняты мазки, в которых определялось не менее 8 скоплений, содержащих 8-10 эпителиальных клеток. Все цитологические препараты окрашивали красителем MGG (Bio-Optica, Италия). Распределение диагностического материала в зависимости от способа получения следующее: мазки отпечатки со столбика соге-биопсии 61,2% наблюдений ($n=167$), ТИАБ – 38,8% ($n=106$).

Результаты. Полноценный материал для цитологического исследования в виде мазков-отпечатков с соге-биопсии и ТИАБ получен в 75,4% ($n=126$) и 95,2% ($n=101$) соответственно. Клетки рака в информативном материале определялись в мазках-отпечатках с материала соге-биопсии в 88,8% ($n=112$), при ТИАБ в 87,1% ($n=88$). Сопоставление результатов двух методов получения материала представлены в табл.1.

Очевидно, что при ТИАБ частота получения информативного материала для цитологического исследования выше, чем в отпечатках с соге-биопсии на 19,8%.

Анализ различных гистологических форм карцином показал, что первичные опухоли печени выявлены у

9 (4,5%) пациентов, метастатическое поражение печени – у 191 (95,5%). У мужчин первичная опухоль печени выявлена в 7 (77,8%) из 9 наблюдений, у женщин в 2 (22,2%) из 9. Вторичные поражения печени в большинстве своем были представлены аденокарциномами (АК) – 173 (91%), мелкоклеточный рак был выявлен в 13 (6,5%) наблюдениях, плоскоклеточный в 5 (2,5%) (табл. 2).

Среди метастазов АК в печень наиболее часто наблюдались метастазы колоректального рака (КРР), на втором месте по частоте встречаемости – АК легкого, на третьем – рака молочной железы.

Цитоморфологический анализ включал:

- изучение клеточности образца,
- оценку взаимного расположения клеток, образования структур,
- характеристику цитоплазмы, ядер и ядерной мембраны, нуклеол, цитоплазматических включений,
- анализ фона, наличие элементов некроза, признаков дегенерации клеток.

Особенности цитоморфологических критериев первичных и метастатических карцином печени представлены в таблице 3. В зависимости от степени выраженности полиморфизма клеток, образований структур в комплексах, а также наличия митозов и характерных

морфологических признаков, соответствующих определенным типам карцином, все наблюдения были условно дифференцированы на высоко-, умеренно- и низкодифференцированные.

Первичный рак печени был диагностирован в 9 (4,5%) наблюдениях. Аспираты ГЦК в 7 из 9 наблюдений отличались высокой клеточностью с характерными трабекулярными структурами в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Во всех 9 препаратах также присутствовали разрозненно лежащие опухолевые клетки, в том числе в виде «голых» ядер. Опухолевые клетки в цитологических препаратах округлой и неправильной полигональной формы, превышающие размеры типичного гепатоцита в 1,5-2 раза. Ядра гиперхромные, округлые или угловатые, средних или крупных размеров с глыбчатым хроматином и мелкими ядрышками. 8 из 9 наблюдений характеризовались наличием двуядерных клеток. В 3 наблюдениях присутствовали внутриядерные включения. Цитоплазма неопластических гепатоцитов в 8 из 9 случаев содержала гранулы желчных пигментов. Ядерно-цитоплазматическое соотношение увеличено. При снижении дифференцировки опухоли в 3 наблюдениях наблюдалось нарастание численности атипичных клеток, в том числе многоядерных клеток и клеток в состоянии митоза. Сопоставить результаты цитологического и гистологического исследований при ГЦК удалось в 6 из 9 наблюдений. В 3 из 6 наблюдений было полное совпадение цитологических и гистологических результатов. В 3 из 6 наблюдений было расхождение диагнозов: результат цитологического исследования – ГЦК, результат гистологического исследования – аденома (2 наблюдения), гиперплазия гепатоцитов (1 наблюдение). Учитывая четкие цитологические признаки карциномы в последних 3-х наблюдениях и невозможности клинически исключить первичную карциному печени, был произведен повторный забор материала. Результат повторного гистологического исследования: высокодифференцированный гепатоцеллюлярный рак во всех 3 наблюдениях. В остальных 3 из 9 случаях отсутствовала возможность взятия материала для гистологического исследования и с учетом клинических данных и результатов ИЦХ цитологически была установлена ГЦК.

Метастазы АК выявлены в 173 (86,5%) наблюдениях. Наиболее часто отмечены метастазы при КРР – 27%, АК легкого – 13,5% и раке молочной железы – 12,5%. Диагноз высоко-, умеренно-дифференцированной аденокарциномы в большинстве случаев трудностей не представлял. Клеточные элементы новообразования располагались в железистоподобных, микропапиллярных, ацинарных структурах или разрозненно в зависимости от дифференцировки. Отмечалась гиперхромия ядер с неровными бугристыми контурами ядерной мембраны, в 149 случаях из 173 выявлялись нуклеолы. Цитоплазма по своей структуре и окраске отличалась разнообразием: грубозернистая, иногда пенящаяся, мелко- или крупно вакуолизирующаяся. Как правило, при рутинном исследовании по цитологической картине предположить первичный очаг опухоли было сложно ввиду отсутствия характерных цитологических признаков.

В 54 (27%) наблюдениях диагностированы метастазы КРР. Для высоко- и умеренно-дифференцированной аденокарциномы кишечного типа в 48 наблюдениях из 54 характерны железистые структуры с сохранением морфологии клеток кишечного типа: клеточные элементы имели вытянутую форму с вытянутыми по большой оси

Таблица 1

Сопоставление информативности двух методов получения цитологического материала

Показатели	Способ получения цитологического материала			
	Мазки-отпечатки с core-биопсии		ТИАБ	
	n	%	n	%
Информативный материал	126	75,4%	101	95,2%
Поставлен диагноз карциномы	112	88,8%	88	87,1%
Количество исследований	167	61,2%	106	38,8%

Таблица 2

Распределение больных по гистологическим формам карцином печени

Первичные и вторичные карциномы печени		Число больных, n	%
Метастазы	Колоректальный рак	54	27%
	Аденокарцинома легкого	27	13,5%
	Рак молочной железы	25	12,5%
	Аденокарцинома желудка	19	9,5%
	Рак поджелудочной железы	15	7,5%
	Аденокарцинома без органоспецифичности	13	6,5%
	Мелкоклеточный рак	13	6,5%
	Серозная аденокарцинома яичника	8	4%
	Рак почки	6	3%
	Плоскоклеточный рак	5	2,5%
	Рак предстательной железы	3	1,5%
	Муцинозная аденокарцинома	2	1%
	Аденокистозный рак слюнной железы	1	0,5%
	Гепатоцеллюлярная карцинома	9	4,5%
Всего	200	100%	

Цитоморфологические критерии первичных и метастатических карцином печени

Цитоморфологические критерии	Гепатоцеллюлярная карцинома ГЦК (n=9)	Метастазы карцином в печень			
		Плоскоклеточный рак (ПР) (n=5)	Мелкоклеточный рак (МР) (n=13)	Аденокарцинома (АК) (n=173)	
Структурные признаки	Железистые структуры	Нередко встречаются трабекулярные структуры	Не встречаются	Не встречаются	Протоковый рак молочной железы, аденокарцинома легкого, желудка, предстательной и поджелудочной железы
	Ацинарные-микропапиллярные структуры	Не встречаются	Не встречаются	Не встречаются	Серозный рак яичников, папиллярный рак щитовидной железы, папиллярные раки других локализаций (поджелудочной, молочной железы, легкого)
Наличие ядерных молдингов (фасеток)	Не характерно	Не характерно	Характерно	Характерно	Низкодифференцированная аденокарцинома легкого, и комбинированный вариант АК и рака с нейроэндокринной дифференцировкой
Изолированно лежащие опухолевые клетки	Характерно	Характерно	Характерно	Характерно	Низкодифференцированная аденокарцинома, почечноклеточный и светлоклеточный рак разных локализаций
Размер клеток	Вариабельный	Вариабельный зависит от степени дифференцировки	Мелкий, средний	Мелкий, средний	Вариабельный в зависимости от типа АК и степени дифференцировки
Наличие признаков внеклеточной и внутриклеточной слизи	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Муцинозный рак любой локализации
Псаммомные тельца	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Серозный рак яичников, папиллярный рак щитовидной железы АК любой локализации
Наличие перстневидноклеточной морфологии клеток	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Колоректальный рак
Клетки высокой цилиндрической формы	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Саркомоподобный рак отдельных локализаций (легкое, молочная железа)
Веретеновидные клетки	Не характерно	Высокодифференцированный ПР, саркомоподобный вариант ПР	Не характерно	Не характерно	Папиллярный рак щитовидной железы, бронхиолоальвеолярный рак
Внутриядерные энуклеации цитоплазмы	Возможны	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно
Клетки, содержащие пигмент	Характерно наличие гранул желчных пигментов	Не характерно	Не характерно	Не характерно	Не характерно
Жировая вакуолизация цитоплазмы	Возможна	Возможна	Не характерно	Не характерно	Светлоклеточный рак любой локализации, липидсекретирующий рак молочной железы

ядрами, полиморфными ядрышками. Ядра в комплексах располагались в виде полисадоподобных структур в 27 из 54 наблюдений. Микропапиллярные структуры отмечались редко. Опухолевые клетки относительно мноморфные, чаще всего овальной формы, имели достаточно светлые ядра, содержащие 1-2 ядрышка. При низкодифференцированном раке характерные цитоморфологические черты были менее выражены, несмотря на то, что при этом именно такие клетки ведут себя более агрессивно и являются причиной вторичного поражения печени.

В 38 (70,4%) наблюдениях использование цитоморфологических критериев и клинических данных позволило диагностировать метастаз КРР в печень. В 16 наблюдениях первичный очаг был определен с помощью применения иммуноцитохимического исследования (ИЦХ), что совпало с данными гистологического исследования на операционном материале.

По частоте встречаемости метастаз рака молочной железы занял второе место – 25 (12,5%) наблюдений.

Считается, что наиболее характерным структурным признаком для рака молочной железы является многоклеточные комплексы в виде округлых шаровидных скоплений. Однако, такое структурообразование наблюдалось редко, по нашим данным не более чем в 25% и в 9% при опухолях других локализаций. С учетом клинических данных в 17 наблюдениях удалось цитологически утвердительно подтвердить метастазы рака молочной железы в печень. В 8 наблюдениях при отсутствии данных о первоисточнике опухоли подтвердить природу метастазов удалось с помощью ИЦХ, маммографии а также при гистологическом исследовании операционного материала.

У 13 (6,5%) пациентов диагностированы метастазы МР в печень: в 6 наблюдениях из легкого, в 4 – без выявленного первичного очага, по одному наблюдению из поджелудочной, молочной желез и ободочной кишки. Опухоль характеризовалась наличием мелких клеток округлой или слегка вытянутой формы со скудной

цитоплазмой. Клетки МР располагались в небольших группах в виде однослойных и многослойных скоплений, пластов, коротких рядков, округлой и неправильной формы комплексов, иногда состоящие из одних «голых» ядер. В части наблюдений определялся краш-синдром. Именно для этого типа карцином характерно образование ядерных молдингов (фасеток): расположение в виде «дорожек», «тел позвонков». Свободно лежащие клетки чаще имели округлую форму. Ядра занимали почти всю клетку, располагаясь центрально, реже эксцентрически, цитоплазма практически не определялась. Рисунок хроматина светлый, мелкозернистый по типу «соль-перец». Обнаружение выше перечисленных цитологических признаков опухоли позволило в 9 случаях подтвердить принадлежность метастатической опухоли печени к ранее известному первичному очагу (6 из 13 наблюдений из легкого, 1 из 13 наблюдений из поджелудочной железы, 1 из 13 наблюдений из молочной железы, 1 из 13 из ободочной кишки), в 4 наблюдениях цитологический диагноз был подтвержден ИЦХ. В 4 наблюдениях сопоставить данные цитологии с гистологическим диагнозом не удалось ввиду отсутствия возможности получения материала для гистологического исследования.

В 8 (4%) наблюдениях диагностирован метастаз серозного рака яичника. Цитопрепараты во всех наблюдениях характеризовались обилием клеток опухоли, в большинстве случаев расположенных в виде микропапиллярных структур и содержащих вакуоли, занимающую не редко практически всю цитоплазму (рис. 1). Для 3 случаев высокодифференцированного серозного рака яичников характерным явилось присутствие секреторирующих клеток с расположением специализированных органелл на поверхности мембраны клеток (цилии) – апокриновый тип секреции. Важным признаком послужило в 6 из 8 наблюдений явилось обнаружение псаммомных телец. Морфологические критерии серозного рака позволили в 3-х наблюдениях подтвердить принадлежность вторичной опухоли печени к ранее известному серозному раку яичника, в 5-х наблюдениях диагноз был выставлен только цитологически, подтвержден клиническими данными и ИЦХ.

В 6 (3%) случаях выявлены метастазы почечно-клеточного рака. Цитологическая картина светлоклеточного почечно-клеточного рака также достаточно характерна. Клетки этой опухоли отличаются небольшими раз-

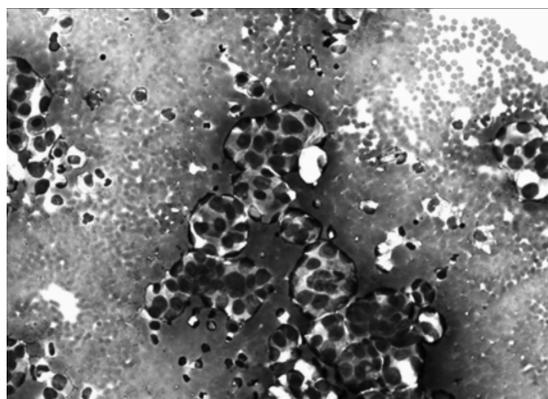


Рис. 1. Цитограмма метастаза серозного рака яичников в печень. Окраска азур-эозином, об. х 20.

