

Учредитель:
ООО «Издательская группа
«Медиа Сфера»

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 68
7 • 2023

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИЮЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Издатель:

**Закрытое акционерное общество
"ЭКОлаб"**

142530, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1.

Телефон редакции:

8-916-201-80-47,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

Художественный редактор

Ч.А. Сафаров

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

Сдано в набор 20.06.2023.

Подписано в печать 03.07.2023.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 8,95.

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>

E-mail: cingiz.62@mail.ru

ПИ № ФС77-37760 от 07. 10. 2009 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память
компью- тера либо воспроизведена любым
способом без предварительного письменного
разреше- ния издателя.

Журнал представлен в базе данных
Российско-го индекса научного цитирования
(РИНЦ) и в следующих международных
информационно-справочных изданиях:
Abstracts of Micology, Adis International Ltd
Reactions Weekly, Chemical Ab-stracts (Print),
Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts
(Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV
Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals,
Index Medicus, Index to Dental Literature, OCLC
Article First, Reactions Weekly (Print), Thomson
Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson
Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi
Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс Ф81645 — для подписчиков

Подписка через Интернет:

https://www.akc.ru/itm/clinic_heskey_a-laboratornay_adiagnostika/

Подписка на электронную версию:

https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849

ISSN 0869-2084.

Клин. лаб. диагностика. 2023. №7.

381-442.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

А.Ю. МИРОНОВ, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Харсеева Г.Г., д.м.н., профессор, (Ростов-на-Дону, Россия);

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР:

Чеботарь И.В., д.м.н. (Москва, Россия);

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Андреева И.И., д.м.н., доцент (Ростов-на-Дону, Россия);

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Гильманов А.Ж., д.м.н., профессор (Уфа, Россия);

Добровольский А.Б., д.б.н., профессор (Москва, Россия);

Иванов А.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Марданлы С.Г., д.м.н., профессор (Электрогорск, Россия);

Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Арипов А.Н., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);

Вавилова Т.В., д.м.н., профессор (Санкт-Петербурге, Россия);

Горбунов В.А., к.м.н., доцент (Минск, Беларусь);

Долгих Т.И., д.м.н., профессор (Омск, Россия);

Ельчанинова С.А., д.м.н., профессор (Барнаул, Россия);

Индутный А.В., д.м.н., доцент (Омск, Россия);

Керимов С.Г., д.м.н., профессор (Баку, Азербайджан);

Козлов А.В., д.м.н., профессор (Санкт-Петербурге, Россия);

Кочетов А.Г., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Кушлинский Н.Е., академик РАН, д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Маматкулов И.Х., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);

Первушин Ю.В., к.м.н., профессор (Ставрополь, Россия);

Пикалов И.В., д.м.н., профессор (Новосибирск, Россия);

Сергеев А.Ю., д.м.н., профессор (Томск, Россия);

Талыбов Т.Г., академик НАН, д.б.н., профессор (Нахчыван, Азербайджан);

Тарасенко О.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Тартаковский И.С., д.б.н., профессор (Москва, Россия);

Цвиренко С.В., д.м.н., профессор (Екатеринбург, Россия);

Шибанов А.Н., к.ф.-м.н. (Москва, Россия);

Эмануэль В.Л., д.м.н., профессор (Санкт-Петербурге, Россия);

Яровая Г.А., д.б.н., профессор (Москва., Россия)

Founders:
LLC "Publishing Group
"Media Sphere"

Publisher:
Closed joint-stock
company "ECOLab"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 68
7 • 2023

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL
Russian Clinical Laboratory Diagnostics

JULY

The Journal is founded in 1955.

Publisher:
Closed joint-stock company "ECOLab"
142530, Moscow region, Elektrogorsk,
st. Budyonny, d. 1.

Editorial office phone:
8-916-201-80-47,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

Art editor Ch.A. Safarov

The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>
E-mail: cingiz.62@mail.ru

ПИ № ФС77-37760 от 07. 10. 2009 г.

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
Miology, Adis International Ltd Reactions
Weekly, Chemi-cal Abstracts (print),
Chemical Titles, EBCO-host Biological
Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE,
Elsevier BV Scopus, Excerpta Med-ica,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to
Dental Literature, OCLC Article First, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's
International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

Editor-in-Chief:

A.Yu. MIRONOV, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*)

DEPUTIE EDITOR-IN-CHIEF:

Galina G. Kharseeva, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

SCIENTIFIC EDITOR:

Igor V. Chebotar, Dr. Sci. (Med.) (*Moscow, Russia*);

EXECUTIVE SECRETARY:

Irina I. Andreeva, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

EDITORIAL BOARD MEMBERS:

Aleksandr Zh. Gilmanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Ufa, Russia*);

Anatoliy B. Dobrovolsky, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Aleksey A. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Seifaddin G. Mardany, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Elektrogorsk, Russia*);

Areg A. Totolyan, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*)

EDITORIAL COUNCIL MEMBERS:

Abdumalik N. Aripov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Tatiana V. Vavilova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Vladimir A. Gorbunov, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor (*Minsk, Belarus*);

Tatiana I. Dolgikh, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Omsk, Russia*);

Svetlana A. Elchaninova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Barnaul, Russia*);

Anton V. Indutny, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor (*Omsk, Russia*);

Sanan G. Kerimov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Baku, Azerbaijan*);

Anton V. Kozlov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Anatoliy G. Kochetov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Nikolay E. Kushlinskii, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Ibrokhim Kh. Mamatkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Iuriy V. Pervushin, Cand. Sci. (Med.), Professor (*Stavropol, Russia*);

Iliia V. Pikalov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Novosibirsk, Russia*);

Aleksey Yu. Sergeev, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tomsk, Russia*);

Tariel G. Talybov, the NAN Academician, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Nakhchivan, Azerbaijan*);

Olga A. Tarasenko, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Igor S. Tartakovskiy, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Sergey V. Tsvirenko, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Ekaterinburg, Russia*);

Aleksandr N. Shibanov, Cand. Sci. (Ph-m.) (*Moscow, Russia*);

Vladimir L. Emanuel, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Galina A. Yarovaya, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*)

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г.*
Мозговой нейротрофический фактор в качестве нового кардиоваскулярного биологического маркера (обзор литературы) 385
- Иксанова А.М., Ожован И.М., Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Миронов А.Ю.*
Антимикробная активность сыворотки крови и её взаимосвязь с показателями общего клинического анализа крови 395

ЦИТОЛОГИЯ

- Славнова Е.Н., Водолеев А.С., Степанов С.О., Пестин И.С., Размахаяев Г.С., Власов М.П.*
Цитологическая диагностика нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (клинические наблюдения) 401

ИММУНОЛОГИЯ

- Магбулова Н.А., Левицкая Ю.В., Джамбекова Г.С., Рузиев Б.Т., Захидова Н.Э., Исматова М.К., Руми Л.Р., Махкамова Р.И., Джураева М.К., Гариб Ф.Ю., Гариб В.Ф.*
Молекула пыльцы солянки (*Salsola kali*) Sal k 5 - мажорный аллерген, рекомендованный к включению в тесты РАМД@ 407

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Шипицына И. В., Осипова Е. В.*
Ингибирование стафилококковой биопленки трипсином и ципрофлоксацином 412
- Гостев В.В., Сидоренко С.В.*
Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы) 418

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Синявкин Д.О., Ермолаева Е.А., Сайфуллин Р.Ф., Байков Д.А., Бычичко Д.Ю.*
Результаты проведения трансфера референсных интервалов для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови беременных женщин с аналитических платформ Siemens Immulite 2000 XPi и Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i 428

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И.*
Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса гепатита С в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией 437

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Подписку на печатное издание журнала
«Клиническая лабораторная диагностика»
можно оформить через агентство «Книга-Сервис».
Подписной индекс 81645 или через
сайт журнала clinlabdia.ru.
На электронную версию журнала через elibrary.ru

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G.
Brain-derived neurotrophic factor as a new cardiovascular biological marker
(review of literature) 385

*Iksanova A.M., Arzumanian V.G., Ojovan I.M., Kolyganova T.I.,
Samoylikov P.V., Konanykhina S.Yu., Mironov A.Yu.*
Antimicrobial activity of blood serum and its association with indicators of
clinical blood analysis 395

CYTOLOGY

*Slavnova E.N., Vodoleev A.S., Stepanov S.O., Pestin I.S., Razmakhaev G.S.,
Vlasov M.P.*
Cytological diagnosis of pancreas neuroendocrine tumors (clinical reports) 401

IMMUNOLOGY

*Magbulova N.A., Levitskaya Yu.V., Djambekova G.S., Ruziev B.T., Zakhidova N.E.,
Ismatova M.K., Rumi L.R., Makhkamova R.I., Juraeva M.K., Garib F.Yu., Garib V.F.*
Salsola kali pollen Sal k 5 molecule is the major allergen and recommended for
inclusion in PAMD@ tools 407

MICROBIOLOGY

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.
Inhibition of staphylococcal biofilm by trypsin and ciprofloxacin 412

Gostev V.V., Sidorenko S.V.
Heteroresistance: clinical implications and detection methods (review of literature) 418

ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

*Sinyavkin D.O., Ermolaeva E.A., Sayfullin R.F., Baykov D.A.,
Bychichko D.Yu.*
The results of the transfer of reference intervals for the serum concentration of β -hCG
in pregnant women from analytical platforms Siemens Immulite 2000 XPI and Ortho
Vitros 3600 to the Mindray CL-2000i 428

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I.
Development of a reagent kit for qualitative detection of Hepatitis C virus
(HCV) RNA in clinical material by real-time PCR with
hybridization-fluorescence detection 437

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г.

МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР В КАЧЕСТВЕ НОВОГО КАРДИОВАСКУЛЯРНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются наиболее частой причиной преждевременной смерти. Актуальной задачей современной кардиологии является поиск и изучение новых сердечно-сосудистых биологических маркеров. В настоящее время имеются доступные современные технологии для идентификации новых биомаркеров, вследствие чего целесообразна разработка мультибиомаркерной модели диагностики и прогнозирования течения ССЗ. Цель представленного обзора – рассмотреть мозговой нейротрофический фактор BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) в качестве нового кардиоваскулярного биомаркера. Проведенные к настоящему времени исследования, посвященные BDNF, указывают на потенциально диагностическую и прогностическую значимость оценки данного маркера у пациентов с кардиоваскулярной патологией. Благотворное влияние BDNF на состояние сердца и сосудов позволяют рассматривать данный маркер в качестве терапевтической мишени. Комбинация BDNF с другими биологическими маркерами, в частности, BNP и его предшественником, возможно, повысит его прогностическое значение. Тем не менее, вопросы, связанные с серийным тестированием данного маркера, в том числе и в условиях мультимаркерной панели, нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: биологические маркеры; сердечно-сосудистые заболевания; мозговой нейротрофический фактор; обзор.

Для цитирования: Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г. Мозговой нейротрофический фактор в качестве нового кардиоваскулярного биологического маркера (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (7): 385-394. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-385-394>.

Для корреспонденции: Алиева Амина Магомедовна, канд. мед. наук, доц. каф. госпитальной терапии им. академика Г.И. Сторожакова; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.03.2023

Принята к печати 10.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G.

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AS A NEW CARDIOVASCULAR BIOLOGICAL MARKER (REVIEW OF LITERATURE)

Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia

Cardiovascular disease (CVD) is the most frequent cause of premature death. An urgent task of modern cardiology is the search and study of new cardiovascular biological markers. Currently, there are available modern technologies for the identification of new biomarkers; therefore, it is advisable to develop a multibiomarker model for the diagnosis and prediction of CVD course. The aim of this review is to consider Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) as a new cardiovascular biomarker. The studies on BDNF conducted to date indicate the potential diagnostic and prognostic significance of the assessment of this marker in patients with cardiovascular pathology. The beneficial effects of BDNF on cardiac and vascular health allow us to consider this marker as a therapeutic target. Combination of BDNF with other biological markers, in particular BNP and its precursor, would probably increase its prognostic value. Nevertheless, issues related to serial testing of this marker, including multimarker panel conditions, need further study.

Key words: biological markers; cardiovascular diseases; cerebral neurotrophic factor; review.

For citation: Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G.

Brain-derived neurotrophic factor as a new cardiovascular biological marker (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7): 385-394 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-385-394>.

For correspondence: Alieva Amina Magomedovna, M.D., Associate Professor of the department of Hospital Therapy named after academician G.I. Storozhakov; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Information about authors: *The authors declare absence of conflict of interests.*

Alieva A.M., <https://orcid.org/0000-0001-5416-8579>;
Teplova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7181-4680>;
Baykova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-0886-6290>;
Kotikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5352-8499>;
Nikitin I.G., <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 23.03.2023

Accepted 10.04.2023

Published 03.07.2023

Введение. Согласно данным Американской кардиологической ассоциации (АНА) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются наиболее частой причиной преждевременной смерти [1]. Актуальной задачей современной кардиологии является поиск и изучение новых сердечно-сосудистых биологических маркеров [2, 3]. Определение концентрации биомаркеров в крови является доступным методом диагностики и мониторинга состояния больного [2, 3]. Благодаря оценке биомаркеров клиницисты имеют возможность диагностировать болезнь на ее ранней стадии развития еще до возникновения тяжелой симптоматики или значимых структурных изменений органов [2 - 5]. Весьма важным аспектом использования биомаркеров у пациентов с ССЗ служит «биомониторинг» на фоне проводимого лечения. Волнообразное течение сердечно-сосудистой патологии с периодами ремиссии и прогрессирования заболевания обуславливает необходимость постоянного контроля состояния пациента и часто сопряжено с трудностями коррекции терапии [2 - 5]. Использование биомаркеров для оценки эффективности лечения или для выявления доклинического ухудшения позволяет существенно уменьшить вероятность развития сердечно-сосудистых осложнений (ССО) [2, 3]. Кроме того, биомаркеры дают представление о весьма сложных патофизиологических процессах в человеческом организме и позволяют выявить терапевтические мишени для патогенетического варианта лечения [2, 3].

Цель представленного обзора – рассмотреть мозговой нейротрофический фактор BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) в качестве нового кардиоваскулярного биомаркера.

Методологический подход. В статье представлена литература, имеющая отношение к роли биологического маркера BDNF при кардиоваскулярной патологии. Мы провели анализ литературных источников, включавший все релевантные публикации до 17.03.2023 года, в базах данных PubMed, РИНЦ, MedLine, Google Scholar, Science Direct. При поиске статей использовали следующие ключевые слова: биологические маркеры, сердечно-сосудистые заболевания, мозговой нейротрофический фактор, biological markers, cardiovascular diseases, brain-derived neurotrophic factor. Списки литературы из определенных статей были также просмотрены для выявления дополнительных релевантных ссылок.

Биология BDNF. Семейство нейротрофинов NTs (neurotrophins) представлено фактором роста не-

рвов NGF (Nerve Growth Factor), BDNF, нейротрофином-3 (neurotrophin-3, NT-3) и нейротрофином-4/5 (neurotrophin-4/5, NT-4/5) [6]. NTs регулируют пролиферацию, дифференцировку, выживание и гибель нейронных и глиальных клеток [7]. В 1950-х годах был идентифицирован первый белок из семейства NTs – NGF. Позже, уже в 1989 году, из головного мозга свиньи был выделен второй белок – BDNF. Вскоре была изучена его структура [8]. В 1993 году экспрессия BDNF была обнаружена и в сердечно-сосудистой системе (ССС) [9]. В настоящее время хорошо известно, что BDNF является наиболее распространенным эндогенным нейротрофическим фактором в человеческом организме [6, 7].

В головном мозге BDNF участвует в нейропластичности, выживании нейронов, образовании новых синапсов, дендритном ветвлении и модуляции профилей, возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров [10, 11]. BDNF активен на всех стадиях развития и старения организма [10]. Экспериментальные мыши, лишённые BDNF, редко достигают зрелого возраста [12].

BDNF также присутствует в кишечнике, тимусе и селезенке [13]. Около 90% BDNF в крови находятся в тромбоцитах [10]. Все нейротрофические факторы являются полипептидами размером от 100 до 150 аминокислотных остатков. BDNF на 50% идентичен по своей структуре с другими NTs [8]. Ген BDNF человека локализован на 11-й хромосоме в области p14.1, состоит из 11 экзонов и 9 промоторов. Наиболее широко изученным однонуклеотидным полиморфизмом гена BDNF является полиморфизм Val66Met, также известный как полиморфизм rs6265 или G196A [14]. Экспрессия гена BDNF регулируется широким спектром эндогенных и экзогенных стимулов. BDNF транслируется как пронейротрофин (pro-BDNF), который может быть расщеплен в зрелый BDNF в цитоплазме эндопротеазами или во внеклеточном матриксе плазмином или матриксными металлопротеиназами (matrix metalloproteinases, MMP) [10].

Биологические эффекты BDNF опосредованы трансмембранной тропомиозин-связанной киназой B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB). С одной стороны, связывание зрелого BDNF с рецептором TrkB может вызвать аутофосфорилирование остатка тирозина во внутриклеточном домене рецептора и активировать нисходящие сигнальные пути, связанные с нейрогенезом и нейропластичностью [15]. С другой стороны, связывание pro-BDNF с рецептором p75 (рецептор фактора роста нервов с низким родством/low-affinity

nerve growth factor receptor (LNGFR)) опосредует процессы, противоположные зрелому BDNF [16]. На сегодняшний день было обнаружено, что несколько сигнальных путей регулируются BDNF/TrkB: PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase, фосфатидилинозитол-3-киназа)/Akt (protein kinase B, протеинкиназа B), митоген-активированная протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase, MAPK), фосфоинозитид фосфолипаза C (phosphoinositide phospholipase C, PLC γ), ядерный фактор κ B (каппа B nuclear factor, NF- κ B) и др. [6 - 8].

Одним из наиболее известных агонистов TrkB-рецептора является соединение из группы флавоноидов – 7,8-дигидроксифлавонон (7,8-dihydroxyflavone, 7,8-DHF). Это соединение обратило на себя внимание в процессе идентификации молекул, способных имитировать действие BDNF, миметиков мозгового нейротрофического фактора [17]. Согласно данным V. Gupta и соавт. [18], 7,8-DHF активировал передачу сигналов TrkB и защищал ганглиозные клетки сетчатки от эксайтотоксического и окислительного стресса, усиливая выживаемость клеток Akt и киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases, ERK1 и ERK2). J. Kang и соавт. [19] установили, что 7,8-DHF подавляет индуцированное перекисью водорода повреждение миоцитов C2C12 путем поглощения активных форм кислорода (АФК) и активации сигнальных путей PI3K/Akt и ERK. Своевременное начатое лечение 7,8-DHF защищало незрелые клетки сетчатки от гипоксически-ишемического поражения путем модуляции сигнального пути MAPK/ERK [20]. Напротив, есть данные о том, что 7,8-DHF не влияет на сигналы ERK [11]. В исследовании H. Park и соавт. [22] описано ингибирование MAPK под действием 7,8-DHF. 7,8-DHF ингибировал воспаление, вызванное липополисахаридами, отрицательно регулируя активацию NF- κ B и MAPK. Согласно данным X. Han и соавт. [23], 7,8-DHF защищает клеточную линию PC12 от негативного влияния 6-гидроксидофамина путем модулирования путей PI3K/Akt и c-Jun n-терминальной киназы (c-Jun n-terminal kinase, JNK). Следует отметить, что указанные исследования изучали роль BDNF/TrkB в центральной нервной системе (ЦНС).

Биологический «портрет» системы BDNF/TrkB многообразный и противоречивый, а ее роль при сердечно-сосудистых заболеваниях полностью не выяснена. Согласно данным J. Zhao и соавт. [24], 7,8-DHF активирует рецептор TrkB и уменьшает токсическое влияние доксорубина (doxorubicin, DOX) на клетки сердца путем активации Akt и ингибирования ERK. Более того, 7,8-DHF уменьшал ишемическое повреждение миокарда путем активации Akt и предотвращал чрезмерное деление митохондрий [25]. Внутривенное введение 7,8-DHF вызывало антигипертензивный эффект у спонтанно-гипертензивных крыс вследствие вазодилатирующего эффекта [26]. Эндотелиальные клетки легочной артерии человека экспрессировали и секретировали BDNF в ответ на гипоксию, которая индуцировала экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) [27]. Необходимо провести дополнительные

работы, чтобы всесторонне прояснить роль 7,8-DHF в сердечно-сосудистой системе, что поможет понять молекулярные механизмы BDNF как в сердечных, так и в сосудистых клетках.

BDNF регулирует сокращение кардиомиоцитов и оказывает положительное влияние на сердечную функцию [28, 29]. Передача сигналов BDNF/ TrkB представляет собой путь, по которому периферическая нервная система напрямую и тонически влияет на функцию миокарда параллельно с β -адренергической системой [28]. Передача сигналов BDNF/TrkB необходима для нормального сокращения сердца и его расслабления. G. Fulgenzi и соавт. [29] сообщили, что сердечный BDNF участвует в сокращении сердца посредством активации TrkB.T1. Делеция TrkB.T1 в кардиомиоцитах вызывала дисрегулируемую передачу сигналов кальция и кардиомиопатию.

BDNF/TrkB уменьшал ишемическое повреждение сердца и апоптоз кардиомиоцитов, регулируя семейство каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (transient receptor potential, TRPM)-TRPC3/6 [30]. Тем не менее, другие исследования показали, что BDNF может усугубить воспаление в сердце стареющих крыс [31, 32]. Однако почему BDNF играет разные роли у молодых и старых крыс, остается не совсем понятным. Таким образом, требуется больше работ для дальнейшего изучения роли BDNF/TrkB при сердечном воспалении и старении. Основываясь на этих выводах, потенциальная роль BDNF при ишемии привлекает все больше и больше внимания. Тем не менее, молекулярный механизм BDNF в защите миокарда от ишемии должен быть прояснен более убедительными доказательствами.

Влияние BDNF на развитие сердца было впервые выявлено при изучении мутантных мышей, у которых отсутствовал BDNF. Эти мыши продемонстрировали раннюю постнатальную летальность [33]. Кроме того, у мышей с дефицитом BDNF наблюдались дефекты межпредсердной перегородки и выраженная хрупкость внутримиекардиальных сосудов [33]. Ультроструктурный анализ сердца мышей с дефицитом BDNF показал, что BDNF способствует стабилизации сердечных артериол и капилляров посредством воздействия на TrkB экспрессирующие эндотелиальные клетки и перicytes/гладкомышечные клетки сосудов [33]. Сверхэкспрессия BDNF в развивающемся сердце мышей приводила к гиперваскуляризации и увеличению плотности капилляров [33]. Таким образом, эти исследования показывают, что BDNF способствует выживанию эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клеток в сердце в позднем эмбриогенезе.

Эмбрионы, лишенные экспрессии TrkB, демонстрируют уменьшение количества субэпикардальных сосудов на поздних сроках беременности [34]. Механизм, лежащий в основе сосудистой недостаточности, которая приводит к поздней гестационной летальности, по-видимому, обусловлен уменьшением перicytes [35, 36]. Тканеспецифическая делеция TrkB в перicytes/гладкомышечных клетках сосудов приводила к нарушению функции перicytes капилляров сердца, однако сосудистые дефекты были не

такими серьезными, как у мышей с отсутствием TrkB [36].

В плазме и сыворотке крови концентрация BDNF имеет разные значения, что обусловлено дегрануляцией тромбоцитов и, как следствие, повышением уровня белка в крови. В плазме крови концентрация BDNF составляет не более нескольких пикограмм на миллилитр (пг/мл) [8]. До сих пор неясно, отражают ли уровни белка BDNF, измеренные в образцах сыворотки, уровни BDNF в мозге, поскольку исследования на животных моделях дали противоречивые результаты [10].

В настоящее время часто используемым набором для количественного определения BDNF в образцах супернатантов клеточных культур, сыворотки, плазмы крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) является Human BDNF Quantikine ELISA Kit (RnD Systems, США). Диапазон измерения составляет 20–4000 пг/мл. Аналитическая чувствительность составляет 20 пг/мл.

Роль BDNF/TrkB при сердечно-сосудистых заболеваниях. В настоящее время установлена важная роль оси BDNF/TrkB при сердечно-сосудистых заболеваниях (см. рисунок, см. таблицу).



Роль оси BDNF/TrkB при сердечно-сосудистой патологии.

Концентрация BDNF в сыворотке крови значительно ниже у больных с ИБС, чем у лиц контрольной группы [37]. Более высокий уровень BDNF в сыворотке крови связан со снижением риска сердечно-сосудистых заболеваний и смертности [38]. Уровни BDNF в плазме крови снижены у пациентов с сердечной недостаточностью и связаны с ее тяжестью [40]. Снижение сывороточных концентраций BDNF значительно связано с неблагоприятными исходами у пациентов с СН [41, 42]. Уровень BDNF в сыворотке

крови при выписке из стационара может быть полезным прогностическим биомаркером у пациентов с СН [43]. Кроме того, снижение уровня BDNF в сыворотке связано с непереносимостью физических нагрузок у пациентов с СН [44]. Концентрация BDNF в сыворотке крови связана с возникновением депрессии у пациентов с ишемической болезнью сердца [39]. Сывороточный уровень BDNF снижен у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и депрессией [45]. Таким образом, BDNF, возможно, является потенциальным диагностическим и прогностическим биомаркером при ССЗ.

BDNF/TrkB и ишемическая болезнь сердца. Y. Liu и соавт. [46] обнаружили, что интрамиокардиальная инъекция BDNF индуцировала ангиогенез при инфаркте миокарда (ИМ). Исследователи также установили, что одновременная инъекция основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, BFGF) и BDNF значительно увеличивала микрососудистую плотность и улучшала сердечную функцию по сравнению с введением только BFGF.

Согласно данным J. Hiltunen и соавт. [47], после ишемии-реперфузии экспрессия BDNF в миокарде левого желудочка (ЛЖ) увеличилась в два раза.

J. Ejiri и соавт. [48] обнаружили, что рекомбинантный BDNF значительно усиливал активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы (НАДФН-оксидаза, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX) и генерацию АФК в культивируемых клетках гладких мышц коронарной артерии (КА) человека. Также исследователи отметили достоверно более высокий уровень BDNF в плазме крови у пациентов с нестабильной стенокардией по сравнению с больными со стабильной стенокардией.

Результаты исследования S. Okada и соавт. [49] свидетельствуют о том, что при инфаркте миокарда экспрессия BDNF активируется нервными сигналами от сердца и BDNF защищает миокард от ишемического повреждения.

В исследовании K. Monisha и соавт. [37] определялись сывороточные уровни BDNF у 221 пациентов с ИБС (группа контроля – 105 человек без ИБС). Уровень BDNF в сыворотке крови был значительно ниже у пациентов с ИБС ($30,69 \pm 5,45$ нг/мл), чем у лиц контрольной группы ($46,58 \pm 7,95$ нг/мл). Многофакторный регрессионный анализ показал, что при ишемической болезни сердца нейтрофилы, общий холестерин, индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) и отношение максимальных скоростей раннего и позднего наполнения трансмитрального кровотока (Е/А) были связаны с низким уровнем BDNF.

A. Sustar и соавт. [50] провели анализ плазменных концентраций BDNF и полиморфизма BDNF Val66Met у 208 пациентов с ИБС и 156 здоровых лиц контрольной группы. Концентрация BDNF в плазме крови была значительно ($p < 0,01$) снижена у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой, и на нее не влияли пол, возраст, курение или наличие полиморфизма BDNF Val66Met. Наличие полиморфизма BDNF Val66Met было достоверно связано с уровнем общего холестерина ($p = 0,004$), липопроте-

Циркулирующий BDNF как потенциальный биологический маркер при сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваниях (данные некоторых клинических исследований)

Заболевание	Биологический материал	Полученные результаты	Источник литературы
Ишемическая болезнь сердца	Сыворотка	BDNF значительно ниже у пациентов с ИБС по сравнению с лицами контрольной группы	Monisha K. и соавт. [37]
Сердечно-сосудистые заболевания	Сыворотка	Более высокий уровень BDNF связан со снижением риска ССЗ и смертности	Kaess B. и соавт. [38]
Депрессия при ИБС	Плазма	Снижение концентрации BDNF связано с возникновением депрессии при ИБС	Han W. и соавт. [39]
Сердечная недостаточность	Плазма	Низкая концентрация BDNF связана с тяжестью СН	Takashio S. и соавт. [40]
Сердечная недостаточность	Сыворотка	Пониженный уровень BDNF прогнозирует неблагоприятные клинические исходы у пациентов с СН	Fukushima A. и соавт. [41]
Сердечная недостаточность	Сыворотка	Низкий уровень BDNF независимо связан с повышенным риском неблагоприятных сердечных событий	Kadowaki S. и соавт. [42]
Сердечная недостаточность	Сыворотка	Уровень BDNF при выписке из стационара может быть полезным прогностическим биомаркером у пациентов с СН	Shibata A. и соавт. [43]
Сердечная недостаточность	Сыворотка	Снижение концентрации BDNF коррелирует с переносимостью физических нагрузок у пациентов с СН	Fukushima A. и соавт. [44]
Сахарный диабет 2-го типа (СД2) с депрессией	Сыворотка	Отмечено снижение уровня BDNF у пациентов с СД2 и депрессией	Prabu P. и соавт. [45]

инов низкой плотности ($p=0,006$) и диастолическим артериальным давлением ($p=0,018$) у больных с ИБС и количеством тромбоцитов ($p=0,003$) у здоровых лиц. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали более низкую концентрацию BDNF в плазме крови у пациентов с ИБС, что позволяет предположить, что данный маркер может быть связан с патогенезом ишемической болезни сердца. Для подтверждения этих выводов необходимо провести лонгитюдные исследования с большими выборками.

Целью исследования F. Esmaeili и соавт. [51] была оценка ассоциаций статуса метилирования BDNF, его уровня в сыворотке крови с тяжестью ИБС (84 пациента с ИБС без сахарного диабета со стенозом не менее 50% в одной из крупных коронарных артерий, группа контроля – 62 пациента без ИБС). Метилирование гена BDNF было значительно выше в группе ИБС, чем в группе без ИБС. После поправки на смешанные факторы, гиперметилирование гена BDNF увеличивало риск ишемической болезни сердца в общей популяции (отношение шансов (ОШ)=2,769; 95% доверительный интервал (ДИ), 1,033-7,423; $p=0,043$). Гиперметилирование гена BDNF было выше у пациентов с тяжелой ИБС, чем у пациентов с легкой ИБС. Уровень BDNF в сыворотке крови не отличался у пациентов с ИБС без СД и контрольных групп. Данные результаты показали, что гиперметилирование BDNF связано с повышенным риском ИБС. Кроме того, гиперметилирование BDNF продемонстрировало значительную корреляцию с тяжестью ишемической болезни сердца.

Роль BDNF/TrkB в сердечной недостаточности.

X. Yang и соавт. [52] исследовали роль передачи сигналов BDNF/TrkB в реакции сердечного стресса на физическую нагрузку и патологический стресс. Ав-

торы обнаружили, что экспрессия BDNF в миокарде была увеличена у мышей, подвергшихся физической нагрузке, и снижалась при СН у мышей. Нокаутные мыши с подавлением TrkB (TrkB KO) демонстрировали притупленный адаптивный сердечный ответ на физическую нагрузку с ослабленной активацией сетей факторов транскрипции, контролирующих митохондриальный биогенез/метаболизм, включая гамма-коактиватор рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1 альфа (PGC-1 α). В ответ на патологический стресс (трансаортальное сужение, ТАС) у мышей TrkB KO наблюдалось усугубление прогрессирования сердечной недостаточности. Подавление PGC-1 α у мышей TrkB KO, подвергшихся физической нагрузке или ТАС, приводило к снижению сердечной энергетики. BDNF индуцировал активацию PGC-1 α и биоэнергетику посредством нового сигнального пути, транскрипционного репрессорного белка Yin Yang 1 (YY1). В совокупности, данные результаты свидетельствуют о том, что BDNF миокарда играет критическую роль в регуляции клеточной энергетики в ответ на сердечный стресс.

Z. Zhang и соавт. [53] сообщили, что физические упражнения уменьшают выраженность атрофии мышц, вызванную сердечной недостаточностью, путем воздействия на BDNF, аденозинмонофосфат-активированную протеинкиназу (AMP activated protein kinase, AMPK) и рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом и их коактиваторов (peroxysome proliferator-activated receptors and their coactivator, PGC1 α). Физические упражнения после ИМ увеличивали синтез BDNF как в скелетных мышцах, так и в неинфарктных областях сердца, а также уменьшали сердечную дисфункцию после инфаркта миокарда [54]. Лечение BDNF улучшало физическую

выносливость у мышей СН [55]. Согласно данным J. Matsumoto и соавт. [56], влияние BDNF на физическую выносливость мышей с СН обусловлено усилением окисления жирных кислот посредством активации пути AMPK α -PGC-1 α в скелетных мышцах.

Согласно данным I. Nakano и соавт. [57], уровни BDNF в сыворотке крови были связаны с физической выносливостью и функцией скелетных мышц, но не с мышечной массой у пациентов с сердечной недостаточностью. Упражнения после инфаркта миокарда увеличивали синтез BDNF в паравентрикулярном ядре, но не в ростральном вентролатеральном продолговатом мозге. Физические упражнения снижали активность Akt в паравентрикулярном ядре и р-кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы типа II β (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, p-CaMKII β) в ростральном вентролатеральном продолговатом мозге, но передача сигналов BDNF-TrkB лишь опосредовала влияние физических упражнений на p-CaMKII β в ростральном вентролатеральном продолговатом мозге [58].

М. Rytka и соавт. [59] у 361 амбулаторных пациентов с СН с фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ниже 50% оценивали сывороточные концентрации BDNF и N-концевого натрийуретического пептида про-B-типа (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP). Пациентов из групп с более низкой (ниже медианы) и более высокой (равной или выше медианы) концентрацией BDNF в сыворотке крови сравнивали с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с поправкой на возраст, пол, индекс массы тела, частоту сердечных сокращений в покое и систолическое артериальное давление. Медиана возраста пациентов составила 63,8 года (межквартильный диапазон (IQR) 57,7-71,5 года), а медиана ФВ ЛЖ составила 31,0% (IQR 23,0-37,4). Лица с более низким уровнем BDNF (<23,5 нг/мл) имели значительно ($p \leq 0,05$) большие систолический и диастолический объемы правого и левого предсердий, больший конечно-диастолический размер правого желудочка (ПЖ), конечно-систолический размер левого желудочка, нижнюю систолическую экскурсию в плоскости трикуспидального кольца, меньшее время ускорения потока в выносящем тракте ПЖ, а также более высокую концентрацию NT-proBNP. Таким образом, у пациентов с сердечной недостаточностью с функцией выброса левого желудочка ниже 50% и более низкой концентрацией BDNF в сыворотке крови, наблюдается более выраженное ремоделирование и дисфункция сердца, чем у лиц с более высоким уровнем BDNF.

H. Varman и соавт. [60] анализировали прогностическую ценность BDNF у 108 пациентов с СН и сниженной ФВ ЛЖ ($\leq 35\%$). Контрольную группу составили 50 человек. Первичными конечными точками исследования были смерть от ССЗ в течение длительного периода наблюдения и госпитализация по поводу ухудшения течения сердечной недостаточности. Уровни NT-proBNP в сыворотке крови у пациентов с СН были выше, тогда как значения BDNF были ниже, чем в контрольной группе (NT-pro-BNP: 5010 \pm 851 пг/мл против 33 \pm 11 пг/мл, $p < 0,001$; BDNF: 8,64 \pm 1,12 нг/

мл против 17,58 \pm 4,51 нг/мл, $p < 0,001$). Многофакторный анализ показал, что снижение уровня BDNF в сыворотке крови было связано со смертью и повторной госпитализацией у пациентов с сердечной недостаточностью (ОШ=0,17, 95% ДИ: 0,05-0,53, $p=0,002$; ОШ=0,702, 95% ДИ: 0,54-0,92, $p=0,010$, соответственно). Таким образом, BDNF является информативным прогностическим биомаркером.

