

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера»

Акционерное общество
"ЭКОлаб"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 69
11 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

НОЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Учредители:

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера» (печатное издание)
127238, г. Москва, Дмитровское ш., 46
кор. 2;

Акционерное общество "ЭКОлаб"
(электронное издание)
142530, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Издатель:
Акционерное общество "ЭКОлаб"

Телефон редакции:
8-916-201-80-47

Зав. редакцией:
Л.А. Шанкина
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Технический редактор:
Ч.А. Сафаров
E-mail: klinlab@internet.ru

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

Сдано в набор 16.10.2024.
Подписано в печать 25.10.2024

Формат 60 × 88%
Печать офсетная
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 8,95

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

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009 г.
ЭЛ № ФС77-80929 от 21.04.2021 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Micrology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biologi-
cal 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 Reu-
ters 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.pressa-rf.ru/cat/1/edition/e81645/Под-
писка_на_электронную_версию:](https://www.pressa-rf.ru/cat/1/edition/e81645/Подписка_на_электронную_версию)
[https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849;](https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849)
<https://www.pressa-rf.ru/rucont/edition/331548/>

ISSN: 0869-2084 (Print)
ISSN: 2412-1320 (Online)

Клин. лаб. диагностика. 2024. Том 69. № 10.
561-636

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);
Земсков В.М., д.м.н., профессор (Москва, Россия)
Иванов А.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Ипполитов Е.В., д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Кочетов А.Г., 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-Петербург, 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);
Керимов С.Г., д.м.н., профессор (Баку, Азербайджан);
Кушлинский Н.Е., академик РАН, д.м.н., профессор (Москва,
Россия);
Маматкулов И.Х., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);
Осман Халил Ареф, к.б.н. (Хомс, Сирия)
Сергеев А.Ю., д.м.н., профессор (Томск, Россия);
Талыбов Т.Г., академик НАН, д.б.н., профессор (Нахчыван,
Азербайджан);
Тартаковский И.С., д.б.н., профессор (Москва, Россия);
Эмануэль В.Л., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);
Яровая Г.А., д.б.н., профессор (Москва, Россия)

LLC Publishing Group
"Media Sphera"

Joint Stock Company
"EKOLab"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 69
11 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

The Journal is founded in 1955

Founders:

LLC "Publishing Group "Media Sphera"
(print edition)

127238, Moscow, Dmitrovskoe sh., 46 k.
b. 2;

Joint Stock Company "EKOLab"
(electronic edition)

142530, Moscow region, Elektrogorsk,
St. Budyonnogo, 1

Publisher:

Joint Stock Company "EKOLab"

Editorial office phone:
8-916-201-80-47,

Managing editor:

L.A. Shankina
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Technical editor:

Ch.A. Safarov
E-mail: klinlab@internet.ru

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

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

E-mail: klinlab@internet.ru

PI No. FS77-37760 dated 10/07/2009

EL No. FS77-80929 dated 04/21/2021

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 Rus-
sian index of scientific quotation (RiNZ) and in fol-
lowing I&R editions: Abstracts of Micology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Bio-
logical Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE,
Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract
Journals, Index Medicus, Index to Dental Litera-
ture, OCLC Article First, Reactions Weekly (Print),
Thomson Reuters Biological Abstracts (Online),
Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN
Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodi-
cals Directory

ISSN: 0869-2084 (Print)
ISSN: 2412-1320 (Online)

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*);

Vladimir M. Zemskov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Evgeny V. Ippolitov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

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

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

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

Areg A. Totolian, 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*);

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

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

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

Osman Khalil Aref, Cand. Sci. (Biol.), (*Homs, Syria*)

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Погорелова Т.Н., Саркисян О.Г., Решетникова Э.А., Гунько В.О., Крукиер И.И., Никашина А.А., Селютина С.Н.

Сравнительный анализ процессов синтеза и катаболизма газотрансмиттеров в плаценте при физиологической беременности и преэклампсии564

Долгих Т.И., Левашова О.А., Долгих В.Т., Сысоева А.С.

Заболевания кишечника: вопросы патогенеза и лабораторной диагностики (обзор литературы)571

ГЕМАТОЛОГИЯ

Шульга А.С., Крайнова Н.Н., Бурцев Д.В.

Стабильность гемоцитометрических показателей лейкоцитарной формулы при различных условиях хранения образцов венозной крови.579

ИММУНОЛОГИЯ

Бызова Н.А., Жердев А.В., Горбатов А.А., Бикетов С.Ф., Дзантиев Б.Б.

Разработка и сопоставление трех видов иммунохроматографических тест-систем для серодиагностики туляремии, отличающихся по составу детектируемых меченых иммунных комплексов592

Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю.

Применение математического моделирования в разработке методов предиктивной диагностики ранних стадий первичного гонартроза.601

Авдеева А.С., Алексанкин А.П., Горбунова Ю.Н., Панафидина Т.А., Попкова Т.В.

Изучение особенностей субпопуляции В-лимфоцитов и уровня CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией системной красной волчанки.610

МИКРОБИОЛОГИЯ

Огиенко О.Н., Бондаренко А.П., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Голубева А.О., Троценко О.Е.

Сравнительный анализ трех методов идентификации грибов рода *CANDIDA*, выделенных при пневмониях (хромогенный агар, баканализатор Vitek2 Compact 30, масс-спектрометр MicroFlex).....617

Мехтиев Э.Р.О., Радугина Н.В., Затевалов А.М., Ильясова Н.А., Жиленкова О.Г., Гудова Н.В., Федоров Д.С., Садеков Т.Ш., Миронов А.Ю.

Критерии метаэкспозомной оценки бактериального вагиноза у пациенток амбулаторного приёма627

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «Клиническая лабораторная диагностика» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Pogorelova T.N., Sarkisyan O.G., Reshetnikova E.A., Gunko V.O., Krukier I.N., Nikashina A.A., Selyutina S.N.

Comparative analysis of the processes of synthesis and catabolism of gas transmitters in the placenta during physiological pregnancy and pre-eclampsia564

Dolgikh T.I., Levashova O.A., Dolgikh V.T., Sysoeva A.S.

Intestinal diseases: issues of pathogenesis and laboratory diagnosis (review of literature)571

HEMATOLOGY

Shulga A.S., Kraynova N.N., Burtsev D.V.

Stability of hemocytometric indices of leukocyte formula under different storage conditions of venous blood samples579

IMMUNOLOGY

Byzova N.A., Zherdev A.V., Gorbatov A.A., Biketov S.F., Dzantiev B.B.

Development and comparison of three types of immunochromatographic test systems for serodiagnosis of tularemia, differing in the composition of detected labeled immune complexes.592

Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu.

Mathematical simulation for the development of diagnosis methods in used to predict early primary gonarthrosis601

Avdeeva A.S., Aleksankin A.P., Gorbunova Y.N., Panafidina T.A., Popkova T.V.

Studying B-lymphocyte supopopulations and CD4+ T-lymphocyte level in patients with early stage of systemic lupus erythetis.610

MICROBIOLOGY

Ogienko O.N., Bondarenko A.P., Kataeva L.V., Stepanova T.F., Golubeva A.O., Trotsenko O.E.

Comparative analysis of three methods for identifying Candida yeast isolated from pneumonia (chromogenic agar, Vitek2 Compact 30 bacterial analyzer, Microflex mass spectrometer).617

Mehtiev E.R.O., Radugina N.V., Zatevalov A.M., Il`yasova N.A., Zhilenkova O.G., Gudova N.V., Fedorov D.S., Sadekov T.Sh., Mironov A.Yu.

Criteria for metaexposomal assessment of bacterial vaginosis in outpatient patients627

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Погорелова Т.Н.¹, Саркисян О.Г.¹, Решетникова Э.А.¹, Гунько В.О.², Крукиер И.И.^{1,2},
Никашина А.А.^{1,2}, Селютина С.Н.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ СИНТЕЗА И КАТАБОЛИЗМА ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРЕЭКЛАМПСИИ

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (НИИ акушерства и педиатрии), 344012, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Серьезным осложнением беременности в настоящее время является преэклампсия (ПЭ). Однако, несмотря на большое количество исследований, процессы связанные с регуляцией систем внутри- и межклеточной сигнализации и коммуникации, от которых зависит состояние гомеостаза, недостаточно изучены. К числу таких регуляторов относятся газотрансмиттеры. Они являются вазодилататорами, регуляторами апоптоза, редокс-процессов, генерации энергии, клеточной пролиферации, что особенно важно при беременности. Указанные факторы стали причиной изучения активности ферментов обмена плацентарных газотрансмиттеров, а также содержание их субстратов и метаболитов при ПЭ.

Цель настоящей работы: *провести сравнительный анализ процессов синтеза и катаболизма трансммиттеров в плаценте при физиологической беременности и преэклампсии.*

Материал и методы. В проспективное исследование были включены 64 женщины, составившие две группы: первую группу вошли 30 клинически здоровых женщины с неосложненным течением беременности и родов (контрольная группа); во вторую (основную) группу - 34 женщины, беременность которых осложнилась ПЭ средней степени. Материалом для исследования служила ткань плаценты. Определяли активность цистотианин - бета - синтазы, цистотианин - гамма – лиазы, меркаптопируват сульфуртрансферазы, гистидиндекарбоксилазу, цистеинаминотрансферазу. Содержание аминокислот, цистеина, метионина, гистидина определяли на автоматическом анализаторе модели ААА - 400 ("Microtechno", Чехия). В работе использованы методы спектрофотометрии, ионообменной хроматографии, иммуноферментный анализ.

Результаты. Установлено, что при ПЭ в плаценте происходят значительные изменения цистатианин-γ-лиазы, цистатианин-β-синтазы, меркаптосульфуртрансферазы, гемоксигеназы, гистидиндекарбоксилазы и цистеинаминоферазы, активность которых снижена в различной степени (от 21% до 35%). Между активностью ферментов обмена газотрансмиттеров и уровнем соответствующих аминокислот обнаружена корреляционная связь различной направленности. Соотношение серосодержащих аминокислот (цистеина и метионина) является прогностическим тестом состояния сердечно-сосудистой системы новорожденных, что подтверждено их обследованием (у 25% детей выявлены признаки кардиопатии).