мерами и обильной цитоплазмой (рис. 2). Ядра средних размеров, округлой формы, содержат крупное, интенсивно окрашенное ядрышко или несколько ядрышек. Цитоплазма светлая с неровными, «кружевными» краями, пеннистая за счет содержания большого количества липидов. Клетки формируют своеобразные структуры в виде «пера». Характерные морфологические критерии почечно-клеточного рака позволили во всех 6 наблюдениях определить метастаз данной опухоли при ранее известном почечно-клеточном раке.

В 5 (2,5%) наблюдениях диагностированы метастазы АК перстневидно-клеточного типа в печень. Характерным для этого типа карцином явилось наличие крупной секреторной вакуоли, занимающей практически всю клетку и отесняющей ядро к периферии, при этом клетки имели вид перстня (рис. 3). Морфологические критерии перстневидно-клеточного рака позволили в 4 наблюдениях подтвердить принадлежность вторичной опухоли печени к ранее известному перстневидно-клеточному раку желудка и в одном наблюдении к ранее известному перстневидно-клеточному раку ободочной кишки.

Метастаз муцинозного рака в печени диагностирован в 2 (1%) наблюдениях. Данный тип опухоли можно заподозрить при наличии обильной гомогенной внеклеточной слизи или муцинозных масс, а так же эпителиальных опухолевых клеток бокаловидной или цилиндрической формы с укрупненными ядрами с достаточно выраженной цитоплазмой, содержащей вакуоли слизи. Характерные морфологические критерии муцинозного рака позволили в одном наблюдении определить принадлежность к ранее известному муцинозному раку яичника и в одном к ранее известному муцинозному раку сигмовидной кишки.

При низкодифференцированных железистых карциномах, как правило, установить железистую природу опухоли по традиционным цитологическим препаратам не представляет затруднений, однако установить источник метастазов практически невозможно (рис. 4). В нашем случае это 75 (43,4%) наблюдений.

Метастаз плоскоклеточного рака в печени диагностирован в 5 (2,5%) наблюдениях. Наиболее часто первичный очаг определяли в легком, а именно в 3 наблюдениях из 5, и в двух наблюдениях – в пищеводе. Клеточные элементы опухоли имели различную морфологию. Наиболее распознаваемыми были клетки высокодифференцированного плоскоклеточного рака с

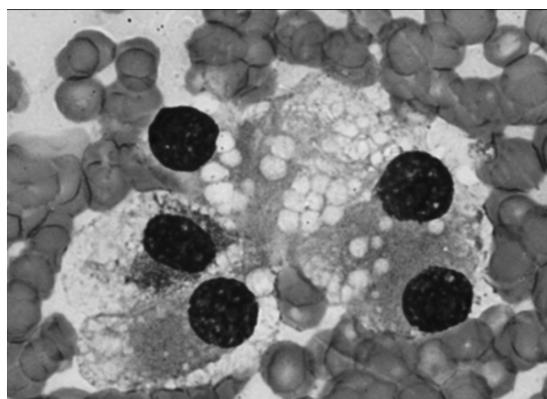


Рис. 2. Метастаз светлоклеточного рака почки в печень. Окраска азур-эозином, об. х 100.

ороговением, даже если они определялись в небольшом количестве. Клетки неправильной округлой, полигональной или вытянутой формы с гиперхромными ядрами – центральным расположением, грубым рисунком хроматина и неровным контуром ядерной мембраны (рис. 5). Отмечалось наличие пикнотичных ядер неправильной формы в 4 наблюдениях из 5. Цитоплазма различной степени базофилии, опалесцирующая, скудная, либо широкая и обильная с признаками кератинизации. При ороговевающих формах рака отмечались признаки дегенерации в цитоплазме. При плоскоклеточном умеренно- и, особенно, низкодифференцированном раке, опухолевые клетки группировались в мелкие солидные комплексы, сходные со структурами железистого рака, при этом характерный признак центрального расположения ядер в части клеток сохранялся. Фон цитопрепаратов, как правило, содержал элементы некроза опухоли. Морфологические критерии плоскоклеточного рака с ороговением и без ороговения позволили в трех наблюдениях подтвердить принадлежность вторичной опухоли печени к ранее известному плоскоклеточному раку легкого, и в двух случаях к плоскоклеточному раку пищевода.

К сожалению, метастазы плоскоклеточного и мелко-

клеточных и иммуноцитохимических признаков, позволяющих определить первичную локализацию опухоли.

В одном наблюдении (0,5 %) отмечен метастаз аденокистозного рака слюнной железы. Цитопрепараты метастаза карциномы в печени были представлены многочисленными комплексами из мелких мономорфных клеток базалоидного типа, в центре которых отмечалось шарообразное оксифильное вещество (Рис. 6). Этот клинический случай интересен тем, что изначально был диагностирован метастаз аденокистозного рака в печени без первично выявленного очага. При тщательном осмотре больного в верхней трети шеи слева обнаружено опухолевидное образование, при пункции которого установлен диагноз аденокистозного рака слюнной железы, подтвержденный впоследствии гистологически на операционном материале.

Выводы:

1. Неадекватный материал для цитологического исследования, полученный со столбика при соге- биопсии составил 24,6%, при ТИАБ – 4,8%.

2. При оценке онкопатологии образований печени показаны большие возможности цитоморфологической диагностики информативных образцов. Утвердительный диагноз о наличии первичных или метастатических поражений печени поставлен в 88,8% по материалу мазков отпечатков соге-биопсии и в 87,1% при ТИАБ.

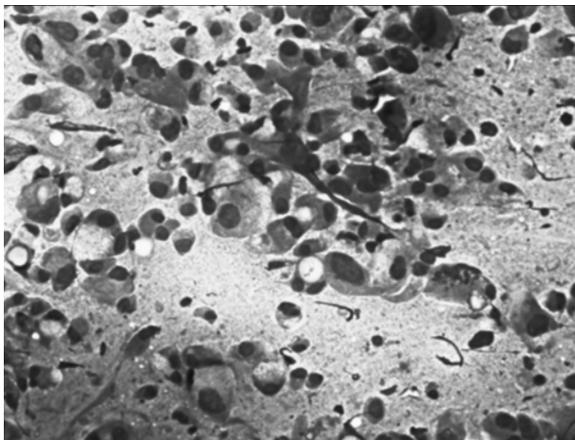


Рис. 3. Метастаз перстневидноклеточной АК в печень. Окраска азур-эозином, об. x 20.

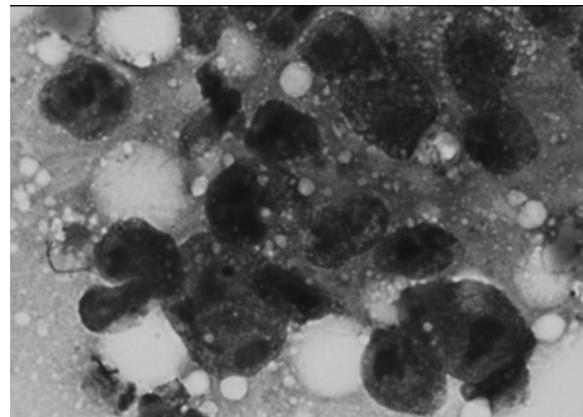


Рис. 4. Метастаз низкодифференцированной АК в печень. Окраска азур-эозином, об. x 100.

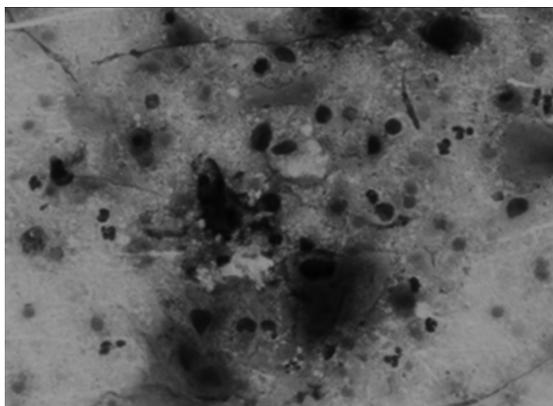


Рис. 5. Метастаз плоскоклеточного рака в печень. Окраска азур-эозином, об. x 20.

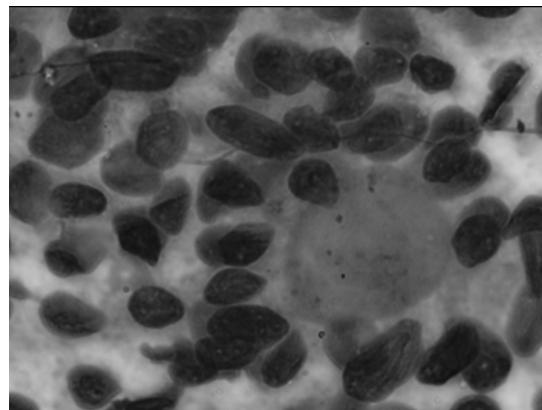


Рис. 6. Метастаз аденокистозного рака в печень. Окраска азур-эозином, об. x 100.

3. Характерные цитоморфологические критерии метастатических аденокарцином печени в 56,6% позволили определить происхождение первичной опухоли.

Таким образом, характерные цитоморфологические критерии первичных и метастатических карцином печени позволили в большинстве случаев не только уверенно поставить цитологический диагноз, но и указать клиницистам локализацию первичного источника метастазирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6-8 см. REFERENCES)

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году*. М.: МНИОИ им.П.А.Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2017.
2. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. *Практическая гепатология*. Рига: Звайгзне; 1984.
3. Громов Г.Б. *Метастатические опухоли печени. Закономерности метастазирования, диагностика и лечение*. Дис. ... канд. мед. наук. Ташкент; 1991.
4. Медведева Б.М. Возможности РКТ и МРТ в диагностике метастатического поражения печени. *Практическая онкология*. 2008; 9(4): 194-6.
5. Ершов В.А., Рылло А.Г. Пункционная гистологическая и цитологическая биопсийная диагностика заболеваний печени. *Вестник хирургии*. 2007; 1:78-9.
9. Москвина Т.А., Григорук О.Г., Добровольская Л.Н., Сигитова Е.С., Лазарев А.Ф. Значение цитологической диагностики объемных образований печени в практической работе онкологического учреждения. *Сибирский онкологический журнал*. 2008; Прил. 1:91-2.
10. Фомичёв О.М. *Малоинвазивные манипуляции для диагностики и лечения злокачественных опухолей печени*. Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2004.
11. Болгова Л.С., Туганова Т.Н., Ташиев Р.К., Лобода В.И., Логинова Е.А. Цитологическая диагностика опухолей печени по материалам пункционных биопсий. *Вопросы онкологии*. 2006; 52 (6): 691-5.

REFERENCES

1. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. The state of oncological care for the population of Russia in 2016. [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2016 godu]. Moscow: MNIIOI im. P.A.Gertsena – filial FGBU «NMIC» Minzdrava Rossii; 2017. (in Russian)
2. Blyuger A.F., Novickij I.N. Practical hepatology [Prakticheskaya gepatologiya]. Riga: Zvaigzne; 1984. (in Russian)
3. Gromov G.B. Metastatic liver tumors. Regularities of metastasis, diagnosis and treatment. [Metastaticheskie opukholi pecheni. Zakonomernosti metastazirovaniya, diagnostika i lechenie]. Dis. Tashkent; 1991. (in Russian)
4. Medvedeva B.M. Possibilities of CT and MRT in the diagnosis of liver metastatic lesions. *Prakticheskaya onkologiya*. 2008; 9(4): 194-6. (in Russian)
5. Ershov V.A., Ryllo A.G. Puncture histological and cytological biopsy diagnostics of liver diseases. *Vestnik khirurgii*. 2007; 1:78-9. (in Russian)
6. Ganjei-Azar P., Nadji M. Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology. New York: Springer; 2007.
7. Zhang Z., Zhao L., Guo H. Diagnostic Significance of Immunocytochemistry on Fine Needle Aspiration Biopsies Processed by Thin-Layer Cytology. *Diagn. Cytopathol*. 2012; 40: 1071-6.
8. Knoepp S.M., Placido J., Fields K. The Application of Immunocytochemistry to Direct Smears in the Diagnosis of Effusions. *Diagn. Cytopathol*. 2013; 41(5):425-30.
9. Moskvina T.A., Grigoruk O.G., Dobovol'skaya L.N., Sigitova E.S., Lazarev A.F. The value of cytological diagnosis of masses of the liver in the practical work of an oncological institution. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2008; Suppl. 1: 91-2. (in Russian)
10. Fomichyov O. M. Minimally invasive manipulations for the diagnosis and treatment of malignant liver tumors. [Maloinvazivnye manipulyacii dlya diagnostiki i lecheniya zlokachestvennyh opuholej pecheni]. Dis. Moscow; 2004. (in Russian)
11. Bolgova L.S., Tuganova T.N., Tashchiev R.K., Loboda V.I., Loginova E.A. Cytological diagnosis of liver tumors based on puncture biopsies. *Voprosy Onkologii*. 2006; 52(6): 691-5. (in Russian)
12. Chitrakala Sugumar, Sheeba D. A Study of Fine Needle Aspiration Cytology of Focal Liver Lesions. *IJSR*. 2016; 5: 10-2.