A. Shibata и соавт. [43] изучали прогностическую ценность сывороточного уровня BDNF у пациентов с СН. Кроме того, исследователи оценивали взаимосвязь между BDNF и толерантностью к физической нагрузке. В исследование проспективно включили 94 пациента, которые были госпитализированы по поводу декомпенсации СН и прошли кардиологическую реабилитацию. Корреляций между BDNF и пиковым потреблением кислорода (VO_2) отмечено не было. Анализ Каплана-Мейера показал, что сердечная смерть или повторная госпитализация из-за декомпенсации СН были значительно выше в группе с низким BDNF ($p=0,023$). Комбинация пиковых уровней VO_2 и BDNF позволила выделить подгруппы со значительно различающимися вероятностями событий ($p=0,005$). В частности, в группе с низким BDNF и низким пиковым VO_2 частота повторных госпитализаций в течение полугода после выписки была значительно выше, чем в других группах. Многофакторный анализ позиционировал BDNF как независимый фактор неблагоприятных событий (отношение рисков (ОР) 0,956; 95% ДИ 0,911-0,999; $p=0,046$).

Роль BDNF/TrkB и кардиотоксичность. Дозозависимая кардиотоксичность является основным побочным эффектом доксорубина (DOX), но молекулярные механизмы этого остаются неясными. Растет количество доказательств того, что нейротрофическая передача сигналов играет ключевую роль как в нейронах, так и в сердце [6]. Изучению биологической связи между нейротрофической передачей сигналов и DOX-индуцированной кардиотоксичностью посвящено несколько исследований, результаты которых представлены ниже.

Согласно данным P. Hang и соавт. [61], передача сигналов BDNF/TrkB нарушена при кардиотоксичности, вызванной DOX. Экспрессия сердечного белка BDNF была ниже у мышей, получавших DOX, чем у контрольных мышей. Внутривенное введение рекомбинантного BDNF человека улучшало функцию сердца и уменьшало апоптоз кардиомиоцитов путем активации сигналов Akt. J. Zhao и соавт. [62] показали, что миметик BDNF, 7,8-DHF, активировал рецептор TrkB и ослаблял DOX-индуцированную кардиотоксичность и митохондриальную дисфункцию у мышей.

В своем исследовании D. Liao и соавт. [63] определяли уровень нейротрофинов и их рецепторов в сердцах крыс после введения DOX. DOX вводили 7 раз в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в 2 дня внутривентриально. Отмечено значимое повышение уровней креатинфосфокиназы (КФК), КФК-МБ, лактатдегидрогеназы, тропонина Т и аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови в группе DOX. Экспрессия гена и BDNF в сердцах зна-

чимо снижались после введения DOX. BDNF в сыворотке крови снижался у крыс, получавших DOX. DOX вызывал значительное снижение уровня тропомиозин-ассоциированной киназы A (TrkA) и соотношения фосфоTrkA (phospho, pTrkA)/TrkA и pTrkB/TrkB. Кроме того, введение DOX подавляло протеинкиназу B и фосфорилирование киназы. Настоящее исследование впервые продемонстрировало, что передача сигналов BDNF/TrkB и передача сигналов фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF)/TrkA была изменена под влиянием DOX, что указывает на участие нейротрофической передачи сигналов в DOX-индуцированной кардиотоксичности.

Роль BDNF/TrkB при диабете и ожирении. Установлено, что циркулирующий уровень BDNF снижается у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [64, 65]. Также выявлено, что прием метформина увеличивает концентрацию BDNF в крови [66].

Согласно данным метаанализа (2734 больных с СД и 6004 контрольных лиц), уровни BDNF в сыворотке крови были значительно ниже у пациентов с СД по сравнению с контрольной группой (стандартизованная средняя разница (SMD)=-1,00, $p<0,001$). Уровни BDNF в плазме крови не отличались у пациентов с СД по сравнению с контрольной группой. При проведении анализа в подгруппах концентрации BDNF в сыворотке крови были ниже у пациентов с СД (SMD=-1,26, $p<0,001$), СД и депрессией (SMD=-1,69, $p<0,001$), а также у пациентов с диабетической ретинопатией по сравнению с контрольной группой (SMD=-1,03, $p=0,01$). Данные результаты говорят о том, что снижение уровня BDNF может нарушать метаболизм глюкозы и участвовать в патогенезе сахарного диабета и его осложнений [65].

Согласно данным S. Sefidgari-Abrasi и соавт. [67], экспрессия рецепторов BDNF и TrkB в сердце снижены у крыс с СД2. Одновременное введение лактобактерий плантарум (*L. plantarum*) и инулина вызывало значительное повышение экспрессии сердечного серотонина и рецепторов BDNF ($p<0,001$), а также значительное снижение кардиального интерстициального ($p<0,001$) и периваскулярного фиброза ($p<0,001$) и апоптоза ($p=0,01$). Кроме того, наблюдалась сильная корреляция серотонинового рецептора 5-HT подтипа 2B (5-Hydroxytryptamine Receptor 2B, HTR2B) и TrkB с интерстициальным/периваскулярным фиброзом и апоптозом ($p<0,001$).

J. Gong и соавт. [68] сообщили, что при СД кавелин-3 оказывает защитное действие на сердце при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда путем воздействия на β 2-адренорецепторы, а также на пути циклического аденозинмонофосфата (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/протеинкиназа A (protein kinase A, PKA) и BDNF/TrkB.

T. Nakagawa и соавт. [69] доложили, что лечение BDNF увеличивало расход энергии у мышей с СД. Эффективность BDNF в регуляции метаболизма глюкозы и энергии была воспроизведена при интрацеребровентрикулярном введении, что позволяет предположить, что BDNF действовал непосредственно на гипоталамус.

J. Wood и соавт. [70] продемонстрировали, что лечение 7,8-DHF увеличивает мышечное митохондриальное дыхание и системный расход энергии, что приводит к уменьшению прироста массы тела и частично устраняет метаболические нарушения, вызванные ожирением. S. Cho и соавт. [71] выявили, что 7,8-DHF обладает антиоксидантным действием и защищает клетки от апоптотической гибели, вызываемой высоким содержанием глюкозы. Таким образом, 7,8-DHF может стать многообещающим кандидатом для лечения осложнений сахарного диабета.

C. Chan и соавт. [72] обнаружили, что активация мышечного рецептора TrkB регулирует энергетический обмен у мышей с ожирением. Более того, активация рецептора TrkB может снизить риск осложнений СД [73].

Роль BDNF/TrkB и аритмии сердца. В настоящее время в доступной нам литературе имеются данные только одного клинического исследования, посвященного изучению связи BDNF с аритмиями. В проспективном исследовании F. Rahman и соавт. [74] изучили, был ли BDNF связан с частотой фибрилляции предсердий (ФП). Они обнаружили, что уровень BDNF в сыворотке крови статистически не связан с возникновением ФП.

Заключение. Исследования в области изучения новых биологических маркеров должны помочь в ранней диагностике и подборе более эффективной терапии пациентов кардиологического профиля. Анализ лабораторных биологических маркеров основательно занял свою нишу в онкологии, однако применение их в области сердечно-сосудистых заболеваний пребывает в состоянии начального становления. В настоящее время имеются доступные современные технологии для идентификации новых биомаркеров, вследствие чего целесообразна разработка мультибиомаркерной модели диагностики и прогнозирования течения ССЗ. Проведенные к настоящему времени исследования, посвященные BDNF, указывают на потенциально диагностическую и прогностическую значимость оценки данного маркера у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. Благоприятное влияние BDNF на состояние сердца и сосудов позволяют рассматривать данный маркер в качестве терапевтической мишени. Комбинация BDNF с другими биологическими маркерами, в частности, BNP и его предшественником, возможно, повысит его прогностическое значение. Тем не менее, вопросы, связанные с серийным тестированием данного маркера, в том числе и в условиях мультимаркерной панели, нуждаются в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 6-7, 9-74 см. REFERENCES)

2. Кожевникова М.В., Беленков Ю.Н. Биомаркеры сердечной недостаточности: настоящее и будущее. Кардиология. 2021; 61 (5): 4-16. DOI: 10.18087/cardio.2021.5. n1530.
3. Алиева А.М., Резник Е.В., Гасанова Э.Т., Жбанов И.В., Никитин И.Г. Клиническое значение определения биомаркеров крови у

- больных с хронической сердечной недостаточностью. Архив внутренней медицины. 2018; 8 (5): 333-45. DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-5-333-345.
4. Алиева А.М., Алмазова И.И., Пинчук Т.В., Резник Е.В., Федулаев Ю.Н., Никитин И.Г. Значение копептина в диагностике и прогнозе течения сердечно-сосудистых заболеваний. Клиническая медицина. 2020; 98 (3): 203-9. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-203-209.
 5. Алиева А.М., Пинчук Т.В., Воронкова К.В., Шнахова Л.М., Эттингер О.А., Ахмедова М.Ф., и др. Неоптерин – биомаркер хронической сердечной недостаточности (обзор современной литературы). *Consilium Medicum*. 2021; 23 (10): 756-9. DOI: 10.26442/20751753.2021.10.201113.
 8. Фоминова У.Н., Гурина О.И., Шепелева И.И., Попова Т.Н., Кекелидзе З.И., Чехонин В.П. Нейротрофический фактор головного мозга: структура и взаимодействие с рецепторами. Российский психиатрический журнал. 2018; (4): 64-72.
-
- REFERENCES
1. Perk J. The 2016 version of the European Guidelines on Cardiovascular Prevention. *Eur Heart J. Cardiovasc. Pharmacother*. 2017; 3 (1): 9-10. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvw030.
 2. Kozhevnikova M.V., Belenkov Yu.N. Biomarkers in Heart Failure: Current and Future. *Kardiologiya*. 2021; 61 (5): 4-16. DOI: 10.18087/cardio.2021.5.n1530. (in Russian)
 3. Aliyeva A.M., Reznik E.V., Hasanova E.T., Zhibanov I.V., Nikitin I.G. Clinical value of blood biomarkers in patients with chronic heart failure. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2018; 8 (5): 333-45. DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-5-333-345. (in Russian)
 4. Aliyeva A.M., Almazova I.I., Pinchuk T.V., Resnick E.V., Fedulaev Yu.N., Nikitin I.G. The value of copeptin in the diagnosis and prognosis of cardiovascular diseases. *Klinicheskaya meditsina*. 2020; 98 (3): 203-9. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-203-209. (in Russian)
 5. Aliyeva A.M., Pinchuk T.V., Voronkova K.V., Shnakhova L.M., Ettinger O.A., Akhmedova M.F. et al. Neopterin is a biomarker of chronic heart failure (review of modern literature). *Consilium Medicum*. 2021; 23 (10): 756-9. DOI: 10.26442/20751753.2021.10.201113. (in Russian)
 6. Hang P.Z., Zhu H., Li P.F., Liu J., Ge F.Q., Zhao J. et al. The Emerging Role of BDNF/TrkB Signaling in Cardiovascular Diseases. *Life (Basel)*. 2021; 11 (1): 70. DOI: 10.3390/life11010070.
 7. Bazzari A.H., Bazzari F.H. BDNF Therapeutic Mechanisms in Neuropsychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci*. 2022; 23 (15): 8417. DOI: 10.3390/ijms23158417.
 8. Fominova U.N., Gurina O.I., Shepeleva I.I., Popova T.N., Kekelidze Z.I., Chexonin V.P. Neurotrophic factor of the brain: structure and interaction with receptors. *Rossiyskiy psikiatricheskii zhurnal*. 2018; (4): 64-72. (in Russian)
 9. Scarisbrick I.A., Jones E.G., Isackson P.J. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J. Neurosci*. 1993; 13: 875-93. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-03-00875.1993.
 10. Lima Giacobbo B., Doorduyn J., Klein H.C., Dierckx R.A.J.O., Bromberg E., de Vries E.F.J. Brain-Derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation. *Mol. Neurobiol*. 2019; 56 (5): 3295-3312. DOI: 10.1007/s12035-018-1283-6.
 11. Li Y., Li F., Qin D., Chen H., Wang J., Wang J. et al. The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci*. 2022; 14: 986443. DOI: 10.3389/fnagi.2022.986443.
 12. Ernfors P., Lee K.-F., Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*. 1994; 368: 147-50. DOI: 10.1038/368147a0.
 13. Sochal M., Ditmer M., Gabryelska A., Bialasiewicz P. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Immune-Related Diseases: A Narrative Review. *J. Clin. Med*. 2022; 11 (20): 6023. DOI: 10.3390/jcm11206023.
 14. Nguyen V.T., Hill B., Sims N., Heck A., Negron M., Lusk C. et al. Brain-derived neurotrophic factor rs6265 (Val66Met) single nucleotide polymorphism as a master modifier of human pathophysiology. *Neural. Regen. Res*. 2023; 18 (1): 102-6. DOI: 10.4103/1673-5374.343894.
 15. Lin C.C., Huang T.L. Brain-derived neurotrophic factor and mental disorders. *Biomed. J*. 2020; 43 (2): 134-42. DOI: 10.1016/j.bj.2020.01.001.
 16. Hing B., Sathyaputri L., Potash J.B. A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet*. 2018; 177 (2): 143-67. DOI: 10.1002/ajmg.b.32616.
 17. Yang S., Zhu G. 7,8-Dihydroxyflavone and Neuropsychiatric Disorders: A Translational Perspective from the Mechanism to Drug Development. *Curr. Neuropharmacol*. 2022; 20 (8): 1479-97. DOI: 10.2174/1570159X19666210915122820.
 18. Gupta V.K., You Y., Li J.C., Klistorner A., Graham S.L. Protective Effects of 7,8-Dihydroxyflavone on Retinal Ganglion and RGC-5 Cells Against Excitotoxic and Oxidative Stress. *J. Mol. Neurosci*. 2013; 49: 96-104. DOI: 10.1007/s12031-012-9899-x.
 19. Kang J.S., Choi I.-W., Han M.H., Kim G.-Y., Hong S.H., Park C. et al. The cytoprotective effects of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress are mediated by the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression through the activation of the PI3K/Akt and ERK pathways in C2C12 myoblasts. *Int. J. Mol. Med*. 2015; 36: 501-10. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2256.
 20. Huang H.-M., Huang C.-C., Tsai M.-H., Poon L.Y.-C., Chang Y.-C. Systemic 7,8-Dihydroxyflavone Treatment Protects Immature Retinas Against Hypoxic-Ischemic Injury via Müller Glia Regeneration and MAPK/ERK Activation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2018; 59: 3124-35. DOI: 10.1167/iovs.18-23792.
 21. Tsai T., Klausmeyer A., Conrad R., Gottschling C., Leo M., Faissner A. et al. 7,8-Dihydroxyflavone leads to survival of cultured embryonic motoneurons by activating intracellular signaling pathways. *Mol. Cell Neurosci*. 2013; 56: 18-28. DOI: 10.1016/j.mcn.2013.02.007.
 22. Park H.Y., Kim G.Y., Hyun J.W., Hwang H.J., Kim N.D., Kim B.W. et al. 7,8-Dihydroxyflavone exhibits anti-inflammatory properties by downregulating the NF-kappaB and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Med*. 2012; 29: 1146-52. DOI: 10.3892/ijmm.2012.935.
 23. Han X., Cheng M.-N., Chen L., Fang H., Wang L.-J., Li X.-T. et al. 7,8-Dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cell death through modulating PI3K/Akt and JNK pathways. *Neurosci Lett*. 2014; 581: 85-8. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.08.016.
 24. Zhao J., Du J., Pan Y., Chen T., Zhao L., Zhu Y. et al. Activation of cardiac TrkB receptor by its small molecular agonist 7,8-dihydroxyflavone inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med*. 2019; 130: 557-67. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.024.
 25. Wang Z., Wang S.-P., Shao Q., Li P.-F., Sun Y., Luo L.-Z. et al. Brain-derived neurotrophic factor mimetic, 7,8-dihydroxyflavone, protects against myocardial ischemia by rebalancing optic atrophy 1 processing. *Free Radic. Biol. Med*. 2019; 145: 187-97. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.033.
 26. Huai R., Han X., Wang B., Li C., Niu Y., Li R. et al. Vasorelaxing and Antihypertensive Effects of 7,8-Dihydroxyflavone. *Am. J. Hypertens*. 2013; 27: 750-60. DOI: 10.1093/ajh/hpt220.
 27. Helan M., Aravamudan B., Hartman W.R., Thompson M.A., Johnson B.D., Pabelick C.M. et al. BDNF secretion by human pulmonary artery endothelial cells in response to hypoxia. *J. Mol. Cell Cardiol*. 2014; 68: 89-97. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.006.
 28. Feng N., Huke S., Zhu G., Tocchetti C.G., Shi S., Aiba T. et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112: 1880-5. DOI: 10.1073/pnas.1417949112.
 29. Fulgenzi G., Tomassoni-Ardori F., Babini L., Becker J., Barrick C., Puvarel S. et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J. Cell Biol*. 2015; 210: 1003-12. DOI: 10.1083/jcb.201502100.
 30. Hang P., Zhao J., Cai B., Tian S., Huang W., Guo J. et al. Brain-de-

- rived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11 (5): 536-45. DOI: 10.7150/ijbs.10754.
31. Cao L., Zhang L., Chen S., Yuan Z., Liu S., Shen X. et al. BDNF-mediated migration of cardiac microvascular endothelial cells is impaired during ageing. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16: 3105-15. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01621.x.
 32. Halade G.V., Ma Y., Ramirez T.A., Zhang J., Dai Q., Hensler J.G. et al. Reduced BDNF attenuates inflammation and angiogenesis to improve survival and cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2013; 305: H1830-H1842. DOI: 10.1152/ajpheart.00224.2013.
 33. Donovan M.J., Lin M.I., Wiegand P., Ringstedt T., Kraemer R., Hahn R. et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 2000; 127 (21): 4531-40. DOI: 10.1242/dev.127.21.4531.
 34. Wagner N., Wagner K.D., Theres H., Englert C., Schedl A., Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes. Dev.* 2005; 19 (21): 2631-42. DOI: 10.1101/gad.346405.
 35. Kermani P., Hempstead B. BDNF Actions in the Cardiovascular System: Roles in Development, Adulthood and Response to Injury. *Front Physiol.* 2019; 10: 455. DOI: 10.3389/fphys.2019.00455.
 36. Anastasia A., Deinhardt K., Wang S., Martin L., Nichol D., Irmady K. et al. Trkb signaling in pericytes is required for cardiac microvessel stabilization. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e87406. DOI: 10.1371/journal.pone.0087406.
 37. Monisha K.G., Prabu P., Chokkalingam M., Murugesan R., Milenkovic D., Ahmed S.S. Clinical utility of brain-derived neurotrophic factor as a biomarker with left ventricular echocardiographic indices for potential diagnosis of coronary artery disease. *Sci. Rep.* 2020; 10: 1-8. DOI: 10.1038/s41598-020-73296-6.
 38. Kaess B.M., Preis S.R., Lieb W., Beiser A.S., Yang Q., Chen T.C. et al. Circulating brain-derived neurotrophic factor concentrations and the risk of cardiovascular disease in the community. *J. Am. Heart Assoc.* 2015; 4: e001544. DOI: 10.1161/JAHA.114.001544.
 39. Han W., Zhang C., Wang H., Yang M., Guo Y., Li G. et al. Alterations of irisin, adropin, preptin and BDNF concentrations in coronary heart disease patients comorbid with depression. *Ann. Transl. Med.* 2019; 7: 298. DOI: 10.21037/atm.2019.05.77.
 40. Takashio S., Sugiyama S., Yamamuro M., Takahama H., Hayashi T., Sugano Y. et al. Significance of Low Plasma Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Heart Failure. *Am. J. Cardiol.* 2015; 116: 243-9. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.04.018.
 41. Fukushima A., Kinugawa S., Homma T., Masaki Y., Furihata T., Yokota T. et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Level Predicts Adverse Clinical Outcomes in Patients with Heart Failure. *J. Card. Fail.* 2015; 21: 300-6. DOI: 10.1016/j.cardfail.2015.01.003.
 42. Kadowaki S., Shishido T., Honda Y., Narumi T., Otaki Y., Kinoshita D. et al. Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessel.* 2015; 31: 535-44. DOI: 10.1007/s00380-015-0628-6.
 43. Shibata A., Hanatani A., Izumi Y., Kitada R., Iwata S., Yoshiyama M. Serum brain-derived neurotrophic factor level and exercise tolerance complement each other in predicting the prognosis of patients with heart failure. *Heart Vessel.* 2018; 33: 1325-33. DOI: 10.1007/s00380-018-1174-9.
 44. Fukushima A., Kinugawa S., Homma T., Masaki Y., Furihata T., Yokota T. et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2013; 168: e142-e144. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.08.073.
 45. Prabu P., Poongothai S., Shanthirani C.S., Anjana R.M., Mohan V., Balasubramanyam M. Altered circulatory levels of miR-128, BDNF, cortisol and shortened telomeres in patients with type 2 diabetes and depression. *Acta Diabetol.* 2020; 57: 799-807. DOI: 10.1007/s00592-020-01486-9.
 46. Liu Y., Sun L., Huan Y., Zhao H., Deng J. Application of bFGF and BDNF to improve angiogenesis and cardiac function. *J. Surg. Res.* 2006; 136 (1): 85-91. DOI: 10.1016/j.jss.2006.04.034.
 47. Hiltunen J., Laurikainen A., Vakeva A., Meri S., Saarna M. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J. Pathol.* 2001; 194 (2): 247-53. DOI: 10.1002/path.878.
 48. Ejiri J., Inoue N., Kobayashi S., Shiraki R., Otsui K., Honjo T. et al. Possible Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2005; 112: 2114-20. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.476903.
 49. Okada S., Yokoyama M., Toko H., Tateno K., Moriya J., Shimizu I. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects Against Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction via a Central Nervous System-Mediated Pathway. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 1902-9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.248930.
 50. Sustar A., Perkovic M.N., Erjavec G.N., Strac D.S., Pivac N. Association between reduced brain-derived neurotrophic factor concentration & coronary heart disease. *Indian J. Med. Res.* 2019; 150 (1): 43-9. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1566_17.
 51. Esmacili F., Mansouri E., Emami M.A., Montazerghaem H., Hosseini Teshnizi S., Kheirandish M. et al. Association of Serum Level and DNA Methylation Status of Brain-Derived Neurotrophic Factor with the Severity of Coronary Artery Disease. *Indian J. Clin. Biochem.* 2022; 37 (2): 159-68. DOI: 10.1007/s12291-021-00974-1.
 52. Yang X., Zhang M., Xie B., Peng Z., Manning J.R., Zimmerman R. et al. Myocardial brain-derived neurotrophic factor regulates cardiac bioenergetics through the transcription factor Yin Yang 1. *Cardiovasc. Res.* 2022; cvac096. DOI: 10.1093/cvr/cvac096.
 53. Zhang Z., Wang B., Fei A. BDNF contributes to the skeletal muscle anti-atrophic effect of exercise training through AMPK-PGC1 α signaling in heart failure mice. *Arch. Med. Sci.* 2018; 15: 214-22. DOI: 10.5114/aoms.2018.81037.
 54. Lee H.W., Ahmad M., Wang H.-W., Leenen F.H.H. Effects of exercise training on brain-derived neurotrophic factor in skeletal muscle and heart of rats post myocardial infarction. *Exp. Physiol.* 2017; 102: 314-28. DOI: 10.1113/EP086049.
 55. Matsumoto J., Takada S., Kinugawa S., Furihata T., Nambu H., Kakutani N. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice with Heart Failure. *Circulation.* 2018; 138: 2064-6. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035212.
 56. Matsumoto J., Takada S., Furihata T., Nambu H., Kakutani N., Maekawa S. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Impaired Fatty Acid Oxidation Via the Activation of Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase- α —Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α Signaling in Skeletal Muscle of Mice With Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* 2020; 14 (1): e005890. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.00589.
 57. Nakano I., Kinugawa S., Hori H., Fukushima A., Yokota T., Takada S. et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated with Skeletal Muscle Function but Not with Muscle Mass in Patients with Heart Failure. *Int. Heart J.* 2020; 61: 96-102. DOI: 10.1536/ihj.19-400.
 58. Lee H.W., Ahmad M., Wang H.W., Leenen F.H.H. Effects of exercise on BDNF-TrkB signaling in the paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla in rats post myocardial infarction. *Neuropeptides.* 2020; 82: 102058. DOI: 10.1016/j.npep.2020.102058.
 59. Pytka M.J., Pałasz-Borkowska A., Tarchalski J.L., Nowak A., Przymuszała-Staszak D., Schneider A. et al. The serum concentration of brain-derived neurotrophic factor is lower in ambulatory and clinically stable patients with more advanced systolic heart failure. *Pol. Arch. Intern. Med.* 2022; 132 (10): 16303. DOI: 10.20452/pamw.16303.
 60. Barman H.A., Sahin I., Atici A., Durmaz E., Yurtseven E., Ikitimur B. et al. Prognostic significance of brain-derived neurotrophic factor levels in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction. *Anatol. J. Cardiol.* 2019; 22 (6): 309-16. DOI: 10.14744/AnatolJCardiol.2019.37941.
 61. Hang P., Zhao J., Sun L., Li M., Han Y., Du Z. et al. Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 2016; 21: 685-96. DOI: 10.1111/jcmm.13012.

62. Zhao J., Du J., Pan Y., Chen T., Zhao L., Zhu Y. et al. Activation of cardiac TrkB receptor by its small molecular agonist 7,8-dihydroxyflavone inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* 2019; 130: 557-67. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.024.
63. Liao D., Zhang C., Liu N., Cao L., Wang C., Feng Q. et al. Involvement of neurotrophic signaling in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Exp. Ther. Med.* 2020; 19 (2): 1129-35. DOI: 10.3892/etm.2019.8276.
64. Chan C.B., Ahuja P., Ye K. Developing Insulin and BDNF Mimetics for Diabetes Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2019; 19 (24): 2188-204. DOI: 10.2174/1568026619666191010160643.
65. Moosaie F., Mohammadi S., Saghzadeh A., Dehghani Firouzabadi F., Rezaei N. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2023; 18 (2): e0268816. DOI: 10.1371/journal.pone.0268816.
66. Eyileten C., Mirowska-Guzel D., Milanowski L., Zaremba M., Rosiak M., Cudna A. et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor is Related to Platelet Reactivity and Metformin Treatment in Adult Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Can. J. Diabetes.* 2019; 43 (1): 19-26. DOI: 10.1016/j.jcjd.2018.01.014.
67. Sefidgari-Abrasi S., Roshangar L., Karimi P., Morshedi M., Rahimiyan-Heravan M., Saghafi-Asl M. From the gut to the heart: L. plantarum and inulin administration as a novel approach to control cardiac apoptosis via 5-HT2B and TrkB receptors in diabetes. *Clin. Nutr.* 2021; 40 (1): 190-201. DOI: 10.1016/j.clnu.2020.05.004.
68. Gong J., Zhou F., Wang S.X.X., Xu J., Xiao F. Caveolin-3 protects diabetic hearts from acute myocardial infarction/reperfusion injury through β 2AR, cAMP/PKA, and BDNF/TrkB signaling pathways. *Aging (Albany NY).* 2020; 12 (14): 14300-13. DOI: 10.18632/aging.103469.
69. Nakagawa T., Ono-Kishino M., Sugaru E., Yamanaka M., Taiji M., Noguchi H. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2002; 18 (3): 185-91. DOI: 10.1002/dmrr.290.
70. Wood J., Tse M.C.L., Yang X., Brobst D., Liu Z., Pang B.P.S. et al. BDNF mimetic alleviates body weight gain in obese mice by enhancing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Metabolism.* 2018; 87: 113-22. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.06.007.
71. Cho S.J., Kang K.A., Piao M.J., Ryu Y.S., Fernando P.D.S.M., Zhen A.X. et al. 7,8-Dihydroxyflavone Protects High Glucose-Damaged Neuronal Cells against Oxidative Stress. *Biomol. Ther. (Seoul).* 2019; 27 (1): 85-91. DOI: 10.4062/biomolther.2018.202.
72. Chan C.B., Tse M.C.L., Liu X., Zhang S., Schmidt R., Otten R. et al. Activation of Muscular TrkB by its Small Molecular Agonist 7,8-Dihydroxyflavone Sex-Dependently Regulates Energy Metabolism in Diet-Induced Obese Mice. *Chem. Biol.* 2015; 22: 355-68. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.02.003.
73. Allen R.S., Hanif A.M., Gogniat M.A., Prall B.C., Haider R., Aung M.H. et al. TrkB signalling pathway mediates the protective effects of exercise in the diabetic rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 2018; 47 (10): 1254-65. DOI: 10.1111/ejn.13909.
74. Rahman F., Himali J.J., Yin X., Beiser A.S., Ellinor P.T., Lubitz S.A. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and risk of atrial fibrillation. *Am. Heart J.* 2017; 183: 69-73. DOI: 10.1016/j.ahj.2016.07.027.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Иксанова А.М.¹, Ожован И.М.¹, Арзуманян В.Г.¹, Колыганова Т.И.^{1,2}, Самойликов П.В.¹, Конаныхина С.Ю.¹, Миронов А.Ю.^{3,4}**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ЕЁ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОБЩЕГО КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ**¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;²Первый Московский государственный медицинский университет 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;⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Компоненты сыворотки крови - это белки системы комплемента, иммуноглобулины, сывороточный альбумин, антимикробные пептиды, которые оказывают противомикробное действие. Цель работы - оценка антимикробного действия нативной сыворотки крови и её фракции молекулярной массой менее 100 кДа у лиц разных половозрастных групп на клетки *Staphylococcus aureus*, выявление взаимосвязи между антимикробной активностью и показателями общеклинического анализа крови. Общую антимикробную активность нативной сыворотки (ОА-активность) и её низкомолекулярной фракции, содержащей антимикробные пептиды (АМП-активность), оценивали методом спектрофотометрии. Метод основан на свойстве антимикробных веществ нарушать целостность мембран клеток микроорганизмов, которые в результате последующего окрашивания поглощают краситель. Снижение концентрации красителя в среде инкубации измеряли спектрофотометрически и выражали в процентах по отношению к контрольному образцу. Установлено, что ОА-активность являлась относительно постоянной величиной вне зависимости от пола и возраста обследованных лиц и составляла 77,1% от уровня контроля (медиана). АМП-активность более вариабельна (медиана 18,6% от контроля) и имела различия по возрастным группам: наибольшая АМП-активность соответствовала группе детей до 5 лет (медиана 23,5%) и снижалась с возрастом. ОА-активность и АМП-активность находятся в обратной взаимосвязи (коэффициент Пирсона $r=-0,985$). Установлена прямая корреляция между ОА-активностью и гематокритом ($r=0,991$). Между абсолютным количеством лимфоцитов и АМП-активностью вне зависимости от пола обнаружено наличие прямой корреляционной зависимости высокой силы ($r=0,890$), что позволяет предположить участие лимфоцитов в регуляции продукции АМП.*

Ключевые слова: антимикробные пептиды; антимикробная активность сыворотка крови; *Staphylococcus aureus*; лимфоциты.

Для цитирования: Иксанова А.М., Ожован И.М., Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Миронов А.Ю. Антимикробная активность сыворотки крови и её связь с показателями общеклинического анализа крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (7): 395-400. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-395-400>.

Для корреспонденции: Иксанова Асия Мунировна, мл. научн. сотр. лаб. физиологии грибов и бактерий; email: asya7700@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И. И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.03.2023

Принята к печати 10.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Iksanova A.M.¹, Arzumanyan V.G.¹, Ojovan I.M.¹, Kolyganova T.I.^{1,2}, Samoylikov P.V.¹, Konanykhina S.Yu.¹, Mironov A.Yu.^{3,4}**SERUM ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH PARAMETERS OF CLINICAL BLOOD ANALYSIS**¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;³G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiologyµbiology, Moscow, Russia;⁴Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

*Components of blood serum show an antimicrobial effect on microbial cells - these are complement system proteins, immunoglobulins, serum albumin and antimicrobial peptides. The aim of this work was to estimate antimicrobial activity of blood serum and its fraction with molecular weight less than 100 kDa in different sex and age groups against *Staphylococcus aureus*, as well as to identify the relationship between antimicrobial activity and parameters of complete blood count. The total antimicrobial activity of native serum (TA-activity) and its low molecular weight fraction containing antimicrobial peptides (AMP-activity) against *S. aureus* cells were analyzed by spectrophotometry. The method is based on the property of antimicrobial substances to destroy cell membranes integrity of microbes, which during the following staining absorb the dye. Decrease of dye concentration in the incubation medium estimated by spectrophotometer and expressed in percent of control sample. It was found that the TA-activity was a relatively constant value regardless of gender and age and amounted to 77.1% (median). AMP-activity was more*

variable (median 18.6%) and differed by age groups: the highest AMP-activity corresponded to the group of children under 5 years old (median 23.5%) and decreased with age. At the same time, the TA-activity and AMP-activity were in an inverse relationship (Pearson's coefficient $r=-0.985$). A direct correlation was found between TA-activity and hematocrit ($r=0.991$). Between the absolute number of lymphocytes and AMP activity, regardless of gender, a direct correlation of high strength ($r=0.890$) was found, which suggests the involvement of lymphocytes in the regulation of the production of AMP.

Key words: antimicrobial peptides; antimicrobial activity of blood serum; *Staphylococcus aureus*; lymphocytes.

For citation: Iksanova A.M., Arzumaniyan V.G., Ojovan I.M., Kolyganova T.I., Samoylikov P.V., Konanykhina S.Yu., Mironov A.Yu. Antimicrobial activity of blood serum and its association with indicators of clinical blood analysis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7): 395-400 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-395-400>.

For correspondence: Iksanova A.M., research scientist, Laboratory of fungal and bacterial physiology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; e-mail: asya7700@mail.ru

Information about authors:

Iksanova A.M.,	https://orcid.org/0000-0002-8841-910X ;
Ojovan I.M.,	https://orcid.org/0000-0002-8129-0817 ;
Arzumaniyan V.G.,	https://orcid.org/0000-0001-9769-1634 ;
Kolyganova T.I.,	https://orcid.org/0000-0002-9065-9786 ;
Samoylikov P.V.,	https://orcid.org/0000-0003-3580-3199 ;
Konanykhina S.Yu.,	https://orcid.org/0000-0001-7071-8067 ;
Mironov A.Yu.,	https://orcid.org/0000-0002-8544-5230 .

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

Funding. The study was carried out on the scientific equipment of the Collective Usage Center «I. I. Mechnikov NIIVS», Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Science of Russia, Agreement № 075-11-2021-676 dated 28.07.2021.

Received 30.03.2023

Accepted 10.04.2023

Published 03.07.2023

Введение. Общеклинический анализ крови (ОАК) является общедоступным и универсальным видом исследования. Отклонение от референсных интервалов может свидетельствовать о наличии хронических и острых заболеваний [1].

Активность крови против патогенов обусловлена наличием в ней различных систем защиты, таких как антимикробные пептиды (АМП), белки системы комплемента, альбумин, иммуноглобулины. Уровень этих веществ может изменяться во время болезни, особенно при инфекционных процессах. Многие из этих веществ оказывают непосредственное антимикробное действие на патогены. Установлено деструктивное действие альбумина, важнейшего белка крови, на условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) и дрожжи [2]. Сыворотка крови оказывает прямое разрушающее воздействие на инфузории *Tetrahymena pyriformis* [3]. Иммуноглобулины, находящиеся в сыворотке крови, могут оказывать бактериостатическое действие на микроорганизмы, например, действие моноклональных IgM на спирохеты *Borrelia* [4] и поликлональных IgA против различных патогенов [5]. Бактерицидная активность показана в отношении IgG против *Pseudomonas aeruginosa* [6].

АМП оказывают прямое разрушающее воздействие на микроорганизмы путём деструкции цитоплазматической мембраны бактерий [7], грибов [8], одноклеточных паразитов [9], ряда оболочечных вирусов [10]. К таким веществам относятся гепцидин, дефензины, кателицидин, дермицидин, адреномедуллин, псориазин, секреторный ингибитор лейкопротеазы, лизоцим, РНК-аза, липокалин, азуроцидин, кальпротектин, бактерицидный белок, повышающий проницаемость, лактоферрин [11].

Несмотря на то, что протеом крови в диапазоне молекулярных масс менее 100 кДа насчитывает более 600 белков [12], антимикробной активностью обладают именно АМП, молекулярные массы которых находятся в диапазоне от 2,8 до 80 кДа [13]. В этой фракции крови отсутствуют такие активные компоненты, как белки системы комплемента (кроме единичных белков) и иммуноглобулины, поскольку их молекулярная масса превышает 100 кДа.

Определение уровня совокупной антимикробной активности нативной сыворотки крови и её фракции молекулярной массой менее 100 кДа у лиц разных половозрастных групп, сравнение полученных результатов с данными ОАК позволит выявить взаимосвязи вышеуказанных показателей.

Материал и методы. Сыворотку крови получали от здоровых добровольцев и пациентов медицинского центра НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. Фракцию менее 100 кДа получали путём центрифугирования сыворотки крови при 12 тыс. g в течение 15 минут с использованием молекулярных фильтров (Amicon ultra 100 kDa).