Заключение. Выявленный дисбаланс метаболизма активных клеточных медиаторов – газотрансмиттеров в плаценте является одним из важных звеньев в цепи молекулярных нарушений при ПЭ, поскольку приводит к нарушению дисбаланса во всей фетоплацентарной системе.

Ключевые слова: метаболизм газотрансмиттеров; плацента; преэклампсия

Для цитирования: Погорелова Т.Н., Саркисян О.Г., Решетникова Э.А., Гунько В.О., Крукиер И.И., Никашина А.А., Селютина С.Н. Сравнительный анализ процессов синтеза и катаболизма газотрансмиттеров в плаценте при физиологической беременности и преэклампсии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2024; 69 (11): 565-570.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-565-570>

Для корреспонденции: Погорелова Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, проф. кафедры общей и клинической биохимии №1; e-mail: vergiliusmerlin@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 10.04.2024

Принята к печати 12.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Pogorelova T.N.¹, Sarkisyan O.G.¹, Reshetnikova E.A.¹, Gunko V.O.¹, Krukier I.N.^{1,2}, Nikashina A.A.^{1,2}, Selyutina S.N.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PROCESSES OF SYNTHESIS AND CATABOLISM OF GAS TRANSMITTERS IN THE PLACENTA DURING PHYSIOLOGICAL PREGNANCY AND PRE-ECLAMPSIA

¹Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 344022, Rostov-on-Don, Russia;

²Rostov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Research Institute of Obstetrics and Pediatrics), 344012, Rostov-on-Don, Russia

To clarify the role of placental gas transmitters in the development of preeclampsia (PE), the activity of enzymes of their metabolism, the content of precursors and metabolites were studied. The purpose of this work was to study the characteristics of the metabolism of two gas transmitters (H₂S and CO) in the placenta and to determine the possible influence of their modification on the development of PE.

Methods. The prospective study included 64 women who made up two groups: the first group included 30 clinically healthy women with uncomplicated pregnancy and childbirth (control group); the second (main) group included 34 women whose pregnancy was complicated by moderate PE. The material for the study was placenta tissue. The activity of cystathionine beta synthase, cystathionine gamma lyase, mercaptopyruvate sulfurtransferase, histidine decarboxylase, and cysteine aminotransferase was determined. The content of amino acids, cysteine, methionine, histidine was determined on an automatic analyzer model AAA - 400 (Microtechno, Czech Republic).

Results. It has been established that with PE in the placenta, significant changes occur in cystathionine gamma lyase, cystathionine beta synthase, mercaptosulfur transferase, heme oxygenase, histidine decarboxylase and cysteine aminotransferase, the activity of which is reduced to varying degrees (от 21% до 35%). A correlation of various directions was found between the activity of gas transmitter metabolic enzymes and the level of corresponding amino acids. The ratio of sulfur-containing amino acids (cysteine and methionine) is an informative prognostic test for the state of the cardiovascular system of newborns, which was confirmed by their examination (25% of children showed signs of cardiopathy).

Conclusion. The identified imbalance in the metabolism of active cellular mediators - gas transmitters in the placenta may be one of the important links in the chain of molecular disorders in PE.

Key words: gas transmitter metabolism; placenta; preeclampsia

For citation: Pogorelova T.N., Sarkisyan O.G., Reshetnikova E.A., Gunko V.O., Krukier I.N., Nikashina A.A., Selyutina S.N. Comparative analysis of the processes of synthesis and catabolism of gas transmitters in the placenta during physiological pregnancy and pre-eclampsia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 565-570 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-565-570>

For correspondence: Pogorelova Tatyana Nikolaevna, Doctor of Biology. sciences, prof. Department of General and Clinical Biochemistry No. 1; e-mail: e-vergiliusmerlin@yandex.ru

Information about authors:

Pogorelova T.N., [https:// orcid. org/0000-0002-0400-0652](https://orcid.org/0000-0002-0400-0652);
Sarkisyan O.G., [https:// orcid. org/0000-0001-5293-986X](https://orcid.org/0000-0001-5293-986X)
Reshetnikova E.A., [https:// orcid. org/0009-0008-7422-0221](https://orcid.org/0009-0008-7422-0221)
Gunko V.O., [https:// orcid. org/0000-0001-8607-9052](https://orcid.org/0000-0001-8607-9052);
Krukier I.I., [https:// orcid. org/0000-0003-4570-6405](https://orcid.org/0000-0003-4570-6405);
Nikashina A. A., [https:// orcid. org/0000-0001-8099-9093](https://orcid.org/0000-0001-8099-9093);
Selyutina S.N., [https:// orcid. org/0000-0003-2049-5592](https://orcid.org/0000-0003-2049-5592).

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.04.2024
Accepted 12.09.2024
Published 25.10.2024

Введение. Перинатальный период онтогенеза во многом зависит от метаболического обеспечения функциональных процессов в биологической системе мать - плацента - плод, важную роль в которой играет плацента. Последствия внутриутробных повреждений в плаценте в процессе гестации могут обнаруживаться у новорождённых, а также в отдалённые этапы у детей младшего возраста и даже у взрослых. Среди серьёзных осложнений, отражающихся на развитии беременности, в том числе и на функционировании плаценты, ведущая роль принадлежит преэклампсии (ПЭ), которая до настоящего времени продолжает оставаться одной из значимых причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. [1,2] Причём частота этой мультифакторной патологии не имеет тенденции к снижению. Несмотря на большое количество работ, посвящённых биохимическим аспектам патогенеза ПЭ, остаются весьма мало изученными процессы, связанные с регуляцией систем внутри - и межклеточной сигнализаций и коммуникации, от которых зависит состояние гомеостаза. К числу таких регуляторов относятся активные малые эндогенные молекулы – газотрансмиттеры. В насто-

ящее время известны три газотрансмиттера. Первым по времени открытия является оксид азота (NO), второй - монооксид углерода (CO) и новая сигнальная молекула - сероводород (H₂S). Все они являются вазодилататорами, регуляторами апоптоза, редокс - процессов, генерации энергии, клеточной дифференциации и пролиферации, что особенно важно при беременности [3-5].

Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ процессов синтеза и катаболизма трансммиттеров в плаценте при физиологической беременности и преэклампсии.

Материал и методы. В проспективное исследование были включены 64 женщины, составившие две группы. В первую группу вошли 30 клинически здоровых женщины с неосложнённым течением беременности и родов (контрольная группа); во вторую (основную) группу - 34 женщины, беременность которых осложнилась ПЭ средней степени в соответствии с международной классификацией болезней - МКБ-10, код 014.0.

Критерии включения: возраст пациенток от 20 до 35 лет. Все пациентки были первобеременными, пер-

вородящими. В основную группу вошли беременные женщины с клиническими лабораторными признаками ПЭ, появившимися после 24-26 недели гестации: гипертензия (давление 140 - 160/90 мм.рт. ст.), протеинурия (выше 0,3 г/сут, но ниже 2 г/сут). В контрольную группу вошли женщины с физиологическим течением беременности. Все беременные были родоразрешены в сроке после 37 недель через естественные родовые пути.

Критерии исключения: декомпенсированная дисфункция плаценты, тяжелые формы соматических заболеваний. Пациентки дали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования. Работа проведена в соответствии с нормами Хельсинской декларации (2008 год) и директивами Европейского сообщества (8/609 ЕС). Все необходимые и регламентированные приказом Минздрава РФ от 20.10.2020 № 1130н "Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология" и клиническими рекомендациями «Презеклампсия. Эклампсия. Отеки, протеинурия и гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде» соблюдены.

Исследования включали клинические, клинико-лабораторные и функциональные методы. Материалом для исследования служила ткань плаценты. Образцы плаценты получали сразу после родов при соблюдении холодового режима ($t = +2 - +4$ °C), промывали охлажденным физиологическим раствором для удаления крови и амниотической жидкости, затем гомогенизировали (при $t = +2 - +4$ °C) с помощью гомогенизатора Ultra Turrax (IKA, Германия) в PBS - буфере. В экстрактах, полученных из плацентарной ткани определяли активность ферментов обмена газотрансмиттеров и выражали полученные результаты в нмоль/мин х мг. Определяли активность цистотианин - бета - синтазы, (КФ 4.2.1.22), цистотианин - гамма - лиазы (КФ 4.4.1.1.), меркаптопируват сульфуртрансферазы (КФ 2.8.1.2.) - ферментов, ответственных за синтез газотрансмиттера H_2S , гемоксигеназы (КФ 1.14.99.3), участвующей в синтезе газотрансмиттера CO, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (Тест -

наборы "Cloud Clone Corp", США), выполненного в соответствии с инструкцией фирмы - изготовителя. Активность гистидиндекарбоксилазы (КФ 4.1.1.22) оценивали спектрометрически в присутствии пиридоксальфосфата по убыли субстрата реакции. Уровень одного из конечных продуктов этой реакции – CO_2 может также отражать интенсивность генерации газотрансмиттера CO. Активность цистеинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.3) определяли по приросту содержания глутаминовой кислоты после инкубации цистеина с альфа - кетоглутаровой кислотой. [6]. Содержание аминокислот, метаболически связанных с продукцией газотрансмиттеров (цистеина, метионина, гистидина), как и содержание глутаминовой кислоты, определяли на автоматическом анализаторе модели AAA - 400 ("Microtechno", Чехия) и выражали в мкмоль/г. Подготовку проб и анализ проводили согласно инструкции к анализатору с использованием натрий - цитратных буферных растворов с pH 3,26; 4,25; 5,28. Идентификацию аминокислот, расчёт площадей пиков и определение концентрации осуществляли по результатам анализа соответствующих стандартных образцов (Sigma - Aldrich, США) для калибровки прибора. Количество гомоцистеина и аденозилметионина рассчитывали по результатам выше названного ИФА.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistika 10,0 (Stat. Soft Inc.). Проверка данных биохимических показателей в группах критерием Шапиро-Уилка показала, что гипотеза о нормальности их распределения должна быть отвергнута. В связи с этим, при парном сравнении групповых показателей использовали U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me \pm IQR$ [25%;75%]. Оценка корреляционной связи между показателями проводилась с применением рангового коэффициента Спирмена. Все результаты статистической обработки считали значимыми при $p < 0,05$ (95% уровень статистической значимости).