Поступила 16.02.21

Принята к печати 26.04.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Люцова Е.Д.¹, Господинова М.Д.¹, Бочева Я.Д.²

ФУНКЦИИ И ВОЗМОЖНОСТИ ЛИПОКАЛИНА-2 КАК ФЕКАЛЬНОГО БИОМАРКЕРА ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹Кафедра инфекционных болезней, паразитологии и дерматовенерологии, Медицинский университет «Профессор доктор Параскев Стоянов», 9000, Варна, Болгария;

²Кафедра по общей медицине и клинической лаборатории, Медицинский университет «Профессор доктор Параскев Стоянов», 9000, Варна, Болгария

Несмотря на видимые успехи в снижении заболеваемости и смертности от кишечных инфекций и острых диарей, с ними связанных, особенно в детском возрасте, проблема их диагностики и лечения остаётся актуальной. Рассмотрены структура, функции, возможности приложения липокалина-2 в инфектологии как неинвазивного биомаркера бактериального воспаления в кишечнике.

Ключевые слова: липокалин-2; NGAL; биомаркер; кишечные инфекции, диарея.

Для цитирования: Люцова Е. Д., Господинова М. Д., Бочева Я. Д. Функции и возможности липокалина-2 как фекального биомаркера при острых кишечных инфекциях (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 371-373. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-371-373>

Lyutsova E.D.¹, Gospodinova M.D.¹, Bocheva Y.D.²

FUNCTIONS AND POTENTIAL OF LIPOCALIN-2 AS FECAL BIOMARKER FOR ACUTE GASTROINTESTINAL INFECTIONS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Department of Infectious Diseases, Parasitology and Dermatovenereology, Medical University «Prof. Dr. Paraskev Stoyanov», Varna, Bulgaria, 9000;

²Department of General Medicine and Clinical Laboratory, Medical University «Prof. Dr. Paraskev Stoyanov», Varna, Bulgaria, 9000

Despite the visible progress in reducing morbidity and mortality from intestinal infections and acute diarrhea associated with them, especially in childhood, the problem of their diagnosis and treatment remains relevant. The article discusses the structure, function and application of lipocalin-2 in infectious diseases as a non-invasive biomarker of bacterial inflammation in the intestine.

Key words: lipocalin-2; NGAL; biomarker; intestinal infections; diarrhea.

For citation: Lyutsova E.D., Gospodinova M.D., Bocheva Y.D. Functions and potential of lipocalin-2 as fecal biomarker for acute gastrointestinal infections (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 371-373 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-371-373>

For correspondence: Lyutsova Ekaterina Dmitrievna, assistant professor Department of Infectious Diseases, Parasitology and Dermatovenereology; evalkova83@gmail.com

Information about authors:

Lyutsova E. D., <https://orcid.org/0000-0001-7692-3934>;

Gospodinova M. D., <https://orcid.org/0000-0003-4313-3842>

Bocheva Y. D., <https://orcid.org/0000-0001-7073-5713>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 25.02.2021

Accepted 25.04.2021

В XXI веке человечество отмечает крупные успехи в снижении смертности детей до 5-летнего возраста, регистрируя спад почти на 60%: с 12,5 млн в 1990 г. до 5,2 млн в 2019 г. Причины, ведущие к летальному исходу в этой возрастной группе, остаются прежними: пневмония, диарея, малярия [1]. Несмотря на видимые достижения, масштаб проблемы инфекционных диарей у детей того же возраста остаётся угрожающим: в 2016г. зарегистрировано 446 тыс. летальных исходов, глобальное количество эпизодов диареи достигло 1 105 406 865 [2]. Наиболее сложная ситуация в развивающихся-

ся странах, но и в экономически развитых государствах широкое распространение кишечных патогенов также возможно, благодаря путешествиям населения, импорту продуктов питания из различных стран мира, массовому посещению детских дошкольных учреждений, наличию учреждений по уходу за престарелыми людьми [3].

Одним из осложняющих факторов решения данной проблемы является полиэтиологичность инфекционных диарей, с ежегодно всё более увеличивающейся численностью бактериальных, вирусных, грибковых, протозойных патогенов,

Для корреспонденции: Люцова Екатерина Дмитриевна, ассистент каф. инфекционных болезней, паразитологии и дерматовенерологии; e-mail: evalkova83@gmail.com

их вызывающих. Методы диагностики кишечных инфекций не совершенствуются столь же быстрыми темпами. Для современных врачей чаще всего доступны бактериологический метод, иммунохроматографическая верификация вирусов или токсинов бактерий, микроскопия паразитов, молекулярная диагностика методом ПЦР [4]. Их недостатками являются трудоёмкость, продолжительность, высокие требования к оснащённости лаборатории и обученности персонала. Возможность идентифицировать патогенный микроорганизм, выделенный в копрокультуре, составляет от 2,4% до 32%, ещё меньше вероятность детекции этиологического агента для пациентов отделений интенсивной терапии (0,1%) [5]. Наличие новых диагностических методов, способствующих постановке диагноза инфекционной диареи и позволяющих оценить степень её тяжести, является актуальным.

Внимание исследователей и практических врачей привлечено к фекальным биомаркерам, как неинвазивным и легко применяемым для диагностики. Областью их основного применения является гастроэнтерология и пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника, при которых интенсивность воспаления, прогноз рецидивов, эффективность лечения можно оценить с помощью продуктов, секретируемых иммунокомпетентными клетками в очаге воспаления в слизистой оболочке кишечника. Наиболее исследованными фекальными маркерами являются кальпротектин, лактоферрин, S100A12 и ряд других [6]. Их применение в инфектологии остаётся недостаточно изученным и дискуссионным [3]. Ведётся поиск новых фекальных биомаркеров с доказанной возможностью их применения при инфекционных диареях.

Одним из таких фекальных биомаркеров является липокалин-2 (LCN-2) или нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL). LCN-2 является частью суперсемейства липокалинов, разделяя с остальными его представителями компактную третичную структуру с центральным гидрофобным ядром для связывания небольших липофильных субстанций (рис. 1).

Этот 25 кДа гликопротеин первоначально выделен из нейтрофильных гранул, в ковалентно связанном с желатиназой состоянии [7]. Синтез липокалина-2 осуществляется на миелоцитарной и промиелоцитарной стадии гранулоцитоза в костном мозге с последующим его накоплением во вторичных нейтрофильных гранулах [8]. Синтез и секреция этого гликопротеина не ограничивается исключительно нейтрофилами. Для NGAL характерна широкая экспрессия различными клетками и тканями под воздействием провоспалительных цитокинов: макрофагами, дендритными клетками, эпителием желудочно-кишечного и респираторного трактов, клетками почек, гепатоцитами, адипоцитами, эндотелием сосудов, кардиомиоцитами [9]. Идентифицированы два мембрано-связанных типа рецепторов для LCN-2: мегалин, экспрессируемый на поверхности эпителия почек, участвующий в почечной реабсорбции, и рецептор 24p3R, относящийся к семейству катионных транспортёров, широко распространённый в различных тканях организма [10].



Рис. 1. Третичная структура NGAL, полученная методом ядерно-резонансной спектроскопии (Protein Data Bank identification number 1NGL).

В результате поиска лиганда для NGAL установлена функция этого гликопротеина-связывание с сидерофорами бактерий [11]. Сидерофоры- низкомолекулярные соединения, синтезируемые различными бактериями для получения железа (Fe^{3+}) – жизненно важного для их существования, единственным внеклеточным источником которого являются железосодержащие белки организма-хозяина (лактоферрин, ферритин) [10]. Энтробактин(Ent) – сидерофор, синтезируемый кишечными патогенами семейства *Enterobacteriaceae* (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli* и др.), обладая высоким аффинитетом к Fe^3 , формирует с ним комплексы, которые, взаимодействуя с Ent-рецепторным протеином FerA, проникают в бактериальную клетку и обеспечивают её необходимым для существования железом. Выделение нейтрофилами LCN-2 позволяет ограничить этот процесс по причине его более высокого сродства к комплексу Ent- Fe^{3+} в сравнении с FerA [12] (рис. 2).

В доказательство этому представлен ряд исследований на животных моделях. В опытах с генно-модифицированными LCN-2-дефицитными мышами показан их более высокий уровень смертности после заражения *E. coli* в сравнении с контрольными мышами [13]. Доказана роль NGAL не только, как бактериостатического гликопротеина-хелатора бактериальных сидерофоров, но и компонента, модулирующего противомикробный иммунный ответ. В эксперименте на генно-модифицированных LCN-2-дефицитных мышах их нейтрофилы являлись неполноценными, обладали сниженным хемотаксисом и подвижностью, макрофаги характеризовались низкой способностью к продукции провоспалительных (интерлейкин (ИЛ)-6, ИЛ-1 β , фактор некроза опухоли (ФНО- α) цитокинов, что повышало чувствительность животных к инфекции и способствовало усиленному размножению бактерий [12].

Способность модифицировать иммунный ответ к бактериальным патогенам не только по сидерофор-опосредованному механизму – важная способность NGAL, так как в процессе эволюции паразитизма некоторые патогенные штаммы *S. enterica*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* приобрели способность синтезировать сидерофоры, не позволяющие структурно связываться с NGAL. Наличие *iroA* кластера генов даёт возможность таким штаммам синтезировать С-гликозилированный дериват энтробактина – салмохелин, который, являясь структурно более объёмным, избегает взаимодействия с NGAL и позволяет кишечным патогенам с успехом получить доступ к необходимому им железу [14]. В этой ситуации возможен плейотропный эффект NGAL, действующий не только на внеклеточном, но и на внутриклеточном уровне, что имеет важное значение при инфицировании внутриклеточными патогенами. *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, приоритетный этиологический агент 90 млн диарей и 155 тыс. смертей, с ними связанных, реализует свою вирулентность, реплицируясь в макрофагах организма [15]. Показано, что LCN-2 способствует экспорту железа из инфицированных сальмонеллой макрофагов, уменьшая его внутриклеточную доступность для патогена, редуцирует продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-10 и повышает синтез провоспалительных ИЛ-6 и ФНО- α , что ведёт к выздоровлению [16].

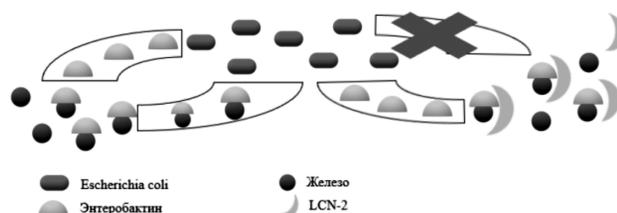


Рис. 2. Взаимодействие LCN-2 с комплексом Ent – Fe^{3+} .

Являясь антимикробным гликопротеином системы врождённого иммунитета, NGAL играет важную роль при инфекционно-воспалительных заболеваниях кишечника. Для ответа на вопрос, возможно ли использование NGAL как неинвазивного биомаркера при заболеваниях такого рода, проведён ряд экспериментов. При химически индуцированном колите у подопытных мышей было доказано, что уровень фекального NGAL (fe-NGAL) находится в прямой зависимости от степени воспаления кишечника, отражает темп восстановления его слизистой оболочки в процессе выздоровления, отличается стабильностью при сохранении при температуре -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+24^{\circ}\text{C}$ в течение суток, то есть обладает качественными характеристиками, необходимыми для биомаркёров [17]. Последующие исследования затрагивают и человеческую популяцию. Исследована пригодность fe-NGAL в качестве маркера воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона, язвенный колит). Установлена высокая чувствительность и специфичность fe-NGAL (95,7% и 94,7%, соответственно) как биомаркера, позволяющего дифференцировать пациентов с активными формами воспалительных заболеваний кишечника от здоровых лиц. Отмечена стабильность fe-NGAL при комнатной температуре в течение 7 суток, что крайне важно в клинической практике [18].

На современном этапе развития инфектологии использование фекальных биомаркёров ограничено, вопреки распространённости проблемы кишечных инфекций, особенно в педиатрии, где наблюдается высокая детская смертность по причине острых инфекционных диарей. Это является очевидным пробелом, так как могло бы стать дополнительным методом дифференциации кишечных инфекций, стратификации степени тяжести, решения вопроса о необходимости и/или продолжительности антибактериального лечения. Для внедрения подобных маркёров в рутинную практику врачей-инфекционистов оценены возможности фекального кальпротектина, который находит своё место при дифференциальной диагностике бактериальных и вирусных кишечных инфекций, коррелируя при этом с тяжестью заболевания, и являясь дополнительным тестом при распознавании *Clostridium difficile*-энтероколитов, позволяя прогнозировать тяжёлые формы данной инфекции [19]. Небольшое количество исследований на ограниченном контингенте пациентов пока не позволяет этому биомаркёру стать частью алгоритмов диагностики острых диарей. Поиск и внедрение в практику клинической лабораторной диагностики новых неинвазивных, чувствительных и специфичных маркёров является актуальным и практически полезным. В отличие от кальпротектина, синтезируемого в основном нейтрофильными гранулоцитами в условиях воспаления, fe-NGAL экспрессируется и клетками кишечника в дополнение к клеткам белой крови. Его измерение может охарактеризовать различные аспекты воспаления в кишечнике и более точно оценивать скорость репарации слизистой оболочки, и помочь лечащим врачам при решении вопроса о продолжительности антибактериальной терапии. В доступной медицинской литературе отсутствуют данные о применении fe-NGAL при диагностике инфекционных диарей, что, основываясь на его вышеизложенных антибактериальных и иммуномодулирующих свойствах, является пробелом и нуждается в дальнейшем изучении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-18 см. REFERENCES)

19. Вълкова Е.Д., Господинова М.Д., Тодоров И.Т. Фекальный кальпротектин в дифференциальной диагностике острых кишечных инфекций. *Журнал инфектологии*. 2018;10(2):117-22. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-2-117-122>.