Общую антимикробную активность сыворотки (ОА-активность) и её низкомолекулярной фракции (АМП-активность) оценивали методом спектрофотометрии по отношению к *S. aureus* Wood 46, который культивировали на ГРМ-агаре до конца экспоненциальной фазы роста [14]. 150 мкл сыворотки соединяли с 150 мкл физиологического раствора и 50 мкл суспензии клеток; контрольная проба содержала 300 мкл физраствора и 50 мкл суспензии клеток. Клеточную суспензию готовили из расчёта: 1 петля культуры 1 мм в 50 мкл физраствора, стандартизировали по оптической плотности. Образцы инкубировали 2 ч

при 32 °С, центрифугировали 5 минут при 12 тыс. g, супернатант удаляли, полученные осадки окрашивали путём внесения по 300 мкл 1 mM раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6 (краситель стандартизован по оптической плотности). После повторной инкубации в течение 45 минут при 32 °С образцы вновь центрифугировали. По 50 мкл супернатантов соединяли с 2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6. Оптическую плотность растворов оценивали на спектрофотометре «Genesys 10SUV-Vis» (США) при длине волны 440 нм - это максимум поглощения красителя при данном pH. ОА- и АМП-активность выражали как отношение разности между оптической плотностью контрольного и опытного образцов, отнесённой к оптической плотности контрольного образца и выраженной в процентах [15]. Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel. Полученные показатели скорректированы по каждому наблюдению как отклонение от среднего арифметического по положительному контролю. Положительным контролем для ОА-активности служил пул сывороток 3-х здоровых доноров, для АМП-активности - фракция ниже 100 кДа, полученная из того же пула. Расчет производили по формуле:

$$A_{\text{оп.расч.}} = A_{\text{оп}} \times (A_{\text{ср.ар.}} / A_{\text{положит. контроля}}),$$

где: $A_{\text{оп.расч.}}$ - расчётная активность образца;

$A_{\text{оп}}$ - активность образца в данном опыте;

$A_{\text{положит. контроля}}$ - активность положительного контроля в данном опыте;

$A_{\text{ср.ар}}$ - среднее арифметическое всех положительных контролей, полученных в исследовании.

С помощью данного метода оценивали распределение АМП-активности по половозрастным группам здоровых добровольцев и пациентов на 104-х образцах сыворотки крови. На 88 образцах сыворотки крови сравнивали полученный результат АМП-активности с показателями ОАК. На 83 образцах сыворотки крови оценивали ОА-активность по половозрастным группам здоровых добровольцев и пациентов, проводили сравнение ОА-активности и АМП-активностей между собой.

Расчёт коэффициентов Манна-Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий

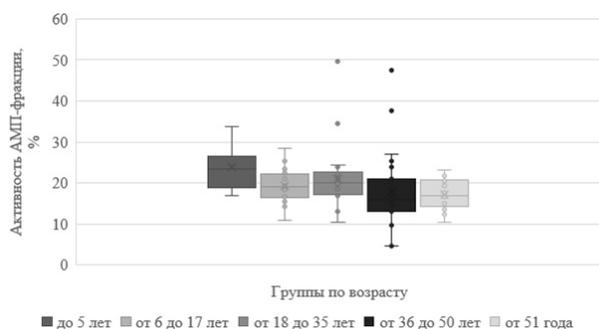


Рис. 1. Распределение АМП-активности в группах по возрасту: до 5 лет (n=10), от 6 до 17 лет (n=28), от 18 до 35 лет (n=22), от 36 до 50 лет (n=25), от 51 года (n=19).

между показателями, проводили с помощью программы [https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html].

Результаты. Для определения взаимосвязи между антимикробной активностью АМП-фракции и возрастом пациентов разделили на 5 возрастных групп: группа до 5 лет включительно, от 6 до 17 лет включительно, от 18 до 35 лет включительно, от 36 до 50 лет, старше 51 года (рис. 1).

Обнаружены достоверные различия между первой и последней группами по возрасту ($p \leq 0,01$). Наибольшая активность наблюдалась в группе детей младшего возраста (до 5-ти лет) и составила 23,5% (медиана). С возрастом АМП-активность постепенно снижалась до достижения среднего возраста (группа от 36 до 50 лет), и составила 15,9%. В группе людей старше 51 года активность АМП-фракции незначительно увеличивалась (до 16,8%).

Медианы АМП-активности сыворотки крови у мужчин и у женщин одинаковы, и составили - 18,6%. Очень низкие величины АМП-активности наблюдались чаще у женщин, очень высокие - у мужчин. У двух мужчин выявлены экстремально высокие значения АМП-активности - 47,4 и 49,6%, у двух женщин обнаружены экстремально низкие значения активности - 4,5 и 4,7%.

У женщин АМП-активность была несколько выше в молодом и среднем возрасте (рис. 2), чем у мужчин того же возраста ($p \geq 0,05$). В старшем возрасте (от 51 года) у мужчин АМП-активность немного выше, чем у женщин ($p \geq 0,05$).

Полученные значения активности АМП-фракции по представленной выборке ($n=104$) варьируют значительно, о чём свидетельствует коэффициент вариации ($CV=35\%$), а стандартное отклонение составляет 6,8. Среднее значение АМП-активности по выборке - 19,4%, медиана - 18,6%. Коэффициент корреляции между АМП-активностью и возрастом составляет $r=-0,673$.

В тех же возрастных группах (см. выше) определяли ОА-активность (рис. 3), однако, различия между группами по данному показателю не являются высокозначимыми ($0,01 \leq p \leq 0,05$). Аналогично, нет различий между показателями по полу ($p \geq 0,05$).

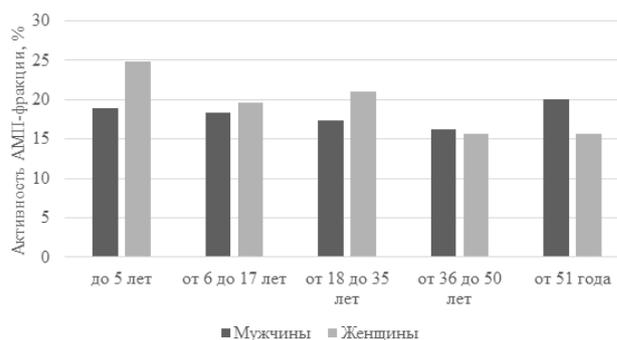


Рис. 2. Распределение АМП-активности сыворотки крови в группах по полу и возрасту: до 5 лет мужчины (n=3), женщины (n=7); от 6 до 17 лет мужчины (n=15), женщины (n=13); от 18 до 38 лет мужчины (n=9), женщины (n=13); от 36 до 50 лет мужчины (n=9), женщины (n=16); от 51 года мужчины (n=6), женщины (n=13).

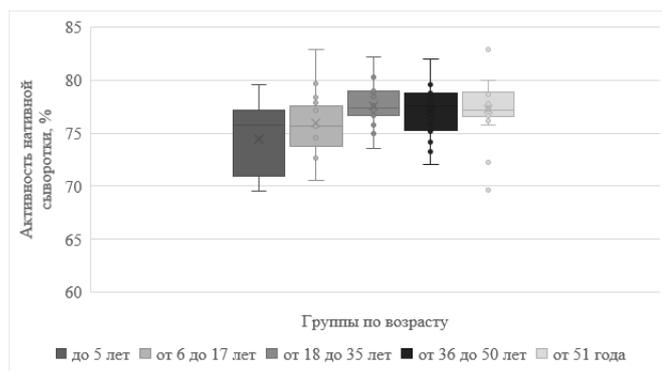


Рис. 3. Распределение ОА-активности сыворотки крови в группах по возрасту: до 5 лет (n= 7), от 6 до 17 лет (n=17), от 18 до 35 лет (n=19), от 36 до 50 лет (n=22), от 51 года (n=18).

Результаты полученного измерения общей активности сыворотки крови, в отличие от таковых по АМП-активности, варьируют незначительно: коэффициент вариации составляет 3,6% по данной вы-

борке, стандартное отклонение - всего 2,7. Среднее значение - 76,8%, медиана - 77,1%.

Для сравнения показателей ОАК с АМП-активностью пациенты разделены на группы в зависимости от величины данного параметра (см. таблицу). Оказалось, что между АМП-активностью и абсолютным количеством лимфоцитов имела место прямая корреляция высокой силы, причём как у мужчин, так и у женщин. Обратная корреляция наблюдалась между уровнем АМП-активности и гематокритом, концентрацией гемоглобина и абсолютным количеством базофилов.

Распределение величин АМП-активности по возрастным группам (рис. 4) показало, что в группе детей до 5 лет с самой высокой активностью абсолютное значение содержания нейтрофилов ниже, чем лимфоцитов, тогда как в остальных группах всё наоборот. В норме такие показатели характерны для детей младшего возраста (физиологический перекрест).

Сравнение уровней ОА-активности и АМП-активности (n=83) показало наличие обратной корреляции высокой силы: для мужчин коэффициент Пирсона составил r=-0,828, для женщин r=-0,756, по всей выборке r=-0,985.

При ранжировании выборки (n=70) по возрастанию ОА-активности сыворотки в 5-ти группах установлена взаимосвязь с показателями ОАК: выявлена прямая корреляция между ОА-активностью и концен-

Сравнение АМП-активности сыворотки крови и основных показателей общего анализа крови*

Медианы	Группы по активности АМП, %					Корреляция показателей общего анализа крови с показателями АМП-активности:		
	до 11,9	от 12 до 15,9	от 16 до 19,9	от 20 до 23,9	от 24 и выше	Мужчины	Женщины	Итого
АМП-активность, мужчины, %	10,4	14,4	17,1	20,9	31,7	-	-	-
АМП-активность, женщины, %	7,2	14,0	17,6	22,3	26,2	-	-	-
АМП-активность, итого, %	10,3	14,2	17,4	22,0	26,4	-	-	-
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,64	4,72	4,73	4,84	4,53	-0,401	-0,067	-0,164
Гемоглобин, г/л	140,5	138,5	134,0	138,0	129,5	-0,880	-0,790	-0,809
Гематокрит, %	39,3	41,8	39,4	39,6	36,5	-0,768	-0,577	-0,676
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	261,5	251,0	310,5	279,0	279,0	0,297	0,419	0,391
Общее кол-во лейкоцитов, 10 ⁹ /л	6,01	6,17	6,43	7,42	5,96	0,036	0,335	0,276
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	2,81	3,15	3,24	3,12	2,41	-0,615	-0,311	-0,431
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,18	2,40	2,23	2,70	2,77	0,862	0,873	0,890
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,65	0,58	0,58	0,63	0,56	-0,631	-0,606	-0,562
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,14	0,16	0,20	0,19	0,19	0,650	0,830	0,782
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,04	0,03	0,03	0,03	0,01	-0,884	-0,736	-0,765
СОЭ, мм/час	6,0	6,0	5,0	6,5	5,0	-0,459	-0,323	-0,340

Примечание. * - группа до 11,99%: мужчины (n=4), женщины (n=4); группа от 12 до 15,99%: мужчины (n=4), женщины (n=11); группа от 16 до 19,99%: мужчины (n=15), женщины (n=15); группа от 20 до 23,99%: мужчины (n=7), женщины (n=13); группа от 51 года: мужчины (n=4), женщины (n=8).

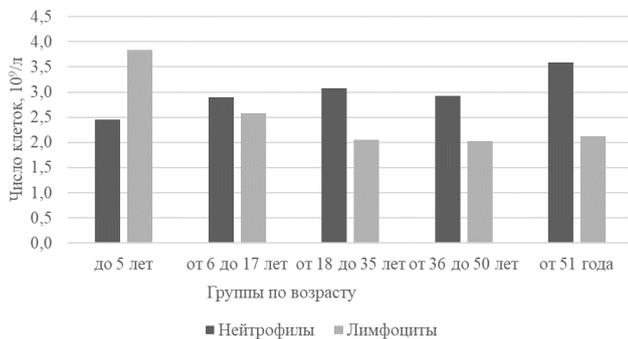


Рис. 4. Уровни нейтрофилов и лимфоцитов в крови в разных возрастных группах: до 5 лет (n=9), от 6 до 17 лет (n=26), от 18 до 35 лет (n=16), от 36 до 50 лет (n=23), от 51 года (n=14).

трацией гемоглобина ($r=0,982$), уровнем гематокрита ($r=0,991$) и абсолютным количеством эритроцитов ($r=0,704$). Обратная корреляция наблюдалась с абсолютным количеством эозинофилов ($r=-0,732$). Других взаимосвязей между показателями ОАК и ОА-активностью не выявлено.

Обсуждение. Общепринятые количественные методы оценки противомикробной активности сыворотки крови сводятся к трудоёмким и длительным методам посевов и микроскопии, тогда как используемый в данном исследовании спектрофотометрический метод позволяет довольно быстро и точно оценить данный показатель. В качестве модельного объекта использованы бактерии *S. aureus*, которые являются распространёнными УПМ и могут вызывать различные заболевания.

Измерение ОА-активности сыворотки крови человека против *S. aureus* показало среднее значение на уровне 76,8%. Значения ОА-активности варьировали незначительно, стандартное отклонение находилось в рамках погрешности метода. При тяжёлых бактериальных инфекциях и при онкологических заболеваниях уровень альбумина в крови снижается, а поскольку альбумин является одним из противомикробных факторов, то его концентрация в крови коррелирует с антимикробной активностью сыворотки [2, 16]. Отсутствие в изученной выборке пациентов с тяжёлыми инфекционными процессами и онкологическими заболеваниями объясняет маловариабельные значения ОА-активности. В результате полученных данных можно не без основания предположить, что ОА-активность является достаточно постоянной величиной, мало отличающейся у относительно здоровых пациентов.

Выявлена связь между гематокритом и ОА-активностью сыворотки крови против *S. aureus*: чем выше гематокрит, тем выше общая активность. Высокий гематокрит указывает, что сыворотка крови более насыщена веществами, проявляющими антимикробную активность. Выявлена связь ОА-активности с

уровнем гемоглобина, что требует дальнейшего изучения. Связь ОА-активности сыворотки с другими показателями ОАК не выявлена.

Активность АМП-фракции сыворотки показала большую вариабельность по сравнению с ОА-активностью (коэффициент вариации CV=35%) и в среднем составила 19,4%. При этом ОА-активность и АМП-активность находились в обратной взаимосвязи, что согласуется с полученными ранее данными [17] и может быть обусловлено взаимозаменяемостью высоко- и низкомолекулярных компонентов, обладающих антимикробной активностью. Обнаружена обратная корреляция между уровнем АМП-активности и гематокритом, концентрацией гемоглобина и абсолютным количеством базофилов, что требует дальнейших исследований. АМП-активность имеет обратную корреляцию высокой силы с возрастом пациентов. Обращает на себя внимание, что максимальная АМП-активность наблюдалась в группе детей до 5 лет. Поскольку АМП синтезируются лейкоцитами, причём по большей части нейтрофилами [18], логично предположить наличие взаимосвязи между абсолютным количеством нейтрофилов и АМП-активностью. Из полученных данных такого вывода сделать невозможно: для этого нужны исследования как здоровых лиц, так и пациентов с инфекционными и соматическими заболеваниями. Установлена прямая корреляция высокой силы между АМП-активностью и абсолютным количеством лимфоцитов. У детей в возрасте до 5 лет наблюдается физиологический перекрест между показателями нейтрофилов и лимфоцитов, что и подтверждается полученными данными (см. рис. 4). Выявленная прямая корреляция между АМП-активностью сыворотки и количеством лимфоцитов позволяет предположить участие лимфоцитов в синтезе и/или в регуляции продукции антимикробных соединений. Имеются данные о том, что продуцируемые лимфоцитами цитокины являются важными регуляторами продукции АМП [19]. Достоверно определить причинно-следственную связь сложно: неясно, является ли высокая АМП-активность сыворотки крови следствием высокого уровня лимфоцитов или имеются иные причины.

Заключение. ОА-активность сыворотки крови против *S. aureus* является относительно постоянной величиной вне зависимости от пола и возраста. АМП-активность сыворотки более вариабельна и имеет различия по возрастным группам: наибольшая АМП-активность соответствует группе детей до 5 лет и снижается с возрастом. ОА-активность и АМП-активность находились в обратной взаимосвязи. Выявлена прямая зависимость между абсолютным количеством лимфоцитов и АМП-активностью. Обнаружена прямая корреляция между общей активностью сыворотки крови и гематокритом.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4 - 10, 12, 13, 18, 19 с.м. REFERENCES)

1. Казакова М. С., Луговская С. А., Долгов В. В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего-

- го населения. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 6: 43-9.
2. Арзумян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019; 167(6): 722-5.
 3. Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И., Чикина Е.Ю., Никитина С.Г., Симашкова Н.В., Брусков О.С. Система комплемента как маркер иммунной дисфункции при расстройствах аутистического спектра у детей. Медицинская иммунология. 2019; 21(4): 773-80.
 11. Иксанова А.М., Арзумян В.Г., Конаныхина С.Ю., Самойликов П.В. Антимикробные пептиды и белки в биожидкостях человека. Независимые микробиологические исследования. 2022; 9(1): 37-55.
 14. Арзумян В.Г., Михайлова Н.А., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Ерофеева Т.В., Костинов М.П., Киселевский М.В., Полищук В.Б. Способ определения противомикробной активности цельной сыворотки и фракции ее антимикробных пептидов. Патент РФ № 2686337; 2018.
 15. Арзумян В.Г., Ожован И.М. Модифицированный метод оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток эукариот. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002; 134(7): 118-20.
 16. Арзумян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А., Вартанова Н.О., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Полищук В.Б. Применение сывороточного альбумина в качестве противомикробного агента. Патент РФ № 2716003; 2019.
 17. Арзумян В.Г., Быстрицкая Е.П., Колыганова Т.И., Иксанова А.М., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Вартанова А.А., Свитич О.А. Антимикробная активность сыворотки крови до и после вакцинации препаратом «ЭпиВакКорона». Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022; 173(3): 2-8.
 5. Funakoshi S., Doi T., Nakajima T., Suyama T., Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. *Microbiol. Immunol.* 1982; 26(3): 227-39.
 6. Xie X., McLean M.D., Hall J.C. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity- and Complement-Dependent Cytotoxicity-Independent Bactericidal Activity of an IgG against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* 2010; 184: 3725-33.
 7. Yeaman M., Yount N. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55(1): 27-55.
 8. De Lucca A., Walsh T. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43(1): 1-11.
 9. Alberola J., Rodriguez A., Francino O., Roura X., Rivas L., Andreu D. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 641-3.
 10. Bastian A., Schafer H. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul. Pept.* 2001; 101: 157-61.
 11. Iksanova A.M., Arzumanyan V.G., Konanykhina S.Y., Samoylikov P.V. Antimicrobial peptides and proteins in human biological fluids. *Nezavisimye mikrobiologicheskie issledovaniya*. 2022; 9(1): 37-55. (in Russian)
 12. Schenk S., Schoenhals G.J., de Souza G., Mann M. A high confidence, manually validated human blood plasma protein. *BMC Medical Genomics*. 2008; 1:41.
 13. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013; 6(12): 1543-75.
 14. Arzumanyan V.G., Mikhailova N.A., Artem'eva T.A., Butovchenko L.M., Vartanova N.O., Erofeeva T.V., Kostinov M.P., Kiselevskiy M.V., Polishchuk V.B. Method of determining antimicrobial activity of whole serum and fraction of its antimicrobial peptides. Patent RF № 2686337; 2018. (in Russian)
 15. Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2002; 134(7): 118-20. (in Russian)
 16. Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M., Svitich O.A., Vartanova A.A., Artem'eva T.A., Butovchenko L.M., Polishchuk V.B. Use of serum albumin as an antimicrobial agent. Patent RF № 2716003; 2019. (in Russian)
 17. Arzumanyan V.G., Bystritskaya E.P., Kolyganova T.I., Iksanova A.M., Samoilikov P.V., Konanikhina S. Yu., Vartanova A.A., Svitich O.A. Antimicrobial activity of serum before and after vaccination with "Epivaccorona". *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2022; 173(3): 2-8. (in Russian)
 18. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *BLOOD*. 2000; 96(8), 2664-72
 19. Kolls J.K., McCray P.B.Jr., Chan Y.R. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8 (11): 829-35.

REFERENCES

1. Kazakova M.S., Lugovskaya S.A., Dolgov V.V. The reference values of indicators of total blood analysis of adult working population. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2012; 6: 43-9. (in Russian)
2. Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M., Svitich O.A. Antimicrobial effect of albumin on bacteria and yeast cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2019; 167(6): 763-6. (in Russian)
3. Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Factor M.I., Chikina E. Yu., Nikitina S.G., Simashkova N.V., Brusov O.S. Complement system as a marker of immune dysfunction in children autism spectrum disorders. *Meditsinskaya immunologiya*. 2019; 21(4): 773-80. (in Russian)
4. LaRocca T.J., Katona L.I., Thanassi D.G., Benach J.L. Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region. *J. Immunol.* 2008; 180(9): 6222-8.

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Славнова Е.Н.¹, Водолеев А.С.¹, Степанов С.О.¹, Пестин И.С.², Размахаев Г.С.¹, Власов М.П.³

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, г. Москва, Россия;

²ГБУ «Городская клиническая больница имени Д.Д. Плетнёва» Департамент здравоохранения г. Москвы. 105077, г. Москва, Россия;

³МБОУ городского округа Королев Московской области «Лицей № 4», 141090, Московская область, Россия

Представлены клинические наблюдения цитологической диагностики нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы. Авторами описаны типичные цитологические, гистологические и иммуногистохимические признаки нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, позволившие диагностировать новообразования на дооперационном этапе и подтвердить гистологическим и иммуногистохимическим исследованием операционного материала.

Ключевые слова: нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы; цитологическое исследование; гистологическое исследование; иммуногистохимия.

Для цитирования: Славнова Е.Н., Водолеев А.С., Степанов С.О., Пестин И.С., Размахаев Г.С., Власов М.П. Цитологическая диагностика нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (клинические наблюдения). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (7): 401-406. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-401-406>.

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, д-р мед. наук, цитолог, вед. науч. сотр. отделения онкоцитологии; e-mail: slavnov@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.03.2023

Принята к печати 06.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Slavnova E.N.¹, Vodoleev A.S.¹, Stepanov S.O.¹, Pestin I.S.², Razmakhaev G.S.¹, Vlasov M.P.³

CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF PANCREAS NEUROENDOCRINE TUMORS (CLINICAL REPORTS)

¹P.Hertsen's Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Centre of Radiology of the Ministry of Public Health of Russian Federation 125284, Moscow, Russia;

²D.D. Pletnev City Clinical Hospital, Moscow Department of Health. 105077, Moscow, Russia;

³MBOU of the urban district of Korolev, Moscow Region "Lyceum No. 4", 141090, Moscow Region, Korolev, Russia

Clinical observations of cytological diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors are presented. The authors describe typical cytological, histological and immunohistochemical signs of neuroendocrine tumors of the pancreas, which made it possible to diagnose neoplasms at the preoperative stage and confirm them by histological and immunohistochemical examination of the surgical material.

Key words: neuroendocrine tumors of the pancreas; cytological examination; histological examination; immunohistochemistry.

For citation: Slavnova E.N., Vodoleev A.S., Stepanov S.O., Pestin I.S., Razmakhaev G.S., Vlasov M.P. Cytological diagnosis of pancreas neuroendocrine tumors (clinical reports). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7): 401-406 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-401-406>.

For correspondence: Slavnova E.N., Doctor of Medical Sciences, lead researcher of the Department of Cytology; e-mail: slavnov@rambler.ru

Information about authors:

Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Vodoleev A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5151-7718>;
Stepanov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-8804-2237>;
Pestин I.S., <https://orcid.org/0000-0001-5137-3315>;
Razmakhaev G.S., <https://orcid.org/0000-0002-3979-8940>;
Vlasov M.P., <https://orcid.org/0009-0009-1454-2939>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) поджелудочной железы представляют собой разнородную группу злокачественных новообразований с различным биологическим поведением, которые составляют 2-5% среди опухолей поджелудочной железы [1,2]. Нейроэндокринные новообразования поджелудочной железы экспрессируют синаптофизин и

обычно хромогранин А. Они включают злокачественные высокодифференцированные нейроэндокринные новообразования, называемые нейроэндокринными опухолями, и низкодифференцированные нейроэндокринные новообразования, называемые нейроэндокринными карциномами (см. таблицу) [3].

Классификация и критерии градации нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы, ВОЗ, 2020 г.

Терминология	Степень дифференцировки	Градация	Количество митозов/2мм ²	Ki-67 индекс
Нейроэндокринная опухоль G1	Высокодифференцированная	Низкая	<2	<3%
Нейроэндокринная опухоль G2	Высокодифференцированная	Средняя	2-20	3-20%
Нейроэндокринная опухоль G3	Высокодифференцированная	Высокая	>20	>20%
Нейроэндокринная карцинома, мелкоклеточного типа	Низкодифференцированная	Высокая	>20	>20%
Нейроэндокринная карцинома, крупноклеточного типа	Низкодифференцированная	Высокая	>20	>20%
Смешанная нейроэндокринная нейроэндокринное новообразование	Высокодифференцированная или низкодифференцированная	Вариабельная	Вариабельное	Вариабельный

Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы подразделяют на функционирующие и нефункционирующие новообразования.

Описание клинических наблюдений

Клиническое наблюдение № 1. Пациентка Р., 73 лет, обратилась в МНИОИ им. П.А. Герцена с жалобами на боли в животе, непереносимость глюкозы, умеренный диабет, желчнокаменную болезнь, стеатоз, диарею, анемию, потерю веса и желудочную гипохлоргидрию из-за снижения желудочной секреции. В плазме крови повышены уровни соматостатина и кальцитонина. В мае 2019 года при компьютерной томографии (КТ) органов брюшной полости у больной выявлена солидная опухоль поджелудочной железы 2 см в диаметре, находящаяся в хвосте поджелудочной железы, вероятно нейроэндокринной природы. При однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, совмещенной с компьютерной томографией обнаружена картина объемного образования поджелудочной железы с гиперэкспрессией соматостатиновых рецепторов. КТ и клинические данные свидетельствовали о наличии у больной соматостатиномы. Соматостатиннома является редкой нейроэндокринной опухолью из дельта-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Больной проведена тонкоигльная аспирационная биопсия опухоли при проведении эндоскопической ультрасонографии (ЭУС) (рис.1). Форма опухоли округлая, контуры четкие, ровные, структура образования неоднородная.

Цитологическая картина в пунктате была характерна для нейроэндокринной опухоли. Цитограмма высококлеточная с чистым фоном, представлена мелкими мноморфными плазмцитомидными клетками, расположенными разрозненно или в виде псев-

допапиллярных структур; ядра клеток округлой или овальной формы, некоторые с продольной бороздкой; хроматин крупнозернистый («соль-перец»); цитоплазма прозрачная или слабоэозинофильная (рис.2, а). Благодаря тому, что цитологический материал был набран в Эппендорф с транспортной средой, приготовлены жидкостные цитологические препараты для проведения иммуноцитохимического исследования. При иммуноцитохимии опухолевые клетки характеризовались выраженной экспрессией синаптофизина, апикальной экспрессией хромогранина А, белок пролиферативной активности Ki-67 экспрессировал 1% опухолевых клеток (рис.2, б - з).

Больной проведена резекция поджелудочной железы. После удаления макроскопически опухоль была представлена одиночным, хорошо очерченным узлом диаметром 2 см. На поперечном срезе опухоль четко отграничена, но не инкапсулирована и состояла из паренхимы желто-коричневого цвета. Микроскопически опухоль характеризовалась трабекулярной, солидной и ацинарной архитектурой (рис.3, а). Опухолевые клетки имели кубическую или округлую форму с эозинофильной цитоплазмой и однородными ядрами. Иммуногистохимически в опухолевых клетках выраженная диффузная экспрессия синаптофизина более слабо выраженная экспрессия хромогранина А. Белок пролиферативной активности Ki-67 выявлен в 1% опухолевых клеток (рис.3, б). Таким образом, подтверждена функционирующая нейроэндокринная опухоль G1, соматостатинома.

Клиническое наблюдение № 2. Пациентка, 56 лет, обратилась в МНИОИ им. П.А. Герцена в 2019 г. с жалобами на боли в верхних отделах живота, потерю массы тела, механическую желтуху.

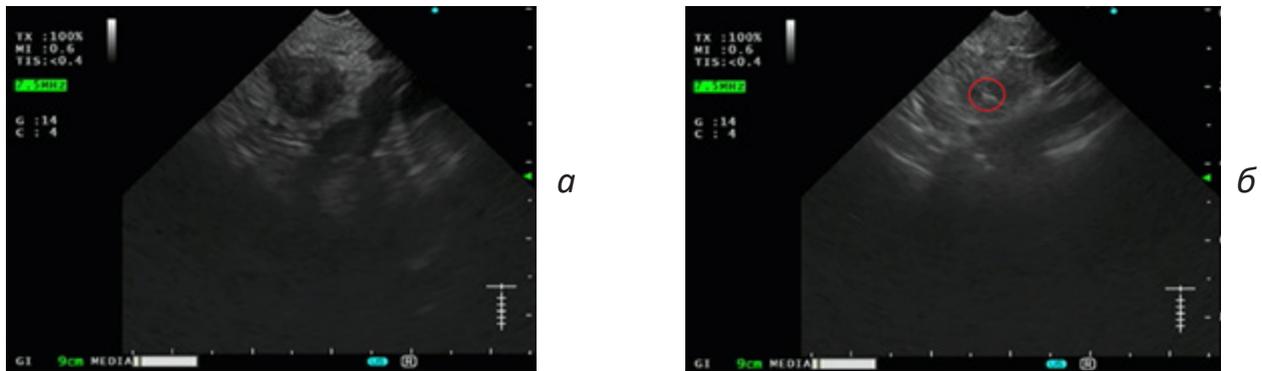


Рис.1. ЭУС. *а, б* - нейроэндокринная опухоль в хвосте поджелудочной железы.

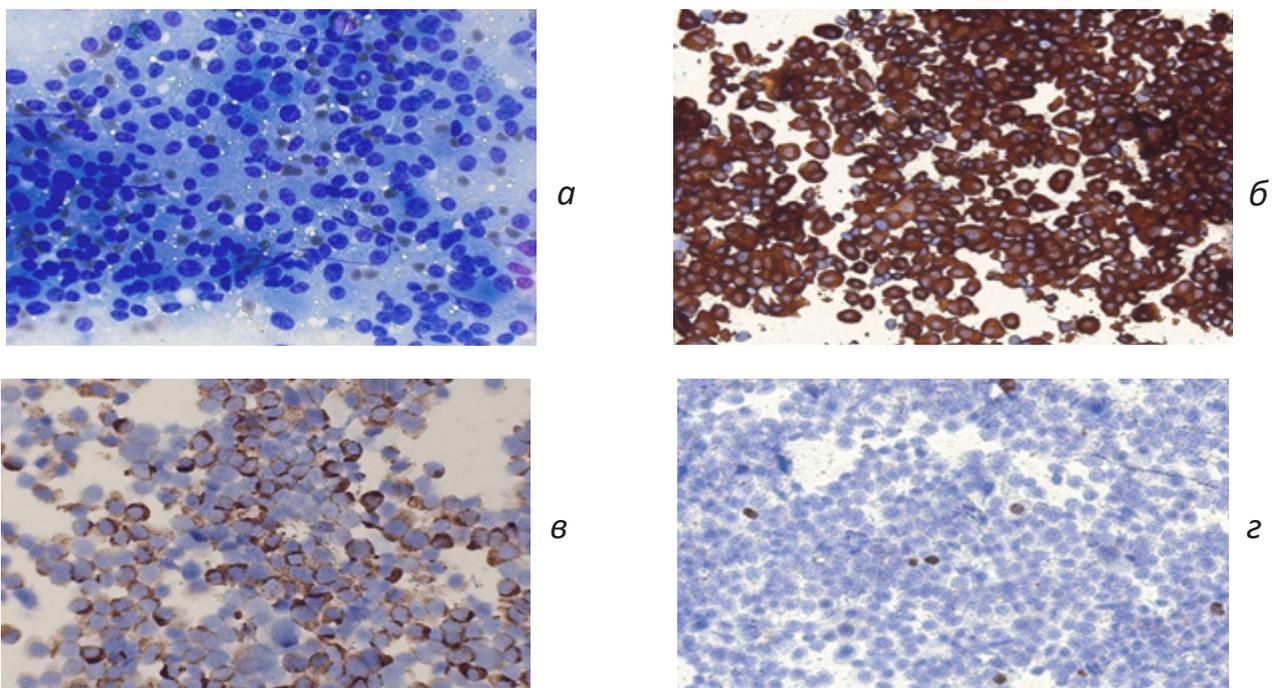


Рис.2. Цитологическая и иммуноцитохимическая картина нейроэндокринной опухоли G1.

а - цитогарма нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы G1. Ув. x400. Окраска по Лейшману; *б* - положительная экспрессия синаптофизина клетками нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400; *в* - положительная экспрессия хромогранина А клетками нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400; *г* - положительная экспрессия Ki-67 1% клеток нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400.

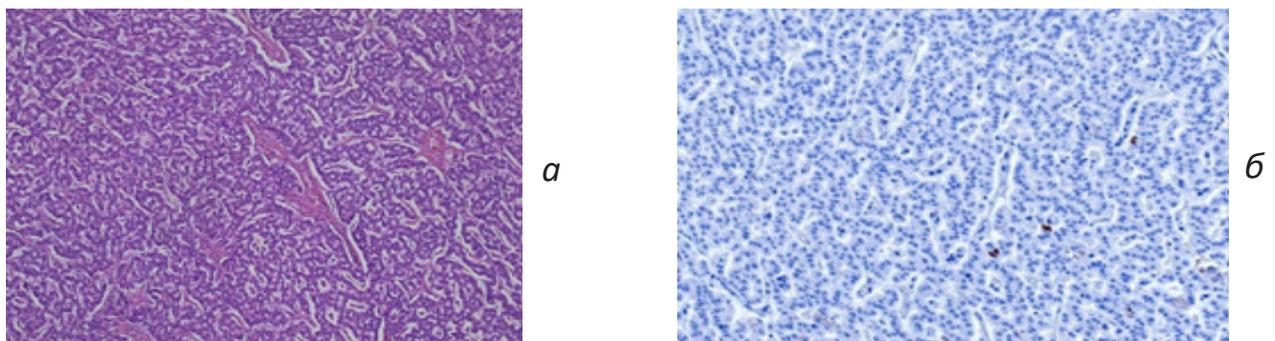


Рис.3. Нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы G1.

а - гистологическая картина нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы G1. Ув. x100, Окраска гематоксилин эозином; *б* - положительная экспрессия Ki-67 в 1% клеток нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуногистохимия. Ув. x100.

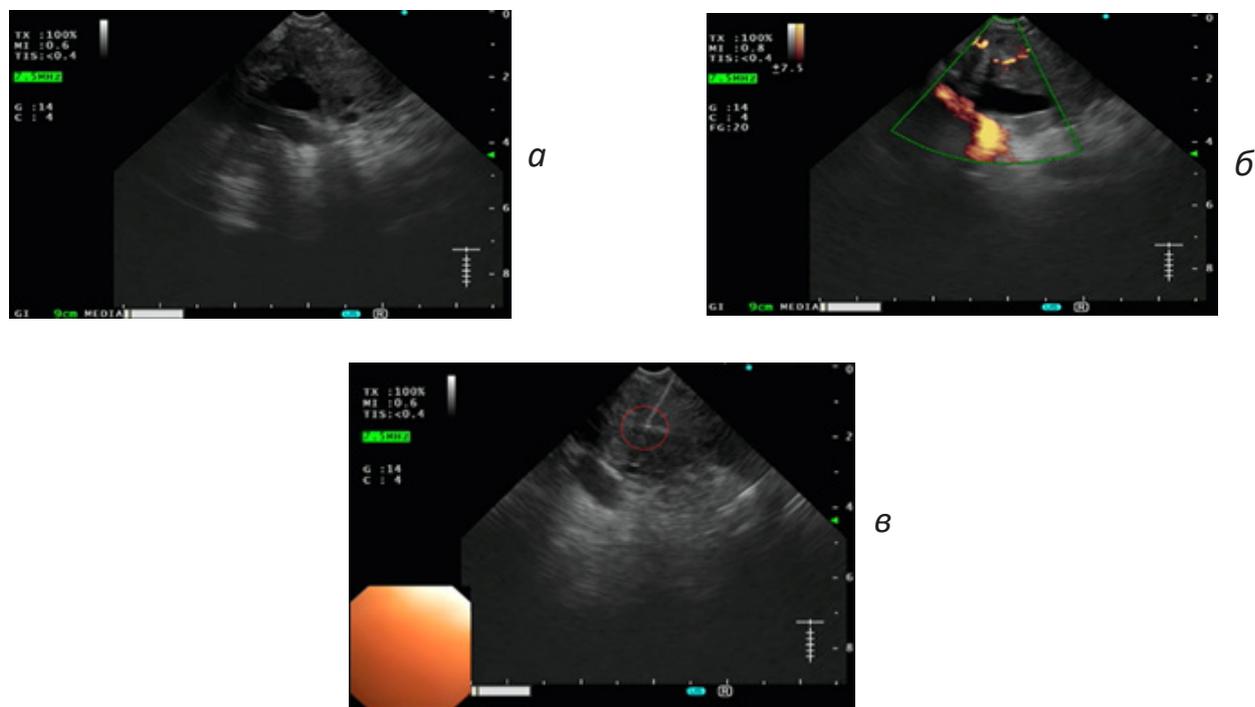


Рис.4. ЭУС. а,б,в - нейроэндокринная опухоль в головке поджелудочной железы.