Результаты. Проведенные исследования свидетельствуют, что развитие ПЭ происходит на фоне статистически значимых изменений метаболизма газотрансмиттеров и их предшественников (табл. 1,2).

Таблица 1

Активность ферментов обмена газотрансмиттеров в плаценте при преэклампсии ($Me \pm IQR$)

Ферменты	Показатели активности ферментов (нмоль/мин • мг)	
	Физиологическая беременность	Преэклампсия
Цистатионин-β-синтаза	0,064(0,016) [0,056-0,072]	0,045(0,008)* [0,041-0,049]
Цистатионин-γ-лиаза	0,038(0,016) [0,056-0,072]	0,031(0,312)* [0,028-0,340]
Меркапто-пируваттрансфераза	0,026(0,016) [0,030-0,046]	0,020(0,002)* [0,018-0,020]
Гемоксигеназа	0,62(0,014) [0,056-0,070]	0,41(0,08)* [0,037-0,045]
Гистидиндекарбоксилаза	1,15(1,31) [0,09-1,40]	0,84(0,24)* [0,72-0,96]
Цистеинаминотрансфераза	0,61(0,14) [0,54-0,68]	0,42(0,12)* [0,36-0,48]

Примечание. Статистическая значимость различий между показателями при физиологической беременности и преэклампсии; * - $p < 0,05$.

В различной степени (от 21% до 35%) снижается активность трёх ферментов, участвующих в синтезе H₂S: цистатионин-β - синтазы (CBS), цистатионин-γ-лиазы (CSE), 3-меркапто-пируваттрансферазы (3MST), а также ферментов синтеза СО: гемоксигеназы, (на 33,2%) и гистидиндекарбоксилазы (на 26,4%).

Содержание субстрата этого фермента - гистидина,

напротив, выше контрольных показателей на 29,7%. Подобно другим ферментам уменьшается и активность цистеинаминотрансферазы (на 31,4 %), участвующей в десульфгидратации цистеина через ряд промежуточных реакций, включающих, в частности, синтез гомоцистеина.

В свою очередь, содержание последнего снижается в плаценте при ПЭ на 30,1%.

Таблица 2

Содержание аминокислот и их производных в плаценте при преэклампсии Me± IQR

Показатель	Содержание аминокислот и их производных (мкмоль/г)	
	При физиологической беременности	С преэклампсией
Цистеин	0,51 (0,16) [0,43-0,59]	0,34(0,08)* [0,30-0,38]
Гомоцистеин	15,24(4,56) [12,96-17,52]	10,80(3,8) * [8,9-12,7]
Метионин	0,25(0,08) [0,21-0,29]	0,32(0,08)* [0,28-0,36]
Аденозил метионин.	11,63(3,22) [10,02-13,24]	7,66(2,73)* [6,49-8,83]
Гистидин	0,37(0,08) [0,33-0,41]	0,48(0,18)* [0,39-0,57]

Примечание. Статистическая значимость различий между показателями при физиологической беременности и преэклампсии; * - $p < 0,05$.

В отличие от цистеина, количество которого уменьшается на 30,2%, уровень серосодержащего метионина увеличивается на 29,3%. В то же время содержание важного продукта метаболизма метионина – аденозил метионина снижается на 34,2%. Между показателями активности ферментов и содержанием аминокислот и их производных установлена взаимозависимость, подтверждённая результатами корреляционного анализа. Положительная корреляционная зависимость выявлена между активностью CBS, CSE, 3MST, цистеинаминотрансферазы и уровнем цистеина ($r = 0,85; 0,83; 0,80; 0,84; p < 0,01$). Обратная связь установлена для содержания гистидина и активности гистидинкарбоксилазы ($r = -0,84; p < 0,01$), а также метионина и аденозилметионина ($r = -0,86; p < 0,01$).

Обсуждение. Выявленный дисбаланс в метаболизме газотрансмиттеров в плаценте при ПЭ связан, очевидно, с нарушением активности ферментов, в результате работы которых синтезируются эти клеточные мессенджеры, и с изменением содержания субстратов их синтеза. Для H₂S это, прежде всего, цистеин, а также метионин. Активность трёх ферментов синтеза H₂S снижается примерно одинаково, хотя механизм их действия отличается на фоне общей десульфгидротации цистеина. Для CBS характерна конденсация гомоцистеина с цистеином и образование цистионина [7]. Под действием CSE через ряд промежуточных реакций из цистеина образуются тиоцистеин с последующим неферментативным преобразованием его до цистеина и H₂S. Фермент 3MST функционирует только в комплексе с цистеинаминотрансферазой, под действием которой продуцируется 3-меркаптопируват и затем непосредственно синтезируется H₂S [8]. Такое количество параллельных ферментативных путей, очевидно, должно обеспечивать поддержание необходимого уровня H₂S в связи с его выраженными регуляторными функциями. Однако при ПЭ изменяется активность всех трёх фер-

ментов, что усиливает функционально-метаболические нарушения при этой патологии. Как следует из приведённых данных, основной аминокислотой, участвующей в метаболизме H₂S, является цистеин, зависящий от фермента его обмена - цистеинаминотрансферазы. Оба эти показателя в плаценте при осложнённой гестации значительно снижаются. Необходимо отметить, что уменьшение содержания цистеина наряду с модификацией обмена газотрансмиттера приводит к снижению синтеза внутриклеточного антиоксиданта - глутатиона, дополняющего падение общей антиоксидантной активности при ПЭ [9].

Определённый интерес для суждения о роли аминокислотного дисбаланса в плаценте при ПЭ представляет также метионин, содержание которого повышено. Метионин участвует во втором пути метаболизма H₂S – трансметилировании, в результате которого образуются гомоцистеин, затем цистатионин и, в конечном итоге, H₂S [10]. Учитывая, что содержание метионина не снижается, а, напротив, повышается, можно полагать, что это связано с уменьшением его участия в синтезе S - аденозилметионина - основного донора метиловых групп и аллостерического активатора CBS [11], а также со снижением синтеза гомоцистеина. Что касается второго трансммиттера - СО, то его эндогенное образование в организме человека происходит под действием фермента гемоксигеназы, катализирующей окисление гема гемоглобина и других гемсодержащих белков. При этом образуется биливердин, двухвалентное железо и СО. Обнаруженное нами снижение активности гемоксигеназы, очевидно, является основной причиной нарушения метаболизма СО в плаценте при ПЭ. Кроме того, определённый вклад в дисбаланс газотрансмиттеров может вносить уменьшение активности гистидиндекарбоксилазы, одним из продуктов ферментативного катализа которой является углекислый газ, отражающий изменение содержания

СО [12]. Количество гистидина - субстрата описываемого фермента, напротив, увеличивается, находясь в обратной корреляции с активностью фермента. Повидимому, этот дисбаланс объясняется снижением использования гистидина в указанной реакции. В последние годы появились доказательства позитивного влияния СО на функции фетоплацентарной системы, эффективность имплантации и плацентации, рост и развитие плода, его выживаемость [13]. Уменьшение активности гемоксигеназы и гистидиндекарбоксилазы несомненно повреждает течение этих физиологических процессов. В целом, оценивая дисбаланс плацентарного метаболизма газотрансмиттеров при ПЭ с учётом их основных функций, можно отметить важную роль выявленных нарушений в ухудшении гемодинамики в плаценте и снижении фетоплацентарного кровотока, повреждении эндотелия сосудов плаценты, сдвиге соотношения про- и антиоксидантов, ухудшении энергообеспечения фетоплацентарного комплекса.

Кроме того, поскольку газотрансмиттеры являются регуляторами обмена нуклеотидов, особенно циклонуклеотидов [14], снижение активности их ферментов в плаценте, сопровождается нарушением процессов пролиферации, апоптоза, клеточной дифференцировки. Последствия выявленных функционально-метаболических повреждений в фетоплацентарной системе могут проявляться не только в пре- но и в постнатальном периоде, и приводить к дальнейшим осложнениям в развитии новорождённого. Информативными маркерами этих осложнений являются не абсолютные уровни показателей, а их соотношения, в частности, отношение серосодержащих аминокислот цистеина и метионина. Наблюдения за детьми основной группы, которые были переведены из родильного блока в отделение патологии новорожденных, показали, что в 25% случаев к 7 - 8 суткам у них появились проявления постгипоксических нарушений сердечно-сосудистой системы. Соотношение двух указанных аминокислот при признаках кардиопатии составило 1,02, а при нормальной беременности - 1,57 ($p < 0,01$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что при беременности, осложнённой ПЭ, происходят изменения плацентарного метаболизма регуляторных газотрансмиттеров H_2S и СО, которые приводят к нарушению общего гомеостаза как в самой плаценте, так и, как следствие, во всей фетоплацентарной системе. Результаты настоящего исследования позволяют расширить наши представления о молекулярно-клеточных механизмах формирования и дальнейшего развития ПЭ.