REFERENCES

1. United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME), 'Levels & Trends in Child Mortality: Report 2020. Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation'. United Nations Children's Fund. New York; 2020.
2. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Infectious diseases*. 2018; 18(11): 1211–28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1).
3. Shane A. L., Mody R. K., Crump J. A., Tarr P. I., Steiner T. S., Kotloff K. et al. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017; 65(12): e45–e80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>.
4. Christian Leli, Luigi Di Matteo, Franca Gotta, Daria Vay, Valeria Cavallo, Roberta Mazzeo et al. Evaluation of a multiplex gastrointestinal PCR panel for the aetiological diagnosis of infectious diarrhea. *Infectious Diseases*. 2020; 52(2): 114-20. DOI: 10.1080/23744235.2019.1688861.
5. Shen N., Tao Y., Du B. L., & Cao Q. Molecular diagnostic practices for infectious gastroenteritis. *Chinese medical journal*. 2020; 133(12): 1485–6. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000841>.
6. Liu F., Lee S.A., Riordan S.M., Zhang Land, Zhu L. Global Studies of Using Fecal Biomarkers in Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Med.* 2020; 7:580803. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.580803>.
7. Li D., Yan Sun W., Fu B., Xu A., & Wang Y. Lipocalin-2-The myth of its expression and function. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2020;127(2): 142–51. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13332>.
8. Dahl Sara Louise, Woodworth Joshua S., Lerche Christian Johann, Cramer Elisabeth Præstekjær, Nielsen Pia Rude, Moser Claus et al. Lipocalin-2 Functions as Inhibitor of Innate Resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:2717. DOI=10.3389/fimmu.2018.02717.
9. Bonnard B., Martínez-Martínez E., Fernández-Celis A. et al. Antifibrotic effect of novel neutrophil gelatinase-associated lipocalin inhibitors in cardiac and renal disease models. *Scientific Reports*. 2021; 11: 2591. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82279-0>.
10. Xia Xiao, Beng San Yeoh, Matam Vijay-Kumar. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annual Review of Nutrition*. 2017; 37 (1): 103-30.
11. Goetz D. H., Holmes M. A., Borregaard N., Bluhm M. E., Raymond, K. N., Strong, R. K. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell*. 2002; 10(5), 1033–43. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00708-6).
12. Wang Q., Li S., Tang X., Liang L., Wang F., Du H. Lipocalin 2 Protects Against *Escherichia coli* Infection by Modulating Neutrophil and Macrophage Function. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 2594. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02594>.
13. Berger T., Togawa A., Duncan G. S., Elia A. J., You-Ten A., Wakeham A., Fong H. E., Cheung C. C., Mak T. W. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(6): 1834–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510847103>.
14. Fischbach M. A., Lin H., Zhou L., Yu Y., Abergel R. J., Liu D. R. et al. The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(44), 16502–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604636103>.
15. Lathrop S. K., Binder K. A., Starr T., Cooper K. G., Chong A., Carmody A. B., Steele-Mortimer O. Replication of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infection and immunity*. 2015; 83(7), 2661–71. <https://doi.org/10.1128/IAI.00033-15>.
16. Nairz M., Schroll A., Haschka D., Dichtl S., Sonnweber T., Theurl I. et al. Lipocalin-2 ensures host defense against *Salmonella Typhimurium* by controlling macrophage iron homeostasis and immune response. *European journal of immunology*. 2015; 45(11): 3073–86. <https://doi.org/10.1002/eji.201545569>.
17. Chassaing B., Srinivasan G., Delgado M. A., Young A. N., Gewirtz A. T., Vijay-Kumar M. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328>.
18. Thorsvik S., Damås J. K., Granlund A. V., Flo T. H., Bergh K., Østvik A. E., Sandvik A. K. Fecal neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2017; 32(1): 128-35.
19. Vlkova E.D., Gospodinova M.D., Todorov I.T. Fecal calprotectin in the differential diagnosis of acute intestinal infections. *Zhurnal infekologii*. 2018;10(2):117-22. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-2-117-122>. (in Russian)

Поступила 25.02.21

Принята к печати 25.04.21

Домотенко Л. В.¹, Морозова Т. П.¹, Шепелин А. П.¹, Миронов А. Ю.²

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ТРАНСПОРТНЫХ СРЕД

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, г. о. Серпухов, Московская обл., Россия;

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

Цель исследования – оценка эффективности проведения контроля качества транспортных сред в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов с использованием аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Представлены результаты сравнительной оценки выживаемости 10 штаммов аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов после хранения в полужидкой транспортной среде Эймса в течение 24 и 48 ч при температуре (4–8)°С и (20–25)°С в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов.

Методика, описанная в МУК 4.2.2316, вызывает ряд технических трудностей, ведущих к невоспроизводимым результатам. Оценка выживаемости микроорганизмов в полужидких транспортных средах по ГОСТ ISO 11133-2016 является качественной. Количественная оценка получена с использованием двух методов Swab Elution и Roll Plate, рекомендованных стандартом CLSI M40-A2.

Ключевые слова: микробиологические транспортные системы; выживаемость микроорганизмов; среда Эймса; оценка качества; стандарт CLSI M40-A2.

Для цитирования: Домотенко Л. В., Морозова Т. П., Шепелин А. П., Миронов А. Ю. Оценка качества транспортных систем в микробиологических лабораториях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 374-378.
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-374-378>

Domotenko L.V.¹, Morozova T.P.¹, Shepelin A.P.¹, Mironov A.Yu.²

EFFICIENCY OF BACTERIOLOGICAL TRANSPORT MEDIA QUALITY CONTROL

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Serpukhov, Moscow region, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation

The aim of the study is to assess the effectiveness of quality control of transport environments in accordance with the requirements of domestic and international standards using aerobic and optional anaerobic microorganisms. The results of a comparative assessment of the survival of 10 strains of aerobic and optional anaerobic microorganisms after storage in the semi-liquid transport environment of Ames for 24 and 48 hours at temperatures (4–8)°C and (20–25)°C in accordance with the requirements of domestic and international standards are presented.

The methodology described in ICC 4.2.2316 causes a number of technical difficulties leading to non-reproducible results. The survival rate of microorganisms in semi-liquid transport environments under ISO 11133-2016 is of high quality. The quantitative assessment is based on two Swab Elution and Roll Plate methods recommended by the CLSI M40-A2 standard.

Key words: microbiological transport systems; Survival of microorganisms Ames' environment; Assess quality CLSI M40-A2.

For citation: Domotenko L. V., Morozova T. P., Shepelin A. P., Mironov A. Yu. Efficiency of bacteriological transport media quality control. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 374-378 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-374-378>

For correspondence: Domotenko L. V., Leading Researcher, Laboratory of Nutrient Medium Development; e-mail: domotenko@list.ru

Information about authors:

Domotenko L. V., <http://orcid.org/0000-0002-4785-6418>;

Morozova T. P., <https://orcid.org/0000-0002-1891-9918>;

Shepelin A. P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 15.03.2021
Accepted 25.03.2021

Введение. Инфекционные заболевания и связанная с ними смертность по-прежнему представляют серьезную опасность для здоровья и жизни людей во всем мире. В XXI веке появились новые болезни, приводящие к эпидемиям и даже пандемиям, вызванные неизвестными ранее патогенами [1, 6]. Не снижают своей роли известные «старые» инфекции:

туберкулёз, менингиты, внебольничные пневмонии, вызывающие наиболее тяжёлые расстройства здоровья, приводящие к хроническим нарушениям, инвалидности и даже смерти [6]. В Российской Федерации сохраняется высокий уровень заболеваемости кишечными инфекциями и наносимого ими экономического ущерба [2].

Для корреспонденции: Домотенко Любовь Викторовна, вед науч. сотр. лаб. разработки питательных сред; e-mail: domotenko@list.ru

Сложившаяся эпидемиологическая ситуация ставит перед лабораториями, выполняющими микробиологические исследования, задачи по повышению качества лабораторной диагностики инфекций с целью более эффективного использования результатов в лечебном процессе [3]. Качество лабораторного теста рассматривается как достоверность и возможность его воспроизведения. К одним из основных факторов, влияющих на достоверность и воспроизводимость результатов лабораторного анализа, относятся качество лабораторных материалов [4,5], к которым относятся транспортные системы и их составляющие: транспортная среда и устройство для взятия анализа.

Бактериологические лаборатории всё чаще получают пробы инфицированного материала на тампонах, помещённых в сухую пробирку или в транспортную среду. Многие врачи предпочитают отбор и транспортирование проб в транспортных системах из-за простоты использования, низкой стоимости и доступности.

Влияние типа транспортной системы и её составляющих на результаты исследований часто недооценивается. Вероятно, это связано с безоговорочной верой в то, что требования, предъявляемые к транспортным средам, обязательно выполняются. Исходя из определения, транспортная среда в отличие от питательной среды должна обеспечивать сохранение жизнеспособности микроорганизма и обязана предупредить или в значительной степени лимитировать размножение микроорганизмов.

Оценке качества транспортных систем, транспортных сред и тампонов посвящено большое количество публикаций, в основном, зарубежных исследователей [7-12]. В медицинских учреждениях часто используется только один тип тампона и транспортной среды для удовлетворения всех потребностей в микробиологическом анализе, например, в скрининговых тестах на статус бактериального носительства, для диагностики инфекций кожи и слизистых оболочек или конъюнктивы глаз или для получения образцов во время операций и др.

Доступными являются коммерческие транспортные системы, содержащие различные транспортные среды и устройства для взятия анализа. Транспортные среды представлены, в основном, полужидкими средами Кэри-Блэра, Стюарта (с углём или без угля), Эймса (с углём или без угля), жидкими средами – модифицированной средой Эймса и специальными средами, предназначенными конкретно для разных видов клинического материала. Устройства для взятия анализа представляют тампон на палочке (зонд-аппликатор), называемые в англоязычной литературе transport swab, в немецкой *tupfer*, по-русски – тампон-зонд, зонд-тампон и др. Тампоны в этих устройствах в классическом варианте изготовлены из хлопкового или вискозного волокна. Современные тампоны, укомплектованные с жидкими транспортными средами, изготовлены из вспененного полиуретана или нейлонового флок-волокна. Объём, удерживаемый тампонами, может различаться. Зонды-аппликаторы отличаются используемым материалом (деревянные, пластиковые, алюминиевые) или формой (алюминиевые стандартные, алюминиевые мягкие, алюминиевые витые и др.).

Выбор оптимальной транспортной системы осуществляется с использованием тест-штаммов микроорганизмов в соответствии с требованиями современных стандартов.

Цель исследования – оценка эффективности проведения контроля качества транспортных сред в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов с использованием аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Материал и методы. Использованы тест-штаммы *Haemophilus influenzae* ATCC 10211, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA – 427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»; транспортная среда Эймса сухая производства ФБУН ГНЦ ПМБ. Оболенск, РУ № РЗН 2018/7437, приготовленная в соответствии с инструкцией производителя и разлитая в стеклянные пробирки с завинчивающимися пробками; тампоны-зонды полимерные с вискозным наконечником стерильные в индивидуальной упаковке производства Ningbo Greetmed Medical Instruments Co. LTD, China, серия 20012018, годен до 19.01.2023.

H. influenzae засеивали на шоколадный агар с ростовой добавкой (РУ № ФСП 2012/13081), *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis* на кровяной агар, приготовленный на основе колумбийского агара (РУ № РЗН 2020/12505), *S. aureus*, *S. flexneri*, *E. coli*, *P. aeruginosa* на питательную среду № 1 ГРМ (РУ № ФСП 2011/ 11415). Посевы инкубировали при температуре $35\pm 2^{\circ}$ С. Культивирование *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* осуществляли в капнофильной атмосфере, обогащенной 5% CO_2 .

Для определения сохранения жизнеспособности микроорганизмов в транспортных средах согласно рекомендациям МУК 4.2.2316-08 готовили суспензии соответствующих тест-штаммов в стерильном 0,85% растворе хлорида натрия по стандартному образцу мутности 10 ЕД (ОСО 10 МЕ) с концентрацией приблизительно $1,0 \times 10^9$ микробных клеток/мл. Согласно требованиям МУК, необходимо внести в 4 пробирки с транспортными средами по 1 мл суспензии из разведений 10^{-5} и 10^{-6} . Из двух засеянных пробирок сразу после посева (0 проба), тщательно перемешав содержимое, произвести высев по 0,1 мл взвеси на чашки Петри с шоколадным агаром и инкубировать посевы в соответствующих условиях. Остальные пробирки с посевами выдержать при температуре $(18-24)^{\circ}$ С в течение 24 ч, затем высевать на чашки Петри с соответствующими средами аналогично посеву 0 пробы.

Согласно стандарту М40-А2, готовили суспензии тест-штаммов бактерий в стерильном 0,85% растворе хлорида натрия по ОСО 10 МЕ. Для «Roll plate» метода использованы суспензии тест-штаммов из разведений 10^{-3} - 10^{-5} . По 0,1 мл каждого разведения вносили в 3 стерильные пробирки, помещали в них стерильные тампоны-зонды, выдерживали их 10 с до полного впитывания тампоном суспензии и погружали в пробирки с транспортной средой так, чтобы тампон не доходил до дна пробирки 1,5-2,0 см и не касался стенок пробирки. Тампоны хранили в транспортной среде при регулируемой комнатной температуре $(20-25)^{\circ}$ С и при температуре $(4-8)^{\circ}$ С в течение 0, 24, 48 часов. После соответствующего времени хранения, включая 0 ч (через 10-15 с после инокуляции) для каждого разведения микроорганизмов, тампоны извлекали из транспортной среды и производили посев вращательными движениями тампона во всей поверхности соответствующих питательных сред (как бы прокатывая тампон). После инкубации посевов визуально учитывали результаты. Для получения достоверных результатов подсчёт колоний производили только на чашках, где росло от 25 до 250 колоний.