При проведении эндоскопической ультрасонографии (ЭУС) ЭХО эндоскопическую картину следует дифференцировать между Ст и нейроэндокринной опухолью тела поджелудочной железы с признаками местной распространенности (рис. 4). Форма опухоли округлая, контуры четкие, структура образования неоднородная.

При проведении ЭУС выполнена тонкоигольная аспирационная биопсия опухоли. Цитологически опухоль высококлеточная с чистым фоном, представлена мелкими слабополиморфными плазмодитоидными клетками, расположенными в основном разрозненно; ядра клеток округлой или овальной формы; хроматин крупнозернистый («соль-перец»); цитоплазма прозрачная или слабоэозинофильная содержит красные цитоплазматические гранулы (рис. 5, а). Из цитологического материала, набранного в Эппендорф с транспортной средой, приготовлены жидкостные цитологические препараты для проведения иммуноцитохимического исследования. Опухолевые клетки характеризовались выраженной экспрессией синаптофизина, апикальной слабой экспрессией хромогранина А, белок пролиферативной активности Ki-67 экспрессировали 5% опухолевых клеток (рис. 5, а - з).

При проведении УЗИ брюшной полости обнаружено метастатическое поражение печени. Проведена тонкоигольная аспирационная биопсия метастаза в печени. Цитологическая картина соответствовала первичной опухоли поджелудочной железы (рис. 6, а, б).

Поскольку у больной имелась распространенная форма нейроэндокринной опухоли ей назначено комбинированное лечение.

Обсуждение. Нейроэндокринные новообразования поджелудочной железы относятся к числу относительно редких опухолей. Факторы риска развития нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы включают семейный анамнез, курение, употребление алкоголя, ожирение и диабет [4]. За последние 10 лет частота нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы неуклонно возрастала как для низкодифференцированных, так и для высокодифференцированных новообразований [5], вероятно, в результате достижений в области визуализации.

Алгоритм диагностики нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы основан на тщательном анализе клинических проявлений, подтверждении нейроэндокринного генеза опухоли и определении ее функциональной активности, топической визуализации опухоли и ее морфологической верификации. Для точной морфологической диагностики нейроэндокринных новообразований необходимо проведение иммуноморфологического исследования. Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы экспрессируют синаптофизин (обычно диффузная и выраженная экспрессия) и хромогранин А (обычно очагово и апикально). Они также экспрессируют нейрон-специфическую энolahу, CD56 и CD57 [6]. Для функционирующих нейроэндокринных опухолей определяется экспрессия специфических для них гормонов (инсулина, глюкагона, соматостатина, гастрина, серотонина, АКТГ, панкреатического полипептида).

Заключение. Представленные клинические

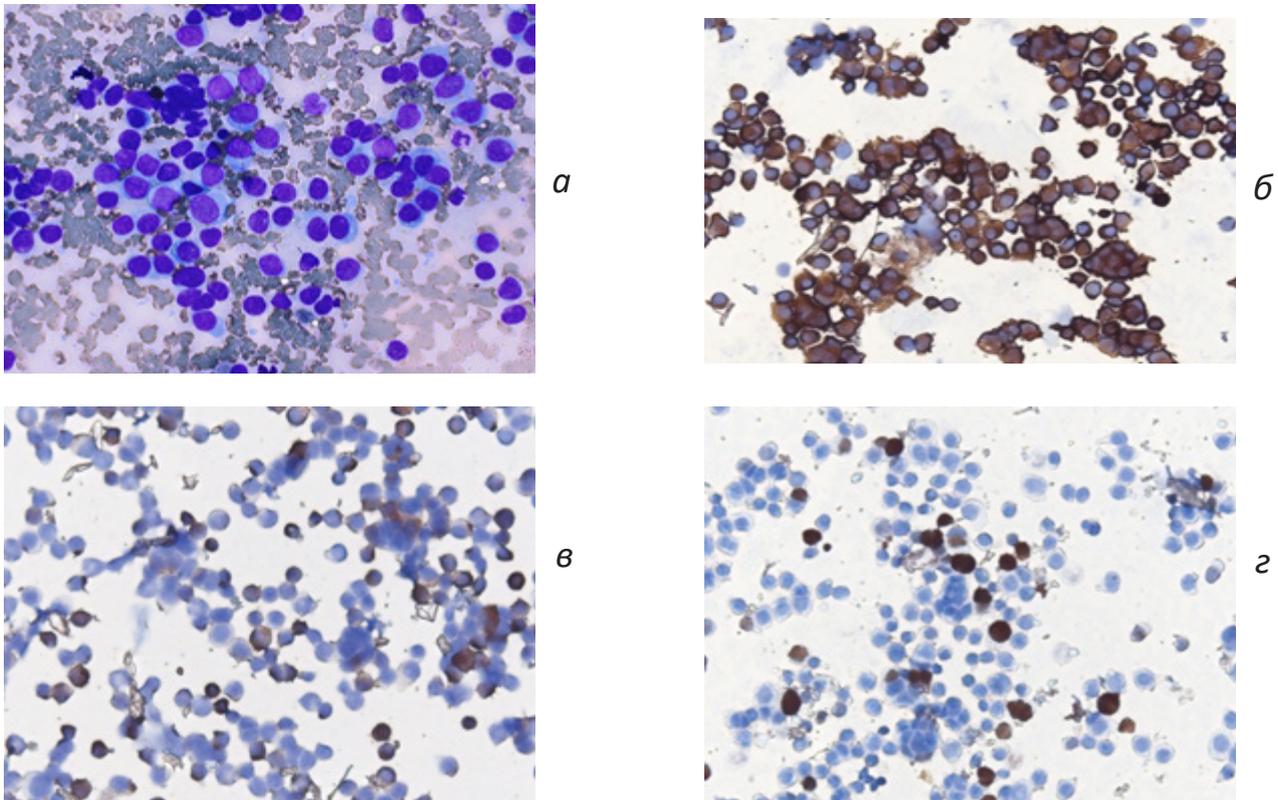


Рис.5. Цитологическая и иммуноцитохимическая картина нефункционирующей нейроэндокринной опухоли G2.

а - цитогарма нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы G2. Ув. x400, Окраска по Лейшману; б - положительная экспрессия синаптофизина клетками нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400; в - положительная экспрессия хромогранина А клетками нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400; г - положительная экспрессия Ki-67 5% клеток нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы. Иммуноцитохимия. Ув. x400.

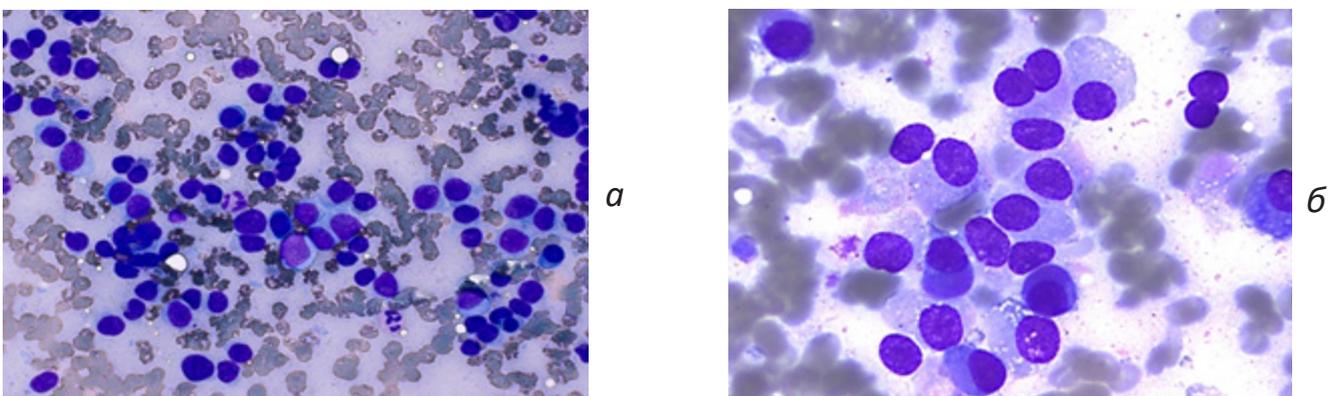


Рис.6. Метастатическое поражение печени.

а - цитогарма метастаза нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы в печень G2. Ув. x400. Окраска по Лейшману; б - цитогарма метастаза нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы в печени G2. Ув. x1000. Окраска по Лейшману.

случаи демонстрируют сложности диагностики нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы. В последние годы все больше нейроэндокринных новообразований диагностируют цитологически, при проведении тонкоигольных аспирационных биопсий при проведении эндоскопической ультразвукографии (ЭУС), либо через кожу под контролем

УЗИ [7,8]. Применение комплексной цитологической и иммуноцитохимической диагностики позволяет не только установить нейроэндокринную природу новообразования поджелудочной железы, но и установить индекс пролиферативной активности (Ki-67), без определения которого невозможна полноценная диагностика НЭН для выбора адекватной тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Franco J., Feng W., Yip L., Genovese E., Moser A. J. Non-functional neuroendocrine carcinoma of the pancreas: incidence, tumor biology, and outcomes in 2,158 patients. *J. Gastrointest. Surg.* 2010; 14(3):541-8.
2. Halfdanarson T.R., Bamlet W.R., McWilliams R.R., Hobday T.J., Burch P.A., Rabe K.G., Petersen G.M. Risk factors for pancreatic neuroendocrine tumors: a clinic-based case-control study. *Pancreas.* 2014; 43(8):1219-22.
3. Digestive System Tumours. WHO Classification of Tumours, 5th ed. Lyon France; 2019.
4. Leoncini E., Carioli G., Vecchia C L., Boccia S., Rindi G. Risk factors for neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol.* 2016; 27(1):68-81.
5. Raziye Boyar Cetinkaya I, Bjarte Aagnes, Espen Thiis-Evensen, Steinar Tretli, Deidi S Bergestuen, Svein Hansen. Trends in Incidence of Neuroendocrine Neoplasms in Norway: A Report of 16,075 Cases from 1993 through 2010. *Neuroendocrinology.* 2017; 104(1):1-10.
6. Uccella S., La Rosa S., Volante M., Papotti M. Immunohistochemical biomarkers of gastrointestinal, pancreatic, pulmonary, and thymic neuroendocrine neoplasms. *Endocr. Pathol.* 2018; 29(2):150-68.
7. Vinaek R., Capurso G., Larghi A. Grading of EUS-FNA cytologic specimens from patients with pancreatic neuroendocrine neoplasms: it is time move to tissue core biopsy? *Gland Surg.* 2014; 3(4):222-5.
8. Sigel C.S., Krauss Silva V.W., Reid M.D., Chhieng D., Basturk O., Sigel K.M., Daniel T.D., Klimstra D.S., Tang L.H. Assessment of cytologic differentiation in high-grade pancreatic neuroendocrine neoplasms: A multi-institutional study. *Cancer Cytopathol.* 2018; 126(1):44-53.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Магбулова Н.А.¹, Левицкая Ю.В.^{1,2}, Джамбекова Г.С.¹, Рузиев Б.Т.¹, Захидова Н.Э.³, Исмадова М.К.³, Руми Л.Р.³, Махкамова Р.И.³, Джураева М.К.³, Гариб Ф.Ю.⁴, Гариб В.Ф.^{1,5}

МОЛЕКУЛА ПЫЛЬЦЫ СОЛЯНКИ (SALSOLA KALI) SAL K 5 - МАЖОРНЫЙ АЛЛЕРГЕН, РЕКОМЕНДОВАННЫЙ К ВКЛЮЧЕНИЮ В ТЕСТЫ PAMD@

¹Международный центр молекулярной аллергологии Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан, 100174, Ташкент, Узбекистан;

²Центр передовых технологий Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан, 100174, Ташкент, Узбекистан;

³Международный центр аллергии, 100000, Ташкент, Узбекистан;

⁴ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия;

⁵Медицинский университет г. Вены, 1090, Вена, Австрия

Солянка (Salsola kali) произрастает в большей части Европы, Северной Африки, Ближнего Востока, Центральной Азии, Китая, Австралии и является важным аллергенным источником поллиноза. В качестве маркера сенсибилизации к пыльце Salsola kali в рутинной клинической диагностике и назначении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) используется молекула Sal k 1. В составе пыльцы содержится также аллергенная молекула Sal k 5, являющаяся членом семейства Ole e 1-подобных белков. Цель исследования - определение распространённости IgE к Sal k 5 в молекулярном профиле сенсибилизации к Salsola kali. В исследование вошли 36 пациентов с респираторной аллергией и наличием IgE к экстракту пыльцы Salsola kali. Специфический IgE к цельному экстракту пыльцы Salsola kali и рекомбинантным аллергенным компонентам Sal k 1 и Sal k 5 оценивали in vitro с использованием мультиплексного теста на респираторные аллергены на основе ELISA с дополнительным включением в него рекомбинантной молекулы Sal k 5. Распространённость сенсибилизации к молекулам rSal k 1 и rSal k 5 отмечена у 75 и 55,6 % больных, имеющих позитивную реакцию к цельному экстракту пыльцы Salsola kali. Одновременная ко-сенсибилизация к rSal k 1 и rSal k 5 встречалась у 41,6% больных. Моно-сенсибилизация к rSal k 1 или к rSal k 5 характерна для 33,3 и 13,9 % больных соответственно. Аллергенная молекула rSal k 5, наряду с rSal k 1 может считаться мажорным аллергеном. Включение молекулы Sal k 5 в диагностические протоколы и в состав мультиплексного анализа позволит с более высокой точностью определять пациентов с аллергией на пыльцу Salsola kali для назначения АСИТ и проведения мониторинга её эффективности.

Ключевые слова: молекулярная диагностика аллергии; поллиноз; солянка; аллергенные молекулы Sal k; иммуноглобулины E; PAMD@.

Для цитирования: Магбулова Н.А., Левицкая Ю.В., Джамбекова Г.С., Рузиев Б.Т., Захидова Н.Э., Исмадова М.К., Руми Л.Р., Махкамова Р.И., Джураева М.К., Гариб Ф.Ю., Гариб В.Ф. Молекула пыльцы солянки (Salsola kali) Sal k 5 - мажорный аллерген, рекомендованный к включению в тесты PAMD@. Клиническая лабораторная диагностика. 2023; 68 (7):407-411. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-407-411>.

Для корреспонденции: Гариб Виктория Фирузовна, д-р мед. наук, науч. сотр. отдела патофизиологии и исследований аллергии медицинского университета г. Вена, Австрия; e-mail: vgarib@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта AL-482104522 Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан.

Поступила 24.04.2023

Принята к печати 25.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Magbulova N.A.¹, Levitskaya Yu.V.^{1,2}, Djambekova G.S.¹, Ruziev B.T.¹, Zakhidova N.E.³, Ismatova M.K.³, Rumi L.R.³, Makhkamova R.I.³, Juraeva M.K.³, Garib F.Yu.⁴, Garib V.F.^{1,5}

SALSOLA KALI POLLEN SAL K 5 MOLECULE IS A MAJOR ALLERGEN AND RECOMMENDED FOR INCLUSION IN PAMD@ TOOLS

¹ICMA, International Centre of Molecular Allergology of the Ministry of Higher Education, Science and Innovations of the Republic of Uzbekistan, 100174, Tashkent, Uzbekistan;

²CAT, Center of Advanced Technologies of the Ministry of Higher Education, Science and Innovations of the Republic of Uzbekistan, 100174, Tashkent, Uzbekistan;

³IAC, International allergy center, 100000, Tashkent, Uzbekistan;

⁴Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 125993, Moscow, Russia;

⁵Medical University of Vienna, Department of Pathophysiology and Allergy Research, 1090, Vienna, Austria

Russian Thistle (Salsola kali) is an important roadside, grazing, and agricultural weed native to much of Europe, North Africa, the Middle East, Central Asia, China, and Australia with a serious impact on pollinosis. In routine clinical diagnosis and allergen-specific immunotherapy (ASIT) prescription, the sensitization marker of S. kali pollinosis Sal k 1 allergen molecule is used. Pollen also contains the allergenic Sal k 5 molecule, which is a member of the Ole e 1-like protein family. The study aimed to describe the pattern of Salsola kali sensitisation and allergy. Thirty-six patients with allergic diseases and specific IgE to Salsola kali pollen extract entered this study. Specific IgE to whole Salsola kali allergens extract and rSal k 1 and rSal k 5 allergen components were assessed using an ELISA-based in-vitro multiplex allergy customer test. A sensitization frequency 75 and 55,6 % to rSal k 1 and rSal k 5 was observed in patients with pollinosis in Uzbekistan with the positive IgE-reaction to Salsola kali extract, where the combination of IgE to rSal k 1 and rSal k 5 are presented in 41,6 %, and monosensitisation to rSal k 1 or rSal k 5 are characterized of 33,3 and 13,9% of patients respectively. The allergenic molecule rSal k 5, along with rSal k 1 can be considered a major allergen of Salsola kali pollinosis. Its inclusion in diagnosis protocols and microarrays would allow the more accurate definition of allergic patients, prescription, and control of ASIT therapy.

Key words: molecular allergy diagnosis; PAMD@ tools; pollinosis; Russian thistle: allergen molecules Sal k; IgE.

For citation: Magbulova N.A., Levitskaya Yu.V., Djambekova G.S., Ruziev B.T., Zakhidova N.E., Ismatova M.K., Rumi L.R., Makhkamova R.I., Juraeva M.K., Garib F.Yu., Garib V.F. *Salsola kali* pollen Sal k 5 molecule is the major allergen and recommended for inclusion in PAMD@ tools. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7): 407-411 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-407-411>.

For correspondence: Garib V.F., Dr. Sci. Med., researcher of the department of pathophysiology and allergy research, Medical University of Vienna, Austria; e-mail: vgarib@inbox.ru

Information about authors:

Magbulova N.A.,	https://orcid.org/0009-0009-8579-3882 ;
Levitskaya Yu.V.,	https://orcid.org/0000-0002-3140-1507 ;
Djambekova G.S.,	https://orcid.org/0000-0003-2810-8737 ;
Ruziev B.T.,	https://orcid.org/0009-0001-9357-9239 ;
Zakhidova N.E.,	https://orcid.org/0009-0008-6967-371X ;
Ismatova M.K.,	https://orcid.org/0009-0001-0992-4790 ;
Rumi L.R.,	https://orcid.org/0009-0003-4612-5490 ;
Makhkamova R.I.,	https://orcid.org/0009-0004-4014-2449 ;
Juraeva M.K.,	https://orcid.org/0009-0008-6072-420X ;
Garib F.Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-3749-1950 ;
Garib V.F.,	https://orcid.org/0000-0003-3855-217X .

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

Acknowledgment. This research was funded by the Ministry of Higher Education, Science and Innovation, Republic of Uzbekistan (grant AL-482104522).

Received 24.04.2023

Accepted 25.04.2023

Published 03.07.2023

Введение. Термин «точная молекулярная диагностика аллергии» «precision allergy molecular diagnosis» (PAMD@) предложен консенсусным документом WAO-ARIA-GA2LEN для объединения таких понятий, как компонентная диагностика аллергии, диагностика аллергии на молекулярном уровне или молекулярная диагностика аллергии для индивидуализации стратегии от диагностики до прогнозирования развития заболевания, профилактики и персонализированного лечения больных [1].

Солянка является сельскохозяйственным, пастбищным, экологическим сорняком, произрастающим в большей части Европы, Северной Африки, Ближнего Востока, Средней Азии, Китая, Австралии. Виды *Salsola* были случайно завезены в качестве загрязнителей семян сельскохозяйственных культур и пастбищ, в результате чего солянка стала широко распространённым сорняком в Канаде, США, Мексике, Китае, Индии, Японии, Австралии, Новой Зеландии. Обобщение современных данных о распространении солянки в мире представлены на рис. 1.

Пыльца *Salsola kali* (русский чертополох, солянка) идентифицирована как важная причина сезонного аллергического ринита пациентов, проживающих

в регионах Средиземноморья, ряда арабских стран и центральных штатов Северной Америки [2]. В полупустынных юго-восточных районах *Salsola* является основной причиной сезонной аллергии наряду с поллинозом к пыльце олив или пыльцы трав. Там, где экстенсивное орошение превращает прежнюю травянистую территорию в полупустыню, отмечается значительный рост аллергии на *Salsola* параллельно со снижением аллергии на травы [3].

Ключевым шагом для диагностики и лечения аллергии является идентификация клинически значимого аллергена. Наиболее распространёнными диагностическими инструментами для выявления сенсibilизации к аллергенам являются кожные прик-тесты и *in vitro* тесты для выявления сывороточного специфического иммуноглобулина класса E (sIgE).

Несмотря на то, что общепринятым критерием положительной немедленной кожной реакции является наличие папулы размером 3 мм в диаметре [4], среди исследователей нет единого мнения в диагностической точности данного теста [5], критерий 3 мм не всегда достаточен для точной диагностики истинной аллергии на *Salsola kali*. В ситуации, когда возникают расхождения или существуют трудности в оценке

истории болезни пациента и результатов прик-теста, рекомендуется применять назальный провокационный тест [6]. Этот тест сопровождается высоким риском побочных реакций, особенно если у пациента в анамнезе имеется анафилактический шок или тяжёлая аллергическая реакция.

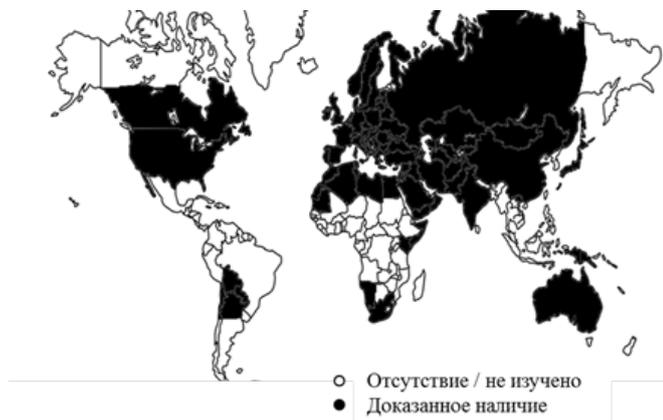


Рис. 1. Распространение растений рода *Salsola* в мире.

С этих позиций молекулярная диагностика аллергических заболеваний является важным инструментом PAMD@ и заключается в определении IgE к спектру аллергенных молекул, входящих в состав аллергенного источника [1], в том числе и пыльцы *Salsola kali*. Существуют единичные и множественные платформы для определения профиля сенсибилизации пациента на молекулярном уровне. Аллергенные молекулы, входящие в состав тестов, по своему происхождению могут быть очищенными или рекомбинантными. Выбор спектра аллергенных молекул в составе тестов зависит от клинической значимости аллергена и распространённости сенсибилизации к нему в конкретной популяции. Почти все мажорные аллергены пыльцы сорняков для определения специфических IgE находятся в составе однокомпонентного теста ImmunoCAP, исключение составляет Che a 1 молекула пыльцы мари (*Chenopodium album*), присутствующей только в мультиплексных системах (ImmunoCAP ISAC и ALEX²) [7].

Установлено, что молекула Sal k 1 (пектинметилэстераза) является мажорным аллергеном, и его рекомбинантный аналог используется в качестве маркера аллергии на пыльцу *Salsola kali* [8].

Идентифицированная молекула Sal k 5 биохимически относится к группе протеинов - гомологов Ole e 1. [9]. Частота сенсибилизации к этой молекуле у больных поллинозом, проживающих в центре и на Восточном побережье Испании, находится в пределах от 30 до 40%, что не позволяет трактовать молекулу Sal k 5 в качестве мажорного аллергена для испанской популяции.

Цель исследования - определение распространённости IgE к Sal k 5 в молекулярном профиле сенсиби-

лизации к *Salsola kali* у пациентов с респираторной аллергией, проживающих на территории Средней Азии.

Материал и методы. Материалом исследований являлась сыворотка пациентов с респираторной аллергией, находившихся под наблюдением аллергологов Международного центра аллергии (IAC) и Международного центра молекулярной аллергологии (МЦМА) Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан, г. Ташкента в период 2020-2022 гг. Все больные были опрошены врачами центров и заполняли стандартную анкету пациента. Собранная информация включала демографические и клинические данные. Клинические состояния включали сезонный ринит, конъюнктивит и/или астму.

Кожные прик-тесты выполнялись с использованием аллергенов для прик-теста (Immunotek, Мадрид, Испания). Панель включает аллергены наиболее распространённых видов пыльцы в регионе (*Olea europaea*, *Phleum pratense*, *Salsola kali*, *Cupressus arizonica*, *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Parietaria judaica*). Участники с положительным прик-тестом хотя бы на один аллерген считались атопическими.

В дальнейшем в анализ были включены только 36 пациентов с сезонной респираторной аллергией периода позднее лето - начало осени и наличием IgE к натуральному экстракту пыльцы *Salsola kali*. Спектр клинических проявлений включал аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, бронхиальную астму. Среди исследуемых пациентов были дети в возрасте от 2 до 12 лет - 16 пациентов, подростки в возрасте от 12 до 18 лет - 8 пациентов, взрослые - 12 пациентов. Гендерное распределение относительно равномерное - 16 пациентов женского пола (44%) и 20 пациентов мужского пола (56%).

Специфический IgE к цельному экстракту пыльцы *Salsola kali* и рекомбинантным аллергенным компонентам Sal k 1 и Sal k 5 оценивали *in vitro* с использованием мультиплексного теста на респираторные аллергены на основе ELISA (респираторный фрагмент платформы ALEX2) с дополнительным включением в него rSal k 5. Сотрудниками МЦМА был разработан дизайн мультиплексного чипа на основе коммерческого теста ALEX2. Тест с рабочим названием ALEX-SIT включал 40 респираторных аллергенных источников, наиболее важных для региона, аллерговакцины к которым официально зарегистрированы в Республике Узбекистан. Дополнительно в тест была внесена рекомбинантная молекула Sal k 5, специально произведённая в научной лаборатории компании MADx, Австрия по заказу МЦМА. Постановка теста осуществлялась в полном соответствии с протоколом производителя.

Анализ IgE проведён по отношению к аллергенным молекулам Phl p 12 и Phl p 7, являющимися маркерами сенсибилизации к паналлергенам пыльцы растений, профилину и полкальцину, соответственно. Несмотря на наличие в тест-системе блокатора CCD, для исключения ложноположительных реакций, связанных с натуральным гликозилированием, в анализ включён уровень IgE к CCD молекулам. Положитель-

ной считали концентрацию $\geq 0,3$ kUA/L, согласно инструкции производителя.

Коэффициент корреляции Пирсона рассчитывался при помощи программы Wessa, P., Free Statistics Software, версии 1.2.1 2023 года, позволяющей производить вычисления корреляции Пирсона: диаграмму рассеяния, корреляцию Пирсона, ковариацию, определение и Т-критерий корреляции. К обоим вариантам применялись тесты нормальности Харке-Бера и Андерсона-Дарлинга.

Результаты. Индивидуальные профили sIgE к различным аллергенным молекулам у пациентов с аллергией на *Salsola kali* представлены на рис. 2.

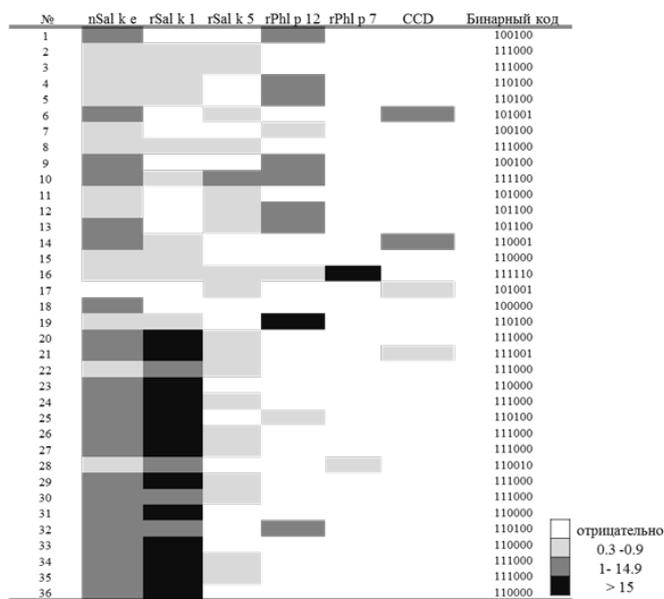


Рис. 2. Индивидуальные sIgE профили у пациентов с аллергией на пыльцу *Salsola kali*. Показаны уровни IgE (kUA/L) (цветовой код), выявленные к каждой конкретной аллергенной молекуле.

Как следует из рис. 2, профили сенсibilизации отличаются высокой индивидуальностью. На основании анализа полученных данных нами был введен бинарный код. При позитивном значении IgE выше 0,3 kUA/L аллергенной молекуле присваивался код «1», негативное значение, в том числе менее 0,3 kUA/L, оценивалось как «0». Последовательность составления индивидуального кода IgE к натуральному экстракту и к перечню аллергенных молекул была следующей: (nSal k e / rSal k 1 / rSal k 5 / rPhl p 12 / rPhl p 7 / CCD).

Используя бинарный код, удалось выявить 13 профилей у данного контингента больных. Наибольший интерес представляли профили, отражающие истинную сенсibilизацию на пыльцу *Salsola kali*, т. е. имеющие в своей композиции начальные коды 111, 110, 101. Таких пациентов оказалось 32 из 36, что составило 88,9%. Распространенность сенсibilизации к молекулам rSal k 1 и rSal k 5 отмечена у 27 из 36 (75%) и 20 из 36 (55,6 %) больных соответственно.

Одновременная ко-сенсibilизация к rSal k 1 и rSal k 5 встречалась у 15 из 36 (41, 6%) больных (началь-

ный код 111).

Моно-сенсibilизация к rSal k 1 или к rSal k 5 была характерна для 20 из 36 (33,3%) и 5 из 36 (13,9 %) больных соответственно (начальные коды 110 и 101).

Три пациента (№№ 1, 7, 9) имели бинарный код профиля 100100. В связи с наличием у них IgE к перекрестным аллергенам, в частности, к профилинам другого аллергенного источника, реакция на экстракт *Salsola kali* была расценена нами как ложноположительная.

Гендерного различия в преимуществах наличия определённого бинарного кода не выявлено. Код 111000 доминировал как у подростков (у 4-х из 8 больных, 50%), так и у взрослых (у 4-х из 12 больных, 33%).

Представляло интересным определение корреляции данных уровня sIgE к цельному экстракту с уровнями sIgE к единичным аллергенным молекулам истинной сенсibilизации на *Salsola kali*, т. е. к rSal k 1 и к rSal k 5. Используя калькулятор Wessa, 2023, нами была обнаружена очень слабая корреляция между параметрами на натуральный экстракт nSal k и на молекулу rSal k 1 ($p=0,446$; 95% CI [0.138745521339889, 0.676166802035943], и полное отсутствие корреляции между IgE к экстракту и rSal k 5 ($p= 0,0001$; 95% CI [-0.328380243846879, 0.328691214273461]. Расчет суммы уровней IgE к rSal k 1 и rSal k 5 значительно не улучшил показатели корреляции IgE к нативному экстракту ($p=0,447$; 95% CI [0.139709189430447, 0.676699865151703]).

Обсуждение. Молекулярная аллергология, в частности, молекулярная аллергодиагностика, вошла в новую фазу своего развития и становится основой для осуществления персонализированного подхода к терапии аллергических заболеваний. Современный согласительный документ WAO-ARIA-GA2LEN 2020 года ввёл новый термин PAMD@ как приложение для точной молекулярной диагностики аллергии, позволяющее улучшить менеджмент аллергических заболеваний [1]. Реализация профилактических и лечебных стратегий терапии требует детальных знаний о соответствующих молекулах аллергенов, воздействующих на данную популяцию, определяет необходимость наличия инструментов как для выбора соответствующего типа вакцины в целях проведения аллергенспецифической терапии (АСИТ) - единственного на сегодняшний день метода патогенетического лечения больных с аллергией, так и в целях оценки её реальной эффективности у каждого конкретного пациента.

Маркёром истинной сенсibilизации к пыльце солянки, широко распространённого сорняка почти на всех континентах Земного шара, в течение долгого периода считалась только молекула Sal k 1. Новая молекула, выделенная из пыльцы *Salsola kali*, и затем полученная рекомбинантным способом, Sal k 5 является членом семейства Ole e 1-подобных белков. Sal k 5 можно считать важным аллергеном этого источника [9].

Мы включили рекомбинантную молекулу Sal k 5 в состав респираторного мультиплексного теста, произведенного на основе мультиплексной платформы

молекулярной аллергодиагностики ALEX2 (MADx, Австрия).

По нашим данным, к rSal k 5 сенсibilизировано 55,6% пациентов Средней Азии, позитивных к экстракту пыльцы *Salsola kali*. Как известно, мажорным аллергеном называется аллергенная молекула, к которой имеется sIgE более чем у 50% пациентов [10].

Мы показали, что профиль сенсibilизации к источнику солянки индивидуален. Используя бинарный код, определены 13 разных профилей у 36 пациентов с респираторной аллергией и подтвержденной сенсibilизацией на экстракт пыльцы этого растения. При этом моносенсibilизация к rSal k 5 обнаружена у 14% пациентов. В случае использования в тесте только одного мажорного аллергена Sal k 1, данные пациенты вошли бы в группу с ложноположительной реакцией на экстракт и не расценивались бы кандидатами для проведения АСИТ *Salsola kali*. Это подчеркивает важность включения молекулы Sal k 5 в диагностические тесты, в тесты выбора АСИТ, и возможно, мониторинга за проводимым лечением. Включение Sal k 5 в протоколы диагностики находит свое отражение в работах научной группы под руководством М. Villalba из Мадридского университета Испании. Несмотря на то, что у больных поллинозом, проживающих в Центре и на Восточном побережье Испании частота сенсibilизации находится в пределах от 30 до 40%, учёные уверены, что включение Sal k 5 в состав тестов на определение специфических иммуноглобулинов IgE, позволит более точно выявлять пациентов с аллергией на пыльцу *Salsola kali* [9].

Молекулы профилина являются пан-аллергенами с высокой гомологичностью несмотря на то, что содержатся в пыльце разных, неродственных аллергенных источников. Сенсibilизация к профилинам ведёт к ложноположительным результатам как прик-теста, так и *in vitro* тестов по определению IgE к нативному экстракту, в составе которого присутствуют молекулы профилина. В нашем исследовании 3 пациента, позитивных к экстракту *Salsola kali*, не имели истинной сенсibilизации к виду-специфическим аллергенным молекулам rSal k 1 и rSal k 5, а были сенсibilизированы к молекуле профилина, маркером которого является rPhl p 12. Тем самым, положительная реакция на экстракт явилась ложноположительной, что находит подтверждение в работе N. Segura и соавт. [11], показавшими, что у пациентов, сенсibilизированных к профилину, соответствие между прик-тестом, выполненным на основе натурального экстракта, и молеку-

лярной диагностикой намного ниже, чем у пациентов, не сенсibilизированных к профилину [11].