ЛИТЕРАТУРА

- Ходжаева З.С., Коган Е.А., Клименченко Н.И., Акатьева А.С., Сафонова А.Д., Холин А.М., Вавина О.В., Сухих Г.Т. Клинико-патогенетические особенности ранней и поздней преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2015; 1:12-7.
- Мирошина Е.Д., Тютюнник Н.В., Храменко Н.В., Харченко Д.К., Кан Н.Е. Диагностика преэклампсии на современном этапе (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2017; 23(1): 96-102. DOI: 10.17116/repro201723196-102.
- Сукманский О.И., Реутов В.П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний. *Успехи физиологических наук*. 2016; 47(3): 30-58.
- Храмова И.А., Черток В.М., Коцюба А.Е., Черток А.Г. Структурная организация кровеносной системы матки. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; 3: 13-23. DOI:10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.13-23.
- Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводород. *Успехи физиологических наук*. 2021; 52(3): 41-5. DOI: 10.31857/S0301179821030085.
- Карпищенко А.И., Алипов А.Н., Алексеев В.В. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
- Колесников С.И., Власов Б.Я., Колесникова Л.И. Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей. *Вестник РАМН*. 2015; 70(2): 237-41. DOI:10.15690/vramn.v70i2.1318.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. *J. Biochem*. 2009; 146(5): 623-6. DOI:10.1093/jb/mvp111.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции. *Биомедицинская химия*. 2010; 56(6): 657-62. DOI: 10.18097/PBMC20105606657.
- Holwerda K.M., Karumanchi S.A., Lely A.T. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. *Curr. Opin. Nephro Hypertens*. 2015; 24(2):170-6. DOI: 10.1097/MNH.000000000000096.
- Вараксин А.А., Пушина Е.В., Значение сероводорода в регуляции функции органов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2012; 2: 27-32.
- Vera-Aviles M., Vantana E., Kardinasari E., Koh N.L., Latundeda G.O. Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018; 11(4):pii E111. DOI: 10.3390/ph11040111.
- Zenclussen M.L., Casalis P.A., Jensen F., Woidacki K., Zenclussen A.K. Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus. *Front. Endocrinol*. 2014; 5:32. DOI: 10.3389/fendo.2014.00032.
- Погорелова Т.Н., Друккер Н.А., Крукиер И.И., Никашина А.А., Палиева Н.В., Левкович М.А., Авруцкая В.В. Дисбаланс плацентарных циклических и ациклических нуклеотидов и модификация их взаимосвязи с обменом регуляторных газотрансмиттеров при преждевременных родах. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2023; 23(5):13-8. DOI:10.17116/rosakush20232305113.

REFERENCES

- Khodzhaeva Z.S., Kogan Ye.A., Klimenchenko N.I., Akatyeva A.S., Safonova A.D., Kholin A.M., Vavina O.V., Sukhikh G.T. Clinical and pathogenetic features of early and late preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2015; 1:12-7. (in Russian)
- Miroshina E.D., Tyutyunnik N.V., Khramchenko N.V., Kharchenko D.K., Kan N.E. Modern diagnostic methods of preeclampsia (a review). *Problemy reproduktivnoy*. 2017; 23(1):96-102. DOI:10.17116/repro201723196-102. (in Russian)
- Sukmansky O.I., Reutov V.P. Gasotransmitters: Physiological role and involvement in the pathogenesis of the diseases. *J Advances in Physiological Sciences*. 2016; 47(3): 30-58. (in Russian)
- Khramova I.A., Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Chertok A.G. Structural organization of the uterus circulatory system. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; (3):13-23. DOI:10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.13-23. (in Russian)
- Zinchuk V.V. Oxygen Transport Functions of Blood and Hydrogen Sulfide Gasotransmitter. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2021; 52(3): 41-5. DOI: 10.31857/S0301179821030085. (in Russian)
- Karpishchenko A.I., ed. Medical laboratory technologies: a guide to clinical laboratory diagnostics. 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Media. 2013. (in Russian)
- Kolesnikov S.I., Vlasov B.Ya., Kolesnikova L. I. Hydrogen Sulfide as a Third Essential Gas Molecule in Living Tissues. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; 70(2):237-41. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1318. (in Russian)
- Shibuya N., Mikami Y., Kimura Y., Nagahara N., Kimura H. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. *J. Biochem*. 2009; 146(5): 623-6.

- DOI:10.1093/jb/mvp111.
9. Kulinsky V.I., Kolesnichenko, L.S., Biochemistry (Moscow). The nuclear glutathione and its functions. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2010; 4(3): 224-7. DOI: 10.18097/PBMC20105606657. (in Russian)
 10. Holwerda K.M., Karumanchi S.A., Lely A.T. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2015; 24(2):170-6. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000096.
 11. Varaksin A.A., Pushchina E.V. Role of hydrogen sulphide in regulatory functions. *Tikhokeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; (2):27-36. (in Russian)
 12. Vera-Aviles M., Vantana E., Kardinasari E., Koh N.L., Latunde-Dada G.O. Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018; 11(4). pii E111. DOI: 10.3390/ph11040111.
 13. Zenclussen M.L., Casalis P.A., Jensen F., Woidacki K., Zenclussen A.K. Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus. *Front Endocrinol*. 2014; 5:32. DOI: 10.3389/fendo.2014.00032.
 14. Pogorelova T.N., Drukker N.A., Krukier I.I., Nikashina A.A., Palieva N.V., Levkovich M.A., Avrutskaya V.V. Imbalance of placental cyclic and acyclic nucleotides and modification of their relationship with the metabolism of regulatory gas-transmitters in preterm labor. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2023; 23(5):13-8. DOI:10.17116/rosakush20232305113. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Долгих Т.И.¹, Левашова О.А.¹, Долгих В.Т.², Сысоева А.С.¹

ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА: ВОПРОСЫ ПАТОГЕНЕЗА И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, 440060, Пенза, Россия;

²ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», 107031, Москва, Россия

Цель настоящего обзора - систематизация данных о патогенезе заболеваний кишечника и лабораторных биомаркеров для клинического применения. Поиск литературы за период 2012-2024 годов был проведен по ключевым словам «воспаление, воспалительные заболевания кишечника, микробиота, фекальный кальпротектин, фекальный трансферрин, фекальный гемоглобин, зонулин» с использованием баз данных eLIBRARY, Scopus, Web of Science Core Collection и поисковой системы Google Scholar. Было выявлено более 3000 ссылок, проанализировано 186 статей, из которых для написания настоящего обзора отобрано 48 источников, позволивших рассмотреть вопросы патогенеза воспаления кишечника с учетом накопленных научных данных и лабораторного потенциала. Важной составляющей диагностического процесса служит выявление предикторов воспалительных заболеваний кишечника. К ведущим патогенетическим факторам можно отнести изменение состава и функции микробиоты кишечника, ослабленный местный (секреторный) иммунитет, индукцию воспаления, повреждение и нарушение проницаемости слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Использование биомаркеров (кальпротектина, фекального трансферрина, фекального гемоглобина и зонулина) для скрининга, дифференциальной диагностики, оценки степени и тяжести повреждения кишечника позволит сократить частоту инвазивных процедур и снизить риск развития осложненных и тяжелых форм.

Ключевые слова: воспаление; патогенез; заболевания кишечника; микробиота; лабораторная диагностика; кальпротектин; фекальный трансферрин; фекальный гемоглобин; зонулин; обзор

Для цитирования: Долгих Т.И., Левашова О.А., Долгих В.Т., Сысоева А.С. Заболевания кишечника: вопросы патогенеза и лабораторной диагностики (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 571-578.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-571-578>

Для корреспонденции: Левашова Ольга Анатольевна, канд. биол. наук, доцент кафедры медицинской микробиологии и лабораторной медицины Пензенского института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ; e-mail: olga.lewashova@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.05.2024
Принята к печати 05.09.2024
Опубликовано 25.10.2024

Dolgikh T.I.¹, Levashova O.A.¹, Dolgikh V.T.², Sysoeva A.S.¹

INTESTINAL DISEASES: ISSUES OF PATHOGENESIS AND LABORATORY DIAGNOSIS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Penza Institute of Advanced Medical Studies – branch of the Federal State Government-financed Educational Establishment of Additional Professional Education “Russian Medical Academy of Life-long Professional Learning” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 440060, Penza, Russia;

²Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, 107031, Moscow, Russia

The aim of this review was to systematise data on the pathogenesis of gut diseases and laboratory biomarkers for clinical application. A literature search for the period 2012-2024 was conducted using the keywords ‘inflammation, inflammatory bowel disease, microbiota, faecal calprotectin, faecal transferrin, faecal haemoglobin, zonulin’ using eLIBRARY, Scopus, Web of Science Core Collection databases and Google Scholar search engine. More than 3000 references were identified, 186 articles were analysed, of which 48 sources were selected for writing this review, which allowed to consider the pathogenesis of intestinal inflammation taking into account the accumulated scientific data and laboratory capacity. Identification of predictors of inflammatory bowel disease is an important part of the diagnostic process. The leading pathogenetic factors include changes in the composition and function of the intestinal microbiota, weakened local (secretory) immunity, induction of inflammation, damage and permeability disorder of the gastrointestinal (GI) mucosa. The use of biomarkers (calprotectin, faecal transferrin, faecal haemoglobin and zonulin) for screening, differential diagnosis, assessment of the degree and severity of intestinal damage will reduce the frequency of invasive procedures and reduce the risk of complications and severe forms.

Key words: inflammation; pathogenesis; intestinal diseases; microbiota; laboratory diagnostics; calprotectin; faecal transferrin; faecal haemoglobin; zonulin; review

For citation: Dolgikh T.I., Levashova O.A., Dolgikh V.T., Sysoeva A.S. Intestinal diseases: issues of pathogenesis and laboratory diagnosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 571-578 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-571-578>

For correspondence: *Levashova Olga Anatolyevna*, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Medical Microbiology and Laboratory Medicine, Penza Institute of Advanced Training of Doctors - branch of the Russian Medical Academy Continuing Professional Education; e-mail: olga.lewashowa@yandex.ru

Information about authors:

Dolgih T.I., <https://orcid.org/0000-0001-6005-966C>;

Levashova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-8440-6598>;

Dolgih W.T., <https://orcid.org/0000-0001-9034-4912>;

Sysoyeva A.S., <https://orcid.org/0009-0008-6981-464X>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.05.2024

Accepted 05.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Современная концепция дифференциальной диагностики заболеваний кишечника претерпела изменения в силу возросшего влияния биологического фактора [1], что особенно проявилось в период эпидемии COVID-19, и постковидный период [2]. Литературные данные последних лет свидетельствуют о широком распространении воспалительных заболеваний кишечника, включая внекишечные проявления как у взрослых, так и у детей [3-5]. В последние годы уточнена роль генетических и биологических факторов в патогенезе воспалительных процессов в кишечнике, появились новые лекарственные препараты, позволяющие воздействовать на многие звенья воспалительного процесса.