При использовании «Swab Elution» метода процедура приготовления суспензий тест-штаммов, их разведений, внесение тампонов-зондов в транспортные среды проводили аналогично «Roll plate» методу, но используя только одно разведение суспензии 10^{-3} . Концентрация инокулята, внесённого с тампоном-зондом в транспортную среду, составляла 10^5 КОЕ/мл.

По окончании времени экспозиции (0 ч, 24 ч, 48 ч) тампоны извлекали из транспортных сред, помещали в пробирку с 1 мл стерильного 0,85% раствора хлорида натрия. Содержимое пробирок энергично перемешивали на вихревой мешалке типа Vortex в течение 15-20 с, готовили три десяти-

тикатных разведения в 0,85% растворе хлорида натрия. По 0,1 мл суспензий из всех полученных разведений высевали на чашки Петри с соответствующей питательной средой. По окончании инкубации подсчитывали количество выросших колоний, учитывая посе́вы, где наблюдался рост от 25 до 250 колоний. Количество жизнеспособных микроорганизмов после хранения в транспортной среде выражали в виде среднего значения, полученного для трёх образцов, вычисляли десятичный логарифм (lg) изменения концентраций жизнеспособных микроорганизмов относительно их количества в нулевой пробе (0 ч).

При использовании метода контроля качества полужидких транспортных сред, описанного в ГОСТ ISO 11133-2016, транспортную среду инокулировали тест-штаммами *H. influenzae* ATCC 10211 и *P. aeruginosa* ATCC BAA-427 с концентрацией инокулята $2-3 \times 10^5$ КОЕ /мл. Тампон-зонд помещали в 0,1 мл суспензии тест-штамма на 10 с, затем инокулировали им транспортную среду. Инокулированную транспортную среду инкубировали при температуре (20-25)⁰ С и при температуре (4-8)⁰ С в течение 24 и 48 часов. По окончании инкубации пересевали на соответствующие питательные среды и инкубировали посе́вы в необходимых условиях. После инкубации визуально отмечали наличие роста микроорганизмов.

Результаты и обсуждение. Процедура контроля качества транспортных сред (систем) регламентирована отечественными и международными нормативными документами. К ним относятся:

МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», рекомендованные для контроля качества питательных сред, в том числе транспортных для клинической и санитарной микробиологии [13]. В методических указаниях раздел 7.11. посвящён определению показателей сохранения жизнеспособности и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов в транспортных средах;

ГОСТ ISO 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред», предназначенный для контроля качества питательных сред (включая транспортные среды), используемых в санитарной микробиологии [14]. С 2016 г. в ГОСТе впервые появился раздел 9.3 «Метод испытания транспортных сред»;

Международный стандарт CLSI M40-A2 «Quality control of Microbiological Transport systems» (Контроль качества микробиологических транспортных систем) специально предназначен для контроля качества микробиологических транспортных систем [15].

Существуют национальные стандарты других стран, например, германский DIN 58942-4-2003 «Medical microbiology – Culture media – Part 4: Transport systems for specimens containing bacteria» и DIN 58942-4-2003 Beiblatt 1 «Medical microbiology – Culture media – Part 4: Transport systems for specimens containing bacteria – Systems, media and conditions for the transport of selected pathogens in clinical specimens».

В России действуют два документа МУК 4.2.2316-08 и ГОСТ ISO 11133-2016. В иностранных публикациях ссылаются на использование методов контроля, описанных в первом или втором издании CLSI M40-A или CLSI M40-A2.

При сравнении методик контроля качества, приведённых в перечисленных документах, следует отметить, что они отличаются по процедуре и по оценочным критериям. В соответствии с требованиями МУК 4.2.2316-08 анализ проводится с помощью 5 штаммов микроорганизмов (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *H. influenzae* ATCC 49247, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *Candida albicans* ATCC 24433), количество которых в транспортной среде после хранения в течение 24 ч при комнатной температуре (18-24⁰ С) не должно отличаться от первоначального более чем в 10 раз.

В соответствии с требованиями ГОСТ ISO 11133-2016 для полужидких транспортных сред проводится качественный контроль, для жидких – подсчитывается количество микроорганизмов после хранения в транспортной среде, которое должно находиться в пределах $\pm 30\%$ от первоначального количества. Оценка качества проводится в условиях, принятых на практике или установленных в конкретном стандарте. В качестве тестируемых выбирают те виды микроорганизмов, для транспортировки которых используется контролируемая транспортная среда.

Международный стандарт CLSI M40-A2 предназначен для производителей и для лабораторий, использующих транспортные системы, контейнеры для мочи и фекалий. Для гарантии чувствительности устройств и их надёжности производителям рекомендуется осуществлять контроль полуквантитативным методом посе́ва тампоном (Roll-plate method) и количественным методом элюции тампона (Swab Elution method), при температуре (20-25)⁰ С и (2-8)⁰ С через 24 и 48 ч хранения с помощью 10 штаммов: *P. aeruginosa* ATCC BAA-427; *S. pyogenes* ATCC 19615; *S. pneumoniae* ATCC 6305; *H. influenzae* ATCC 10211; *N. gonorrhoeae* ATCC 43069; *B. fragilis* ATCC 25285; *P. anaerobius* ATCC 27337; *F. nucleatum* ATCC 25588; *P. acnes* ATCC 6919; *P. melaninogenica* ATCC 25845.

Лабораториям при валидации транспортной системы рекомендовано использовать оба метода или любой из них. В стандарте подробно описано проведение исследований для обоих методов, которые, несмотря на трудоёмкость выполнения, обеспечивают точность и надёжность результатов [8].

Для количественного метода оценки стандартом M40-A2 обозначены следующие критерии: для образцов, хранившихся при 4⁰ С или комнатной температуре, допускается снижение КОЕ не более чем на 3 lg, в случае избыточного роста для образцов, хранившихся при 4⁰ С, допускается увеличение КОЕ не более чем на 1 lg. Для качественного метода оценки допускается такое же увеличение КОЕ для образцов, хранившихся при 4⁰ С. Стандартом не регламентируется увеличение количества КОЕ для образцов, хранившихся при комнатной температуре.

На примере полужидкой среды Эймса проведены сравнительные исследования по оценке качества с использованием различных методик. Оценка качества по методике, рекомендованной МУК 4.2.2316-08, вызывает ряд трудностей, связанных с невозможностью равномерно перемешать среду Эймса с суспензией тест-штаммов и отобрать пробу для посе́ва из-за высокого содержания агара в среде, равной 4 г/л. При использовании данной методики получить воспроизводимые результаты не удастся. Данный метод подходит для контроля качества только жидких транспортных сред.

Методика контроля качества полужидких транспортных сред, предлагаемая ГОСТ ISO 11133-2016, является качественной. При её использовании зарегистрировано наличие роста обоих тест-штаммов микроорганизмов после хранения в транспортной среде при обеих температурах через 24 и 48 ч, причём рост *P. aeruginosa* ATCC BAA-427 более интенсивный, чем рост *H. influenzae* ATCC 10211.

Количественная оценка выживаемости микроорганизмов в транспортной среде, обеспечивающая воспроизводимость результатов, получена только при использовании обоих методов – Roll plate и Swab Elution. Результаты исследований с использованием 11 тест-штаммов аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, приведены в табл. 1 и 2.

В процессе хранения в среде Эймса может происходить гибель или усиленный рост тест-штаммов в зависимости от вида микроорганизма и условий хранения. Концентрации микроорганизмов со сложными питательными потребностями, таких как *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis* снижается на 1-2 lg. Такое поведение требовательных к условиям роста микроорганизмов согласуется с опубликованными результатами исследований

Таблица 1

Количество жизнеспособных микроорганизмов после хранения в среде Эймса при различных температурах в течение 24 ч и 48 ч при использовании Swab Elution метода

№ п/п	Тест-штаммы	Концентрация микроорганизмов в образце (КОЕ/мл)						Десятичный логарифм (lg) изменения концентраций жизнеспособных микроорганизмов относительно 0 ч			
		0 ч	4-8°С		20-25°С		4-8°С		20-25°С		
			24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	
1.	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	8,70×10 ⁴	6,45×10 ⁴	8,45×10 ³	6,53×10 ³	8,40×10 ²	-0,11	-1,00	-1,11	-2,00	
2.	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	1,05×10 ⁵	6,80×10 ⁴	8,86×10 ³	5,40×10 ⁴	3,42×10 ³	-0,17	-1,04	-0,27	-1,47	
3.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	5,32×10 ⁴	4,55×10 ⁴	1,05×10 ⁴	4,08×10 ³	9,10×10 ²	-0,07	-0,70	-1,12	-1,76	
4.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6503	1,40×10 ⁵	5,95×10 ⁴	7,95×10 ³	6,10×10 ³	2,30×10 ³	-0,38	-1,26	-1,36	-1,77	
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,00×10 ⁵	1,85×10 ⁵	1,24×10 ⁵	1,40×10 ⁵	9,82×10 ⁴	-0,04	-0,20	-0,14	-0,31	
6.	<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238	1,72×10 ⁴	1,32×10 ⁴	1,20×10 ⁴	1,25×10 ⁴	4,05×10 ³	-0,11	-0,14	-0,13	-0,62	
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC BAA - 427	1,30×10 ⁵	3,74×10 ⁵	6,90×10 ⁵	6,55×10 ⁶	8,15×10 ⁷	+0,46	+0,73	+1,69	+2,78	
8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1,15×10 ⁵	1,86×10 ⁵	3,55×10 ⁵	8,15×10 ⁶	9,40×10 ⁷	+0,26	+0,49	+1,84	+2,91	
9.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,17×10 ⁵	1,94×10 ⁵	7,16×10 ⁵	2,75×10 ⁶	8,86×10 ⁷	+0,24	+0,78	+1,38	+2,88	
10.	<i>Shigella flexneri</i> 1a 8516	1,27×10 ⁵	1,50×10 ⁵	2,05×10 ⁵	1,05×10 ⁵	2,00×10 ⁷	+0,04	+0,26	+0,91	+2,12	
11.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1,30×10 ⁵	1,47×10 ⁵	9,77×10 ⁵	2,55×10 ⁵	8,05×10 ⁶	+0,04	+0,88	+0,30	+1,79	

Таблица 2

Количество жизнеспособных микроорганизмов после хранения в среде Эймса при различных температурах в течение 24 ч и 48 ч, определенное Roll plate методом

№ п/п	Тест-штаммы	Концентрация микроорганизмов в образце (КОЕ/мл)						Десятичный логарифм (lg) изменения концентраций жизнеспособных микроорганизмов относительно 0 ч			
		0 ч	4-8°С		20-25°С		4-8°С		20-25°С		
			24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	
1	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	4,10×10 ⁴	2,80×10 ⁴	3,00×10 ³	3,22×10 ³	3,88×10 ²	-0,17	-1,14	-1,11	-2,03	
2.	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	6,15×10 ⁴	3,72×10 ⁴	4,25×10 ³	2,40×10 ⁴	1,15×10 ³	-0,23	-1,15	-0,42	-2,71	
3.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	2,98×10 ⁴	2,17×10 ⁴	6,55×10 ³	2,65×10 ³	5,72×10 ²	-0,14	-0,65	-1,04	-1,71	
4.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6503	8,20×10 ⁴	3,24×10 ⁴	5,20×10 ³	4,50×10 ³	1,10×10 ³	-0,39	-1,20	-1,26	-2,86	
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,55×10 ⁵	1,10×10 ⁵	8,80×10 ⁴	9,15×10 ⁴	9,27×10 ⁴	-0,14	-0,25	-0,23	-0,24	
6.	<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238	1,10×10 ⁴	8,85×10 ³	8,40×10 ³	7,25×10 ³	2,85×10 ³	-0,07	-0,12	-0,11	-0,58	
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC BAA - 427	9,16×10 ⁴	3,22×10 ⁵	5,30×10 ⁵	5,70×10 ⁶	6,95×10 ⁷	+0,46	+0,76	+1,79	+2,85	
8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8,75×10 ⁴	1,05×10 ⁵	2,37×10 ⁵	6,00×10 ⁶	6,85×10 ⁷	+0,07	+0,43	+1,83	+2,89	
9.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7,95×10 ⁴	1,15×10 ⁵	5,80×10 ⁵	1,58×10 ⁶	6,70×10 ⁷	+0,14	+0,86	+1,30	+2,92	
10.	<i>Shigella flexneri</i> 1a 8516	8,85×10 ⁴	9,30×10 ⁴	1,70×10 ⁵	8,25×10 ⁵	1,60×10 ⁷	+0,05	+0,28	+0,96	+2,25	
11.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	9,22×10 ⁴	9,85×10 ⁴	8,64×10 ⁵	1,78×10 ⁵	7,15×10 ⁶	+0,04	+0,96	+0,30	+1,83	

ряда зарубежных авторов, в которых описано даже полная гибель микроорганизмов при их хранении в некоторых транспортных системах [16]. Хранение *P. aeruginosa* и *E. coli* сопровождалось усиленным ростом на 2-3 lg особенно при комнатной температуре. Наиболее заметные изменения

концентраций жизнеспособных микроорганизмов наблюдались через 48 ч хранения в транспортной среде. Хранение тест-штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *S. flexneri* 1a 8516 в транспортной среде не вело к заметным изменениям концентраций.