Заключение. Sal k 5 молекула является мажорным аллергеном для пациентов Средней Азии с сезонной респираторной аллергией на пыльцу солянки. Включение rSal k 5 в PAMD@ тесты определения специфических иммуноглобулинов IgE на молекулярном уровне повышает диагностическую точность и позволяет эффективнее подбирать персонализированные препараты для проведения АСИТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ansotegui I.J., Melioli G., Canonica G.W., Gómez R.M., Jensen-Jarolim E., Ebisawa M. et al. A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. World Allergy Organization Journal. 2020; 13:100091. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100091 WAO - ARIA - GA2LEN.
2. Al-Ahmad M., Jusufovic E., Arifhodzic N. Which skin prick test wheal size detects true allergy to *Salsola kali*. Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol. 2021; 53(5):228-33. DOI: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.161.
3. Villalba M., Barderas R., Mas S., Colas C., Batanero E., Rodriguez R. Amaranthaceae pollens: Review of an emerging allergy in the mediterranean area. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2014; 24:371-81.
4. Bousquet P.J., Chatzi L., Jarvis D., Burney P. Assessing skin prick tests reliability in ECRHS-I. Allergy. 2008; 63(3):341-6.
5. Nevis I.F., Binkley K., Kabali C. Diagnostic accuracy of skin-prick testing for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. Allergy Asthma Clin. Immunol. 2016; 12:2.
6. Rondon C., Canto G., Blanca M. Local allergic rhinitis: a new entity, characterization and further studies. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2010; 10(1):1-7.
7. Hoffmann-Sommergruber K., Santos A.F. and Breiteneder, H. The Molecular Allergology User's Guide version 2.0 is freely available! Allergy. 2023; Online ahead of print. DOI: 10.1111/all.15643.
8. Mas S., Boissy P., Monsalve R.I., Cuesta-Herranz J., Díaz-Perales A., Fernández J. et al. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. Int. Arch. Allergy Immunol. 2015; 167(2):83-93. DOI: 10.1159/000434680.
9. Castro L., Mas S., Barderas R., Colás C., García-Sellés J., Barber D., Rodríguez R., Villalba M. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. Int. Arch. Allergy Immunol. 2014; 163(2):142-53. DOI: 10.1159/000356345. PMID: 24356442.
10. Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J., Valenta R., Hilger C., Hofmaier S. et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. Pediatr Allergy Immunol. 2016; 27:23:1-250. DOI: 10.1111/pai.12563.
11. Segura N., Abos T., Compaired J.A., Compés E., Guallar I., Morales M. et al. Influence of profilin on sensitisation profiles determined by cutaneous tests and IgE to major allergens in polysensitized patients. Clin. Transl. Allergy. 2016; 6:23. DOI: 10.1186/s13601-016-0114-y.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2023

Шипицына И. В., Осипова Е. В.

ИНГИБИРОВАНИЕ СТАФИЛОКОККОВОЙ БИОПЛЕНКИ ТРИПСИНОМ И ЦИПРОФЛОКСАЦИНОМ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

Применение ферментов совместно с антибиотиками представляет перспективное направление терапии различных инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнкой, в том числе и при хроническом остеомиелите. Цель работы: повысить чувствительность бактерий *Staphylococcus spp.* к цiproфлoксацину, используя трипсин для разрушения матрикса биоплёнки. Биоплёнки бактерий *Staphylococcus spp.* ($n=23$) выращивали в лунках полистироловых планшетов и на поверхности покровных стекол. Эксперимент состоял из 4-х серий. В первой (контрольной) серии получали 72-часовую биоплёнку исследуемых клинических штаммов. Во второй и третьей сериях на 48- часовые биоплёнки воздействовали трипсином и цiproфлoксацином в концентрации 2 мкг/мл, в четвёртой - одновременно трипсином и цiproфлoксацином в равных соотношениях. Определяли интенсивность биоплёнкообразования на иммуноферментном анализаторе и изучали морфологию биоплёнок с помощью светового микроскопа. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Gnumeric 1.12.17. В контрольной серии эксперимента практически вся поверхность покровного стекла была покрыта плёнкой. После обработки цiproфлoксацином, матрикс биоплёнки становился более разреженным, при воздействии трипсином - рыхлым. Сочетанное действие трипсином и цiproфлoксацином вело к частичной деградации биоплёнки, рассеиванию и уменьшению площади её матрикса. Цiproфлoксацин не ингибировал биоплёнкообразование клиническими изолятами *S. aureus*, но бактериостатически действовал на рост биоплёнок, образованных штаммами *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* по сравнению с контролем. Трипсин не оказывал ингибирующего действия на *S. haemolyticus*, но снижал активность биоплёнкообразования штаммами *S. aureus* и *S. epidermidis*. Результатом совместного действия цiproфлoксацина и трипсина стало снижение интенсивности биоплёнкообразования всех исследуемых штаммов стафилококков в 1,5-2,2 раза. Эффективность комбинированной терапии против биоплёночных форм бактерий в хронических ранах не изучена. Применение ферментов, разрушающих межклеточный матрикс биоплёнки, способствует переходу микроорганизмов в состояние планктонных форм, что повышает эффективность проводимой антибиотикотерапии и может позволить снизить сроки санации хронических ран.

Ключевые слова: хронический остеомиелит; биоплёнка; цiproфлoксацин; трипсин.

Для цитирования: Шипицына И. В., Осипова Е. В. Ингибирование стафилококковой биоплёнки трипсином и цiproфлoксацином. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (7): 412-417. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-412-417>.

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела доклинических и лабораторных исследований ФГБУ; e-mail: ivschimik@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 16.03.2023

Принята к печати 10.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Shipitsyna I. V., Osipova E. V.

INHIBITION OF STAPHYLOCOCCAL BIOFILM BY TRYPSIN AND CIPROFLOXACIN

Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Centre «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, Russia

*The use of enzymes together with antibiotics is a promising direction in the treatment of various infectious diseases associated with biofilm, including chronic osteomyelitis. To increase the sensitivity of bacteria Staphylococcus sp. to ciprofloxacin, using trypsin to destroy the biofilm matrix. Biofilms of bacteria Staphylococcus spp. ($n=23$) were grown in the wells of polystyrene plates and on the surface of coverslips. The experiment consisted of 4 series. In the first (control) series, a 72-hour biofilm of the studied clinical strains was obtained. In the second and third series, 48-hour biofilms were exposed to trypsin and ciprofloxacin at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; in the fourth series, they were simultaneously treated with trypsin and ciprofloxacin in equal proportions. The intensity of biofilm formation was determined on an enzyme immunoassay analyzer and the biofilm morphology was studied using a light microscope. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the Gnumeric 1.12.17 program. In the control series of the experiment, almost the entire surface of the coverslip was covered with a film. After treatment with ciprofloxacin, the biofilm matrix became sparser, and when exposed to trypsin, it became loose. The combined action of trypsin and ciprofloxacin led to partial degradation of the biofilm, dispersion and reduction in the area of its matrix. Ciprofloxacin did not inhibit biofilm formation by clinical isolates of *S. aureus*, but had a bacteriostatic effect on the growth of biofilms formed by strains of *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* compared to the control. Trypsin had no inhibitory effect on *S. haemolyticus*, but at the same time reduced the activity*

of biofilm formation by strains of *S. aureus* and *S. epidermidis*. The result of the combined action of ciprofloxacin and trypsin was a decrease in the intensity of biofilm formation of all studied strains of *Staphylococcus* spp. by 1.5-2.2 times. The effectiveness of combination therapy against biofilm forms of bacteria in chronic wounds has not been studied. The use of enzymes that destroy the intercellular matrix of the biofilm contributes to the transition of microorganisms to the state of planktonic forms, which increases the effectiveness of antibiotic therapy and can reduce the time of rehabilitation of chronic wounds.

Key words: chronic osteomyelitis; biofilm; ciprofloxacin; trypsin.

For citation: Shipitsyna I. V., Osipova E.V. Inhibition of staphylococcal biofilm by trypsin and ciprofloxacin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2023; 68 (7): 412-417 (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-412-417.

For correspondence: Shipitsyna I.V., Ph.D., researcher of the department of preclinical and laboratory studies; e-mail: IVSchimik@mail.ru

Information about authors:

Shipitsyna I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>;
Osipova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-2408-4352>.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 16.03.2023

Accepted 10.04.2023

Published 00.07.2023

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* - лидеры по частоте встречаемости при хроническом остеомиелите [1-3]. Наличие факторов патогенности (микрoкапсулы, адгезинов, протеина А, ферментов агрессии, коагулазы, нейраминидазы, фибринолизина, гиалуронидазы, экзотоксинов и др.) позволяет стафилококкам уклоняться от воздействия защитных механизмов врождённого иммунитета [4, 5]. Бактерии рода *Staphylococcus* формируют биоплёнки, в составе которых микроорганизмы обмениваются сигналами, поступающими из окружающей среды, и при достижении определённой концентрации способны изменять свой метаболизм, повышая шансы на выживание [5, 6]. Основное свойство биоплёнок - высокая устойчивость к антимикробным препаратам (АМП), что в значительной степени связано со строением внеклеточного матрикса [4, 6-9]. Дисперсия бактерий биоплёнки приводит к рецидиву инфекционного процесса. При этом АМП, высокоактивный в отношении планктонных клеток *in vitro*, оказывается не эффективным *in vivo* в борьбе с биоплёнкой [4, 9, 10].

Одним из эффективных подходов к эрадикации биоплёнки считается разрушение её матрикса, в результате чего бактерии становятся более восприимчивыми к иммунной системе хозяина и АМП [7, 11]. Особое внимание в контексте разрушения матрикса биоплёнки привлекает использование ферментов, эффективность которых зависит от его состава [11-14]. В стафилококковых биоплёнках соотношение полисахаридов, белков, эДНК может варьировать в зависимости от наличия питательных веществ, окружающей среды хозяина и других условий, что позволяет использовать широкий спектр экзоферментов для воздействия на определённые компоненты матрикса [4,7].

Применение ферментов совместно с АМП представляет перспективное направление терапии различных инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнкой, в том числе и при хроническом остеомиелите.

Цель работы: повысить чувствительность бакте-

рий *Staphylococcus* spp. к ципрофлоксацину, используя трипсин для разрушения матрикса биоплёнки.

Материал и методы. Объект исследования – клинические штаммы *Staphylococcus* spp. ($n=23$), выделенные из биоматериала ран и свищей пациентов с хроническим остеомиелитом.

Идентификацию микроорганизмов проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе MicroScan WalkAway Plus System (Siemens, США) с использованием грамположительных панелей - Pos. Combo 33 (PC 33) в соответствии с критериями CLSI [15]. В качестве контроля использованы референтные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 26213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

Биоплёнки исследуемых микроорганизмов выращивали в лунках полистироловых планшетов и на поверхности покровных стекол по ранее описанной методике [16]. Эксперимент состоял из 4-х серий. В первой (контрольной) серии получали 72-часовую биоплёнку исследуемых клинических штаммов. Во второй и третьей сериях на 48-часовые биоплёнки воздействовали трипсином и ципрофлоксацином в концентрации 2 мкг/мл соответственно, в четвёртой - одновременно трипсином и ципрофлоксацином в равных соотношениях. Через 24 часа оценивали активность биоплёнкообразования на иммуноферментном анализаторе «Biotek ELx808» (США).

Изучение морфологии биоплёнки, полученной на поверхности покровного стекла, проводили с помощью светового микроскопа Axio Lab.A1 и модульного программного обеспечения ZEN («Carl Zeiss», Германия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Gnumeric 1.12.17. Используются показатели описательной статистики: медиана (Me), квартили (Q_{25} - Q_{75}) и критерий Вилкоксона для определения статистической значимости. Различия между группами считали существенными при $p<0,05$.

Клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами, изложенными в

Хельсинской декларации, с разрешения комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г. А. Илизарова».

Результаты и обсуждение. Исследована био-плёнкообразующая способность 23 клинических штаммов *Staphylococcus* spp., принадлежащих к 3 таксонам: *S. aureus* ($n=10$, из них 4 - MRSA), *S. epidermidis* ($n=8$, из них 6 - MRSE), *S. haemolyticus* ($n=5$, из них 2 - MRSH). Среди клинических штаммов - 65% чувствительны к ципрофлоксацину (см. таблицу).

Чувствительные к ципрофлоксацину штаммы

Штаммы	Количество штаммов, n
<i>S. aureus</i>	7
<i>S. epidermidis</i>	5
<i>S. haemolyticus</i>	3

Средняя био-плёнкообразующая способность бактерий *Staphylococcus* spp. составляла 0,380 (0,358; 0,434) ед. опт. пл. (рис. 1.) Воздействие ципрофлоксацина и трипсина по отдельности на сформированную био-плёнку бактерий вело к снижению оптической плотности относительно первоначальных значений и составило 0,308 (0,276; 0,414) ед. опт. пл. и 0,231 (0,211; 0,309) ед. опт. пл., соответственно. При совместном воздействии трипсина с ципрофлоксацином активность био-плёнкообразования снижалась в 1,7 раза.

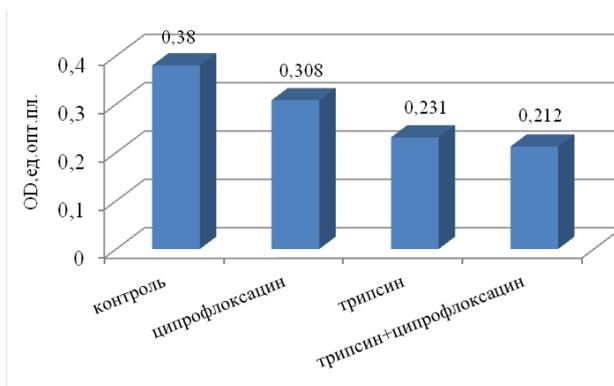


Рис. 1. Био-плёнкообразующая способность бактерий *Staphylococcus* spp. Здесь и на рис. 3,4: по оси абсцисс - препарат; по оси ординат - оптическая плотность.

Изменения в морфологии био-плёнки, наблюдаемые с помощью световой микроскопии, представлены на рис. 2, а – г. В контроле практически вся поверхность покровного стекла покрыта плёнкой (рис 2, а). После обработки ципрофлоксацином, матрикс био-плёнки становился более разреженным (рис. 2, б). При воздействии трипсином био-плёночный матрикс становился рыхлым, увеличивалась площадь и количество пустот в матриксе, появлялись отдельно лежащие клетки (рис. 2, в). Совместное действие трипсином и ципрофлоксацином вело к частичной деградации био-плёнки, рассеиванию и уменьшению площади её матрикса (рис. 2, г).

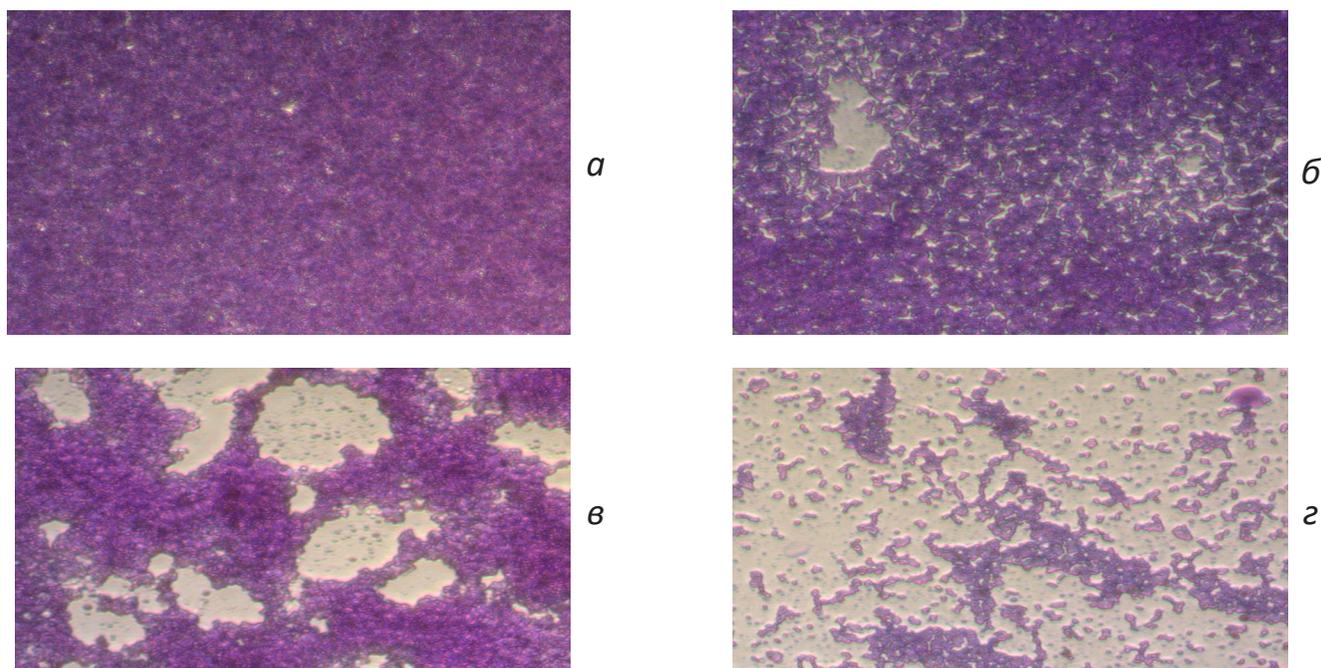


Рис. 2. Морфология био-плёнки, образованной клиническим штаммом MRSE на поверхности покровного стекла. а - морфология био-плёнки через 72 ч; б - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности раствором ципрофлоксацина в дозе 2 мг/мл.; в - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности трипсином в дозе 2 мг/мл; г - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности трипсином и ципрофлоксацином. Световая микроскопия, об. x40. Окраска генциановым фиолетовым.

Ципрофлоксацин незначительно снижал активность биоплёнкообразования чувствительных к нему штаммов (рис. 3.). Трипсин оказывал бактериостатическое действие, снижая уровень биоплёнкообразования как чувствительных, так и резистентных к ципрофлоксацину штаммов в 1,7 и 1,4 раза соответственно. При сочетанном действии трипсина и ципрофлоксацина активность биоплёнкообразования чувствительных к препарату штаммов составляла 0,189 (0,171; 0,247) ед. опт. пл., резистентных штаммов - 0,257 (0,201; 0,259) ед. опт. пл.

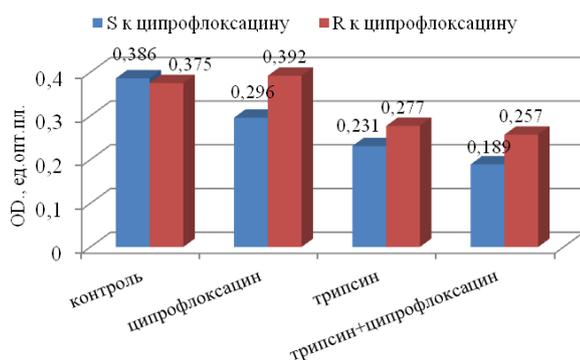


Рис. 3. Активность биоплёнкообразования бактерий *Staphylococcus* spp. в зависимости от чувствительности к ципрофлоксацину.

90% исследуемых штаммов обладали высокоадгезивными свойствами. Ципрофлоксацин не ингибировал биоплёнкообразование клиническими изолятами *S. aureus*, но бактериостатически действовал на рост биоплёнок, образованных штаммами *S. haemolyticus* ($p=0,006$) и *S. epidermidis* ($p=0,005$) по сравнению с контролем (рис. 4.). Трипсин не оказывал ингибирующего действия на *S. haemolyticus*, в то же время снижал активность биоплёнкообразования штаммами *S. aureus* ($p=0,00004$) и *S. epidermidis* ($p=0,02$). Результатом сочетанного действия ципрофлоксацина и трипсина стало снижение интенсивности биоплёнкообразования всех исследуемых штаммов стафилококков в 1,5-2,2 раза.

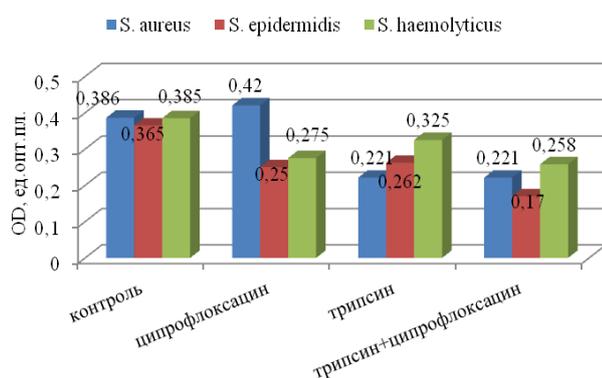


Рис. 4. Влияние трипсина и ципрофлоксацина на активность биоплёнкообразования штаммами *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*.

Одной из актуальных задач фармакологии на сегодняшний день является разработка препаратов, ингибирующих рост бактериальной плёнки, либо способствующих её разрушению [9, 11-13]. Биоплёнка - сложно организованные сообщества бактерий, окруженные биополимерным матриксом, служащим защитой от внешних воздействий [5-8]. Экспериментально доказано, что планктонные формы стафилококков в течение 2-4 часов образуют прочно присоединенные микроколонии, после чего вовлекаются в полноценные биоплёнки, процесс формирования которых занимает, в среднем, 2-4 дня [17]. Резистентность микроорганизмов биоплёнки может быть обусловлена ограниченным проникновением АМП в матрикс, экспрессией невыявленных генов резистентности, образованием клеток-персистеров, на которые АМП не действуют, и другими факторами [10, 18].

Механическое удаление считается наилучшим способом уменьшения биомассы, однако в виду сложной визуализации биоплёнки, до сих пор не определён наиболее эффективный для этого метод [18]. Среди других способов - применение дезинфектантов, которые могут как стимулировать, так и разрушать матрикс биоплёнки [19]. Применение биоцидов, проникающих внутрь биоплёнки и подавляющих рост микроорганизмов, активно изучается в настоящее время [20]. Имеются данные о способности ферментов разрушать матрикс биоплёнки [11-13]. Показана высокая эффективность трипсина в отношении биоплёнок *S. aureus* - *P. aeruginosa*, по сравнению с другими ферментами [21]. Установлено, что выраженность деградации биоплёнки от трипсина зависит от его концентрации и длительности воздействия [22]. Поскольку матрикс биоплёнки способствует развитию устойчивости к АМП, предполагают, что освободившиеся после деградации планктонные клетки будут более чувствительны к АМП. Получены и противоположные результаты, согласно которым ферменты как снижают, так и усиливают антимикробную активность АМП [21, 23]. Показан эффект от воздействия пектиназы и субтилизина на биоплёночную форму *Escherichia coli*, химотрипсина на биоплёнки *Staphylococcus aureus* [14]. Идентифицировано соединение QQ-2, оказывающее ингибирующее действие на формирование биоплёнки грамположительными бактериями [24]. Для разрушения матрикса биоплёнки нами использован протеолитический фермент - трипсин. Согласно полученным данным, трипсин при сочетанном действии с ципрофлоксацином способствует снижению интенсивности биоплёнкообразования штаммами стафилококков.

Заключение. Эффективность комбинированной терапии против биоплёночных форм бактерий в хронических ранах не изучена. Применение ферментов, разрушающих межклеточный матрикс биоплёнки, способствует переходу микроорганизмов в планктонную форму, что повышает эффективность проводимой антибиотикотерапии и может позволить снизить сроки санации хронических ран.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7, 13, 15, 21 - 24 см. REFERENCES)

1. Шипицына И.В., Осипова Е.В. Мониторинг ведущей грамположительной микрофлоры и ее антибиотикочувствительности у лиц с хроническим остеомиелитом за трехлетний период. *Гений ортопедии*. 2022; 28(2): 189-93. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-2-189-193.
2. Миронов С.П., Цискарашвили А.В., Горбатюк Д.С. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Гений ортопедии*. 2019; 25(4): 610-21.
3. Бурнашов С.И., Шипицына И.В., Осипова Е.В. Микрофлора операционных ран и свищей у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 627-31.
4. Окулич В.К., Кабанова А.А., Сенькович С.А., Плотников Ф.В. Резистентность к антибиотикам госпитальных изолятов золотистого стафилококка, образующих биопленку. *Здравоохранение (Минск)*. 2015; 7:11-6.
5. Корниенко М.А., Копыльцов В.Н., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействию на клетки человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34(1): 18-25.
6. Шлепотина Н.М., Плоткин Л.Л., Белов В.В. Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций (обзор литературы). *Гинекология*. 2014; 4(118): 106-12.
7. Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биоплёнки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6.
8. Сухина М.А., Калашникова И.А., Кашников В.Н., Веселов А.В., Михалева В.И., Пиядина А.Ю. Влияние антибактериальных веществ на рост биопленки клинических изолятов. *Колопроктология*. 2018; 2(64): 78-84.
9. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(1): 51-8.
10. Степанова Т.В., Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Навольнев С.О., Навольнева О.С., Гинцбург А.Л. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia*. *Медицинский алфавит*. 2010; 1(2): 47-51.
11. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Голотин В.А., Белик А.А., Бакунина И.Ю. и др. Влияние ферментов на формирование бактериальных биопленок. *Здоровье. Медицинская экология*. Наука. 2015; 1. 60(2): 86-94.
12. Тризна Е.Ю., Байдамшина Д.Р., Холявка М.Г., Шарафутдинов И.С., Хаирутдинова А.Р., Хафизова Ф.А. и др. Растворимые и иммобилизованные папаин и трипсин-деструкторы бактериальных биопленок. *Гены и клетки*. 2015; 10(3):106-12.
13. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Розова Л.В. Адгезивная способность клинических штаммов *Enterobacter cloacae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам. *Новости хирургии*. 2017; 25(3): 273-8.
14. Габидова А.Э., Галынкин В.А. Основные начала возникновения резистентности в биосфере. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017; 3(1): 92-102. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407>.
15. Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса. *Травматология и ортопедия России*. 2011; 3:119-25.
16. Ковалишена О.В., Алебашина Л.А., Саперкин Н.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* к дезинфектантам: систематический обзор. *Журнал МедиАль*. 2014; 3(13):72-7.

20. Тец Г.В., Артеменко Н.К., Янковский Г.М., Кевер Л.В., Комиссарчик Я.Ю., Тец В.В. Действие антимикробного препарата «Мультицид» на биоплёнки стафилококка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(6): 746-50.

REFERENCES

1. Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Monitoring of the leading gram-positive microflora and its antibiotic sensitivity in patients with chronic osteomyelitis over a three-year period. *Geniy ortopedii*. 2022; 28(2): 189-93. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-2-189-193. (in Russian)
2. Mironov S.P., Tsiskarashvili A.V., Gorbatiuk D.S. Chronic post-traumatic osteomyelitis as a problem of modern traumatology and orthopedics (literature review). *Geniy ortopedii*. 2019; 25(4): 610-21. (in Russian)
3. Burnashov S.I., Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Microflora of surgical wounds and fistulas in patients with chronic osteomyelitis of the tibia before reconstructive treatment, in case of recurrence of infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10): 627-31. (in Russian)
4. Okulich V.K., Kabanova A.A., Senkovich S.A., Plotnikov F.V. Antibiotic resistance of hospital isolates of *Staphylococcus aureus* forming a biofilm. *Zdravookhraneniye (Minsk)*. 2015; 7: 11-6. (in Russian)
5. Kornienko M.A., Kopyltsov V.N., Shevlyagina N.V. Didenko L.V., Lyubasovskaya L.A., Pripitnevich T.V. et al. The ability of *Staphylococci* of various species to form biofilms and their effect on human cells. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2016; 34(1): 18-25. (in Russian)
6. Shlepotina N.M., Plotkin L.L., Belov V.V. Microbiological and clinical significance of biofilm infections (literature review). *Ginekologiya*. 2014; 4(118): 106-12. (in Russian)
7. Schilcher K., Horswill A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020 Aug 12; 84(3): e00026-19. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19.
8. Savilov E.D., Anganova E.V., Noskova O.A., Dukhanina A.V. Bacteria biofilms in purulent-septic infections. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6. (in Russian)
9. Sukhina M.A., Kalashnikova I.A., Kashnikov V.N., Veselov A.V., Mikhalevskaya V.I., Piyadina A.Yu. Effect of antibacterial agents on biofilm growth of clinical isolates. *Koloproktologiya*. 2018; 2(64): 78-84. (in Russian)
10. Chebotar' I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D., Lazareva AV., Chistyakova V.P., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antibiotic resistance of biofilm bacteria. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14(1): 51-8. (in Russian)
11. Stepanova T.V., Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Navolnev S.O., Navolneva O.S., Gintsburg A.L. Development of biofilm control agents: study of the effect of polysaccharide lyases on the matrix of biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Meditinskiy alfavit*. 2010; 1(2): 47-51. (in Russian)
12. Terent'eva N. A., Timchenko N. F., Balabanova L. A., Golotin V.A., Belik A.A., Bakunina I.Yu. et al. Influence of enzymes on the formation of bacterial biofilms. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya*. 2015; 1. 60(2): 86-94. (in Russian)
13. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* 2013; 8: 97-109.
14. Trizna E.Yu., Baidamshina D.R., Kholyavka M.G., Sharafutdinov I.S., Khairutdinova A.R., Khafizova F.A. et al. Soluble and immobilized papain and trypsin-destroyers of bacterial biofilms. *Geny i kletki*. 2015; 10(3): 106-12. (in Russian)
15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second information supplement. CLSI document M100-S22. Wayne P.A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
16. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Rozova L.V. Adhesive ability of

- clinical strains of *Enterobacter cloacae* isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis and their sensitivity to antimicrobial drugs. *Novosti khirurgii*. 2017; 25(3): 273-8. (in Russian)
17. Gabidova A.E., Galynkin V.A. The main beginnings of the emergence of resistance in the biosphere. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2017; 3(1): 92-102. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407>. (in Russian)
 18. Afinogenova A.G., Darovskaya E.N. Microbial biofilms of wounds: state of the art. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2011; 3:119-25. (in Russian)
 19. Kovalishena O.V., Alebashina L.A., Saperkin N.V. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to disinfectants: a systematic review. *Zhurnal MediAl'*. 2014; 3(13): 72-7. (in Russian)
 20. Tets G.V., Artemenko N.K., Yankovsky G.M., Kever L.V., Komissarchik Ya.Yu., Tets V.V. The effect of the antimicrobial drug "Multicide" on *Staphylococcus* biofilms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 163(6): 746-50. (in Russian)
 21. Fanaei Pirlar R., Emaneini M., Beigverdi R., Banar M.B., van Leeuwen W., Jabalameli F. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the woundlike medium. *PLoS ONE*. 2020; 15(6): e0235093. DOI: 10.1371/journal.pone.0235093.
 22. Zhou J., Meng X.H., Han Q.C., Huang Y.X., Huo L.J., Lei Y.Y. An *in vitro* study on the degradation of multispecies biofilm of periodontitis-related microorganisms by bovine trypsin. *Front. Microbiol.* 2022; 13:951291. DOI: 10.3389/fmicb.2022.951291.
 23. Waryah C.B., Wells K., Ulluwishewa D., Chen-Tan N., Gogoi-Tiwari J., Ravensdale J. et al. *In vitro* antimicrobial efficacy of tobramycin against *Staphylococcus aureus* biofilms in combination with or without DNase I and/or dispersin B: a preliminary investigation. *Microbial. Drug. Resistance*. 2017; 23(3): 384-90. DOI: 10.1089/mdr.2016.0100 PMID: 27754780.
 24. Weiland-Bräuer N., Kisch M.J., Pinnow N., Liese A., Schmitz R.A. Highly effective inhibition of biofilm formation by the first metagenome-derived AI-2 quenching enzyme. *Front Microbiol.* 2016; 7:1098. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01098.



ЭКОлаб

производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

ЛОРАТАДИН

СИРОП
ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ

www.ekolab.ru



**СКАЖИ - "НЕТ"
АЛЛЕРГИИ**



ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. НЕОБХОДИМО
ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

www.ekolab.ru

КАРНИТЁНОК (L-карнитин детский)



WILDBERRIES

OZON



Маркет **apteka.ru**



СБЕР

ЕАПТЕКА



ЭКОлаб

производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

НИФУРОКСАЗИД

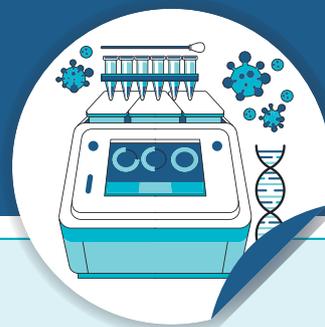


www.ekolab.ru

СУСПЕНЗИЯ ОТ ДИАРЕИ

для взрослых и детей с 1-ого месяца жизни

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ



COVID 19

«КовидЭк Директ»

Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

«КовидЭк Магнит»

Набор реагентов для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

«КовидЭк Экстракт»

Набор реагентов для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Готовятся к выпуску:

ВИЧ-инфекция

«ВИЧ1 ЭК»

Набор реагентов для качественного выявления нуклеиновых кислот вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ1/HIV1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

«ВИЧ1ЭК-q»

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (HIV1/ВИЧ1) в клиническом материале методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Гепатит

«ГепАВ/С Эк»

Набор реагентов для качественного выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) и/или РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени.

«ГепАЭК С-q»

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

«ГепАЭК В-q»

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

«УроЭК Директ»

Набор реагентов для качественного выявления и дифференциации ДНК микроорганизмов урогенитальных инфекций в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

© ГОСТЕВ В.В., СИДОРЕНКО С.В., 2023

Гостев В.В.^{1,2}, Сидоренко С.В.^{1,2}

ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», 197022, Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

*В настоящее время общепринятого определения гетерорезистентности нет, и чаще всего этот термин используют для описания неоднородности в уровне чувствительности отдельных клеток бактериальной суспензии, полученной из единичной колонии. При этом выделяют поликлональную и моноклональную гетерорезистентность. Под поликлональной гетерорезистентностью стоит понимать смешанную популяцию разных генетических линий одного вида с разной чувствительностью к антибиотикам. Моноклональная популяция всегда представлена одной генетической линией, в которой малая часть клеток проявляет устойчивость к антибиотику. Настоящий обзор посвящен только моноклональной гетерорезистентности. С точки зрения лабораторной диагностики, смешанная популяция в рамках одной колонии одного вида микроорганизма по признаку чувствительности к антибиотикам, является сложно дифференцируемым фенотипом. Гетерорезистентность в отношении разных антибиотиков встречается среди многих клинически значимых патогенов, в том числе и прихотливых. Использование методов диффузии в агар, серийных разведений, градиентных тестов, молекулярной детекции для оценки чувствительности к антибиотикам малоэффективны для выявления гетерорезистентности. Клиническая значимость гетерорезистентности очевидна, определение ложной чувствительности ведет за собой назначение неадекватной антибактериальной терапии. В обзоре представлена сравнительная характеристика различных подходов для лабораторного определения фенотипа гетерорезистентности к разным антибактериальным препаратам. Приведено описание популяционного анализа и его различных модификаций как золотого стандарта выявления гетерорезистентности. Приведен сравнительный анализ подходов для выявления гетерорезистентности к ванкомицину у *Staphylococcus aureus*. Дана оценка роли классических методов определения чувствительности к антибиотикам для выявления гетерорезистентных фенотипов. В обзоре рассмотрены возможности использования методов молекулярного типирования и полногеномного секвенирования для выявления смешанных популяций. Гетерорезистентность является достаточно распространенным явлением, однако ее клиническое значение остается до конца не изученным. В настоящее время необходимы четкие определения и унификация методов выявления гетерорезистентности, особенно среди грамотрицательных патогенов. Очевидна необходимость разработки экспресс-методов для скрининга и выявления таких фенотипов в рутинной лабораторной практике.*

Ключевые слова: обзор; гетерорезистентность; методы; чувствительность к антибиотикам; популяционный анализ.

Для цитирования: Гостев В.В., Сидоренко С.В. Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (7): 418-427. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-418-427>.