Однако фундаментальные аспекты воспалительных заболеваний кишечника, касающиеся снижения риска хирургических вмешательств и восстановления качества жизни пациентов до популяционного уровня, ещё далеки от своего разрешения [1]. Установление этиологии специфических колитов, связанных с заражением вирусами, бактериями и паразитами, которые вызывают воспаление стенки кишечника и диарею, и проведение дифференциальной диагностики с иммуновоспалительными заболеваниями (язвенный колит, болезнь Крона, недифференцированный колит), лучевым колитом и другими ятрогенными поражениями кишечника в ранние сроки являются принципиальными для проведения адекватных лечебно-диагностических мероприятий [1, 2, 4, 6, 7]. Анализ особенностей течения заболеваний в отдаленном постковидном периоде показал значительное снижение качества жизни пациентов при рецидиве симптоматики [2, 6].

Об увеличении числа больных с воспалительными заболеваниями кишечника с 79,5 до 84,3 на 100 тыс. населения свидетельствуют опубликованные ещё в 2020 году результаты мультицентрового метаанализа данных 195 стран (1990–2017 гг.) [8]. В российской популяции пациентов средний возраст дебюта заболевания составляет 35,3 года для язвенного колита и 31,2 года – для болезни Крона [9]. Установлена распространенность язвенного колита 16,6 случаев на 100 тыс. населения с регистрируемым ежегодным приростом 11,3%, а болезни Крона – 5,6 случаев на 100 тыс. населения с приростом 13,7% [10]. Пик воспалительных заболеваний кишечника детского возраста приходится на подростковый период: у 20% детей - в возрасте до 10 лет, а у 5% – в возрасте до 5 лет [3, 5, 9, 10].

Установлено, что верификация воспалительных заболеваний кишечника сложна и занимает достаточно

длительный период времени (в среднем 2,6 лет – для болезни Крона и 1,1 года - для язвенного колита), в течение которого патологический процесс продолжает нарастать из-за затянувшейся дифференциальной диагностики и неадекватной терапии. Только у 36,9% пациентов с болезнью Крона диагноз устанавливался в течение первого года (у пациентов с язвенным колитом - в 72% случаев) [9, 10, 12-14]. В связи с этим целесообразно рассмотреть вопросы патогенеза воспаления кишечника с современных позиций с учетом накопленных научных данных и лабораторного потенциала.

Методология поиска источников литературы.

Целью настоящего обзора стала систематизация данных о патогенезе заболеваний кишечника и лабораторных биомаркеров для клинического применения. Поиск литературы за период 2012-2024 годы был проведен, по ключевым словам, «воспаление, воспалительные заболевания кишечника, микробиота, фекальный кальпротектин, фекальный трансферрин, фекальный гемоглобин, зонулин» с использованием баз данных eLIBRARY, Scopus, Web of Science Core Collection и поисковой системы Google Scholar. Было выявлено более 3000 ссылок, проанализировано 186 статей, из которых для написания настоящего обзора отобрано 48 источников, позволивших рассмотреть вопросы патогенеза воспаления кишечника с учетом накопленных научных данных и лабораторного потенциала.

Стратегия диагностики заболеваний кишечника.

Современная стратегия диагностики и лечения пациентов с заболеваниями кишечника основана на трансформации представлений о патогенезе воспалительных заболеваний кишечника [11, 12]. Она направлена на уточнение биомаркеров, используемых для раннего выявления и дифференциальной диагностики функциональных и органических нарушений кишечника воспалительного, аутоиммунного характера, новообразований [2, 5, 7], учитывая, что дебют воспалительных заболеваний кишечника может возникнуть в любом возрасте [3, 5, 10, 13, 14]. Литературные данные свидетельствуют о важном вкладе SARS-CoV-2 в развитие воспаления [2, 15-18]. У больных с COVID-19 частота нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта составляла 17,6% (в серии наблюдений, включавшей 60 исследований и 4243 пациента) [15], и отдаленные последствия наблюдаются в настоящее время [2].

Основными факторами риска при воспалительных заболеваниях кишечника являются тотальное поражение кишки, высокая интенсивность воспаления,

стриктурирующий фенотип болезни Крона и наличие первичного склерозирующего холангита [5, 7, 13, 14]. Примерно у 25% пациентов с язвенным колитом и у 45% – с болезнью Крона развиваются внекишечные проявления, отмечается поражение нескольких систем организма [3-5], а одним из главных осложнений этих заболеваний является развитие новообразований толстой кишки [7, 12-14].

Большая часть внекишечных проявлений отмечается при болезни Крона по сравнению с язвенным колитом (за исключением первичного склерозирующего холангита, предпочтительно встречающегося при язвенном колите) [4, 7]. Наиболее часто поражаются у детей и взрослых суставы, кожа и слизистые оболочки глаза и гепатобилиарная система [3, 4, 18].

Установлено, что внекишечные проявления могут предшествовать кишечным симптомам, возникать синхронно с ними или на протяжении болезни, нарастая по мере развития патологического процесса [19]. Поражения других органов при воспалительных заболеваниях кишечника не всегда патогенетически связано с течением или осложнением основного заболевания, может быть нежелательным явлением применяемой терапии, а также просто сопутствовать ему, являясь частью «ко- или полиморбидности» [4, 16, 17, 19].

В последние годы отмечается трансформация воспалительных заболеваний кишечника в сторону большей вариабельности симптоматики, несоответствия клинических симптомов с реальной тяжестью воспаления, роста доли пациентов с внекишечными проявлениями и резистентностью к препаратам индукционной и базисной терапии воспалительных заболеваний кишечника [11, 12].

Воспаление слизистой оболочки кишечника как типовой патологический процесс. Воспаление (inflammatio, phlogosis) – типовой патологический процесс, возникающий в ответ на повреждение ткани и направленный на ограничение, нейтрализацию и элиминацию флогогенного агента и восстановление поврежденных тканей. Он характеризуется развитием как патогенных, так и адаптивных реакций организма [16, 17]. Этиологические факторы воспаления подразделяются на экзогенные (механические, физические, химические, биологические) и эндогенные (продукты распада тканей, нарушенного обмена веществ, обычные продукты, накапливающиеся в больших концентрациях, эффекторные иммунные клетки, иммунные комплексы) [16].

Патогенез воспаления включает альтерацию с выделением медиаторов (местных химических веществ, образующихся, освобождаемых либо активируемых в очаге воспаления, действующих и разрушающихся в пределах очага воспаления), сосудистую реакцию с экссудацией, эмиграцией и пролиферацией [16-18, 20, 21].

Альтерация подразделяется на первичную (изменения вызываются непосредственным действием флогогенного фактора: некроз, некробиоз, дистрофия, апоптоз) и вторичную (возникает под влиянием патогенного действия продуктов первичной альтерации, спазма сосудов, ацидоза, повышения осмотического давления в тканях). К факторам вторичной альтерации относятся кислородные радикалы, оксид азота, мембраноатакующий комплекс (C5-C9) системы комплемента, гидроли-

тические ферменты лизосом, фактор некроза опухоли, катионные белки, эозинофильные цитотоксические белки, лактоферрин [16, 17, 20, 21], кальпротектин, фекальный трансферрин и фекальный гемоглобин [7, 15].

К ведущим патогенетическим факторам можно отнести изменение состава и функции микробиоты кишечника, ослабленный местный (секреторный) иммунитет, индукцию воспаления, повреждение и нарушение проницаемости слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [2, 7, 16, 17, 20, 21, 23]. Установлено, что индуцировать повреждение кишечника может прямое цитотоксическое действие SARS-CoV-2 на энтероциты, а дополнительные повреждения могут быть обусловлены гипоксией, вызванной пневмонией и неблагоприятными лекарственными воздействиями [15, 16, 17, 18, 20-22]. Изменение микробиоты в сочетании с нарушением функции слизисто-эпителиального барьера приводит к формированию воспалительных изменений в кишечной стенке [11, 20-23].

Воспаления проявляется изменениями тонуса стенок и просвета сосудов крово- и лимфообращения, проницаемости стенок сосудов. Исход воспаления зависит от причины, реактивности организма и структуры органа с тремя вариантами: а) гибель жизненно важных тканей с тяжелыми последствиями для организма; б) постепенное ограничение очага воспаления от здоровой ткани; в) постепенное замещение очага воспаления соединительной тканью [16]. Биологическое значение воспаления заключается в постепенном замещении очага воспаления соединительной тканью, ограничении очага повреждения от всего организма и ликвидации вредоносных начал, пролиферации лимфоцитов и плазматических клеток с выработкой антител и повышением местного и общего иммунитета [7, 16, 17].

По современным представлениям внекишечные проявления воспалительных заболеваний кишечника считаются результатом антиген-специфического иммунного ответа кишечника на клетки вне кишки, либо независимого воспалительного события, которое инициируется в результате генетических факторов риска и/или факторов риска окружающей среды [4, 9, 10, 19]. Повышение проницаемости кишечного барьера для антигенов окружающей среды (прежде всего нарушение распознавания бактериальных молекулярных маркеров дендритными клетками в условиях измененного профиля микробиоты кишечника) приводит к хронизации воспаления в стенке кишки за счет дефектов врожденного и приобретенного иммунитета. Транслоцированные в условиях повышенной проницаемости кишечного барьера бактерии могут вызвать адаптивные иммунные реакции на общие для микроорганизмов и органов человека эпитопы, что приводит к развитию внекишечных проявлений [19, 21-23].

Кишечный барьер. Синдром повышенной проницаемости. Кишечный барьер — это гистион со сложной многоуровневой морфофункциональной, физико-химической и иммунобиологической структурой, обеспечивающий протективную функцию организма, регулирующий поступление веществ из внешней среды [20]. В 2020 году утверждено определение «синдром повышенной проницаемости слизистых оболочек» [20]. Целостность кишечного барьера имеет большое значение для ограничения контакта патогенных антиге-

нов с иммунными клетками собственной соединительнотканной пластинки слизистой оболочки.

Кроме того, эпителиальные клетки кишки способны поглощать бактерии, изолировать и нейтрализовать токсины и обнаруживать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, секретировать факторы, способствующие восстановлению эпителия [7, 20]. Регулируемый кишечный барьер необходим также для контролируемого транспорта антигена к резидентным иммунным клеткам в ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани и для поддержания обучения иммунной системы [20-22].