Более высокие концентрации жизнеспособных микроорганизмов после хранения в транспортной среде, определённые количественным методом Swab Elution, объясняются техникой проведения исследования. При выполнении данного метода извлечение микроорганизмов, адсорбированных на тампоне, производилось на вихревой мешалке типа Vortex, при Roll plate методе извлечение микроорганизмов происходит при контакте тампона с поверхностью питательной среды.

При анализе полученных результатов с позиций оценочных критериев трёх рассмотренных стандартов, получается, что по требованиям МУК 4.2.2316-2008, транспортная среда не может быть использована в работе, поскольку допустимо только изменение концентрации соответствующих тест-штаммов в процессе хранения не более чем в 10 раз. Качественная оценка по требованиям ГОСТ 11133-2016, количественная и полуквантитативная оценка по требованиям CLSI M40-A2 допускают применение данной транспортной среды. Необходимо учитывать поведение в транспортных средах различных микроорганизмов особенно при их совместном присутствии в анализе, взятом из нестерильных в норме локусов. Важно объективно обнаружить именно возбудитель инфекции, а не комменсальный микроорганизм.

Заключение. Транспортные системы стали неотъемлемой частью рутинной работы микробиологической лаборатории. Выбор оптимальной транспортной системы для выполнения конкретной задачи в целях стандартизации исследований подтверждает необходимость проведения процедуры контроля качества транспортной системы.

Среди методов контроля, приведённых в трёх стандартах, оптимальными по процедуре исполнения и критериям качества, являются два метода CLSI M40-A2. Этот стандарт не переведён на русский язык и отсутствует в открытом доступе. Назрела необходимость в актуализации МУК 4.2.2316 в части контроля качества транспортных сред и транспортных систем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 7-12, 15, 16 см. REFERENCES)

2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2020. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf (дата обращения 12.02.2021).
3. Меньшиков В.В. Зачем клинической лаборатории нужна стандартизация и как её применить на практике? Учебно-методическое пособие. М.: Лабора; 2012.
4. ГОСТ Р ИСО 15189-2015. Лаборатории медицинские Частные требования к качеству и компетентности: Дата введения 2016-06-01. URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293764/4293764303.pdf> (дата обращения 28.01.2021).
5. Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Шепелин А. П., Алёшкин В. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (8): 61-5.
6. Микробиология и иммунология. Учебник. Воробьёв А.А., ред. 2-е изд. М.: Медицина; 2005.
13. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
14. ГОСТ ISO 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство,

хранение и определение рабочих характеристик питательных сред: дата введения 2017-07-01. URL: <https://meganorm.ru/Data/631/63141.pdf> (дата обращения 12.02.2021).

REFERENCES

1. World Health Organization SARS (Severe Acute Respiratory Shttps://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf yndrome). 2019. URL: <https://www.who.int/ith/diseases/sars/en/> (Date of treatment 02/28/2021).
2. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. Moscow: Rospotrebnadzor; 2020. URL: (Date of treatment 02/28/2021). (in Russian)
3. Men`shikov V.V. Why does the clinical laboratory need standardization and how to apply it in practice? Teaching aid. Moscow: Labora; 2012. (in Russian)
4. GOST R ISO 15189-2015. Medical laboratories. Requirements for quality and competence: Date of introduction 2016-06-01. URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293764/4293764303.pdf> (Date of treatment 02/28/2021). (in Russian)
5. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Alyoshkin V. A. The state and trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60 (8): 61-5. (in Russian)
6. Microbiology and immunology. Textbook [Mikrobiologiya i immunologiya. Uchebnik]. Vorob'yov A.A., ed. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
7. Warnke P., Warning L., Podbielski A. Some Are More Equal – A Comparative study on swab uptake and release of bacterial suspensions. *PLoS ONE*. 2014; 9: e102215. doi:10.1371/journal.pone.0102215.
8. Gizzie N., Adukwu E. Evaluation of liquid-based swab transport systems against the new approved CLSI M40-A2 standard. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54: 1152-6. doi:10.1128/JCM.03337-15.
9. Nys S., Vijgen S., Magerman K., Cartuyvels R. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29: 453-6. doi: 10.1007/s10096-010-0883-5.
10. Tano E., Melhus Å. Evaluation of three swab transport systems for the maintenance of clinically important bacteria in simulated mono- and polymicrobial samples. *APMIS*. 2011; 119: 198-203. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02710.x.
11. Tan T. Y., Yong Ng L. S., Fang Sim D. M., Cheng Y., Hui Min M. O. Evaluation of bacterial recovery and viability from three different swab transport systems. *Pathology*. 2014; 46: 230-3. doi:10.1097/pat.0000000000000074.
12. Elcocks E., Adukwu E.C. Laboratory evaluation of the Sigma Transwab transport system for the recovery of *Candida* species using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M40-A2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021; 40: 735-8 doi: 10.1007/s10096-020-04062-9.
13. Methods for the control of bacteriological culture media: Methodical instructions. Moscow: Federal'nyi Tsentr gigeny I epidemiologii Rospotrebnadzora; 2008. (in Russian)
14. GOST ISO 11133-2016. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media: introduction date 2017-07-01. URL: <https://meganorm.ru/Data/631/63141.pdf> (Date of treatment 02/12/2021). (in Russian)
15. CLSI. Quality control of Microbiological Transport systems; Approved Standard – Second Edition. CLSI M40-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute. 2014; 34: 54.
16. DeBurger B., Mortensen J. What's New in the World of Swabs? *Journal of Continuing Education Topics and Issues*. 2008; Article 332: 18-22.

Поступила 15.03.21

Принята к печати 25.03.21

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Столяр М.А.^{1,2}, Горбенко А.С.^{1,2}, Ольховский И.А.^{1,2}, Бахтина В.И.³, Михалёв М.А.⁴, Ольховик Т.И.⁴, Комаровский Ю.Ю.¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МРНК ГЕНА JAK2 В ВЕНОЗНОЙ КРОВИ И ОЦЕНКА ЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

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

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

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

⁴КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница №7, 660003, Красноярск, Россия

Избыточная активность сигнальных путей, опосредованных янускиназой-2 (JAK2), в клетках костного мозга и крови определяет высокий уровень готовности к реализации иммунных воспалительных реакции и нарушений гемостаза. Ряд мутаций в гене JAK2 действуют как движущие силы патогенеза миелолифолиферативной неоплазии (МЛН), вовлечены в развитие отдельных вариантов острых лейкозов, ряда солидных злокачественных образований, а также сердечно-сосудистых заболеваний. В качестве маркера, отражающего уровень активности этого фермента, предложено использовать тесты количественного определения мРНК JAK2 в циркулирующих клетках крови.

Цель: разработка оригинальной методики выявления мРНК JAK2 в венозной крови и оценка возможного диагностического значения при хронических онкогематологических заболеваниях. Разработка метода ПЦР-РВ для определения экспрессии мРНК гена JAK2 в образцах венозной крови выполнялась в соответствии с требованиями MIQE. Дизайн праймеров и TaqMan зондов подбирали, используя программу Primer3 с учетом возможности исключения последующей обработки ДНКазой. Оценивалась стабильность исследуемого мРНК в вакутейнерах с разными наполнителями и в зависимости от времени хранения образцов. Уровень мРНК JAK2 определяли в лейкоцитах крови 41 пациента с В-ХЛЛ, 16 пациентов с ХМЛ, 12 пациентов с множественной миеломой и 39 доноров и здоровых добровольцев. Показано, что значения относительной экспрессии мРНК JAK2 значимо не зависят от используемого антикоагулянта и стабильны в диапазоне 2 – 7 часов после взятия крови в вакутейнере с ЭДТА. Выявлено снижение уровня мРНК JAK2 в пробах венозной крови у пациентов с первичными ХЛЛ и с множественной миеломой, но не при ХМЛ. Уровень маркера у большинства пациентов с ХЛЛ после начала терапии приближался к диапазону, характерному для здоровых людей.

Разработан оригинальный метод ПЦР-РВ для количественного определения мРНК JAK2 в образцах венозной крови, соответствующий требованиям системы MIQE. Определение мРНК JAK2 будет полезным для уточнения особенностей патогенеза отдельных заболеваний, вовлекающих нарушение синтеза и активности JAK2, а также может стать дополнительным маркером прогноза и оценки эффективности терапии при отдельных онкогематологических заболеваниях.

Ключевые слова: ПЦР-РВ; мРНК JAK2; ХЛЛ; ХМЛ; множественная миелома.

Для цитирования: Столяр М.А., Горбенко А.С., Ольховский И.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Комаровский Ю.Ю. Разработка метода определения мРНК гена JAK2 в венозной крови и оценка его диагностического значения в онкогематологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (6): 379-384. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-379-384>

Stolyar M.A.^{1,2}, Gorbenco A.S.^{1,2}, Olkhovskiy I.A.^{1,2}, Bakhtina V.I.³, Mikhalev M.A.⁴, Olkhovik T.I.⁴, Komarovskiy Yu. Yu.¹

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE JAK2 GENE MRNA IN VENOUS BLOOD AND ASSESSMENT OF ITS DIAGNOSTIC VALUE IN ONCOHEMATOLOGY

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

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

³Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russia;

⁴Krasnoyarsk city clinical Hospital №7, Krasnoyarsk, Russia

Overactive JAK pathway signaling is a hallmark of immune diseases and critically affects on inflammation and coagulation. A number of mutations in the JAK2 gene act as driving forces of myeloproliferative neoplasms (MPN), the pathogenesis of certain variants of acute leukemia, a number of solid malignancies and cardiovascular diseases. Assays for quantifying JAK2 mRNA in circulating blood cells can be used as a marker associated with the activity of this enzyme.

Development of an original method for detecting JAK2 mRNA in venous blood and assessment of the possible diagnostic value in chronic oncohematological diseases. The development of an RT-PCR method for determining the expression of the JAK2 gene mRNA in venous blood samples was carried out in accordance with the MIQE requirements. Primers and TaqMan probes were designed using the Primer3 program, taking into account the possibility of excluding subsequent DNase treatment. The stability of the investigated mRNA was assessed in vacutainers with different anticoagulants and depending on the storage time of the

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

samples. The study of the expression of JAK2 mRNA in blood leukocytes of 41 patients with B-CLL, 16 patients with CML, 12 patients with multiple myeloma and 39 donors using the developed "real-time" PCR method. The study revealed a decrease in the level of JAK2 mRNA in venous blood samples in patients with primary CLL, but not with CML or with multiple myeloma. The level of the marker in the majority of patients with CLL after the start of therapy returned to the range typical for healthy people. It has been shown that the values of the relative expression of JAK2 mRNA are most stable in the range of 2 – 7 hours after taking blood in a vacutainer with EDTA.

An original RT-PCR method was developed for the quantitative determination of JAK2 mRNA in venous blood samples, which meets the requirements of the MIQE system. Determination of JAK2 mRNA can be useful for clarifying the pathogenesis features of certain diseases involving impaired Janus kinase activity and can become a promising marker for prognosis and assessment of the effectiveness of therapy.

Key words: JAK2 mRNA; CLL; CML; multiple myeloma.

For citation: Stolyar M.A., Gorbenco A.S., Olkhovskiy I.A., Bakhtina V.I., Mikhalev M.A., Olkhovik T.I., Komarovskiy Yu.Yu. Development of a method for the determination of the JAK2 gene mRNA in venous blood and assessment of its diagnostic value in oncohematology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (6): 379-384 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-379-384>

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

Information about authors:

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

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

Mikhalev M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>;

Olkhovik T.I., <https://orcid.org/0000-0002-4526-1920>;

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

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

Acknowledgment. *The present study was conducted in the framework of the research initiative «Study of the diagnostic value of miR-155 miRNA and its association with the level of mRNA HIF 1a and 2a in the blood cells of patients with CLL, CML and Ph-negative myeloproliferative neoplasms No. AAAA-A18-118031390161-0».*

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

Received 02.02.2021
Accepted 09.04.2021

Введение. Янускиназа-2 (JAK2) – одна из нерецепторных тирозинкиназ семейства янускиназ, инициирующих цитокиновый сигнальный каскад JAK/STAT, который играет важную роль в клетках иммунной системы, помогая бороться с патогенами и опухолевыми клетками и участвует в аутоиммунных процессах [1]. Сигнальный путь JAK/STAT запускается через активацию рецепторов эритропоэтина, тромбопоэтина, гранулоцитарных факторов роста, а также различных воспалительных цитокинов, включая интерлейкины, интерфероны типа I (альфа/бета), интерфероны типа II (гамма), IL-6 и др. [2]. Ген JAK2 расположен на хромосоме 9 человека в локусе p24.1 и состоит из 25 экзонов, кодирует белок из 1132 аминокислот с молекулярной массой 130,7 кДа. В норме наиболее активно ген экспрессируется в кроветворных клетках костного мозга и лимфатических узлов, а его мРНК выявляется в циркулирующих лейкоцитах и тромбоцитах [3].

Гиперактивная передача сигналов JAK в клетках крови характерна для ряда аутоиммунных заболеваний и критически влияет на воспаление и коагуляцию, определяя повышенную тромботическую готовность. Показано, что уровни экспрессии мРНК JAK2 в мононуклеарах венозной крови у пациентов с системной красной волчанкой значительно выше, чем у здоровых людей [2], однако снижались при системном склерозе [7]. Повышенная активность JAK2 вовлечена в патогенез идиопатического легочного фиброза [8].

Ряд мутаций в гене JAK2 приводят к конститутивной, независимой от влияния цитокинов активации этого фермента, и действуют как движущие силы миелопролиферативной неоплазии (МПН), а также участвуют в патогенезе отдельных вариантов острых лейкозов и ряда солидных злокачественных образований. Обсуждается их роль и в развитии возраст-ассоциированных кардиоваскулярных заболеваний [4-6].