Для корреспонденции: Гостев Владимир Валерьевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России»; e-mail: guestvv11@gmail.com

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.05.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликовано 03.07.2023

Gostev V.V.^{1,2}, S. Sidorenko S.V.^{1,2}

HETERORESISTANCE: CLINICAL IMPLICATIONS AND DETECTION METHODS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russian Federation;

²North-Western State Medical University Named After I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russian Federation

*Since there is currently no agreed upon definition of heteroresistance, this term is most frequently used to refer to the variation in the degree of susceptibility of individual bacteria in a bacterial suspension isolated from a single colony. There is a difference between polyclonal and monoclonal heteroresistance. It is necessary to understand that polyclonal heteroresistance is a mixed population of various lineages of the same species with varying antibiotic susceptibility. A monoclonal population is always represented by a single lineage in which a small part of the cells is resistant to the antibiotic. Monoclonal heteroresistance is the only focus of this review. A mixed population within a colony of a single species of microorganism based on antibiotic susceptibility is a difficult-to-detect phenotype from the perspective of laboratory diagnostics. Many clinically significant pathogens, including fastidious ones, exhibit heteroresistance to different antibiotics. Heteroresistance cannot be identified using methods for determining antibiotic susceptibility such as agar diffusion, serial dilutions, gradient diffusion tests, or molecular detection. Heteroresistance has clear clinical implications and the definition of false sensitivity results in the prescription of ineffective antibiotic therapy. The review provides a comparison of various methods for laboratory determining the heteroresistance phenotype to various antibacterial drugs. The population analysis profile and all of its modifications are referred to as the gold standard for heteroresistance detection. It is presented a comparative analysis of methods for identifying vancomycin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. For the purpose of detecting heteroresistant phenotypes, the value of classical antibiotic susceptibility tests is discussed. The*

review examines the viability of identifying mixed populations using whole genome sequencing and molecular typing techniques. The clinical significance of heteroresistance, through a fairly common phenomenon, is still not fully understood. Currently, especially for gram-negative pathogens, clear definitions and a unified approach to heteroresistance detection are required. Developing express methods for screening and detecting such phenotypes in standard laboratory practice is obviously necessary.

Key words: review; bacterial drug resistance; microbial sensitivity tests; vancomycin resistance.

For citation: Gostev V.V., Sidorenko S.V. Heteroresistance: clinical implications and detection methods (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7):418-427 (in Russ). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-418-427>.

For correspondence: Gostev V.V., PhD, senior researcher of Department of medical microbiology and molecular epidemiology of Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases; e-mail: guestvv11@gmail.com

Information about authors:

Gostev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3480-8089>;

Sidorenko S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3550-7875>.

Acknowledgment. This study was funded by the Russian Science Foundation (grant no. 18-75-10114-P).

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

Received 05.05.2023

Accepted 19.05.2023

Published 03.07.2023

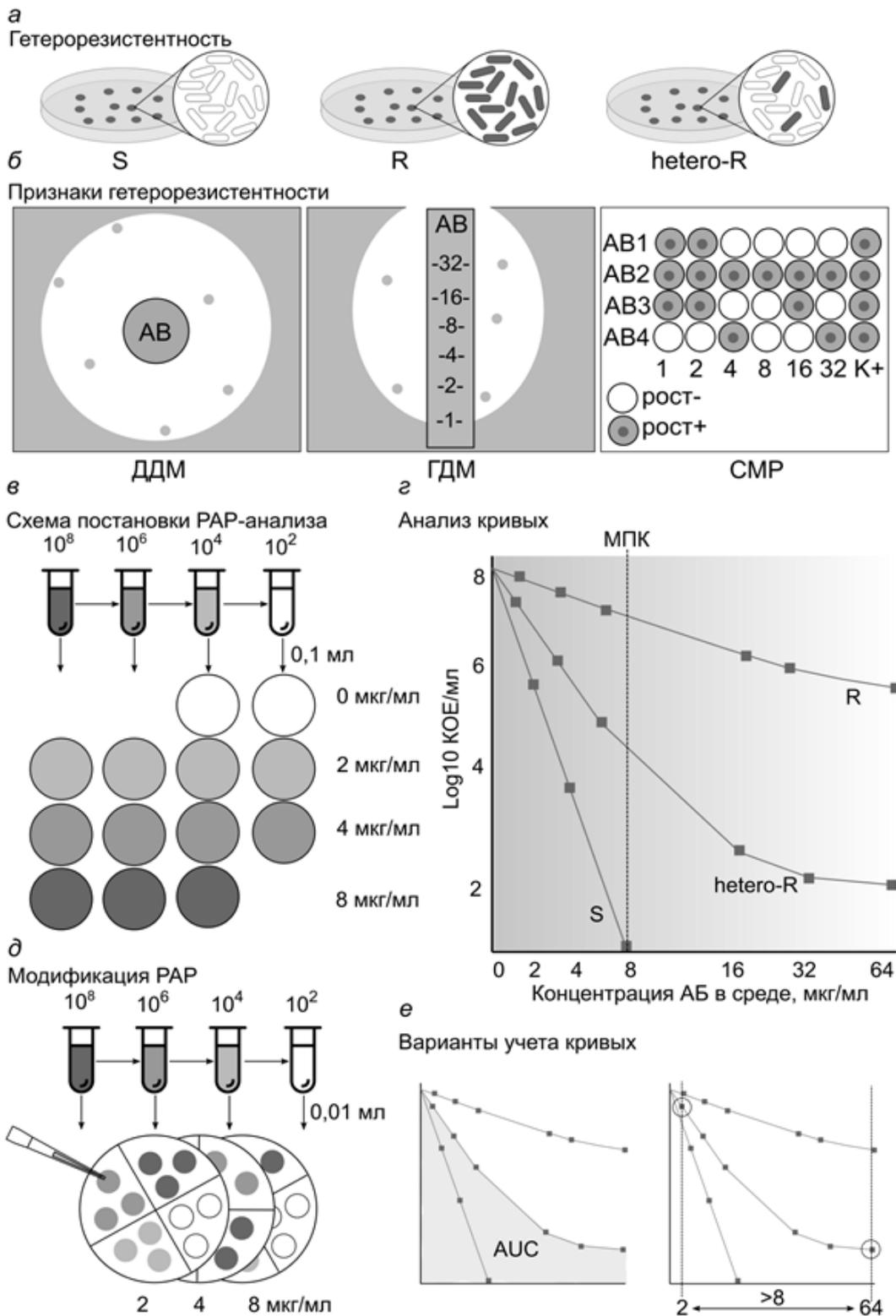
Понятие гетерорезистентности. Традиционно под антимикробной резистентностью понимают вызванную различными биохимическими и генетическими механизмами неспособность антибиотика подавлять функцию своей мишени действия. Золотым стандартом определения чувствительности к антибиотикам является определение методом серийных разведений минимальной подавляющей концентрации (МПК), по величине которой можно судить о микробиологической и клинической чувствительности/устойчивости. Для оценки этих параметров EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) предлагает использовать соответственно эпидемиологическую точку отсечения (epidemiologic cut-off) и клинические пограничные точки (clinical breakpoints) [1]. Диск-диффузионный метод (ДДМ) оценки антимикробной чувствительности является вторичным по отношению к методу серийных разведений.

При использовании стандартных методов по умолчанию предполагается, что все клетки исследуемой бактериальной суспензии, полученной из изолированной колонии, характеризуются одним и тем же уровнем устойчивости. Однако в реальности это не совсем так. Еще в 1947 году Н.Е. Alexander и соавт. [2], работая с *Haemophilus influenzae*, обнаружили, что при исследовании отдельных колоний, сформировавшихся после посева на плотную питательную среду бактериальной суспензии, приготовленной из единичной колонии, результаты оценки чувствительности оказывались неоднородными. Микроорганизмы из подавляющего большинства производных колоний были чувствительны к стрептомицину, но единичные колонии демонстрировали устойчивость. В 1964 году R. Sutherland и соавт. [3] описали неоднородность чувствительности к метициллину отдельных колоний *Staphylococcus aureus*, полученных из гомогенной суспензии. В 1970 году F.N. Kayser и соавт. [4], продолжая изучать феномен неоднородной чувствительности к бета-лактамам производных отдельной колонии *S. aureus*, предложили термин «гетерорезистентность».

В настоящее время общепринятого определения

гетерорезистентности нет. Чаще всего этот термин используют для описания неоднородности в уровне чувствительности отдельных клеток бактериальной суспензии, полученной из единичной колонии [5]. Иными словами, под гетерорезистентностью стоит понимать наличие смешанной культуры по признаку чувствительности к антибиотикам в пределах одной колонии одного микроорганизма (см. рисунок, а). При этом соотношение устойчивых и чувствительных клеток в такой популяции может составлять 10-100 клеток на $10^6 - 10^8$ КОЕ/мл, соответственно. Ввиду такого малого количества резистентных клеток при использовании стандартных подходов определения чувствительности выявить гетерорезистентность весьма затруднительно [6]. Некоторые исследователи относят гетерорезистентность к промежуточному этапу в эволюции фенотипа от чувствительности к полной устойчивости [7]. Одним из подтверждением данной гипотезы является недавнее исследование, где изучался уровень гетерорезистентности к бета-лактамам у карбапенем-устойчивых энтеробактерий в зависимости от длительности применения антибиотиков на примере одного стационара. Авторы установили, что чем дольше использовался антибиотик (десять лет), тем выше гетерорезистентность, которая переходила в стабильную устойчивость [8].

Гетерорезистентность подразделяется на моноклональную и поликлональную. Под поликлональной гетерорезистентностью стоит понимать смесь генетически разных клонов, но относящихся к одному виду, выделенных в культуре из одного биологического материала. Каждый такой клон может характеризоваться своей индивидуальной чувствительностью к антибиотикам [9, 10]. В таком случае количественное соотношение клонов будет приблизительно одинаковым. Поликлональная гетерорезистентность часто описывается у *Helicobacter pylori* и *Mycobacterium tuberculosis* [9-11]. В недавнем исследовании было выявлено, что у 80% пациентов с муковисцидозом выделялись поликлональные гетерорезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* [12].



Гетерорезистентность и методы ее выявления. *а* – отличие фенотипа гетерорезистентности (hetero-R) от чувствительности (S) и устойчивости (R); *б* – признаки возможной гетерорезистентности при постановке разных методов определения чувствительности к антибиотикам: появление одиночных мелких колоний в зонах ингибиции роста при диско-диффузионном методе (ДДМ) или градиентных полосках (ГДМ). Наличие «проскоков» при постановке серийных микроразведений (СМР), АВ1 и АВ2 примеры нормального прохождения СМР, АВ3, АВ4 – примеры проскоков, (K+) – положительный контроль роста; *в* – схема подготовки PAMP-анализа, разведение инокулюма, разведение антибиотика в чашках Петри; *г* – анализ кривых отношения клеточной плотности к концентрации антибиотика, сравнение трех фенотипов: чувствительного, устойчивого и гетерорезистентного; пунктирной линией отмечен уровень МПК, определенный любым стандартным способом; *д* – схема подготовки PAMP-анализа в модификации с использованием микрообъемов; *е* – варианты учета PAMP анализа: измерение параметра AUC и сравнение с контролем; измерение соотношения между максимальной не ингибирующей концентрацией и максимальной ингибирующей.

Настоящий обзор посвящен проблемам выявления исключительно моноклональных гетерорезистентных популяций, состоящих из одной генетической линии. Как правило, в большинстве случаев, микроорганизмы с гетерорезистентностью, при использовании стандартных подходов определения антибиотикочувствительности, относятся к категории чувствительных. Феномен гетерорезистентности описан у многих микроорганизмов, однако частота обнаружения достаточно сильно колеблется от 1% – 50% и зависит от комбинации бактерия-антибиотик, механизмов устойчивости и используемых методов выявления. Так, гетерорезистентность описана у *S. aureus* [13], *Klebsiella pneumoniae* [14], *P. aeruginosa* [15], *Acinetobacter* spp. [16], встречается также среди прихотливых микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae* [17], *H. influenzae* [18], *M. tuberculosis* [19], *H. pylori* [20]. Недавнее исследование показало, что природные цианобактерии, обитающие в пресноводных озерах, также характеризуются множественной перекрестной гетерорезистентностью [21]. Гетерорезистентность к противогрибковым препаратам описана и у грибов *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* [22]. Среди паразитов также описан феномен гетерорезистентности, например, у трипаномы *Trypanosoma rhodesiense* было описано появление минорной субпопуляции, проявляющей устойчивость к действию сыворотки человека [23]. В наибольшей степени изучена гетерорезистентность *S. aureus* к ванкомицину, а среди грамотрицательных бактерий (*K. pneumoniae* и *Acinetobacter* spp.) к колистину и бета-лактамам [5].

Феномен гетерорезистентности описан не только для классических антибиотиков, но и для новых антимикробных препаратов. В частности, необычно высокий уровень частоты встречаемости гетерорезистентности среди карбапенем-устойчивых грамотрицательных бактерий (9–60%), по результатам международных многоцентровых исследований, был выявлен к новому антибактериальному препарату – цефидероколу, представляющего собой гибридную молекулу сидерофора и цефалоспорины [24, 25]. При этом чаще всего устойчивость выявлялась у изолятов *Acinetobacter* spp. Гетерорезистентность может быть нестабильной и в отсутствие воздействия антибиотиками, при частых пассажах или длительном хранении, фенотипы реверсируют в полностью чувствительный фенотип [26]. Перечисленные особенности еще более усложняют лабораторную детекцию рассматриваемого фенотипа. Клиническая значимость гетерорезистентности очевидна, определение ложной чувствительности ведет за собой назначение неадекватной антибактериальной терапии, в ходе которой происходит элиминация чувствительных клеток, а оставшиеся устойчивые клетки дают начало новой популяции. В литературе представлено множество примеров о влиянии гетерорезистентности на неблагоприятные исходы при терапии инфекционных заболеваний. Хронические и рецидивирующие инфекции также могут быть ассоциированы с гетеро-

резистентностью [27]. Существуют также и другие исследования, демонстрирующие отсутствие влияния гетерорезистентности на исход терапии [28, 29]. Такие противоположные результаты свидетельствуют об отсутствии консенсуса о лабораторном выявлении гетерорезистентности, а также о не совсем полном понимании инфекционного процесса, вызванного такими фенотипами.

Классические методы. Выявление гетерорезистентности с помощью традиционных методов определения чувствительности являются единственными доступными инструментами в рутинной лабораторной практике любой лаборатории. Появление одиночных колоний в зоне подавления роста вокруг диска с антибиотиком в ДДМ может служить косвенным признаком гетерорезистентности (см. рисунок, б). Появление отдельных колоний в зоне подавления роста при использовании градиентно-диффузионного метода (ГДМ) с полосками, на которые нанесены градиенты концентраций антибактериального препарата, также может свидетельствовать о наличии возможной гетерорезистентности (см. рисунок, б). Так, например, одно из первых сообщений о гетерорезистентности к колистину у *K. pneumoniae*, во Франции было выявлено с использованием ГДМ, где обнаруживалось множество колоний в зоне ингибиции роста вблизи полоски Etest [30]. Гетерорезистентность проблематично выявить напрямую с помощью метода серийных микроразведений с определением МПК. При наличии резистентной субпопуляции показатель МПК сильно зависит от плотности инокулята и скорости роста резистентных клеток бактерий. В свою очередь, увеличение плотности инокулята может приводить к инокулюм-эффекту, когда уровень МПК повышается при увеличении плотности клеточной биомассы. Выявляемый в таких случаях инокулюм-эффект можно неправильно трактовать как присутствие гетерорезистентной субпопуляции [31, 32]. Однако описан другой косвенный признак гетерорезистентности при постановке серийных разведений. В работе D. Landman соавт. [33] было показано, что при оценке чувствительности к полимиксину В методом серийных микроразведений у 33% из 114 изолятов *Enterobacter cloacae* и *E. aerogenes* наблюдался эффект «проскоков», когда рост появлялся на более высоких концентрациях антибиотика при отсутствии роста в соседних лунках с низкой концентрацией антибиотика (см. рисунок, б). Появление «проскоков» имело случайный характер у разных изолятов. Впоследствии, гетерорезистентность у таких изолятов была подтверждена в популяционном анализе. Метод серийных разведений в агаре для выявления гетерорезистентности имеет больше преимуществ, по сравнению с серийными разведениями в бульоне. Использование агара позволяет выявить возможные микроколонии на более высоких концентрациях антибиотика [34]. Однако к минусам этого подхода можно отнести тот факт, что при стандартной постановке используется низкая клеточная плотность (10^4 – 10^5 КОЕ/мл), в таком случае существует риск пропустить резистентную субпопуляцию. Еще раз стоит подчеркнуть, что выяв-

ление гетерорезистентности с помощью традиционных методов имеет очень низкую эффективность. В 1950-х годах был предложен градиентный метод для определения чувствительности к разным противомикробным препаратам, основанный на использовании двухслойного агара [35]. Сущность метода заключалась в приготовлении в чашке Петри нижнего слоя питательного агара под наклоном, и горизонтальное нанесение второго слоя агара, содержащего антибактериальный препарат. Таким образом, обеспечивался линейный градиент антибактериального препарата от одной точки до противоположной точки чашки Петри. Исследуемая культура микроорганизмов наносилась на поверхность либо на всю площадь агара, либо штрихом. Далее, после инкубирования, по длине роста колоний микроорганизма с учетом линейности диффузии антибактериального препарата в агар, переводили длину роста в уровень МПК. Позже была предложена оригинальная модификация данного подхода с использованием уже тройного агара (Trilevel gradient-agar), разработанного для определения чувствительности грибов к антимикотикам [36]. В основе модификации было добавление третьего тонкого горизонтального слоя питательного агара поверх двух приготовленных нижних. Добавление третьего слоя позволило получить более четкие зоны роста микроорганизмов. На сегодняшний день, метод градиентного агара используется и для выявления гетерорезистентности [6]. Как правило, используют посев в виде штриха и оценивают длину роста колоний по ходу штриха. Появление колоний на высоких концентрациях (в конце штриха) может свидетельствовать о гетерорезистентности. Либо проводят сравнение длин роста штриха с известным гетерорезистентным контрольным штаммом. К основным минусам градиентного подхода можно отнести следующие. Особенности диффузии разных антибиотиков в агар влияют на линейность градиента концентраций; отсутствуют критерии, какую концентрацию антибиотика необходимо использовать; отсутствуют критерии дифференцировки устойчивости и гетерорезистентности. Широко используемые автоматизированные системы, такие как VITEK®2 (bioMérieux), Phoenix™ (Becton Dickinson), Microscan Walkaway (Siemens), также не эффективны для выявления гетерорезистентности, по всей видимости, это связано также с низкой загруженной плотностью инокулюма [34, 37]. Системы для длительного инкубирования и определения чувствительности у *M. tuberculosis*, например, VASTEC™ 960 (Becton Dickinson), также являются не эффективными. Возможно это связано с тем, что устойчивая популяция может вытесняться более быстро растущими клетками, что в итоге приводит к ложноотрицательным результатам [38].

Подходы к выявлению гетерорезистентности к ванкомицину у *S. aureus*. Снижение чувствительности *S. aureus* к ванкомицину при МПК ≥ 2 мкг/мл является неблагоприятным прогностическим клиническим признаком, связанным с возможным появлением гетерорезистентности (heteroresistant vancomycin intermediate *S. aureus*, hVISA). Фенотип hVISA

это единственный на сегодняшний день вариант гетерорезистентности, включенный в рекомендации EUCAST по выявлению специфических механизмов резистентности, имеющих клиническое и эпидемиологическое значение [39]. Так, по рекомендациям EUCAST отмечается, что ДДМ не приемлем, как для определения чувствительности, так и определения гетерорезистентности у стафилококков. Вместо этого предлагаются следующие подходы, которые целесообразно использовать при подозрении на hVISA фенотип (при МПК ванкомицина 2 мкг/мл). Макроградиентный подход заключается в использовании градиентных полосок с ванкомицином и/или тейкопланином, но с высокой плотностью инокулюма, по стандарту мутности 2 МакФарланда с инокуляцией на сердечно-мозговой агар. После инкубации в течение 48 часов, полученные результаты интерпретируются следующим образом, при МПК ванкомицина ≥ 8 мкг/мл или МПК тейкопланина ≥ 12 мкг/мл, исследуемая культура может быть отнесена к гетерорезистентной. Минусом данного подхода может быть инокулюм-эффект, вследствие высокой клеточной плотности [6]. Еще один аналогичный подход заключается в использовании градиентной двойной полоски, содержащей ванкомицин и тейкопланин (Glycopeptide resistance detection gradient test, GRD). GRD-тест выпускается несколькими производителями, например, bioMérieux или Liofilchem®, постановка и интерпретация данного теста аналогична макроградиентному подходу: при достижении МПК ≥ 8 мкг/мл к обоим антибиотикам, исследуемый изолят следует относить к hVISA. В работе S.W. Satola и соавт. [32] был предложен скрининговый тест для детекции hVISA изолятов, основанный на детекции роста на сердечно-мозговом агаре с добавлением ванкомицина (4 мкг/мл) и казеина с использованием инокулюма 0,5 по МакФарланду. Однако, подобный подход не нашел широкого применения, что затрудняет достоверно оценить его эффективность. EUCAST рекомендует использовать альтернативный аналогичный подход: это инокуляция инокулюма в объеме 0,01 мл по шкале мутности 2 МакФарланда, на агар Мюллера-Хинтона, содержащего 5 мкг/мл тейкопланина [39, 40]. После 48 часов инкубации появление колоний будет свидетельствовать о наличии гетерорезистентности к гликопептидам. Несмотря на наличие нескольких подходов, подтверждающим методом выявления гетерорезистентности, является популяционный анализ (Population analysis profile, PAP).

Популяционный анализ – золотой стандарт выявления гетерорезистентности. PAP - анализ был впервые предложен для выявления hVISA, но на сегодняшний день используется практически для всех микроорганизмов и антибиотиков. Данный метод позволяет выявлять минорные субпопуляции, которые способны расти на высоких концентрациях антибиотиков. Схема постановки PAP-анализа (см. рисунок, в) практически одинакова для всех микроорганизмов, а вот подходы интерпретации результатов различаются. В основе PAP-анализа лежит оценка отношения количества живых клеток (КОЕ/мл) в зависимости от

воздействующей концентрации антибиотика. Для постановки РАР-анализа требуется наличие субстанции антибиотика с известной активностью (мкг/мг сухого вещества). Протоколы РАР-анализа достаточно подробно описаны, ниже представлены только основные этапы. Изначально готовятся серии чашек с агаром, содержащим антибиотик, от минимальной (два разведения ниже известного значения МПК) до максимальной концентрации (два и более разведений выше от известного значения МПК). Например, для оценки hVISA фенотипа, который имеет МПК 2 мкг/мл, необходимо приготовить шесть чашек, содержащих ряд концентраций при двукратных разведениях ванкомицина от 0,5 мкг/мл до 16 мкг/мл, и одна чашка без антибиотика. В качестве среды чаще всего используются агар Мюллера-Хинтона или сердечно-мозговой агар. Исходный инокулом исследуемой культуры ($6 \times 10^8 - 10^9$ КОЕ/мл) с последующими 10-кратными разведениями разводятся до 10^1 КОЕ/мл. Каждое разведение инокулома наносится на агар, содержащий каждое разведение антибиотика. Чашки инкубируются 24 – 72 часа до появления колоний. Количество выросших колоний подсчитывается, и с учетом разведений, строится график отношения КОЕ/мл к концентрации антибиотика. В зависимости от категории чувствительности, определенной стандартными способами, характер кривых в РАР-анализе будет различаться (см. рисунок, з). Чувствительный фенотип будет характеризоваться отсутствием роста на более высоких концентрациях, следующих после МПК; устойчивый фенотип, напротив, будет характеризоваться отсутствием спада или незначительным снижением клеточной плотности на возрастающих концентрациях антибиотика. Кривая гетерорезистентного фенотипа будет характеризоваться постепенным снижением КОЕ/мл при повышении концентрации антибиотика. Одной из особенностей гетерорезистентности является существенный разрыв между значением МПК, определенной стандартными подходами и значением МПК в РАР-анализе. В работе R.F. Peltz и соавт. [41] была предложена модификация РАР-анализа, заключающаяся в сокращении объемов инокулома (до 0,01 мл), который добавляется на поверхность агара (см. рисунок, д). С использованием такого подхода существенно сокращается объем используемых сред, так, на одной стандартной чашке Петри (90 мм) с антибиотиком, разделенной на секторы, можно инокулировать несколько тестируемых изолятов и/или их разведений. Подсчет колоний осуществляется в зоне капли инокулома. Для выявления hVISA фенотипов с помощью РАР-анализа был предложен способ определения площади под кривой (Area under curve, AUC), с последующим сравнением AUC известного контрольного штамма, который характеризуется hVISA фенотипом (см. рисунок, е) [42]. Для расчетов используется следующая формула:

$$\frac{AUC_{\text{тестового штамма}}}{AUC_{\text{контрольного штамма}}} = \text{RAR-AUC}.$$

При значениях RAR-AUC $\geq 0,9$, тестируемый изолят будет характеризоваться гетерорезистентностью. В

качестве контрольных штаммов используются штаммы *S. aureus* Mu3 (ATCC 700698) и *S. aureus* Mu50 (ATCC 700699). Другой подход определения гетерорезистентности заключается в измерении разницы между максимальной не ингибирующей концентрацией и максимальной ингибирующей концентрацией в РАР-анализе (см. рисунок, е) [43]. Если такая разница достигает ≥ 8 раз, это свидетельствует о гетерорезистентности. Подобный подход изначально был апробирован для выявления устойчивости *Burkholderia cenocepacia* к полимиксину В и на сегодняшний день используется во многих работах по выявлению гетерорезистентности у грамотрицательных бактерий. К минусам РАР-анализа можно отнести сложность постановки, значительные трудозатраты и времязатраты. Необходимость наличия контрольных штаммов, а также субстанций антибиотиков. Данный метод больше подходит для исследовательских лабораторий и референс-центров. Также, к ограничениям данного метода можно отнести отсутствие стандартизованных протоколов интерпретации получаемых результатов, за исключением определения гетерорезистентности к ванкомицину [44]. Отсутствие стандартных протоколов отражается и на выборе диапазона используемых концентраций антибиотиков. В одних работах используются двукратные разведения, в других работах используют меньшую кратность (шаг 0,1 – 1 мкг/мл), таким образом, нет возможности унифицировать получаемые результаты. РАР-анализ не может быть использован как быстрый скрининговый тест, поскольку на время получения результатов может уходить до 72-х часов. В некоторых исследованиях был предложен «быстрый» РАР-анализ для выявления устойчивости к гликопептидам, где использовалась только одна высокая концентрация (в 2 – 4 раза выше МПК) антибиотика; при появлении роста на этой концентрации это интерпретировалось как гетерорезистентность [45, 46]. Однако, такой подход характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью [6, 47]. На основании анализа ранее опубликованных обзоров [5, 6, 44], в таблице представлены примеры выявления гетерорезистентности у разных микроорганизмов с использованием разных подходов, в большинстве представленных случаев гетерорезистентность была выявлена у клинических изолятов. Методология определения гетерорезистентности *A. baumannii* к колистину подробно представлена в работе E.X. Sherman и соавт. [48].

Молекулярные методы для детекции гетерорезистентности. Использование молекулярных методов с использованием ПЦР или ПЦР в режиме реального времени для детекции различных детерминант устойчивости, в том числе и мутаций, не могут быть использованы для обнаружения гетерорезистентности. Это связано с тем, что большинство коммерческих тест-систем разрабатывается для выявления хорошо изученных и верифицированных детерминант резистентности, а формирование гетерорезистентности происходит преимущественно с формированием множества вариантов мутаций или амплификации генов. Например, у *S. aureus* выявлено более 30 ло

Гетерорезистентность и методы ее выявления среди клинически значимых патогенов

Микроорганизмы	Антибактериальные препараты	Используемые методы обнаружения
<i>S. aureus</i> , стафилококки	Бета-лактамы, цефтаролин	РАР
<i>S. pneumoniae</i>	Пенициллин, фосфомицин	РАР
<i>Enterococcus faecium</i>	Ванкомицин	ГДМ
<i>Clostridioides difficile</i>	Метронидазол	ГДМ, ДДМ
<i>H. influenzae</i>	Имипенем	ГДМ
ГОНФБ, <i>Enterobacterales</i>	Карбапенемы	РАР, ГДМ, ДДМ
ГОНФБ, <i>Enterobacterales</i>	Колистин, полимиксин В	РАР, агар с 4 мкг/мл колистина, ГДМ
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacterales</i>	Ципрофлоксацин	РАР
<i>Bartonella</i> spp.	Ципрофлоксацин	ГДМ
<i>H. pylori</i>	Левифлоксацин, кларитромицин, метронидазол	ГДМ, разведения в агаре
<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i>	Аминогликозиды	РАР, ГДМ
<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacterales</i>	Тигециклин	РАР
<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacterales</i>	Цефидерокол	РАР, ГДМ, ДДМ
<i>S. aureus</i>	Омадациклин	РАР [49]

Примечание. РАР – популяционный анализ; ДДМ – рост колоний в зоне ингибирования роста в диско-диффузионном методе; ГДМ – рост колоний в зоне ингибирования роста у градиентной полоски; ГОНФБ – грамотрицательные неферментирующие бактерии.

кусков, различные мутации в которых ассоциированы с гетерорезистентностью к гликопептидам [50]. Амплификация гена или группы генов, которая обнаруживается среди представителей *Enterobacterales*, *Salmonella* spp., *Acinetobacter* spp., обуславливает формирование гетерорезистентности к бета-лактамам, аминогликозидам, тетрациклинам, колистину [26, 51, 52]. Предел чувствительности обнаружения специфической детерминанты у многих тест-систем составляет от 5% клеток в клеточной популяции, а потенциальная устойчивая субпопуляция при гетерорезистентности составляет 1% и менее клеток [5]. Для повышения чувствительности выявления гетерорезистентности возможно использование цифровой ПЦР (droplet digital PCR, ddPCR). Так, в работе Y. Zheng и соавт. [53] на примере устойчивости *M. tuberculosis* к изониазиду было показано, что метод ddPCR позволяет выявлять до 0,01% ДНК, содержащей специфические мутации, ассоциированные с гетерорезистентностью в смешанной пробе, где 99% от всего количества ДНК представлено ДНК без мутаций. Среди прочих доступных молекулярных подходов стоит выделить полногеномное секвенирование, которое позволяет получить сиквенс всего генома. Любые потенциальные и известные мутации, ассоциированные с гетерорезистентностью можно выявить с помощью данного подхода. Однако, необходимо обратить внимание на то, что необходимо анализировать не только сборки геномов (контиги), но и само выравнивание ДНК-прочтений (ридов). Поскольку гетерорезистентная популяция представляет собой смешанную моноклональную культуру, то необходимо учитывать количественное соотношение ридов с нуклеотидной заменой и ридов без замены при анализе конкретной позиции, соответствующей определенной мутации. Так, в случае обнаружения в выравнивании смешанных ридов, где $\geq 10\%$ ридов несут замену, которая соответствует известной мутации, это может свидетельствовать о наличии субпопуляции [54, 55]. Такой

анализ возможен только при оптимальном покрытии секвенируемого генома (более $\times 100$) и высоком качестве самих ридов. Более сложный случай – это выявление тандемной амплификации генов, которое возможно только с использованием технологий секвенирования с получением длинных прочтений (Oxford Nanopore Technologies или PacBio) [5]. Методы полногеномного секвенирования, несмотря на все большую распространённость и удешевление сиквенса, остаются недоступными для массового использования в клинических бактериологических лабораториях.

Когда необходимо выявлять гетерорезистентность? Поскольку гетерорезистентность имеет важное клиническое значение с одной стороны, и сложность постановки РАР-анализа с другой стороны, возникает вопрос, в каких случаях имеет смысл проводить исследование? Подтверждение гетерорезистентности должно осуществляться при выявлении одиночных колоний при рутинном выполнении ДДМ или ГДМ у исследуемых патогенов. Либо при постановке серийных разведений с получением повторных результатов с «проскоками» лунок. Существуют и клинические аспекты, например, бактериальные изоляты, выделенные от пациентов с предшествующей терапией антибиотиками, имеют риск формирования такого фенотипа [56]. При этом не важно, какую предшествующую антибактериальную терапию получал пациент. Результаты, полученные в *in vitro* экспериментах, показывают, что воздействие одних групп антибиотиков может влиять на формирование гетерорезистентности к другим антибиотикам. Например, воздействие субингибирующими концентрациями бета-лактамов приводит к формированию фенотипа hVISA [57]. Недостаточные дозировки ванкомицина или колистина приводят к появлению гетерорезистентности [58, 59]. Костно-суставные инфекции, хронические остеомиелиты, персистирующие бактериемии, осложненные инфекции центральной нервной системы связаны с риском появления гетерорезистентности [44, 60, 61]. При выяв-

лении гетерорезистентности целесообразно заменить антибиотик на альтернативный, при отсутствии такой возможности наиболее эффективной стратегией будет использование комбинации бактерицидных антибиотиков [44, 62].

Гетерорезистентность, по-видимому, является распространенным явлением, в частности среди изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, однако ее клиническое значение остается до конца неизученным. До сих пор гетерорезистентность остается сложно дифференцируемым фенотипом, для выявления которого необходимы существенные затраты и ресурсы. Остро необходимы четкие определения и унификация методов выявления гетерорезистентности, особенно у грамотрицательных патогенов. Очевидна необходимость разработки экспресс-методов для скрининга и выявления таких фенотипов в рутинной лабораторной практике.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-53, 55-62 с.м.
REFERENCES)

54. Гостев В. В., Сопова Ю. В., Калиногорская О. С., Цветкова И. А., Сидоренко С. В. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль го- и гетеро-мутаций. *Генетика*. 2020; 56(3): 282-91.

REFERENCES

1. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>. 2023.
2. Alexander H.E., Leidy G. Mode of action of streptomycin on type b *H. influenzae*: i. origin of resistant organisms. *The Journal of experimental medicine*. 1947; 85(4):329-38. DOI: 10.1084/jem.85.4.329.
3. Sutherland R., Rolinson G.N. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococci*. *Journal of bacteriology*. 1964; 87(4):887-99. DOI: 10.1128/jb.87.4.887-899.1964.
4. Kayser F.H., Benner E.J., Hoepflich P.D. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalosporins and other beta-lactam antibiotics. *Applied microbiology*. 1970; 20(1):1-5. DOI: 10.1128/am.20.1.1-5.1970.
5. Andersson D.I., Nicoloff H., Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature reviews Microbiology*. 2019; 17(8):479-96. DOI: 10.1038/s41579-019-0218-1.
6. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical microbiology reviews*. 2015; 28(1):191-207. DOI: 10.1128/CMR.00058-14.
7. Dewachter L., Fauvart M., Michiels J. Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance. *Molecular cell*. 2019; 76(2):255-67. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.028.
8. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance to beta-lactam antibiotics may often be a stage in the progression to antibiotic resistance. *PLoS biology*. 2021; 19(7):e3001346. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001346.
9. Zheng C., Li S., Luo Z., Pi R., Sun H., He Q. et al. Mixed infections and rifampin heteroresistance among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2015; 53(7):2138-47. DOI: 10.1128/JCM.03507-14.
10. Mascellino M.T., Porowska B., De Angelis M., Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. *Drug. design, development and therapy*. 2017; 11:2209-20. DOI: 10.2147/DDDT.S136240.