Механические свойства эпителиальной ткани обеспечиваются зоной адгезии и десмосомами, а непосредственное соединение клеток происходит посредством взаимодействия трансмембранных белков. Многокомпонентность межэпителиальных контактов определяет селективность и степень проницаемости слизистой оболочки кишки и обеспечивает обмен низкомолекулярными веществами непосредственно между эпителиоцитами [20-22]. Иммунные клетки контактируют с представленными на поверхности бактериальных клеток углеводными структурами - гликоформами на основе различных моносахаридов, распознающихся посредством толл-подобных рецепторов (TLR) [13, 14, 24]. Рецепторы TLR2, TLR1, TLR6 и TLR4 распознают компоненты клеточной стенки бактерий; TLR5 распознает флагеллин: TLR2 и TLR4 в основном находятся в тонкой кишке, а TLR5 - в толстой кишке человека [24].

В щеточной каемке кишечника присутствуют так называемые М-клетки, которые участвуют в захватывании антигена из просвета кишечника и доставке их антигенпрезентирующим клеткам [20, 21]. Установлено, что активная репликация вируса SARS-CoV-2 приводит к разрушению М-клеток и способствует воспалению слизистой оболочки и диарее, при этом SARS-CoV-2 избегает иммунного обнаружения посредством презентации антигена в лимфоидных фолликулах [25, 26].

Кишечный барьер может быть нарушен на любом уровне гистиона. Кроме того, тесные взаимодействия элементов барьера приводят к формированию замкнутой цепи, взаимно потенцируя и усугубляя увеличение проницаемости. Количество, структура и состав плотных контактов при повреждении, либо воспалении модулируются, неизбежно влияя на микробиом и каскад иммунных реакций в подслизистом слое [20, 21].

При разрушении эпителиального барьера немедленно в кровоток из эпителиальных клеток кишечника поступают цитозольные белки: белок, связывающий жирные кислоты в кишечнике (intestinal fatty acid-binding protein, I-FABP), и диаминооксидаза [25]. I-FABP в большей степени выступает в качестве биомаркеров гибели энтероцитов и атрофии слизистой оболочки кишечника [25]. Диаминооксидаза экспрессируется преимущественно на кончиках ворсинок эпителиоцитов слизистой кишки, в меньшем количестве - в почках и тимусе [20]. Повышение уровня этих белков выявлялось у пациентов с ишемией кишки, синдромом системного воспалительного ответа, некротизирующим энтероколитом, а также у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, ожирением и целиакией [22, 25-27]. Предлагается использовать уровень I-FABP для оценки степени повреждения стенки кишечника и про-

гнозирования летальности пациентов при поступлении в отделение интенсивной терапии [25].

Особый интерес исследователей вызывают молекулярные основы кишечной проницаемости и патологические изменения, которые происходят при воздействии SARS-CoV-2 на энтероциты [25, 26]. Один из механизмов развития диарейного синдрома при COVID-19 включает участие виropоринов, представляющих собой небольшие порообразующие вирусные белки SARS-CoV-2 (белок E и Orf3a) [28]. Эти белки образуют отверстия в мембране, вызывают нарушение обмена ионов в энтероцитах и, в конечном итоге, приводят к возникновению диареи.

Ионный дисбаланс приводит к активации инфлам-матомы NRP3 (NOD-, LRR- и содержащей пиринный домен 3), что сопровождается секрецией провоспалительного цитокина IL-1 β , при этом индуцируется воспалительный ответ [28, 29]. В исследовании Hernández-Solis A. и соавт. [29] показано, что тяжелая форма COVID-19 связана с повышенной проницаемостью межклеточных контактов и дальнейшей транслокацией микробных продуктов в кровь и в качестве ранних индикаторов фатального исхода были предложены IL-6, IL-10, sFas, granulysin. Кроме того, для лечения тяжелых тяжелой формой COVID-19 предлагается использование антагонистов зонулина.

Зонулин является одним из маркеров проницаемости кишечника и представляет собой белок, регулирующий плотные контакты, в состав которых входят трансмембранные белки: окклюдины, клаудины, соединительные молекулы адгезии и др. Он способен обратимо открывать внутриклеточные плотные соединения [28, 30].

Высказывается предположение о том, что функциональную состоятельность кишечного барьера отражает уровень зонулина в сыворотке или плазме крови [20, 30, 31]. В исследованиях последних лет [27] показана возможность использования зонулина в качестве фекального биомаркера для дифференциальной диагностики функциональных и органических заболеваний. Пациенты с синдромом раздраженного кишечника характеризовались более высоким уровнем кишечной проницаемости, чем лица без данного синдрома, при этом больные избыточной массой тела и ожирением имели значительно большую концентрацию зонулина в кале, чем пациенты с нормальным весом.

В качестве потенциального биомаркера синдрома повышенной эпителиальной проницаемости рассматривается липокалин-2, преимущественно экспрессирующийся нейтрофилами и эпителиальными клетками пищеварительной трубки. Усиление экспрессии происходит при активации TLR в процессе иммунного воспалительного ответа [20, 31]. Показано, что сывороточный уровень липокалина-2 в комплексе с металлопротеазой-9 коррелирует с активностью заболевания при воспалительных заболеваниях кишечника, что может быть использовано в качестве маркеров заживления слизистой оболочки [31].

Важной частью защитных механизмов является аутофагия, имеющая большое значение для поддержания клеточного гомеостаза кишечника, удаления дефектных белков, вирусных частиц [33]. Включение вирусных генов в гены клетки-хозяина может изменять свя-

занную с аутофагией экспрессию [33, 34]. Кроме того, снижение синтеза некоторых белков киназного типа (mTOR), непосредственно участвующих в индукции аутофагии, приводит к уменьшению секреции антимикробных пептидов, что также способствует активной репликации вируса в кишечнике [33].

В механизмах аутофагии принимает участие белок беклин (BECN1), положительно регулирующий аутофагию [33-35]. В исследовании Н.М. Окуян и соавторов [34] показано, что этот протеин может служить прогностическим биомаркером при оценке тяжести заболевания COVID-19 и модуляция аутофагии, опосредованная BECN1, что может иметь большое значение для улучшения клинических исходов COVID-19.

Установлено, что к повышению проницаемости кишечной стенки приводит потеря эпителиальной массы тонкой кишки [22]. В исследованиях Schoultz I. и соавт. [22] показано, что одним из маркеров снижения массы энтероцитов является цитруллин, который отрицательно коррелирует с тяжестью кишечных заболеваний при энтеропатиях, возникающих, например, при целиакии и болезни Крона. Оказалось, что уровень циркулирующего цитрулина снижается у пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток из-за орального и желудочно-кишечного мукозита (приводящего к потере эпителиальной массы) в результате интенсивной миелоаблативной терапии [22].

Биомаркерами повреждения слизистой оболочки, особенно при аутоиммунных заболеваниях и малигнизации очага повреждения, являются фекальный трансферрин и фекальный гемоглобин, уровень которых свидетельствует о степени поражения и соответственно о скрытом кровотечении из верхних и нижних отделов кишечника, что оправдывает необходимость одновременного определения [7].

Кишечная микробиота: защитное, трофическое и метаболическое действия. В последние годы интенсивно изучаются сложные взаимоотношения между микробиотой и организмом человека. Доказано, что микробиота кишечника влияет на легкие благодаря перекрестному взаимодействию между микробиотой кишечника и легкими, которое называется «ось кишечник-легкие» [36, 37]. Одним из механизмов длительного активного воспаления при воспалительных заболеваниях кишечника считается чрезмерная активация иммунных клеток слизистой оболочки, в том числе за счет повышенного антигенного воздействия микробиоты в результате нарушения проницаемости кишечника [20, 21].

Предполагается, что «ось кишечник-легкие» является двунаправленной: эндотоксины, микробные метаболиты, могут воздействовать на легкие через кровь, а когда в легких возникает воспаление, это может повлиять и на микробиоту кишечника [37].

Кишечный микробиом оказывает выраженное влияние на патогенез воспалительных заболеваний кишечника и в целом характеризуется сниженным видовым богатством и разнообразием, меньшей временной стабильностью, уменьшением количества полезных бактерий и увеличением болезнетворных бактерий [12, 37, 38]. Нарушение микробиома кишки при повышенной эпителиальной проницаемости и целостности кишечного барьера вносит особый вклад в патогенез за счет чрезмерной стимуляции иммунной системы слизистой

оболочки [12, 23].

Наиболее изучены короткоцепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират), продуцируемые кишечными бактериями в процессе ферментации пищевых волокон и выполняющие ряд важнейших функций: трофическую (энергетический субстрат, стимуляция роста и пролиферации энтероцитов); регуляторную (регулятор моторики, кровотока кишки, а также выработку муцина бокаловидными клетками); противовоспалительную; иммуноотропную; канцеропротективную). Они также могут быть использованы в качестве маркера проницаемости кишечника [39]. Исследования последних лет показали, что короткие некодирующие микроРНК (миРНК), в том числе циркулирующие в крови и фекальные, являются модуляторами различных клеточных процессов через регуляцию экспрессии генов-мишеней и рассматриваются не только как биомаркеры в диагностике заболеваний, но перспективные мишени для терапии различных заболеваний, включая кишечные [40].

Бактериальные токсины могут выступать в качестве иницирующих и промотирующих факторов развития новообразований кишечника, включая колоректальный рак [7, 39, 41].

Изменение состава и функциональной активности кишечной микробиоты, которое происходит под влиянием антибиотиков, возбудителей инфекций, включая SARS-CoV-2, может привести как к функциональным расстройствам, так и к запуску патологического процесса, что определяет клиническую значимость лабораторных тестов [7, 41, 42].