Ингибиторы активности JAK находят свое применение не только в терапии хронических миелопролиферативных заболеваний [9], но также при широком спектре различных иммуновоспалительных патологий [10]. Предложено их ис-

пользование при терапии тяжелой инфекции COVID-19 [11]. Как и в случае терапии МПН, при этом остаются вопросы мониторинга ингибирующего действия препаратов на JAK2.

Исходя из представления о соответствии количества экспрессируемых в клетках молекул протеина JAK2 и уровня экспрессии мРНК гена JAK2, в качестве маркера, связанного с активностью этого фермента, предложено использовать тесты количественного определения мРНК JAK2 в циркулирующих клетках крови [2, 7, 8, 12].

Целью настоящей работы явилась разработка оригинальной методики выявления мРНК JAK2 в венозной крови и оценка возможного диагностического значения при хронических онкогематологических заболеваниях.

Материал и методы. В работе были использованы образцы венозной крови 39 здоровых добровольцев и доноров крови (медиана возраста 43 года, 28 женщин, 11 мужчин) и 69 пациентов (медиана возраста 64 года, 27 женщин и 42 мужчины) с подтвержденным диагнозом ХЛЛ – 41 человек, ХМЛ – 16 человек и множественная миелома – 12 человек. Все исследования выполнялись в рамках научного клинического исследования, одобренного локальным этическим комитетом КГБУЗ «Красноярская краевая клиническая больница».

Основную часть образцов крови отбирали в раствор стабилизатора РНК (ООО «Формула гена»). С целью сравнения результатов часть образцов крови отбирали в вакутейнеры с разными антикоагулянтами (ЭДТА, цитрат, гирудин, СТАД), а затем выделяли из них лейкоциты после обработки гемолизирующим раствором и повторной отмывки. Оценивали также стабильность результатов тестирования в пробах через разные временные периоды (3, 6 и 24 час) хранения крови в вакутейнере с ЭДТА при комнатной температуре 18-22°C. Выделение РНК осуществляли с использованием набора реагентов «Рибо-золь-Д» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия).

Разработка метода количественной оценки уровня экспрессии мРНК гена JAK2 методом ПЦР-РВ в образцах венозной крови выполнялась в соответствии с европейскими требованиями MIQE [13]. При разработке оптимальной последовательности праймеров и TaqMan зондов для определения мРНК JAK2 использовали программу Primer3 [14].

Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК с целью исключения этапа обработки ДНКазой. Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) в 25 мкл смеси, содержащей: 100 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 0,5 М КСl, 0,8% Nonidet P-40, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого из дНТФ, 10 мкл кДНК, по 0,3 мкМ праймеров и TaqMan зонда, 1 единицу активности SynTaq ДНК-полимеразы (ООО «НПО Синтол», Россия). Режим амплификации соответствовал следующей программе: предварительный прогрев при 95°C — 5 мин, далее 50 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 60 с, детекция флуоресцентного сигнала на каждом цикле по каналу FAM. В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген ABL1. Расчет уровня относительной экспрессии мРНК гена JAK2 производили по методу $\Delta\Delta Ct$ [15].

Статистическую оценку полученных результатов проводили с использованием пакета программ R.

Результаты. Пример детекции накопления флуоресцентного сигнала представлен на рис. 1.

Линейный диапазон зависимости от разведения пробы с максимально высокой концентрацией представлен на рис. 2.

Вариация между результатами амплификации в повторах предварительно полученных проб кДНК составила 25%. С целью определения внутрисерийной аналитической вариации в одной постановке были проведены 10 исследований аликвот одной и той же пробы крови (табл.1). Аналитическая вариация метода демонстрирует существенный разброс результатов (CV=34,0%), что, однако, сопоставимо с данными литературы о вариации результатов количественной детекции большинства мРНК в образцах крови [16].

Учитывая такой разброс единичных исследований, в последующем при выполнении анализа мы использовали дублирование проб крови, начиная с процедуры выделения РНК, при этом аналитическая вариация между результатами дублей составила 27%.

В целом в выборке 39 образцов крови здоровых добровольцев при выполнении тестирования в дублированных постановках, медиана полученных значений количества мРНК JAK2 относительно экспрессии мРНК ABL составила 1,61 ($C_{25}-C_{75}$: 0,96-3,23).

Одновременно исследовали влияние разных наполнителей, используемых в системах взятия крови и образцами крови, сразу помещенными в стабилизатор РНК. Было ис-

пользовано 10 образцов венозной крови доноров, которые параллельно забирались во время кроводачи в разные вакутейнеры и в раствор со стабилизатором. Полученные результаты (табл. 2) демонстрируют более ранние пороговые циклы при использовании в качестве гена сравнения мРНК ABL и отсутствие значимого влияния отдельных антикоагулянтов.

В табл. 3 представлены результаты сравнения определения уровня мРНК JAK2, полученных при использовании 8-ми проб венозной крови, помещенной в раствор стабилизатора РНК через 2-3 ч после взятия и проб лейкоцитарной взвеси, параллельно выделенной из тех же образцов венозной крови. Различий в полученных результатах не выявлено.

Отдельно было исследовано влияние времени хранения проб крови в вакутейнерах с ЭДТА до их помещения в стабилизирующий раствор на результаты определения экспрессии мРНК JAK2. Представленные в табл. 4 результаты свидетельствуют, что несмотря на то, что пороговые циклы мРНК ABL остаются стабильными 24 ч, пороговые циклы мРНК гена JAK2 со временем увеличиваются. Расчетные значения относительной экспрессии мРНК JAK2 наиболее стабильны в диапазоне 2 – 7 ч после взятия крови в вакутейнер с ЭДТА.

В качестве примера возможного диагностического значения определения мРНК JAK2 были исследованы образцы венозной крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями. На рис. 3 представлены результаты сравнения уровня экспрессии мРНК JAK2 в образцах венозной крови у

Таблица 1

Результаты определения аналитической вариации оценки уровня мРНК JAK2 в лейкоцитарных клетках венозной крови

№ аликвоты	Ct ABL	Ct JAK2	Уровень мJAK2
1	23,3	23,2	1,09
2	23,4	23,2	1,12
3	22,5	23,7	0,45
4	23,1	23,1	0,97
5	22,0	22,7	0,61
6	22,6	22,8	0,86
7	22,6	22,7	0,95
8	23,0	23,2	0,87
9	22,5	23,5	0,51
10	22,3	23,6	0,41
CV			34,0%

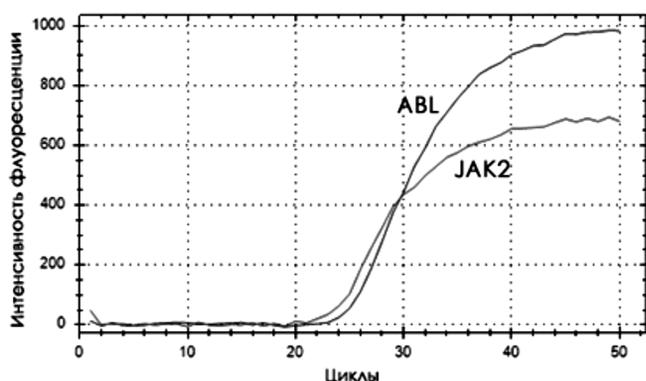


Рис. 1. Пример графиков ПЦР-РВ для ABL и JAK2.

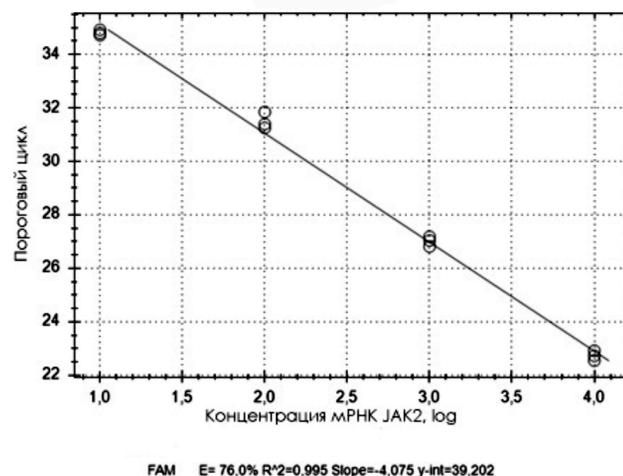


Рис. 2. График зависимости пороговых циклов ПЦР-РВ от разведения кДНК JAK2.

Таблица 2

Влияние наполнителей систем взятия венозной крови на уровень экспрессии мРНК генов- кандидатов в качестве генов «домашнего хозяйства» и мРНК JAK2 у доноров крови

Наполнитель	Ct ABL (min-max)	Ct TBP (min-max)	Ct GUS (min-max)	Ct JAK2 (min-max)	JAK2 (ΔCt к ABL) (Me, C ₂₅ -C ₇₅)
Стабилизатор РНК	25,8 (24,9-26,0)	31,1 (31,0-31,8)	31,3 (30,9-31,6)	29,9 (29,7-30,2)	0,98 (0,67-2,9)
ЭДТА	25,9 (25,1-26,1)	32,04 (30,3-32,3)	31,7 (29,8-32,4)	30,97 (28,96-32,12)	0,82 (0,47-1,59)
СТАД	26,8 (26,1-27,2)	32,18 (31,9-32,5)	32,18 (31,9-32,4)	31,91 (31,35-32,67)	0,7 (0,43-1,52)
Гирудин	26,14 (25,2-26,7)	32,07 (31,0-32,3)	31,83 (30,8-32,7)	31,04 (30,6-32,1)	0,82 (0,36-1,55)
Цитрат	26,1 (25,7-26,9)	31,8 (31,2-32,0)	31,7 (30,6-32,2)	31,06 (30,0-31,98)	0,8 (0,79-1,2)

Таблица 3

Сравнение результатов определения мРНК JAK2 в пробах цельной крови, помещенной в раствор стабилизатора в течение 2 - 3 ч после взятия и результатов параллельного тестирования проб лейкоцитарной взвеси

Показатели	Ct ABL (min-max)	Ct JAK2 (min-max)	JAK2 (Me, C ₂₅ -C ₇₅)	p-уровень
Стабилизатор	24,2 (23,5-29,4)	28,5 (28,0-28,9)	1,7 (0,6-2,6)	0,32
Лейкоциты	22,3 (22,2-22,7)	26,3 (25,7-26,8)	1,4 (1,02-3,3)	

Таблица 4

Влияние времени хранения образцов крови в вакутейнере с ЭДТА при комнатной температуре до помещения в стабилизирующий раствор

Время после взятия крови	Количество проб	Ct ABL (min-max)	Ct JAK2 (min-max)	JAK2 (Me, C ₂₅ -C ₇₅)	p-уровень
5 мин	14	24,9 (23,1-28,9)	30,1 (28,7-37,2)	0,4 (0,01-1,1)	0,003
2-3 ч	20	24,9 (22,4-28,0)	31,6 (29,1-37,9)	0,19 (0,01-1,1)	
6-7 ч	12	24,5 (22,1-26,4)	31,8 (29,5-39,9)	0,18 (0,01-0,9)	
24 ч	22	24,4 (21,9-27,1)	31,78 (28,9-35,5)	0,09 (0,02-1,3)	

пациентов с ХМЛ, ХЛЛ и множественной миеломой. В отличие от пациентов с ХМЛ, в лейкоцитах больных ХЛЛ и миеломой наблюдалось значимое снижение экспрессии мРНК JAK2. При этом отмечается, что у пациентов с ХЛЛ на фоне терапии данный маркер значимо возрастает, хотя и остается сниженным относительно уровня контрольных значений.

Важно отметить, что наблюдаемые сдвиги уровня экспрессии мРНК JAK2 не зависят от уровня циркулирующих лимфоцитов (рис. 4), что свидетельствует об обусловленном лейкомогенезом изменении обмена данной мРНК.

Обсуждение. В настоящей работе впервые предпринята попытка определения количественного уровня мРНК гена JAK2 в образцах венозной крови человека методом ПЦР-РВ. В отличие от многочисленных исследований экспрессии мРНК данного гена в предварительно изолированных клетках, биоптатах или клеточных культурах, непосредственное исследование цельной крови является более удобной и доступной процедурой с точки зрения перспектив внедрения в практику клинической лабораторной диагностики. Кроме того, известно, что сами по себе процедуры предварительной изоляции отдельных клеток крови могут вызывать существенные сдвиги в уровне экспрессии ряда РНК [16]. Выявление связи данного маркера с функционированием внутриклеточных сигнальных систем, зависящих от активности янускиназы, позволит выделять отдельные варианты течения патологических процессов и проводить мониторинг эффективности таргетных препаратов.

Вместе с тем, определяемый уровень мРНК JAK2 в крови является интегральным показателем, отражающим суммарный вклад разных источников этой мРНК, к которым относятся ретикулоциты, гранулоциты, моноциты и тромбоциты, а также эндотелиальные микровезикулы. Судя по результатам сравнительного изучения транскриптома клеток крови, максимальный уровень экспрессии JAK2 наблюдается среди различных субпопуляций лимфоцитов [17], что, очевидно,

отражает активное участие данного фермента в трансляции цитокиновых сигналов. Поскольку уровень мРНК JAK2 в разных клетках крови регулируется относительно независимо, изменение их пропорций в образце цельной крови оказывает безусловное влияние на степень биологической вариабельности данного маркера. Вместе с тем, данный факт несколько не умаляет перспективную диагностическую значимости в том случае, если динамика интегрального показателя отражает особенности патогенеза и коррелирует с эффектом используемой терапии.