11. Marais A., Monteiro L., Occhialini A., Pina M., Lamouliatte H., Megraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut*. 1999; 44(4):463-7. DOI: 10.1136/gut.44.4.463.
12. Maxwell D.N., Kim J., Pybus C.A., White L., Medford R.J., Filkins L.M. et al. Clinically undetected polyclonal heteroresistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis respiratory specimens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2022; 77(12):3321-30. DOI: 10.1093/jac/dkac320.
13. Falagas M.E., Makris G.C., Dimopoulos G., Matthaiou D.K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clinical microbiology and infection*. 2008; 14(2):101-4. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x.
14. Stojowska-Swedzinska K., Lupkowska A., Kuczynska-Wisnik D., Laskowska E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of molecular sciences*. 2021; 23(1). DOI: 10.3390/ijms23010449.
15. Chen Z. Mechanisms and clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa* heteroresistance. *Surgical infections*. 2023; 24(1):27-38. DOI: 10.1089/sur.2022.349.
16. Jo J., Ko K.S. Tigecycline Heteroresistance and Resistance Mechanism in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology spectrum*. 2021; 9(2):e0101021. DOI: 10.1128/Spectrum.01010-21.
17. Engel H., Gutierrez-Fernandez J., Fluckiger C., Martinez-Ripoll M., Muhlemann K., Hermoso J.A. et al. Heteroresistance to fosfomycin is predominant in *Streptococcus pneumoniae* and depends on the murA1 gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(6):2801-8. DOI: 10.1128/AAC.00223-13.
18. Cherkaoui A., Diene S.M., Renzoni A., Emonet S., Renzi G., Francois P. et al. Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation. *Clinical microbiology and infection*. 2017; 23(2):118 e119-118 e119. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.10.009.
19. Ye M., Yuan W., Molaeipour L., Azizian K., Ahmadi A., Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2021; 20(1):73. DOI: 10.1186/s12941-021-00478-z.
20. Keikha M., Karbalaee M. Prevalence of antibiotic heteroresistance associated with *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Microbial pathogenesis*. 2022; 170:105720. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105720.
21. Wang Z., Chen Q., Zhang J., Yan H., Chen Y., Chen C. et al. High prevalence of unstable antibiotic heteroresistance in cyanobacteria causes resistance underestimation. *Water research*. 2021; 202:117430. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117430.
22. Ferreira G.F., Santos D.A. Heteroresistance and fungi. *Mycoses*. 2017; 60(9):562-8. DOI: 10.1111/myc.12639.
23. Xong H.V., Vanhamme L., Chamekh M., Chimfwembe C.E., Van Den Abbeele J., Pays A. et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*. 1998; 95(6):839-46. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81706-7.
24. Choby J.E., Ozturk T., Satola S.W., Jacob J.T., Weiss D.S. Widespread cefiderocol heteroresistance in carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *The Lancet Infectious diseases*. 2021; 21(5):597-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00194-8.
25. Karakonstantis S., Rousaki M., Kritsotakis E.I. Cefiderocol: systematic review of mechanisms of resistance, heteroresistance and *in vivo* emergence of resistance. *Antibiotics*. 2022; 11(6). DOI: 10.3390/antibiotics11060723.
26. Nicoloff H., Hjort K., Levin B.R., Andersson D.I. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nature microbiology*. 2019; 4(3):504-14. DOI: 10.1038/s41564-018-0342-0.
27. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? *PLoS pathogens*. 2019; 15(6):e1007726. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007726.
28. van Hal S.J., Jones M., Gosbell I.B., Paterson D.L. Vancomycin

- heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21217. DOI: 10.1371/journal.pone.0021217.
29. Srinivas P., Hunt L.N., Pouch S.M., Thomas K., Goff D.A., Pancholi P. et al. Detection of colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* from blood and respiratory isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018; 91(2):194-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.028.
 30. Bardet L., Baron S., Leangapichart T., Okdah L., Diene S.M., Rolain J.M. Deciphering heteroresistance to colistin in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Marseille, France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017; 61(6). DOI: 10.1128/AAC.00356-17.
 31. van Hal S.J., Wehrhahn M.C., Barbagiannakos T., Mercer J., Chen D., Paterson D.L. et al. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(4):1489-94. DOI: 10.1128/JCM.02302-10.
 32. Satola S.W., Farley M.M., Anderson K.F., Patel J.B. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(1):177-83. DOI: 10.1128/JCM.01128-10.
 33. Landman D., Salamera J., Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2013; 51(12):4106-11. DOI: 10.1128/JCM.02129-13.
 34. Lo-Ten-Foe J.R., de Smet A.M., Diederer B.M., Kluytmans J.A., van Keulen P.H. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(10):3726-30. DOI: 10.1128/AAC.01406-06.
 35. Bryson V., Szybalski W. Microbial selection. *Science*. 1952; 116(3003):45-51. DOI: 10.1126/science.116.3003.45.
 36. Hunt D.E., Sandham H.J. Improved agar gradient-plate technique. *Applied microbiology*. 1969; 17(2):329-30. DOI: 10.1128/am.17.2.329-330.1969.
 37. Gordon N.C., Wareham D.W. Failure of the MicroScan WalkAway system to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(9):3024-5. DOI: 10.1128/JCM.01033-09.
 38. Zhang Z., Wang Y., Pang Y., Liu C. Comparison of different drug susceptibility test methods to detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(9):5632-5. DOI: 10.1128/AAC.02778-14.
 39. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST; 2017.
 40. Wootton M., MacGowan A.P., Walsh T.R., Howe R.A. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(2):329-32. DOI: 10.1128/JCM.01508-06.
 41. Pfltz R.F., Schmidt J.L., Wilkinson B.J. A microdilution plating method for population analysis of antibiotic-resistant staphylococci. *Microbial drug resistance*. 2001; 7(3):289-95. DOI: 10.1089/10766290152652846.
 42. Wootton M., Howe R.A., Hillman R., Walsh T.R., Bennett P.M., MacGowan A.P. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001; 47(4):399-403. DOI: 10.1093/jac/47.4.399.
 43. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PLoS One*. 2013; 8(7):e68874. DOI: 10.1371/journal.pone.0068874.
 44. Roch M., Sierra R., Andrey D.O. Antibiotic heteroresistance in ESKAPE pathogens, from bench to bedside. *Clinical microbiology and infection*. 2023; 29(3):320-5. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.10.018.
 45. D'Mello D., Daley A.J., Rahman M.S., Qu Y., Garland S., Pearce C. et al. Vancomycin heteroresistance in bloodstream isolates of *Staphylococcus capitis*. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(9):3124-6. DOI: 10.1128/JCM.00592-08.
 46. Sun W., Chen H., Liu Y., Zhao C., Nichols W.W., Chen M. et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from 14 cities in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(9):3642-9. DOI: 10.1128/AAC.00206-09.
 47. Voss A., Mouton J.W., van Elzakker E.P., Hendrix R.G., Goessens W., Kluytmans J.A. et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2007; 6:9. DOI: 10.1186/1476-0711-6-9.
 48. Sherman E.X., Wozniak J.E., Weiss D.S. Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods in molecular biology*. 2019; 1946:39-50. DOI: 10.1007/978-1-4939-9118-1_4.
 49. Bai B., Lin Z., Pu Z., Xu G., Zhang F., Chen Z. et al. *In vitro* activity and heteroresistance of omadacycline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates from China reveal the impact of omadacycline susceptibility by branched-chain amino acid transport system II carrier protein, Na/Pi cotransporter family protein, and fibronectin-binding protein. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10:2546. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02546.
 50. Fait A., Seif Y., Mikkelsen K., Poudel S., Wells J.M., Palsson B.O. et al. Adaptive laboratory evolution and independent component analysis disentangle complex vancomycin adaptation trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022; 119(30):e2118262119. DOI: 10.1073/pnas.2118262119.
 51. Hjort K., Nicoloff H., Andersson D.I. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*. 2016; 102(2):274-89. DOI: 10.1111/mmi.13459.
 52. Anderson S.E., Sherman E.X., Weiss D.S., Rather P.N. Aminoglycoside heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *mSphere*. 2018; 3(4). DOI: 10.1128/mSphere.00271-18.
 53. Zheng Y., Xia H., Bao X., Zhao B., He P., Zhao Y. Highly sensitive detection of isoniazid heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* by droplet digital PCR. *Infection and drug resistance*. 2022; 15:6245-54. DOI: 10.2147/IDR.S381097.
 54. Gostev V., Sopova J., Kalinogorskaya O., Tsvetkova I., Sidorenko S. Selection of resistance to daptomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of homo- and hetero-mutations. *Genetika*. 2020; 56(3):282-91. DOI: 10.31857/S0016675820030066. (in Russian)
 55. Gostev V., Kalinogorskaya O., Ivanova K., Kalisnikova E., Lazareva I., Starkova P. et al. *In vitro* selection of high-level beta-lactam resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10(6). DOI: 10.3390/antibiotics10060637.
 56. He J., Jia X., Yang S., Xu X., Sun K., Li C. et al. Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2018; 51(3):413-21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.014.
 57. Roch M., Clair P., Renzoni A., Reverdy M.E., Dauwalder O., Bes M. et al. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(9):5306-14. DOI: 10.1128/AAC.02574-14.
 58. Gomes D.M., Ward K.E., LaPlante K.L. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(4):424-32. DOI: 10.1002/phar.1577.
 59. David M.D., Gill M.J. Potential for underdosing and emergence of resistance in *Acinetobacter baumannii* during treatment with colistin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008; 61(4):962-4. DOI: 10.1093/jac/dkn009.
 60. Rodriguez C.H., Bombicino K., Granados G., Nastro M., Vay C., Famiglietti A. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive

- care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009; 65(2):188-91. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.019.
61. Li J., Rayner C.R., Nation R.L., Owen R.J., Spelman D., Tan K.E. et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(9):2946-50. DOI: 10.1128/AAC.00103-06.
62. Band V.I., Hufnagel D.A., Jaggavarapu S., Sherman E.X., Wozniak J.E., Satola S.W. et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nature microbiology*. 2019; 4(10):1627-35. DOI: 10.1038/s41564-019-0480-z.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Синявкин Д.О.¹, Ермолаева Е.А.², Сайфуллин Р.Ф.^{1,3}, Байков Д.А.¹, Бычичко Д.Ю.²

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ТРАНСФЕРА РЕФЕРЕНСНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ДЛЯ КОНЦЕНТРАЦИИ β -ХГЧ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С АНАЛИТИЧЕСКИХ ПЛАТФОРМ SIEMENS IMMULITE 2000 XPi И ORTHO VITROS 3600 НА MINDRAY CL-2000i

¹ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы», 123182, Москва, Россия;

²ООО «Фокус-М», 115280, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Количественное определение содержания свободных бета-субъединиц хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови имеет важное прогностическое значение в клинической картине беременности в норме и при патологии. Первичным этапом диагностических мероприятий является сравнение полученных результатов с популяционными референсными интервалами (РИ). Цель исследования - проведение переноса РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови женщин, находящихся на разных сроках беременности, с иммунохемилюминесцентных анализаторов Immulite 2000 XPi (Siemens AG, ФРГ) и Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostics, США) на иммунохемилюминесцентный анализатор CL-2000i (Mindray Medical International Limited, КНР). Исследование проведено на 347 образцах архивной сыворотки крови женщин, срок беременности которых составлял от 1 до 12 недель. Концентрацию β -ХГЧ в сыворотке измеряли на иммунохемилюминесцентных анализаторах в параллельных пробах по парам: Siemens Immulite 2000 XPi - Mindray CL-2000i (204 исследования) и Ortho Vitros 3600 - Mindray CL-2000i (143 исследования). Результаты парных измерений концентраций β -ХГЧ логарифмировали, затем применяли модели линейной регрессии Пассинга-Баблока и Деминга в качестве статистических инструментов для нахождения уравнения связи (уравнения трансфера) для пересчёта РИ. Разработанные РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови беременных женщин, регистрируемой при использовании аналитических систем Mindray серии CL, прошли оценку корректности на клиническом материале и внедрены в лабораторную и клиническую практику медицинского учреждения.

Ключевые слова: беременность; референсный интервал; бета-ХГЧ; ХГЧ.

Для цитирования: Синявкин Д.О., Ермолаева Е.А., Сайфуллин Р.Ф., Байков Д.А., Бычичко Д.Ю. Результаты проведения трансфера референсных интервалов для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови беременных женщин с аналитических платформ Siemens Immulite 2000 XPi и Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68 (7):428-436. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-428-436>.

Для корреспонденции: Бычичко Дмитрий Юрьевич, канд. мед. наук, специалист по продукции ООО «Фокус-М»; e-mail: bdi@fokus-m.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Частичное финансирование проведённого исследования предоставлено ООО «Фокус-М» в рамках программы поддержки научных разработок.

Благодарность. Особую благодарность выражаем среднему медицинскому персоналу лаборатории за сбор биологического материала и проведение анализов.

Поступила 29.03.2023

Принята к печати 20.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Sinyavkin D.O.¹, Ermolaeva E.A.², Sayfullin R.F.^{1,3}, Baykov D.A.¹, Bychichko D.Yu.²

THE RESULTS OF THE TRANSFER OF REFERENCE INTERVALS FOR THE SERUM CONCENTRATION OF β -hCG OF PREGNANT WOMEN FROM ANALYTICAL PLATFORMS SIEMENS IMMULITE 2000 XPi AND ORTHO VITROS 3600 TO THE MINDRAY CL-2000i

¹Moscow City Clinical Hospital 52, 123182, Moscow, Russia;

²LLC «Fokus-M», 115280, Moscow, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia

Measurement of serum free beta chains of human chorionic gonadotropin (β -hCG) concentration has an important prognostic value in the clinical picture of pregnancy in normal and pathological conditions. The first stage of in vitro diagnostics is the

comparison of the obtained results with population reference intervals (RI). Therefore, the purpose of this study was to transfer the RI for the concentration of β -hCG in the blood serum of women at different stages of pregnancy from Immulite 2000 XPI (Siemens AG, Germany) and Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostics, USA) CLIA platforms to CL-2000i (Mindray Medical International Limited, China) The study was carried out on 347 samples of archival blood serum of women whose gestation period ranged from 1 to 12 weeks. The concentration of β -hCG in serum was measured on pairs on CLIA analyzers in parallel: Siemens Immulite 2000 XPI - Mindray CL-2000i (204 studies) and Ortho Vitros 3600 - Mindray CL-2000i (143 studies). The results of paired measurements of β -hCG concentrations were logarithm. The Passing-Bablok and Deming linear regression models were used to find the transfer equations for recalculating RI. RIs for serum concentration of β -hCG of pregnant women using Mindray CL series analytical systems were developed. New RIs passed intralaboratory validation and were introduced into the laboratory and clinical practice.

Key words: pregnancy; reference interval; beta-hCG; hCG.

For citation: Sinyavkin D. O., Ermolaeva E. A., Sayfullin R. F., Baykov D. A., Bychichko D. Yu. The results of the transfer of reference intervals for the serum concentration of β -hCG in pregnant women from analytical platforms Siemens Immulite 2000 XPI and Ortho Vitros 3600 to the Mindray CL-2000i. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7): 428-436 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-428-436>.

For correspondence: Bychichko D. Yu., Product Specialist, LLC «Focus-M»; e-mail: bdi@fokus-m.ru

Information about authors:

Sinyavkin D. O.,	https://orcid.org/0000-0002-9222-7987 ;
Ermolaeva E. A.,	https://orcid.org/0000-0003-2409-9220 ;
Sayfullin R. F.,	https://orcid.org/0000-0003-0191-3728 ;
Baykov D. A.,	https://orcid.org/0000-0002-7901-0126 ;
Bychichko D. Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-1585-4415 .

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

Funding. Partial funding for the study was provided by LLC Fokus-M as part of the scientific development support program.

Acknowledgment. We would like to express our special thanks to the paramedical staff of the laboratory for the collection of biological material and conducting analyses.

Received 29.03.2023

Accepted 20.04.2023

Published 03.07.2023

Введение. Лабораторное диагностическое исследование сыворотки крови беременных женщин на содержание свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) является важной частью комплексного мониторинга течения беременности. Гликопротеин β -ХГЧ продуцируется трофобластом, его концентрация экспоненциально увеличивается до 13-15-й недели, далее снижается до уровня 20-30% от максимального до конца беременности. После родоразрешения концентрация этого гликопротеина снижается ниже порога регистрации аналитических систем [1, 2].

Мониторинг концентрации β -ХГЧ позволяет прогнозировать неблагоприятные исходы одно- и многоплодной беременности, наступившей спонтанно или в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [3-5]. Изменение концентрации β -ХГЧ (абсолютное снижение или замедление роста концентрации в первом триместре беременности) является одним из прогностических признаков клинической картины неразвивающейся беременности [6, 7], угрозы выкидыша [8]. Мониторинг уровня β -ХГЧ является удобным инструментом для выявления эктопической беременности (совместно с инструментальными методами исследования, такими как трансвагинальное ультразвуковое исследование) и оценки результата аспирационного и хирургического прерывания эктопической беременности [9-11].

Для адекватной первичной интерпретации проведенного количественного анализа содержания β -ХГЧ в пробе врачу-клиницисту необходимо провести срав-

нение результатов пациента с установленными валидированными популяционными референсными интервалами (РИ) [12-14]. В России разработка, перенос (трансфер) и валидация РИ является задачей каждой отдельной лаборатории [15-17]. Труднодоступность традиционно применяемых систем и реагентов в данном ЛПУ, необходимость в гармонизации результатов, получаемых при использовании имеющихся аналитических систем в лаборатории, и установлении актуальных РИ стали предпосылками к проведению настоящей работы. Цель исследования - проведение трансфера РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови женщин, находящихся на разных сроках беременности, с аналитических иммунохемилюминесцентных платформ Siemens и Ortho на Mindray.

Материал и методы. Исследование проходило на базе Клинико-диагностической лаборатории № 1 ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗМ». Работа проведена в соответствии с рекомендациями, изложенными в международных и государственных стандартах: IFCC и CLSI EP28-A3c (С28-A3)¹, ГОСТ ISO/IEC 17025-2019², ГОСТ Р 53022.3-2008³, ГОСТ Р ИСО 15189-2015⁴. Поскольку для выполнения настоящего исследования необходим биологический материал специфической популяционной группы (беременных женщин), результаты оценивали ретроспективно нерандомизированно, работая с архивной сывороткой, с целью полного исключения риска создания физического и психоэмоционального негативного состояния участвующих в исследовании женщин. Для проведения трансфера РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке

крови использовали венозную кровь 347 беременных женщин (срок беременности составлял от 1-й до 12-ти недель, медиана возраста - 33,5 года, 95% доверительный интервал для медианы [32,2; 34,1]), прошедших обследование в отделениях ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗМ». После сбора биологического материала кровь центрифугировали в пластиковых пробирках, содержащих активатор свёртывания и разделительный гель (SARSTEDT AG&Co, Германия) для получения сыворотки. Концентрацию β -ХГЧ в сыворотке измеряли на иммунохимических анализаторах в параллельных пробах по парам: Siemens Immulite 2000 XPi - Mindray CL-2000i (204 исследования) и Ortho Vitros 3600 - Mindray CL-2000i (143 исследования). На анализаторе Mindray CL-2000i (Mindray Medical International Limited, КНР) постановку проб осуществляли после исследования концентрации β -ХГЧ на Immulite 2000 XPi (Siemens AG, ФРГ) или Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostics, США), т.е. использовали архивную сыворотку, хранившуюся при температуре от +2 до +8 °С в лабораторном холодильнике POZIS ХЛ-250 (АО «ПО-ЗиС», Россия) от 1 до 24 ч (медиана - 7,8 часа, 95% доверительный интервал для медианы [6,3; 11,2]). Для измерения концентрации β -ХГЧ в сыворотке применяли соответствующие наборы реактивов для каждого из производителей аналитических систем.

Постановку парных проб вели поэтапно. Пробы сыворотки крови пациентов, поступившие в лабораторию, подвергали обработке в рамках стандартных операционных процедур (СОП) и исследовали на аналитических платформах Siemens Immulite 2000 XPi и/или Ortho Vitros 3600. Затем пробы исследовали на платформе Mindray CL-2000i. Полученные результаты из ЛИС обобщали в таблице результатов для дальнейшей статистической обработки.

Заключительным этапом исследования была статистическая обработка результатов парных измерений концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови, проведённая в соответствии с международными стандартами и алгоритмами, используя специализированное программное обеспечение: GraphPad Prism (LLC GraphPad Software, США), MedCalc (MedCalc Software Ltd, США) и Microsoft Excel (пакет Microsoft 365 MSO, Microsoft Corporation, США). Проверку на соответствие полученной выборки нормальному распределению осуществляли по критерию Д'Агостино-Пирсона. Линейность зависимости результатов парных измерений исследовали с использованием диаграммы Бланда-Алтмана (распределения процентной разности), диаграмм квантиль-квантиль (стандартная z-оценка). Логарифмирование проводили с помощью

встроенной функции. Вычисление уравнения зависимости (уравнения трансфера) производили по методам Пассинга-Баблока и Деминга, в первом случае использовали коэффициент корреляции Спирмена, во втором – Пирсона [18-20]. Выбросы оценивали, применяя критерий Тьюки. Для полученных результатов указывали 95% доверительные интервалы (ДИ) и уровень значимости (p), где это возможно. Рассчитанные РИ сопоставляли с РИ, указанными производителями аналитических наборов, валидировали на выборке из 21-й беременной женщины, срок беременности которых составлял от 1-й до 12-ти недель с нормальным течением беременности.

Результаты. В зависимости от аналитической системы результаты работы разделены на две части. В первой части работы проведён трансфер РИ для концентрации β -ХГЧ с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i (204 исследования). Результаты парных измерений подвергли логарифмированию, полученная выборка имела линейную зависимость и соответствовала нормальному распределению по критерию Д'Агостино-Пирсона (рис. 1, а - е).

Исходя из диаграммы «квантиль-квантиль» и диаграммы процентной разности Бланда-Алтмана (см. рис. 1, а, б) можно заключить, что имеется линейная зависимость между логарифмами концентраций β -ХГЧ в парных пробах при использовании аналитических систем Siemens и Mindray. Средняя разность между измерениями составляет 0,19% (ДИ - [-0,45; 0,84%]), стандартное отклонение составило 3,48%, что подтверждает отсутствие значительной системной ошибки в парных измерениях. CUSUM-тест не выявил значимых отклонений от линейной модели зависимости (при $p=0,15$). Характер распределения точек на диаграмме Бланда-Алтмана позволяет сделать вывод, что зависимость процентной разности от величины измерений отсутствует. Соответственно, результаты парных измерений хорошо согласуются.

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена при построении линейной регрессии Пассинга-Баблока (см. рис. 1, в, г) составил 0,995 (ДИ - [0,994; 0,996] при $p<0,0001$), что означает наличие тесной линейной зависимости между результатами. На диаграмме распределения остатков точки расположены случайно, без видимых зависимостей и тенденций, что также подтверждает предпочтительность модели линейной регрессии. Вычислено уравнение регрессии:

$$\lg(C_{Mindray}) = -0,133 + 1,040 \lg(C_{Siemens}),$$

где: $C_{Mindray}$ и $C_{Siemens}$ соответствующие значения

¹CLSI EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. 3rd edition.

²ГОСТ ISO/IEC 17025-2019: Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий, 01.09.2019. GOST ISO/IEC 17025-2019: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 01.09.2019.

³ГОСТ Р 53022.3-2008: Национальный стандарт Российской Федерации. Технологи лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3: Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов, 01.01.2010. GOST R 53022.3-2008: Clinical laboratory technologies. Requirements for quality of clinical laboratory tests. Part 3: Assessment of laboratory tests clinical significance, 01.01.2010.

⁴ГОСТ Р ИСО 15189-2015: Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности, 01.06.2016. GOST R ISO 15189-2015: Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence, 01.06.2016.

концентраций β -ХГЧ при использовании аналитической системы Mindray или Siemens соответственно.

ДИ для коэффициента наклона составил [1,02; 1,06], что исключает значение «1», ДИ для интерсепта - [-0,19; -0,09], что исключает значение «0». Результаты применения уравнения трансфера с Siemens

Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу Пассинга-Баблока приведены в табл. 1.

Вычисленный общий РИ для концентрации β -ХГЧ в результате трансфера с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу Пассинга-Баблока в период беременности с 1-й по 10-ю неделю составил от

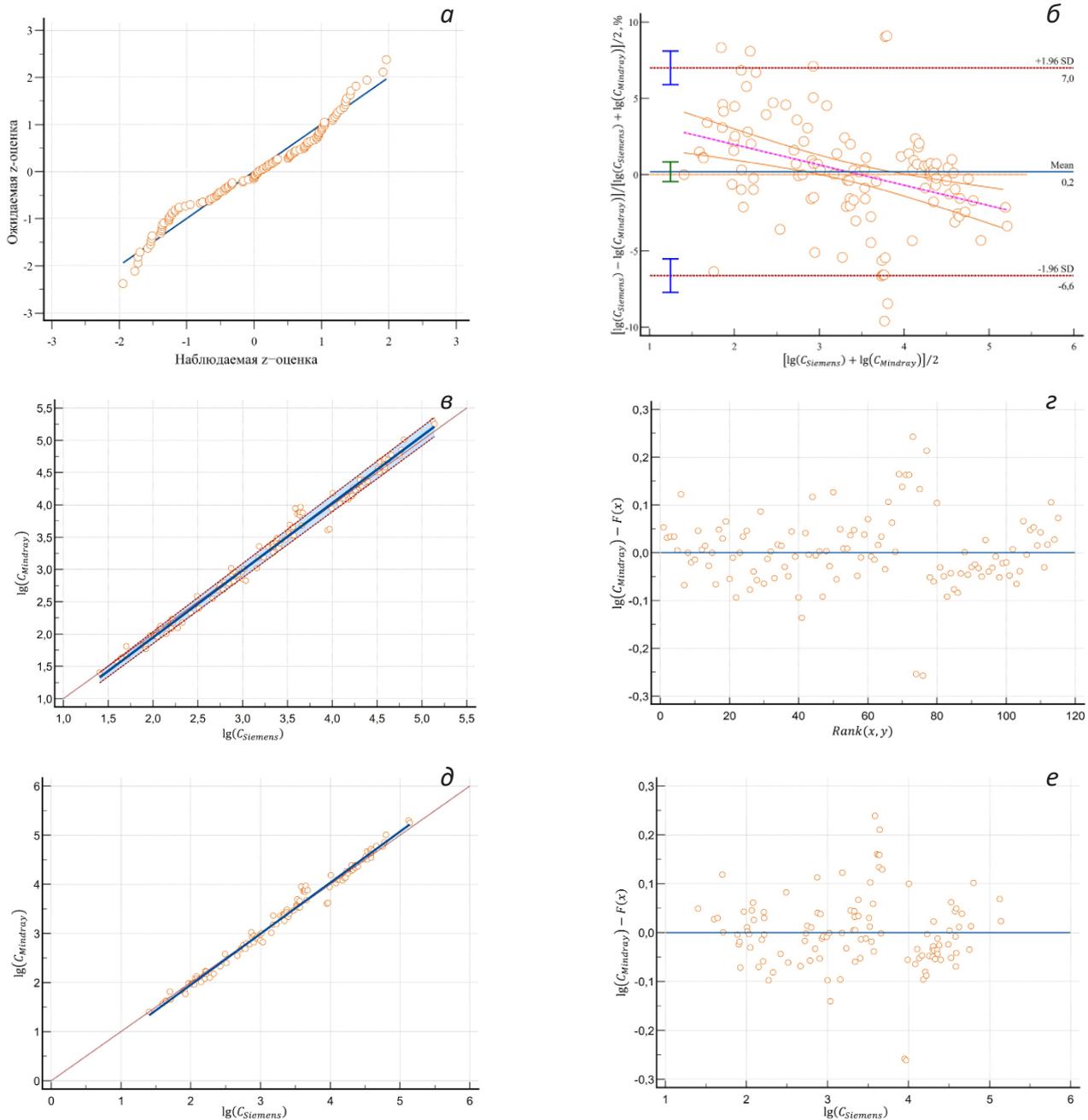


Рис. 1. Графики проведённого трансфера РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i. а - диаграмма «квантиль-квантиль» (стандартная z-оценка), б - диаграмма Бланда-Алмана (процентная разность), в - регрессия Пассинга-Баблока, г - диаграмма распределения остатков для регрессии Пассинга-Баблока [19], д - регрессия Деминга, е - диаграмма распределения остатков для регрессии Деминга.

43,07 до 239882,96 мМЕ/мл, что совпадает с данными, представленными в инструкции от Mindray, где указан РИ от 50 до 221796 мМЕ/мл, с разницей менее 8%.

Коэффициент корреляции Пирсона при построении линейной регрессии Деминга с коэффициентом

том вариации 5,0% (рис. 1, д, е) составил 0,994 (ДИ - [0,991; 0,996]), что означает наличие тесной линейной связи между результатами. На диаграмме распределения остатков точки расположены случайно, без видимых зависимостей и тенденций, как и при

построении регрессии Пассинга-Баблока, что также подтверждает предпочтительность модели линейной регрессии. Вычислено уравнение регрессии Деминга:

$$\lg(C_{Mindray}) = -0,127 + 1,040 \lg(C_{Siemens}),$$

где: $C_{Mindray}$ и $C_{Siemens}$ - соответствующие значения концентраций β -ХГЧ при использовании

аналитической системы Mindray или Siemens соответственно.

ДИ для коэффициента наклона составил [1,02; 1,06], что исключает значение «1», а ДИ для интерсепта - [-0,17; -0,08], что исключает значение «0». Результаты применения уравнения трансфера с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу Де

Таблица 1

РИ для концентрации β -ХГЧ, вычисленные в результате трансфера с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу регрессии Пассинга-Баблока

Срок беременности, недели	Siemens Immulite 2000 XPi		Mindray CL-2000i	
	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл
1-2	50,00	500,00	43,07	472,19
2-3	100,00	5000,00	88,56	5176,25
3-4	500,00	10000,00	472,19	10642,83
4-5	1000,00	50000,00	970,86	56743,56
5-6	10000,00	100000,00	10642,83	116669,68
6-7	15000,00	200000,00	16224,62	239882,96
7-8	15000,00	200000,00	16224,62	239882,96
8-12	10000,00	100000,00	10642,83	116669,68

Примечание. Здесь и в табл. 2-4: НП РИ - нижний предел референсного интервала, ВП РИ - верхний предел референсного интервала.

минга приведены в табл. 2.

Вычисленный РИ для концентрации β -ХГЧ в результате трансфера с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу Деминга в период беременности с 1-й по 10-ю неделю составил от 43,63 до 243204,27 мМЕ/мл, что примерно совпадает с данными, представленными в инструкции к анализатору

Mindray, где указан РИ от 50 до 221796 мМЕ/мл, с разницей менее 10%.

Во второй части аналогичный порядок вычислений использован в проведении трансфера РИ для концентраций β -ХГЧ в сыворотке крови женщин, находящихся на различном сроке беременности, с аналитической системы Ortho Vitros 3600 на Mindray

Таблица 2

РИ для концентрации β -ХГЧ, вычисленные в результате трансфера с Siemens Immulite 2000 XPi на Mindray CL-2000i по методу Деминга

Срок беременности, недели	Siemens Immulite 2000 XPi		Mindray CL-2000i	
	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл
1-2	50,00	500,00	43,63	478,44
2-3	100,00	5000,00	89,72	5246,01
3-4	500,00	10000,00	478,44	10786,98
4-5	1000,00	50000,00	983,78	57521,31
5-6	10000,00	100000,00	10786,98	118276,92
6-7	15000,00	200000,00	16445,04	243204,27
7-8	15000,00	200000,00	16445,04	243204,27
8-12	10000,00	100000,00	10786,98	118276,92

CL-2000i (143 парных результата). Парные измерения подвергли логарифмированию, полученная выборка имела линейную зависимость и соответствовала нормальному измерению (рис. 2, а - е).

Исходя из диаграммы остатков «квантиль-квантиль» и диаграммы процентной разницы Бланда-Алтмана (рис. 2, а, б) можно заключить, что имеется линейная зависимость между логарифмами концентраций β -ХГЧ при использовании аналитических систем Ortho и Mindray. Средняя разность между измерени-

ями составила 3,75% при ДИ [3,15; 4,34%], стандартное отклонение составило 3,15%, что подтверждает отсутствие значительной системной ошибки в парных измерениях. CUSUM-тест не выявил значимых отклонений от линейной модели зависимости (при $p=0,06$). Характер распределения точек на диаграмме Бланда-Алтмана позволяет сделать вывод, что зависимость процентной разности от величины логарифма концентрации β -ХГЧ отсутствует. Соответственно, можно заключить, что результаты парных измерений

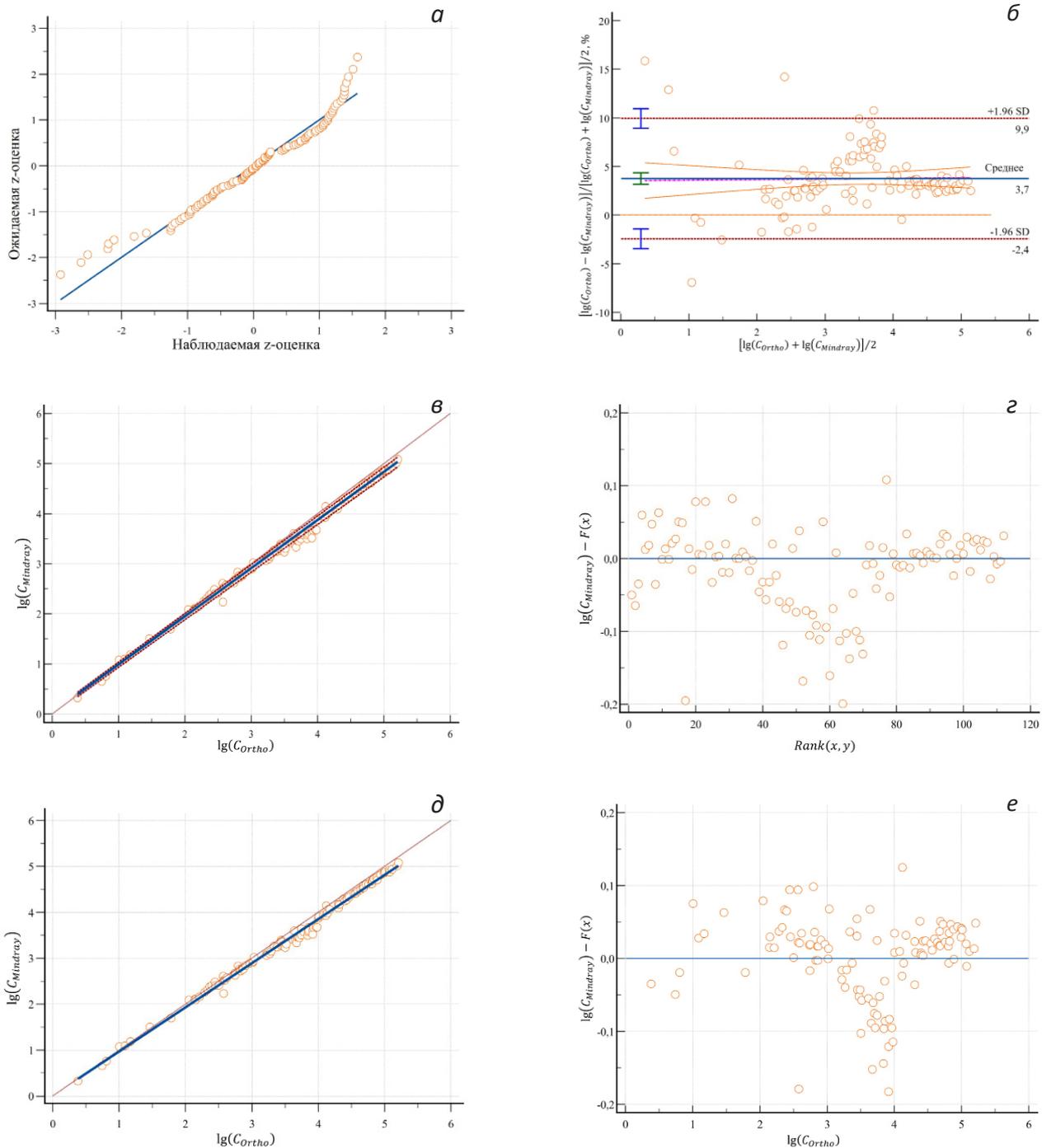


Рис. 2. Графики проведенного трансфера РИ для концентрации β-ХГЧ в сыворотке крови с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i. а - диаграмма «квантиль-квантиль» (стандартная z-оценка); б - диаграмма Бланда-Алтмана (процентная разность); в - регрессия Пассинга-Баблока; г - диаграмма распределения остатков для регрессии Пассинга-Баблока; д - регрессия Деминга; е - диаграмма распределения остатков для регрессии Деминга [19].

хорошо согласуются.

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена при построении линейной регрессии Пассинга-Баблока (рис. 2, в, г) составил 0,997 (при $p < 0,0001$), что означает наличие тесной линейной зависимости между результатами. На диаграмме распределения остатков точки расположены случайно, без видимых зависимостей и тенденций, что также подтверждает предпо-

чительность модели линейной регрессии. Вычислено уравнение регрессии:

$$\lg(C_{Mindray}) = 0,028 + 0,962 \lg(C_{Ortho}),$$

где: $C_{Mindray}$ и C_{Ortho} - соответствующие значения концентраций β-ХГЧ при использовании аналитической системы Mindray или Ortho соответ-

ственно.

ДИ для коэффициента наклона составил [0,950; 0,973], что исключает значение «1», ДИ для интерсепта - [0,019; 0,064], что исключает значение «0».

Результаты применения уравнения трансфера с

Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Пассинга-Баблока приведены в табл. 3.