Бактериальные токсины могут выступать в качестве иницирующих и промотирующих факторов развития новообразований и аутоиммунных заболеваний [7]. Способностью вырабатывать токсины с канцерогенным действием обладают некоторые штаммы *Escherichia coli*, поскольку синтезируемый ими колибактин вызывает двуспиральные разрывы в ДНК, что приводит к онкогенным мутациям. Другие штаммы *E. coli* продуцируют цитотоксический некротизирующий фактор 1 (cytotoxic necrotizing factor 1, CNF1), активирующий белки семейства Rho, которые характеризуются ГТФ-азной активностью и являются ключевыми для регуляции многих витальных процессов (пролиферации, выживания, апоптоза, ангиогенеза и др.) [41].

Лабораторные биомаркеры для скрининга, дифференциальной диагностики, оценки степени и тяжести повреждения кишечника. Одним из важных достижений в скрининге пациентов на потенциальное наличие воспалительных заболеваний кишечника является быстрое тестирование с определением уровня фекального кальпротектина [3, 5, 11-14]. Кальпротектин - димер, образованный двумя белковыми субъединицами (S100A8 и S100A9), который высвобождается в просвет кишечника преимущественно нейтрофилами и уровень которого значительно повышается при воспалении и особенно при воспалительных заболеваниях кишечника [41, 42]. Установлена его потенциальная роль как биомаркера воспаления при инфекциях, включая COVID-19 [43-45]. Он используется для раннего выявления воспалительных заболеваний кишечника, дифференциального диагноза и контроля эффективности терапии [5, 13, 14, 22].

Интенсивность воспаления коррелирует с тяжестью процесса. Нормализация уровня кальпротектина означает восстановление слизистой оболочки, что и является главной задачей при лечении. Концентрация кальпротектина достигает максимальных значений у пациентов с сочетанным поражением толстой и подвздошной кишки и тотальным поражением желудочно-кишечного тракта [3, 5, 13, 14]. Определение содержания кальпротектина является неинвазивным критерием клинической и эндоскопической активности воспалительных заболеваний кишечника у детей и взрослых, а также позволяет определять протяженность и объем поражения кишки у больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона [42, 43]. Отсутствие противопоказаний позволяет проводить анализ содержания кальпротектина как в острый период, так и в период ремиссии воспалительных заболеваний кишечника [13, 14]. Концентрация фекального кальпротектина в норме составляет до 50 мг на 1 г кала для взрослых и детей старше 4-х лет, для детей младшего возраста - выше физиологической нормы взрослых. Для лиц старше 65 лет верхняя граница нормы показателя составляет 112 мг/г [46].

Маркерами скрытого кровотечения при воспалении, развитии аутоиммунного процесса и/или малигнизации кишечника, являются фекальный трансферрин и фекальный гемоглобин, которые попадают в просвет при повреждении слизистой оболочки кишки (трансферрин сохраняется в кале более длительное время, чем гемоглобин) [7, 47]. Использование этих тестов в комплексе с кальпротектином позволяет провести дифференциальный диагноз между функциональными нарушениями (чаще - синдромом раздраженного кишечника) и органическим поражением стенки кишки, повысить выявляемость воспалительных и аутоиммунных заболеваний, предраковых состояний и колоректального рака на ранних стадиях, оценивать эффективность терапии [7, 42, 47]. При проведении многоцентрового ретроспективного когортного исследования, включающего 545 505 участников, для фекального гемоглобина были выявлены пороговые значения: для женщин - 18,3 мкг/г (50-59 лет) и 14,6 мкг/г (60-69 лет), а для мужчин - 16,8 мкг/г (50-59 лет) и 19,9 мкг/г (60-69 лет) [48]. Другими авторами были продемонстрированы результаты исследований, включающих два фекальных маркера - гемоглобин и трансферрин, где при 95% доверительном интервале значения концентрации составили 15,2 мкг/г кала (12,0-18,3 мкг/г) и 3,2 мкг/г фекалий (2,8-3,5 мкг/г) соответственно [46].

Заключение. Таким образом, понимание патофизиологических аспектов развития заболеваний кишечника, совершенствование методов лабораторной диагностики позволит значительно сократить сроки их верификации, разработать алгоритмы диагностики и персонализированные подходы к терапии, что позволит предупредить развитие тяжелых форм. Широкое внедрение в лабораторную практику биомаркеров для скрининга, дифференциальной диагностики, оценки степени и тяжести повреждения кишечника позволит значительно сократить инвазивные исследования и проводить оценку эффективности проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 4, 7, 8, 15, 17, 18, 21,
22-26, 28-42, 44-46 СМ. REFERENCES)

1. Першко А.М., Гриневиц В.Б., Иванюк Е.С. Новые возможности в диагностике и лечении воспалительных заболеваний кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; (9):13-9. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-217-9-13-19.
2. Паценко М.Б., Ардатская М.Д., Анучкин А.А., Буторова Л.И., Гайворонский И.Н., Нугаева Н.Р. и др. Отдаленные последствия COVID-19 у пациентов с функциональными расстройствами кишечника, реабилитационные возможности микробиоценоз-ориентированной терапии. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1119-27. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202523.
3. Корниенко Е. А. Воспалительные заболевания кишечника у детей. М.: Прима Принт; 2014.
5. Хавкин А.И., Налетов А.В., Марченко Н.А. Воспалительные заболевания кишечника у детей: современные достижения в диагностике и терапии. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2023; 33(6):7-15. DOI: 10.22416/1382-4376-2023-33-6-7-15.
6. Парфенов А.И., Каграманова А.В., Князев О.В., Хомерики С.Г., Кулаков Д.С. Современная концепция дифференциальной диагностики колитов: от Г.Ф. Ланга до наших дней. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1022-30. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202496.
9. Белоусова Е.А., Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Хатьков И.Е., Бакулин И.Г., Скалинская М.И., и др. Клинико-демографические характеристики и лечебные подходы у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) в РФ. Первые результаты анализа национального Регистра. *Колопроктология*. 2023; 22(1):65-82. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-1-65-82.
10. Бакулин И.Г., Скалинская М.И., Сказываева Е.В. Северо-Западный регистр пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника: достижения и уроки. *Колопроктология*. 2022; 21(1):37-49. DOI: 10.33878/2073-7556-2022-21-1-37-49.
11. Маев И.В., Бакулин И.Г., Скалинская М.И., Сказываева Е.В. Воспалительные заболевания кишечника: трансформация представлений. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1064-74.
12. Шрайнер Е.В., Хавкин А.И., Новикова М.С., Тикунев А.Ю., Чечушков А.В., Харахорин Р.А., и др. Современные стратегии и перспективы лечения язвенного колита. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; 1(1):149-57. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-149-157.
13. Шельгин Ю.А., Ивашкин В.Т., Ачкасов С.И., Решетов И.В., Маев И.В., Белоусова Е.А., и др. Клинические рекомендации. Болезнь Крона (K50), взрослые. *Колопроктология*. 2023; 3(85):10-49. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-3-10-49.
14. Шельгин Ю.А., Ивашкин В.Т., Белоусова Е.А., Решетов И.В., Маев И.В., Ачкасов С.И. и др. Клинические рекомендации. Язвенный колит (K51), взрослые. *Колопроктология*. 2023; 22(1):10-44. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-1-10-44.
16. Долгих В.Т., Золотов А.Н. Основы иммунопатологии: учебное пособие для вузов. М.: Юрайт; 2024.
19. Яблокова Е.А., Джабарова А.К., Лохматов М.М., Горелов А.В., Крутихина С.Б., Ерохина М.И., и др. Внекишечные проявления воспалительных заболеваний кишечника у детей. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; 1(1):165-77. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-165-177.
20. Скалинская М.И., Деев Р.В., Пресняков Е.В., Чекмарева И.А., Сказываева Е.В., Бакулин И.Г. Гистион эпителиального кишечного барьера при воспалительных заболеваниях кишечника: морфофункциональная характеристика и клиническое значение. *Русский Медицинский Журнал. Медицинское обозрение*. 2023; 7(5):292-9. DOI: 10.32364/2587-6821-2023-7-5-7.
21. Симаненков В.И., Маев И.В., Ткачева О.Н., Алексеенко С.А., Андреев Д.Н., Бордин Д.С. и др. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021; 20(1):121-278. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2758.
27. Федорин М.М., Ливзан М.А., Гаус О.В. Особенности течения синдрома раздраженного кишечника у лиц с избыточной массой тела и ожирением. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*.

логия. 2023;(10):48-56. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-48-56.

43. Ливзан М.А., Долгих Т.И., Лялюкова Е.А. Фекальный кальпротектин в комплексной диагностике заболеваний кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2013;12:83-6.