Один из краеугольных вопросов внедрения молекулярно-генетических методов в клиническую практику является вопрос их стандартизации и снижения аналитической вариации. В процессе нашей работы было продемонстрировано, что для снижения аналитической вариации необходимо использовать дублирование проб начиная с этапа выделения РНК. Нами также проведена оценка влияния отдельных преаналитических аспектов. Мы не наблюдали существенных различий между результатами тестирования проб крови, помещенной в течение первых часов после ее взятия в раствор стабилизатора РНК и результатами тестирования лейкоцитарной взвеси, полученной параллельно в тех же пробах после воздействия гемолизатора (см. табл. 2, 3). Также не было выявлено явного влияния антикоагулянтов, использованных в качестве наполнителя систем взятия крови (см. табл. 2). Важным фактом для дальнейшей стандартизации метода является определение влияния времени хранения крови до проведения тестирования или до помещения ее в раствор стабилизатора (см. табл. 4). Рекомендуемое время тестирования должно быть ограничено максимально 6 часами после взятия крови в вакутейнер с ЭДТА. Альтернативный вариант должен предусматривать помещение пробы крови в раствор стабилизатора в диапазоне от 30 мин до 6 часов после взятия крови. В соответствии с инструкцией к стабилизатору, собранную в него пробу крови необходимо заморозить и хра-

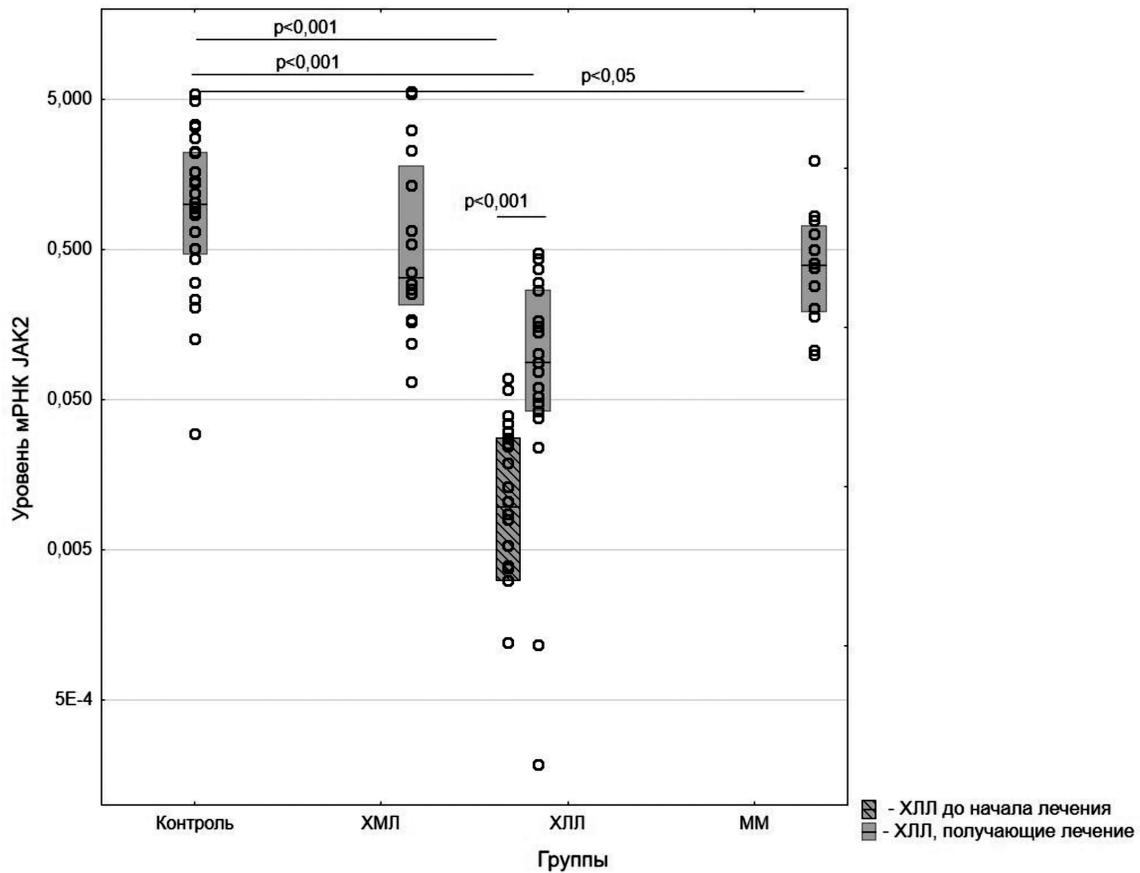


Рис. 3. Сравнительные уровни экспрессии мРНК JAK2 в пробах крови пациентов исследуемых групп.

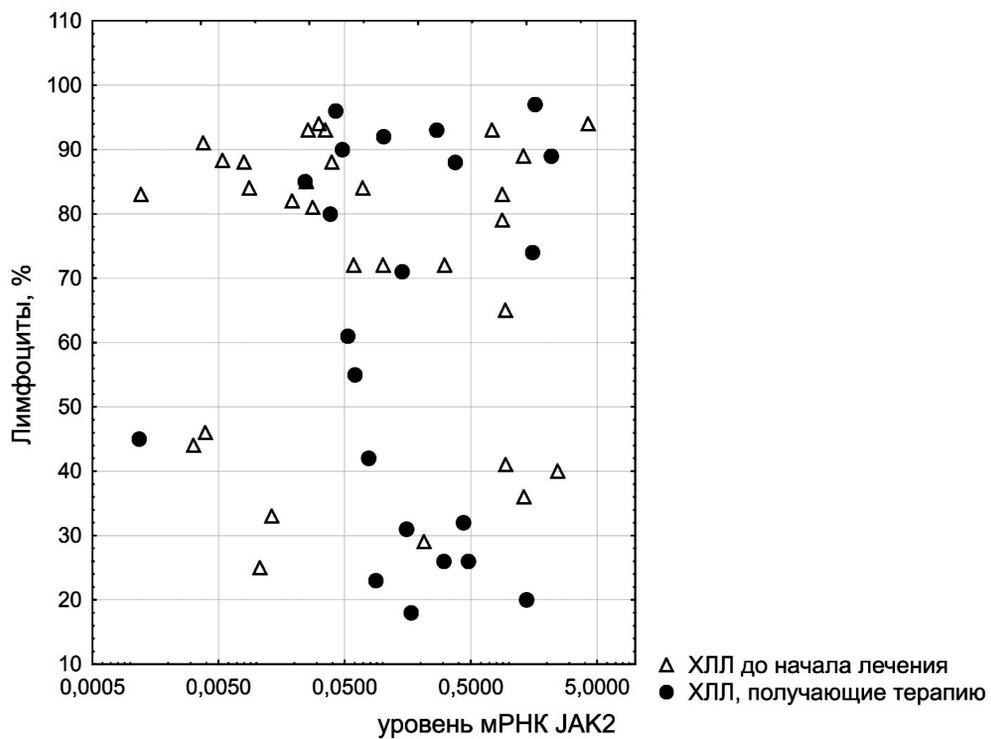


Рис. 4. Отсутствие корреляции уровня лимфоцитов и экспрессии мРНК JAK у пациентов с ХЛЛ.

нить при -18°C до выполнения теста, при этом не допускается повторное замораживание.

В качестве примера возможной диагностической значимости метода определения экспрессии мРНК гена JAK2 в венозной крови было проведено предварительное исследование данного маркера у пациентов с тремя разными онкогематологическими заболеваниями: ХМЛ, ХЛЛ и множественная миелома. В пробах крови пациентов с множественной миеломой, и особенно у пациентов с ХЛЛ до начала терапии, наблюдается существенное снижение экспрессии мРНК JAK2. Данный феномен выявлен впервые и очевидно свидетельствует о нарушении функционирования JAK2-зависимых внутриклеточных регуляторных каскадах в онкотрансформированных лимфоцитах. У большинства пациентов, находящихся на терапии, экспрессия мРНК JAK2 повышалась, хотя медиана значений в этой группе все еще оставалась ниже, чем у здоровых людей. Дальнейшее изучение диагностических возможностей разработанного нами метода предполагает выполнение анализа нескольких последовательных образцов от одних и тех же людей с целью выявления внутри- и межиндивидуальной вариации и определение индивидуальных нормативных значений экспрессии данного гена в клетках крови, а также поиск корреляций сдвигов уровня мРНК JAK2 с проявлениями патологических состояний, включающих нарушения активности янускиназ.

Выводы:

1. Разработан оригинальный метод ПЦР-РВ для количественного определения мРНК JAK2 в образцах венозной крови, соответствующий требованиям системы MIQE и впервые получены значения уровня мРНК JAK2 в цельной крови здоровых людей.

2. Показано отсутствие существенного влияния на уровень мРНК JAK2 различных наполнителей систем взятия крови: ЭДТА, цитрат, гирудин или СТАД.

3. Определен оптимальный период времени хранения образцов в пробирках с ЭДТА для сохранения стабильности мРНК JAK2, составляющий от 0,5 до 6 часов до начала исследования или до помещения пробы в раствор стабилизатора РНК.

4. Выявлено снижение уровня мРНК JAK2 в пробах венозной крови у пациентов с первичными ХЛЛ и множественной миеломой, но не при ХМЛ. Уровень маркера после начала терапии у пациентов с ХЛЛ значительно повышался, хотя и не возвращался в диапазон, характерный для здоровых людей.

5. Определение мРНК JAK2 будет полезным для уточнения особенностей патогенеза отдельных заболеваний, вовлекающих нарушение активности янускиназ и может стать дополнительным маркером прогноза и оценки эффективности терапии.

Финансирование. Исследование проведено в рамках инициативной темы НИР «Исследование диагностического значения микроРНК *miR-155* и ее ассоциации с уровнем мРНК *HIF 1a* и *2a* в клетках крови пациентов при ХЛЛ, ХМЛ и Rh-негативных миелолифферативных новообразованиях № ГР АААА-А18-118031390161-0».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 7-9, 11-17 см. REFERENCES)

- Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Грищенко Д.А., Ткаченко О.А., Марцинкевич Т.Л. Частота выявления соматической мутации V617F в гене JAK2 у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. *Терапевтический архив*. 2019;91(7): 27-30.
- Насонов Е.Л., Лила А.М. Ингибиторы Янус-киназ при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях: новые возможности и перспективы. *Научно-практическая ревматология*. 2019;57(1):8-16.

REFERENCES

- O'Shea J.J., Holland S.M., Staudt L.M. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:161–70. DOI:10.1056/NEJMra1202117.
- Qian D., Liu L., Zhu T., Wen L., Zhu Z., Yin X. et al. JAK2 and PTPRC mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 2020;39:443–8. DOI: 10.1007/s10067-019-04778-w.
- Nauroy P., Delhommeau F., Baklouti F. JAK2V617F mRNA metabolism in myeloproliferative neoplasm cell lines. *Blood Cancer J.* 2014;4(6):e222. DOI:10.1038/bcj.2014.43.
- Perner F., Perner C., Ernst T., Heidel F.H. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells.* 2019;8(8):854. DOI:10.3390/cells8080854.
- Miller C.P., Thorpe J.D., Kortum A.N., Coy C.M., Cheng W.Y., Ou Yang, T.H. et al. JAK2 expression is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and improved breast cancer outcomes: implications for evaluating JAK2 inhibitors. *Cancer Immunol. Res.* 2014;2(4):301-6. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-13-0189.
- Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Grishchenko D.A., Tkachenko O.A., Martsinkevich T.L. Somatic mutation of the V617F JAK2 gene in patients of the cardiovascular diseases. *Tera-pevticheskiy Arkhiv*. 2019; 91(7): 25-8. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000245. (in Russian)
- Vreća M., Zeković A., Damjanov N., Andjelković M., Ugrin M., Pavlović S. et al. Expression of TLR7, TLR9, JAK2, and STAT3 genes in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *J. Appl. Genet.* 2018;59(1):59-66. DOI: 10.1007/s13353-017-0415-4. PMID: 29147913.
- Milara J., Hernandez G., Ballester B., Morell A., Roger I., Montero P. et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 2018;19(1):24. DOI: 10.1186/s12931-018-0728-9.
- Bose P., Verstovsek S. JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms: what is next? *Blood*. 2017;130(2):115-25. DOI:10.1182/blood-2017-04-742288.
- Nasonov E.L., Lila A.M. Janus kinase inhibitors in immunoinflammatory rheumatic diseases: new opportunities and prospects. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2019;57(1): 8-16. DOI: 10.14412/1995-4484-2019-8-16. (in Russian)
- Vannucchi A.M., Sordi B., Moretini A., Nozzoli C., Poggesi L., Pieralli F. et al. Compassionate use of JAK1/2 inhibitor ruxolitinib for severe COVID-19: a prospective observational study. *Leukemia*. 2020;1-13. DOI:10.1038/s41375-020-01018-y.
- Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Komina A.V., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A. et al. A Strong Correlation of the HIF-1 α mRNA Expression Level with the Total Expression of JAK2, As Well As a Decrease in Their Level Is Observed in Leukocytes of Patients with MPN and Lymphoproliferative Cancer. *Blood*. 2019; 134 (Supplement 1):5032.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4): 611-22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797. PMID: 19246619.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15): e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method.* 2001;25: 402–8.
- Whitney A.R., Diehn M., Popper S.J., Alizadeh A.A., Boldrick J.C., Relman D.A. et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2003;100(4):1896-1901. DOI:10.1073/pnas.252784499.
- The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000096968-JAK2> (accessed 28 January 2021).

Поступила 02.02.21

Принята к печати 09.04.21