Вычисленный референсный интервал концентрации ХГЧ в результате переноса с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Пассинга-Баблока в пе-

Таблица 3

РИ для концентрации β -ХГЧ, вычисленные в результате трансфера с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Пассинга-Баблока

Срок беременности, недели	Ortho Vitros 3600		Mindray CL-2000i	
	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл
1-2	50,00	500,00	45,85	419,82
2-3	100,00	5000,00	89,31	3843,60
3-4	500,00	10000,00	419,82	7485,69
4-5	1000,00	50000,00	817,63	35189,60
5-6	10000,00	100000,00	7485,69	68534,24
6-7	15000,00	200000,00	11055,40	133475,31
7-8	15000,00	200000,00	11055,40	133475,31
8-12	10000,00	100000,00	7485,69	68534,24

риод беременности с 1-й по 10-ю неделю составил от 45,85 до 133475,31 мМЕ/мл, что примерно совпадает с данными, представленными в инструкции от производителя Mindray, где указан РИ от 50 до 221796 мМЕ/мл по НП, но вычисленный ВП РИ ниже указанного производителем в 1,6 раза.

Коэффициент корреляции Пирсона при построении линейной регрессии Деминга с коэффициентом вариации 5,0 % (рис. 2, *d*, *e*) составил 0,997 при ДИ [0,996; 0,998], что означает наличие тесной линейной связи между результатами. Диаграмма распределения остатков имеет «пресный» вид, как и при построении регрессии Пассинга-Баблока, что также подтверждает предпочтительность модели линейной регрессии. Вычислено уравнение регрессии Деминга:

$$\lg(C_{Mindray}) = 0,007 + 0,961 \lg(C_{Ortho}),$$

где: $C_{Mindray}$ и C_{Ortho} - соответствующие значения концентраций β -ХГЧ при использовании аналитической системы Mindray или Ortho соответственно.

ДИ для коэффициента наклона составил [0,950; 0,972], что исключало значение «1», ДИ для интерсепта - [0,003; 0,015], что исключало значение «0». Результаты применения уравнения трансфера с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Деминга приведены в табл. 4.

Вычисленный РИ концентрации ХГЧ в результате трансфера с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Деминга в период беременности с 1-й по 10-ю неделю составил от 42,90 до 127208,11 мМЕ/мл, что значительно ниже данных, представленных в инструкции от производителя (Mindray), где указан РИ от 50 до 221796 мМЕ/мл (ВП рассчитанного РИ в 1,7 раза ниже указанного Mindray). Полученные РИ методом регрессии Деминга немного уже (примерно на 4,7% в среднем), чем РИ, полученные в результате применения регрессии Пассинга-Баблока.

Обсуждение. Наиболее приближены к данным производителя РИ для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови беременных женщин, рассчитанные в

Таблица 4

РИ для концентрации β -ХГЧ, вычисленные в результате трансфера с Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i по методу Деминга

Срок беременности, недели	Ortho Vitros 3600		Mindray CL-2000i	
	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл	НП РИ, мМЕ/мл	ВП РИ, мМЕ/мл
1-2	50,00	500,00	42,90	394,81
2-3	100,00	5000,00	83,69	3633,20
3-4	500,00	10000,00	394,81	7086,83
4-5	1000,00	50000,00	770,11	33434,07
5-6	10000,00	100000,00	7086,83	65215,68
6-7	15000,00	200000,00	10475,78	127208,11
7-8	15000,00	200000,00	10475,78	127208,11
8-12	10000,00	100000,00	7086,83	65215,68

результате трансфера с аналитической платформы Siemens Immulite 2000 Xpi на Mindray CL-2000i по методу регрессии Пассинга-Баблока, приведённые в табл. 2: разница между рассчитанными РИ и РИ, указанными производителем диагностических наборов, составила менее 8%, что сопоставимо с межлотовой вариацией для набора реактивов. Резко заниженные данные в результате трансфера РИ с платформы Ortho Vitros 3600 на Mindray CL-2000i могут быть объяснены заранее заниженными РИ для Ortho, которые используются в этом конкретном ЛПУ: ВП РИ указанный производителем составляет 150854 против 200000 мМЕ/мл, используемого в ЛПУ. Проведённая оценка корректности вычисленных РИ для концентрации β -ХГЧ при использовании аналитической системы Mindray CL-2000i, в которой участвовала 21 женщина на точно известных сроках беременности (от 4-х до 11-ти недель), подтвердила корректность новых РИ в 20 случаях из 21. Соответственно, использование новых РИ рационально и адекватно в рамках решения клинических задач, связанных с измерением концентрации этого анализата.

Заключение. Вычисленные референсные интервалы для концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови отличаются от референсных интервалов, указанных производителем, менее чем на 8% и внедрены в лабораторную и клиническую практику отделений ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗМ». Использование разработанных РИ позволяет оценить течение беременности, наличие патологий и эффективность проведённого лечения. Метод регрессии Пассинга-Баблока более предпочтительный и позволяет получить РИ, которые прошли внутреннюю валидацию в лаборатории, при этом коэффициенты корреляции выше, чем у регрессий Деминга. Прежде чем использовать референсные интервалы из настоящего исследования, лабораториям рекомендуется провести их валидацию для конкретной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верин В.К., Иванов В.В. Гормоны и их эффекты: справочник. СПб: ФОЛИАНТ; 2012.
2. Обоскалова Т.А., Кудрявцева Е.В., Коваль М.В., Росюк Е.А., Севостьянова О.Ю., Воронцова А.В. Ведение нормальной беременности на амбулаторно-поликлиническом этапе. Учебное пособие. Обоскалова Т.А. ред., Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет; 2022.
3. Цибизова В.И., Говоров И.Е., Первунина Т.М., Комличенко Э.В., Кудряшова Е.К., Макацария А.Д., Ди Ренцо Д.К. Пренатальный скрининг первого триместра при многоплодной беременности. Часть II: сывороточные белки PAPP-A И β -ХГЧ как маркёры неблагоприятных исходов беременности. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2020; 14(1):34-43. DOI: 10.17749/2313-7347.2020.14.1.34-43.
4. Tacker D.H. Retrospective evaluation of 99th percentile hCG results to adjust clinical decision points. *Clin. Biochem*. 2019; 74:76-9. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2019.10.007.
5. Tesarik J., Galán Lázaro M., Mendoza N., Mendoza Tesarik R. Double HCG trigger improves recovery of oocytes in women with a paucifollicular response to ovarian stimulation: A pilot study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2022; 157(1):149-53. DOI: 10.1002/ijgo.13735.

6. Каграманова Ж.А., Ланцакова П.Е., Малиновская В.В., Сви-стуннов А.А., Выжлова Е.Н., Жигалова Е.А. Факторы риска в патогенезе неразвивающейся беременности по типу гибели эмбриона. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2020; 19(3):30-8. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-3-30-38.
7. Радзинский В.Е., Маклецова С.А., Алеев И.А., Руднева О.Д., Рябинкина Т.С. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС (Междисциплинарной ассоциации специалистов репродуктивной медицины), 1-е изд. М.: Status-Praesens; 2015.
8. Celik E., Melekoğlu R., Baygül A., Kalkan U., Şimşek Y. The predictive value of maternal serum AFP to PAPP-A or b-hCG ratios in spontaneous preterm birth. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. 2022; 42(6):1956-61. DOI: 10.1080/01443615.2022.2055452.
9. Киселев С.И., Питько М.В. Стеночная беременность (клиническое наблюдение и обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2021; 27(1):88-101. DOI: 10.17116/reprou20212701188.
10. Гадаева И.В., Хохлова И.Д., Джибладзе Т.А. Внематочная (эк-топическая) беременность. *Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева*. 2020; 7(1):4-9. DOI: 10.18821/2313-8726-2020-7-1-4-9.
11. Sabbioni L., Carossino E., Severi F. M., Luisi S. From β -hCG values to counseling in tubal pregnancy: what do women want? *Gynecological Endocrinology*. 2019; 35(12):1021-6. DOI: 10.1080/09513590.2019.1640201.
12. Ozarda Y., Higgins V., Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018; 57(1):30-7. DOI: 10.1515/ccclm-2018-0059.
13. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современная теория и практика референсных интервалов. *Лабораторная служба*. 2019; 8(2):36-44. DOI: 10.17116/labs2019802136.
14. Мошкин А.В., Савельев Л.И. Популяционные референсные интервалы. Дискуссия. *Лабораторная служба*. 2019; 8(2):4-9. DOI: 10.17116/labs201980214.
15. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г., Уртаева З.А., Мар-тиросов М.Ю., Грачёва Н.П. и др. Референсные интервалы количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и эритроци-тарных индексов у взрослого населения Астраханской области при применении автоматического гематологического анализатора «Sysmex XT 2000i». *Астраханский медицинский журнал*. 2016; 11(3):117-25.
16. Ольховик А.Ю., Окша Т.А., Васильев А.В., Садовников П.С., Эмануэль В.Л. Верификация ожидаемых значений тест-систем Cobas в качестве референсных интервалов для российской по-пуляции Северо-Западного федерального округа. *Лаборатор-ная служба*. 2019; 8(3):20-30. DOI: 10.17116/labs2019803120.
17. Ивойлов О.О., Максимова Н.Л., Криворучко А.Б., Иванов А.М. Практические подходы к установлению референсных интервалов эритроцитов на основе данных пациентов. *Лабораторная служба*. 2019; 8(2):17-24. DOI: 10.17116/labs2019802117.
18. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2011; 21(1):49-52. DOI: 10.11613/BM.2011.010.
19. Passing H., Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. 1983; 21(11): 709-20.
20. Higgins V., Nieuwesteeg M., Adeli K. Reference intervals: theory and practice. In: Clarke W., Marzinke M.A. eds. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020:37-56. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00003-X.

REFERENCES

1. Verin V.K., Ivanov V.V. Hormones and their effects: a handbook [Gormony i ikh effekty: spravochnik]. St. Petersburg: FOLIANT; 2012. (in Russian)
2. Oboskalova T.A., Kudryavtseva E.V., Koval M.V., Rosyuk E.A.,

- Sevostyanova O.Yu., Vorontsova A.V. Management of normal pregnancy at the outpatient stage. Tutorial. [Vedeniye normal'noy beremennosti na ambulatorno-poliklinicheskom etape. Uchebnoye posobiye] Oboskalova T.A., ed. Yekaterinburg: Ural'skiy gosug-arstnennyi meditsinskiy universitet; 2022. (in Russian)
3. Tsbizova V. I., Govorov I. E., Pervunina T. M., Komlichenko E. V., Kudryashova E. K., Blinov D.V., Makatsariya A.D., Di Renzo G.K. First trimester prenatal screening in multiple pregnancies. Part II: serum proteins PAPP-A and β -hCG as markers of adverse pregnancy outcomes. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya*. 2020; 14(1):34-43. DOI: 10.17749/2313-7347.2020.14.1.34-43. (in Russian)
 4. Tacker D.H. Retrospective evaluation of 99th percentile hCG results to adjust clinical decision points. *Clin. Biochem*. 2019; 74:76-9. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2019.10.007.
 5. Tesarik J., Galán Lázaro M., Mendoza N., Mendoza Tesarik R. Double HCG trigger improves recovery of oocytes in women with a paucifollicular response to ovarian stimulation: A pilot study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2022; 157(1):149-53. DOI: 10.1002/ijgo.13735.
 6. Kagramanova Zh.A., Lanshchakova P.E., Malinovskaya V.V., Svis-tunov A. A., Vizhlova E.N., Zhigalova E.A. Risk factors in the pathogenesis of non-developing pregnancy by the type of embryonic miscarriage. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2020; 19(3):30-8. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-3-30-38. (in Russian)
 7. Radzinsky V.E., Makletsova S.A., Aleev I.A., Rudneva O.D., Ry-abinkina T.S. The undeveloped pregnancy. Methodological recommendations of IARM (Interdisciplinary association of specialists of reproductive medicine) [Nerazvivayushchayasya beremennost'. Metodicheskie rekomendatsii MARS (Mezhdistsiplinarnoy assotsiatsii spetsialistov reproduktivnoy meditsiny)], 1st ed. Moscow: StatusPraesens; 2015. (in Russian)
 8. Celik E., Melekoğlu R., Baygül A., Kalkan U., Şimşek Y. The predictive value of maternal serum AFP to PAPP-A or b-hCG ratios in spontaneous preterm birth. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. 2022; 42(6):1956-61. DOI: 10.1080/01443615.2022.2055452.
 9. Kiselev S.I., Pitko M.V. Mural pregnancy (case report and literature review). *Problemy Reproduksii*. 2021; 27(1):88-101. DOI: 10.17116/repro20212701188. (in Russian)
 10. Gadayeva I.V., Khokhlova I.D., Dzhibladze T.A. Ectopic pregnancy. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V. F. Snegireva*. 2020; 7(1):4-9. DOI: 10.18821/2313872620207149. (in Russian)
 11. Sabbioni L., Carosino E., Severi F.M., Luisi S. From β -hCG values to counseling in tubal pregnancy: what do women want? *Gynecological Endocrinology*. 2019; 35(12):1021-6. DOI: 10.1080/09513590.2019.1640201.
 12. Ozarda Y., Higgins V., Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018; 57(1):30-7. DOI: 10.1515/cclm-2018-0059.
 13. Evgina S.A., Saveliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratornaya sluzhba*. 2019; 8(2):36-44. DOI: 10.17116/labs2019802136. (in Russian)
 14. Moshkin A.V., Savel'ev L.I. Population reference intervals. Discussion. *Laboratornaya sluzhba*. 2019; 8(2):4-9. DOI: 10.17116/labs201980214. (in Russian)
 15. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G., Urtaeva Z.A., Martirosov M.U., Gracheva N.P. et al. Reference intervals of the quantity of red blood cells, concentration of haemoglobin, haematocrit and the erythrocyte indices values at adult population of the astrakhan region using the automatic hematologic analyzer «Sysmex XT 2000i». *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 11(3):117-25. (in Russian)
 16. Olkhovik A.Yu., Oksha T.A., Vasiliev A.V., Sadovnikov P.S., Emanuel V.L. Verification of Expected Values as Reference Ranges for Cobas systems in North-West Russian Federal Region population. *Laboratornaya sluzhba*. 2019; 8(3):20-30. DOI: 10.17116/labs2019803120. (in Russian)
 17. Ivoylov O.O., Maksimova N.L., Krivoruchko A.B., Ivanov A.M. Practical approaches to establishing reference intervals of red blood cells based on patient data. *Laboratornaya sluzhba*. 2019; 8(2):17-24. DOI: 10.17116/labs2019802117. (in Russian)
 18. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2011; 21(1):49-52. DOI:10.11613/BM.2011.010.
 19. Passing H., Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. 1983; 21(11): 709-20.
 20. Higgins V., Nieuwesteeg M., Adeli K. Reference intervals: theory and practice. In: Clarke W., Marzinke M.A. eds. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020:37-56. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00003-X.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Жигалева О.Н.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}, Ермолаев И.И.^{1,2}

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

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

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Гепатит С является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний печени в мире и вызывается инфекцией вируса гепатита С (HCV), которое может привести к тяжелым последствиям – циррозу, раку печени (гепатоцеллюлярной карциноме, ГЦК) и летальному исходу. Согласно стратегии Всемирной организации здравоохранения на 2022–2030 гг. подчеркивается важнейшая роль сектора здравоохранения в прекращении эпидемии. По данным руководства ВОЗ, опубликованном в 2016 году, число смертей от заболеваний, связанных с ВГС увеличивается, а смертность пациентов от ВГС-ассоциированного цирроза и печеночно-клеточного рака будет продолжать расти, если в клинике не будут применяться более эффективные методы лечения. К настоящему времени накоплен большой опыт ведения и лечения пациентов с гепатитом С, который положен в основу представленных рекомендаций. Таким образом, обнаружение ВГС с помощью простого, быстрого, но высокочувствительного и специфичного метода ПЦР может помочь вовремя выявить и как можно раньше начать терапию пациентов. В статье описывается разработка набора реагентов для выявления нуклеиновой кислоты РНК вируса гепатита С методом ПЦР-РВ, что позволит диагностировать пациентов на разных стадиях инфекции, определять эффективность проводимого антиретровирусного лечения. Общая диагностическая чувствительность разрабатываемого набора составляет 100 %, специфичность - 100 %. На основании 200 образцов плазмы и сыворотки крови пациентов при использовании набора методом ПЦР в реальном времени ложноположительных реакций выявлено не было. Данные демонстрируют потенциал использования внутреннего эндогенного образца (ЭВКО), использующего в качестве мишеней гены человека и позволяющий судить о наличии клеток человека в образце и правильности проведения этапа пробоподготовки.

Ключевые слова: ВГС; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ); ПКО; ВКО; амплификация; детекция; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса гепатита С в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридно-флуоресцентной детекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68(7):437-442.

DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-7-437-442>.

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: jigon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО "ЭКОлаб".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.05.2023

Принята к печати 15.05.2023

Опубликовано 03.07.2023

Zhigaleva O.N.¹, Mardanly S.G.^{1,2}, Gashenko T.Yu.^{1,2}, Ermolaev I.I.^{1,2}

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR QUALITATIVE DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN CLINICAL MATERIAL BY REAL-TIME PCR WITH HYBRIDIZATION-FLUORESCENCE DETECTION

¹CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogosk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Hepatitis C is one of the most common chronic liver diseases in the world and is caused by hepatitis C virus (HCV) infection, which can lead to severe consequences - cirrhosis, liver cancer (hepatocellular carcinoma, HCC) and death. The World Health Organization's strategy for 2022-2030 emphasizes the critical role of the health sector in ending the epidemic. According to WHO guidelines published in 2016, the number of deaths from HCV-related diseases is increasing, and patient mortality from HCV-associated cirrhosis and liver cell cancer will continue to rise unless more effective treatments are used in the clinic. To date, there has been extensive experience in the management and treatment of patients with hepatitis C, which forms the basis of the recommendations presented. Thus, detection of HCV using a simple, fast but highly sensitive and specific PCR method can help to

detect in time and start therapy as early as possible for patients. The article describes the development of a reagent kit for detection of hepatitis C virus RNA nucleic acid by PCR-RV method, which will allow to diagnose patients at different stages of infection and to determine the effectiveness of antiviral treatment carried out. Total diagnostic sensitivity of the kit under development is 100%, specificity - 100%. Based on 200 patient plasma and serum samples, no false-positive reactions were detected when using the kit by real-time PCR. The data demonstrate the potential of using an internal endogenous sample (IES) that uses human genes as targets and allows us to judge the presence of human cells in the sample and the correctness of the sample preparation step.

Key words: HCV; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR-RV); PCS; IES; amplification; detection; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a reagent kit for qualitative detection of Hepatitis C virus (HCV) RNA in clinical material by real-time PCR with hybridization-fluorescence detection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68(7): 437-442 (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-437-442.

For correspondence: Zhigaleva Olga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department PCR CJSC «EKO-lab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;
Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>;
Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>.

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

Acknowledgment. *The study was funded by CJSC «EKOlab».*

Received 11.05.2023
Accepted 15.05.2023
Published 03.07.20213

Введение. Вирус гепатита С (ВГС) представляет собой небольшой гепатотропный РНК-вирус из семейства *Flaviviridae*, представляя в нем третий, самостоятельный род *Hepacivirus*. Во всем мире хроническим гепатитом С страдают примерно 58 миллионов человек, при этом ежегодно происходит около 1,5 миллиона новых случаев инфицирования. По имеющимся данным, хроническим гепатитом С страдают 3,2 миллиона детей и подростков. По оценкам ВОЗ, в 2019 г. от гепатита С умерли приблизительно 290 000 человек, главным образом в результате цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (первичного рака печени) [1].

ВГС — это вирус, который может передаваться при совместном использовании игл, шприцев или других приспособлений для инъекций лекарств; от матери к ребенку во время беременности или при родах; или, в редких случаях, при половом контакте [2].

Вирус состоит из нуклеокапсида, имеющего кубический тип симметрии диаметром 50–80 нм, состоящего из сердцевинного (ядерного) белка и одноцепочечной (+) РНК, снаружи расположена белково-липидная оболочка, содержащая аполипопротеин Е (апоЕ) человека и вирусные белки Е1 и Е2 6–8 нм в высоту [3, 4]. Вирусный геном кодирует 10 различных белков, среди которых 3 структурные (С, Е1 и Е2/NS2) и 7 неструктурных (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B). Геном ВГС состоит примерно из 9400 нуклеотидов, с одной большой открытой рамкой считывания, кодирующей полипептид длиной около 3000 аминокислот, состоящий из структурных и неструктурных доменов. Геном HCV фланкирован 5'-нетранслируемой (5'-UTR) и 3'-нетранслируемой (3'-UTR) областями на 5'- и 3'-концах соответственно. Оба UTR являются высокоструктурированными и имеют решающее значение для трансляции и проли-

ферации вируса и хорошо сохраняются среди генотипов или штаммов HCV [5]. 5'UTR состоит из 341 нуклеотида, включает внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) и является наиболее консервативным участком генома [6, 7]. 3'UTR состоит из трех участков: сразу за стопкодомом располагается варибельный участок длиной 27–70 нуклеотидов, за которым следует полиуридиновая/пиримидиновая (polyU/UC) последовательность, далее – высококонсервативный участок длиной 98 нуклеотидов, названный X-РНК [7].

Выделяют 8 генотипов (ГТ), которые обозначаются арабскими цифрами от 1 до 8, и несколько десятков субтипов ВГС, которые обозначаются латинскими буквами [3, 8]. Наибольшее клиническое значение имеют субтипы ГТ 1: а и b. Генотипы и субтипы различаются в последовательностях приблизительно на 30 % и 20 % соответственно. В России самым распространенными являются ГТ 1 (52,6 %, из них 3,7 % приходится на субтип 1a и 48,9 % – на субтип 1b и ГТ 3 (39,6 %), гораздо реже встречается ГТ 2 (7,8 %). Генотипы 4–6 встречаются менее чем в 0,01 % случаев, ГТ 7 и 8 – крайне редко [3, 9].

Выявление РНК ВГС осуществляется с помощью молекулярных методов: ИФА, иммуноблоттинг, полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время основным молекулярно-биологическим методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени, используемая для качественных и количественных тестов. Большое значение определения HCV, определяет алгоритм противовирусной терапии (продолжительность курса лечения, дозы противовирусных препаратов) и ее прогноз.

Вирус гепатита С обладает высокой генетической вариабельностью, с учетом большого количества раз-

личных генотипов, а также множественных мутаций в вирусных частицах. Такие отличные частицы от материнского вируса называют квазивидами. Они способны уклоняться от действия нейтрализующих антител, синтезируемых в ответ на исходный вариант вируса. Такие изменения в геноме вируса часто приводят к увеличению числа ложноотрицательных результатов при проведении ОТ-ПЦР. Ложноотрицательный результат чрезвычайно опасен и может вызвать множество проблем в лечении и контроле над распространением вируса.

Результаты сравнительной частоты мутаций для полипротеина (*POLY*) представлены на прилагаемом рисунке, где выделенным цветом показаны области мутаций у разных людей, точками обозначены совпадающие нуклеотидные последовательности.

В наборах присутствующих на рынке в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) используется экзогенная синтетическая конструкция. Нами была разработана система диагностики HCV на основе набора реагентов для метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с эндогенным ВКО.

Цель исследования - разработать набор реагентов «ГепатЭК С» для качественного выявления РНК ВГС методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Материал и методы.

При подготовке было использовано оборудование и материалы:

- Олигонуклеотиды (ДНК-Синтез, Россия);
- Набор для выделения («КовидЭК Экстракт» - РУ № РЗН 2022/18013 от 17.08.2022, ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [10];
- 2х ПЦР буфер (0,5 М Tris Cl, pH 8.6, 0,05 М KCl, 15 мМ MgCl₂, 1 % Tween 20).

Аmplификацию, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США) [11].

Биологический материал в количестве 200 образцов был получен от компании INVITRO г. Москва.

Пробы плазмы и сыворотки крови от пациентов с ВГС хранились при температуре -20 °С.

Эндогенный внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген человека β -глобулин. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце гена человека, который прошел все стадии исследования: хранение, экстракция, амплификация.

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмиду (pUC19) с синтетическим фрагментом гена РНК ВГС в 1X TE буфере.

Экстракция нуклеиновых кислот для сравнительных наборов проводилась методом спиртового осаждения с последующей отмывкой РНК.

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank был проведен с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Специфичность выбранных олигонуклеотидов изучена с помощью компьютерной программы BLAST online [12].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [13].

Результаты и обсуждение. Разработан набор реагентов «ГепатЭК С» для выявления РНК ВГС в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

По данным приводимых в литературе исследований и анализа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank, в этом исследовании были использованы геномы различных генотипов ВГС. Для создания праймеров была выбрана области полипротеина (*POLY*) вируса ВГС.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных участков в последовательностях ВГС с использованием биотехнологических программ, результаты представлены в таблице [14-16].

Используемые праймеры

Мишень	Ген	Последовательность (5'-3')	Ориентация праймера
ВГС	<i>POLY</i>	GCGATATCATGAGCACACTTCCSTAAA	Прямой
		AATCTAGATCATGGCTGCTGGATGAAT	Обратный
		AGGACGACCGGGTCTTTTC	Флуорисцирующий зонд
Homo sapiens	β -глобулин	ATCTTGGCTCACTGCAACCT	Прямой
		CCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC	Обратный
		ACAGCGCGTTGTTCTATGTG	Флуорисцирующий зонд

Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких как GC%, температура плавления (T_m), длина праймера и их взаимосвязи между собой.

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению вируса методом ОТ-ПЦР стало использование гена самого человека [17].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена β -глобулин, взятых в базе данных

GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [18].

В итоге, для создания реакционной смеси были использованы следующие компоненты: 2х ПЦР буфер, рабочая концентрация Taq-полимеразы - 5 ед/мкл, рабочая концентрация каждого праймера и зондов составляет 1 пМ/мкл, 5 % ДМСО, 0,5 % 40 единиц ревертазы.

Экстрагирование РНК проводилось из 250 мкл об-

разца. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) входили 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО) и положительный контроль ПЦР (ПКО).

Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси и 5 мкл экстрагированных РНК. Отрицательный и положительный контроль для постановки ПЦР вносился в отдельные пробирки в объеме 5 мкл.

Включенный в тест ген β -глобулин человека в качестве внутреннего контроля помогал оценивать качество проведенных исследований и достоверность результатов. Наличие эндогенного ВКО позволило контролировать ход амплификации в каждой пробир-

ке с реакционной смесью и эффективно оценивать этапы проведения анализа и качество хранения пробы, что не позволяет сделать экзогенный ВКО. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО представлены на рисунке 1 (а, б), где по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс количество циклов (Cycles).

Для эндогенного ВКО у каждой пробы наблюдается свой выход на графике с различным уровнем флуоресценции (RFU), для синтетической конструкции наблюдается выход из одной точки, в большей части с одинаковым для всех проб уровнем (RFU).

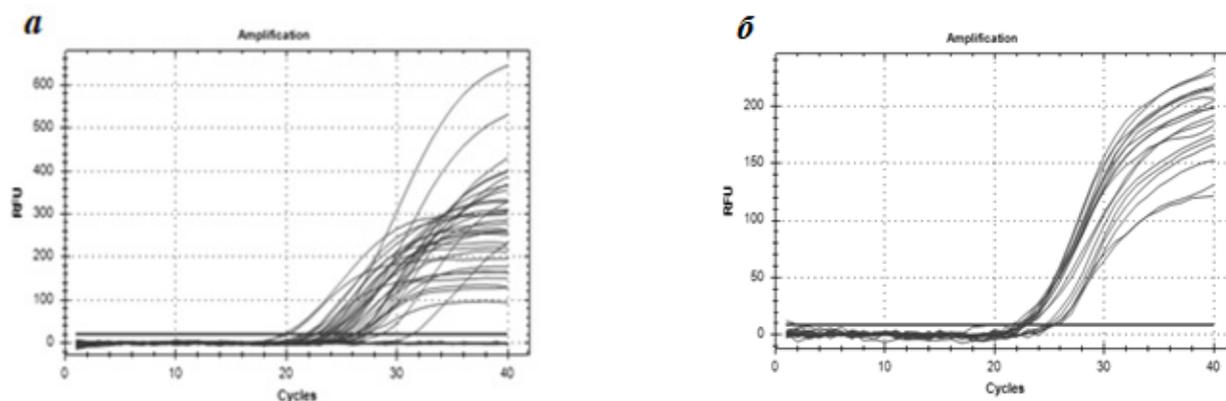


Рис.1. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО.
а - результаты детекции эндогенного ВКО; б - результаты детекции синтетической конструкции ВКО.

Для эндогенного ВКО у каждой пробы наблюдается свой выход на графике с различным уровнем флуоресценции (RFU), для синтетической конструкции наблюдается выход из одной точки, в большей части с одинаковым для всех проб уровнем (RFU).

Амплификация и детекция проводились параллельно по одному (моноплексное выявление) и по двум каналам (мультиплексное выявление), выявляя

одновременно ВГС и ген человека (ВКО) для оценки возможности конкуренции между каналами для ВКО и специфика.

Результаты сравнительной детекции ВГС + ген человека и ВГС представлены на рисунке 2 (а, б), где по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс количество циклов (Cycles).

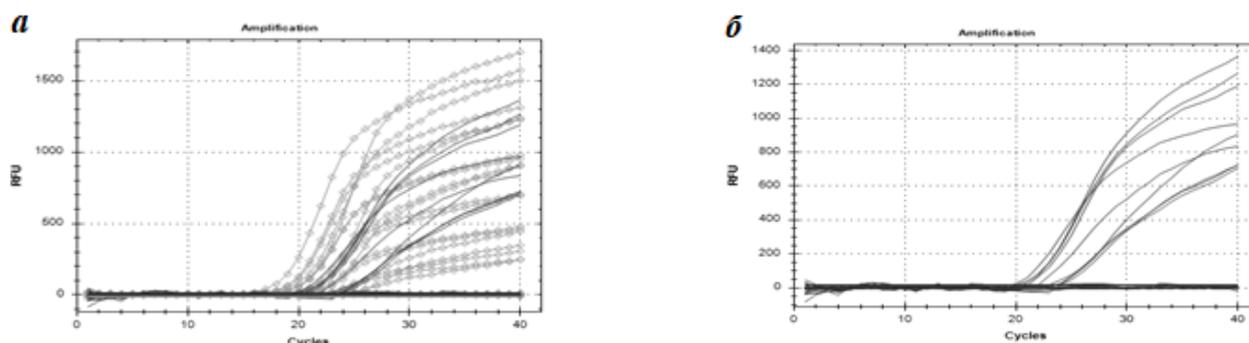


Рис. 2. Результаты сравнительной детекции ВГС + ген человека и ВГС.

а - результаты детекции по двум каналам в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВГС + эндогенный ВКО) – прямые кривые – это выявление РНК ВГС (специфика), ромбовидные кривые – это выявление РНК гена человека (ВКО); б - результаты детекции по одному каналу в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВГС).

Конкуренции между каналами не выявлено. Все результаты по выявлению положительных и отрицательных проб совпали между разрабатываемым набором и коммерческим набором сравнения.

Анализ разрабатываемого набора был подвергнут оценке с точки зрения аналитической чувствительности и специфичности, воспроизводимости результатов.

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК ВГС, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительный результат амплификации специфического продукта по каналу детекции Rox и положительный результат амплификации эндогенного ВКО по каналу детекции Fam.

Оценка аналитической специфичности набора была проведена на панели нуклеиновых кислот следующих организмов: РНК вирусов HAV, HDV, HGV, SARS-CoV-2, HIV, ДНК вирусов HBV, EBV, HCMV, вирус гриппа А, В. Все результаты были отрицательными, показывая, что ни один из этих образцов не вступал в перекрестную реакцию с реакционной системой определения ВГС, тем самым подтверждая ее специфичность, которая составила 100 %.

Для определения чувствительности набора был использован положительный образец, разведенный 10-м шагом до подтвержденной концентрации 8×10^2 ГЭ/мл. Показатели обнаружения были на уровне 100 %, что свидетельствует о достаточной чувствительности.

Повторяемость и воспроизводимость определения РНК ВГС были установлены путем тестирования положительных и отрицательных образцов крови и плазмы.

Условия повторяемости включали в себя: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле:

$$K.B. = \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}}$$

и не превышал 6 %,

где \bar{C} – средняя арифметическая величина концентрации РНК гепатита С, МЕ/мл;

C_i – концентрация РНК гепатита С для каждого отдельного определения, МЕ/мл;

n – число определений.

Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни.

Таким образом, воспроизводимость и повторяемость работоспособности набора реагентов составляет 100 %.

Выбор в качестве генетической мишени в наборе гена полипротеина POLY обусловлен меньшей ча-

стоте мутаций в гене, относительно других регионов генома.

Заключение. Разрабатываемый набор реагентов способен качественно выявлять РНК ВГС разных генотипов независимо от субтипа. Определение различных генотипов позволит своевременно назначить лечение антиретровирусными препаратами, контролировать ход лечения заболевания, что значительно повысит выживаемость среди населения и уменьшит распространение инфекции. Использование эндогенного ВКО, позволит повысить точность проводимого анализа ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 2, 4-6, 8, 12, 14-16, 18 см. REFERENCES)

1. Всемирная организация здравоохранения (Гепатит С) 2023. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (17 Апреля 2023).
3. Рубрикатор клинических рекомендаций (Хронический вирусный гепатит С) 2023. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/516_2 (20 Апреля 2023).
7. Калинина О.В., Дмитриев А.В., Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита С. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(2): 9-13.
9. Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы элиминации инфекции. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(3): 37-45. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-3-37-45.
10. ЗАО «ЭКОлаб» (Отделение ПЦР-диагностики - КовидЭК Экстракт); 2023. Режим доступа: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (дата обращения 27 Апреля 2023).
11. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с принадлежностями») 2023. Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 12 Февраля 2023).
13. Безродный С.Л., Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Помазанов В.В., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ- ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(11): 663-667. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667.
17. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В. Разработка набора реагентов для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом прямой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (12): 739-743. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743>.

REFERENCES

1. World Health Organization (Hepatitis C) 2023. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (accessed 17 April 2023). (in Russian).
2. Centers for Disease Control and Prevention (Hepatitis C Surveillance 2020) 2023. Available at: <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2020surveillance/hepatitis-c.htm> (accessed 14 April 2023).
3. Rubric of clinical guidelines (Chronic viral hepatitis C) 2023. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/516_2 (accessed 20 April 2023).

- 2023). (in Russian).
4. Jean Dubuisson, François-Loïc C. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology*. 2014; 61(1): S3-S13. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
 5. Guoli S., Tetsuro S. Molecular Basis of Encapsidation of Hepatitis C Virus Genome. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9(396): 1-7. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00396.
 6. Brett D., Charles M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005; 436: 933-938. DOI: 10.1038/nature04077.
 7. Kalinina O.V., Dmitriev A.V. Structural and functional genome organization and life cycle of Hepatitis C virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2015; 33(2): 9-13.
 8. Sergio M.B., Charlotte H., Bandita H.P., Robert H., Luisa M.S., Diana M.B. et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018; 218(11): 1722–1729. DOI: 10.1093/infdis/jiy401. (in Russian).
 9. Pimenov N.N., Komarova S.V., Karandashova I.V., Tsapkova N.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of incidence, prevalence and mortality rates before the start of the programme of infection elimination. *Infectious Diseases*. 2018; 16(3): 37-45. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-3-37-45. (in Russian).
 10. CJSC «EKOLab» (PCR diagnostic department - CovidEK Extract). 2023. Available at: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (accessed 27 April 2023). (in Russian).
 11. Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor): state register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices (Registration certificate for the medical product «Thermocycler for nucleic acid amplification 1000 with accessories») 2023. Available at: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 12 February 2023). (in Russian).
 12. Basic Local Alignment Search Tool 2023. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 10 February 2023).
 13. Bezrodny S.L., Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Pomazanov V.V., Gashenko T.Yu. Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 663-667 (in Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667.
 14. Lida C., Wenli L., Kuo Z., Rui Z., Tian L., Mingju H. et al. Hepatitis C Virus RNA Real-Time Quantitative RT-PCR Method Based on a New Primer Design Strategy. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2016; 18(1): 84-91. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.07.009.
 15. Akanksha S., Dhananjay S.M., Mohammad I. A Single-step Multiplex Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction Assay for Hepatitis C Virus Genotypes. *International Journal of Translational Medicine*. 2016; 5(1): 34-42.
 16. Vaithilingaraja A., Roland R., Vidhya K., Eric Y.S., Tuyet N.Ho, Chang L. et al. High-Resolution Functional Profiling of Hepatitis C Virus Genome. *PLoS Pathog*. 2008; 4(10): 1-16. DOI:10.1371/journal.ppat.1000182.
 17. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V. Development of a reagent kit for the real-time detection of SARS-CoV-2 RNA in naso- and oropharyngeal smears by direct polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (12): 739-743 (in Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743.
 18. International Nucleotide Sequence Database Collaboration 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 5 April 2023).