REFERENCES

- Pershko A.M., Grinevich V.B., Ivanyuk E.S. New opportunities in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; (9):13-9. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-217-9-13-19. (in Russian)
- Patsenko M.B., Ardatskaya M.D., Anuchkin A.A., Butorova L.I., Gaivoronsky I.N., Nugaeva N.R. et al. Long-term consequences of COVID-19 in patients with functional bowel disorders, rehabilitation prospective of microbiocenosis-oriented therapy. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1119-27. DOI:10.26442/00403660.2023.12.202523. (in Russian)
- Kornienko E. A. Inflammatory bowel disease in children. Moscow: Prima Print; 2014. (in Russian)
- Cohen S., Padlipsky J., Yerushalmy-Feler A. Risk factors associated with extraintestinal manifestations in children with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2020; 74(5):691-7. DOI: 10.1038/s41430-019-0490-1.
- Khavkin A.I., Nalyotov A.V., Marchenko N.A. Inflammatory Bowel Diseases in Children: Modern Achievements in Diagnostics and Therapy. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2023; 33(6):7-15. DOI: 10.22416/1382-4376-2023-33-6-7-15. (in Russian)
- Parfenov A.I., Kagramanova A.V., Knyazev O.V., Khomeriki S.G., Kulakov D.S. Modern concept of differential diagnosis of colitis: from G.F. Lang to the present day. A review. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1022-30. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202496. (in Russian)
- Hirata I. Evaluation of the usefulness of the simultaneous assay of fecal hemoglobin (Hb) and transferrin (Tf) in colorectal cancer screening - for the establishment of the Hb and Tf two-step cutoff assay (HTTC assay). *Diagnosis*. 2020; 7(2):133-9. DOI: 10.1515/dx-2019-0049.
- GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5(1):17-30. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30333-4.
- Belousova E.A., Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Khatkov I.E., Bakulin I.G., Skalinskaya M.I., et al. Clinical and Demographic Features and Treatment Approaches for Inflammatory Bowel Diseases (Crohn's Disease, Ulcerative Colitis) in the Russia. The Primary Results of the Analysis of the National Register. *Koloproktologiya*. 2023; 22(1):65-82. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-1-65-82. (in Russian)
- Bakulin I.G., Skalinskaya M.I., Skazyvaeva E.V. North-Western register of patients with inflammatory bowel diseases: Achievements and lessons learned. *Koloproktologiya*. 2022; 21(1):37-49. DOI: 10.33878/2073-7556-2022-21-1-37-49. (in Russian)
- Maev I.V., Bakulin I.G., Skalinskaya M.I., Skazyvaeva E.V. Inflammatory bowel diseases: Transformation of representations. A review. *Терапевтический архив*. 2023; 95(12):1064-74. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202507. (in Russian)
- Shrayner E.V., Khavkin A.I., Novikova M.S., Tikunov A.Yu., Chechushkov A.V., Kharakhorin R.A., et al. Modern strategies and prospects for the treatment of ulcerative colitis. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; 1(1):149-57. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-149-157. (in Russian)
- Shelygin Yu.A., Ivashkin V.T., Achkasov S.I., Reshetov I.V., Maev I.V., Belousova E.A. et al. Clinical guidelines. Crohn's disease (K50), adults. *Koloproktologiya*. 2023; 22(3):10-49. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-3-10-49. (in Russian)
- Shelygin Yu.A., Ivashkin V.T., Belousova E.A., Reshetov I.V., Maev I.V., Achkasov S.I., et al. Ulcerative colitis (K51), adults. *Koloproktologiya*. 2023; 22(1):10-44. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-1-10-44. (in Russian)
- Cheung K.S., Hung I.F.N., Chan P.P.Y., Lung K.C., Tso E., Liu R., et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2020; 159(1):81-95.
- Dolgikh V.T., Zolotov A.N. Fundamentals of immunopathology: a textbook for universities. Moscow: Yurayt; 2024. (in Russian)
- Yang C., Xiao S.Y. COVID-19 and inflammatory bowel disease: A pathophysiological assessment. *Biomed. Pharmacother.* 2021; 135:111233. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111233.
- Khreefa Z., Barbier M.T., Koksal A.R., Love G., Del Valle L. Pathogenesis and mechanisms of SARS-CoV-2 infection in the intestine, liver, and pancreas. *Cells*. 2023; 12(2): 262-285. DOI: 10.3390/cells12020262.
- Yablokova E.A., Dzhabarova A.K., Lokhmatov M.M., Gorelov A.V., Krutikhina S.B., Erokhina M.I., et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel diseases in children, a modern view of the problem. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; 209(1):165-77. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-165-177. (in Russian)
- Skalinskaya M.I., Deev R.V., Presnyakov E.V., Chekmareva I.A., Skazyvaeva E.V., Bakulin I.G. Histone of the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel diseases: morphofunctional characteristics and clinical significance. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Medicinskoe obozrenie*. 2023; 7(5):292-9. DOI: 10.32364/2587-6821-2023-7-5-7. (in Russian)
- Simanenkova V.I., Maev I.V., Tkacheva O.N., Alekseenko S.A., Andreev D.N., Bordin D.S., et al. Syndrome of increased epithelial permeability in clinical practice. Multidisciplinary national Consensus. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2021; 20(1):121-278. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2758. (in Russian)
- Schoultz I., Keita A.V. The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells*. 2020; 9(8):1909. DOI: 10.3390/cells9081909.
- Chassaing B., Gewirtz A.T. Identification of inner mucus-associated bacteria by laser capture microdissection. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 7:157-60. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.09.009.
- Hug H., Mohajeri M.H., La Fata G. Toll-Like receptors: regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients*. 2018; 10:203. DOI: 10.3390/nu10020203.
- Tyszko M., Lipińska-Gediga M., Lemańska-Perek A., Kobylińska K., Gozdzik W., Adamik B. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a prognostic marker in critically ill COVID-19 patients. *Pathogens*. 2022; 11(12):1526.
- Hörnrich B.F., Großkopf A.K., Schlagowski S., Tenbusch M., Kleine-Weber H., Neipel F., et al. SARS-CoV-2 and SARS-CoV spike-mediated cell-cell fusion differ in their requirements for receptor expression and proteolytic activation. *J. Virol.* 2021; 95(9):e00002-21. DOI: 10.1128/JVI.00002-21.
- Fedorin M.M., Livzan M.A., Gaus O.V. Features of the course of irritable bowel syndrome in overweight and obese people. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023;(10):48-56. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-48-56. (in Russian)
- Cavezzi A., Menicagli R., Troiani E., Corrao S. COVID-19, Cation dysmetabolism, sialic acid, CD147, ACE2, viroporins, hepcidin and ferroptosis. A possible unifying hypothesis. *F1000Res*. 2022; 11:102. DOI: 10.12688/f1000research.108667.2.
- Hernández-Solis A., Güemes-González A.M., Ruiz-Gómez X., Álvarez-Maldonado P., Castañeda-Casimiro J., Flores-López A. et al. IL-6, IL-10, sFas, granulysin and indicators of intestinal permeability as early biomarkers for a fatal outcome in COVID-19. *Immunobiology*. 2022; 227(6):152288. DOI: 10.1016/j.imbio.2022.152288
- Wang X., Memon A.A., Palmér K., Hebelius A., Sundquist J., Sundquist K. The association of zonulin-related proteins with prevalent and incident inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2022; 22(1):3. DOI: 10.1186/s12876-021-02075-y.
- Aasbrenn M., Lydersen S., Farup P.G. Changes in serum zonulin in individuals with morbid obesity after weightloss interventions: a prospective cohort study. *BMC Endocr. Disord.* 2020; 20(1):108. DOI: 10.1186/s12902-02000594-5.
- Moschen A.R., Adolph T.E., Gerner R.R. et al. Lipocalin-2: a master mediator of intestinal and metabolic inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017; 28(5):388-97. DOI: 10.1016/j.tem.2017.01.003.
- Mao J., Lin E., He L., Yu J., Tan P., Zhou Y. Autophagy and viral infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1209:55-78. DOI: 10.1007/978-981-15-0606-2_5.
- Boroumand-Noughabi S., Khoshnegah Z., Amel Jamehdar S., Ayatol-

- lahi H., Sheikhi M., Rostami M., et al. Deregulation of the expression of beclin1 and light chain 3(LC3), autophagy-related genes, in COVID-19 patients. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 2022; 36:99. DOI: 10.47176/mjiri.36.99.
35. Okuyan H.M., Dogan S., Bal T., Çabalak M. Beclin-1, an autophagy-related protein, is associated with the disease severity of COVID-19. *Life Sci.* 2021; 278:119596. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119596.
36. Mentella M.C., Scaldaferrri F., Pizzoferrato M., Gasbar rini A., Miggiagno G. A.D. Nutrition, IBD and gut microbiota: a review. *Nutrients.* 2020; 12(4):944. DOI: 10.3390/nu12040944.
37. Dumas A., Bernard L., Poquet Y., Lugo-Villarino G., Neyrolles O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol.* 2018; 20(12):e12966. DOI: 10.1111/cmi.12966.
38. Hall A.B., Tolonen A.C., Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat. Rev. Genet.* 2017; 18(11):690-9. DOI: 10.1038/nrg.2017.63.
39. Jaworska K., Konop M., Bielinska K., Hutsch T., Dziekiewicz M., Banaszkiwicz A., et al. Inflammatory bowel disease is associated with increased gut-to-blood penetration of short-chain fatty acids: A new, non-invasive marker of a functional intestinal lesion. *Exp. Physiol.* 2019; 104(8):1226-36. DOI: 10.1113/EP087773.
40. Sarshar M. Scribano D., Ambrosi C., Palamara A.T., Masotti A. Fecal microRNAs as innovative biomarkers of intestinal diseases and effective players in host-microbiome interactions. *Cancers (Basel).* 2020; 12(8):2174. DOI: 10.3390/cancers12082174.
41. Candela M., Guidotti M., Fabbri A. Brigidi P., Franceschi C., Fiorentini C. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit. Rev. Microbiol.* 2011; 37(1):1-14. DOI: 10.3109/1040841X.2010.501760.
42. D'Haens G., Ferrante M., Vermeire S., Baert F., Noman M., Moortgat L. et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2012; 18(12):2218-24. DOI: 10.1002/ibd.22917.
43. Livzan M.A., Dolgikh T.I., Lialukova E.A. Fecal calprotectin in complex diagnostics of intestinal diseases. *Eksperimental'naya I klinicheskaya gastroenterologiya.* 2013; 12:83-6. (in Russian)
44. Adriana D.N., Sugihartono T., Nusi I.A., Setiawan P.B., Purbayu H., Maimunah U. et al. Role of fecal calprotectin as a hypoxic intestinal damage biomarker in COVID-19 patients. *Gut. Pathog.* 2022; 14(1):34. DOI: 10.1186/s13099-022-00507-y.
45. Zerbato V., Di Bella S., Giuffrè M., Jaracz A.W., Gobbo Y., Luppino D. et al. High fecal calprotectin levels are associated with SARS-CoV-2 intestinal shedding in COVID-19 patients: A proof-of-concept study. *World J. Gastroenterol.* 2021; 27(22):3130-7. DOI: 10.3748/wjg.v27.i22.3130.
46. Ricciuto A., Griffiths A.M. Clinical value of fecal calprotectin. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2019; 56(5):307-20. DOI: 10.1080/10408363.2019.1619159.
47. Takashima Y., Shimada T., Yokozawa T. Clinical benefit of measuring both haemoglobin and transferrin concentrations in faeces: demonstration during a large-scale colorectal cancer screening trial in Japan. *Diagnosis.* 2015; 2(1):53-9. DOI: 10.1515/dx-2014-0052.
48. Vanaclocha-Espi M., Ibáñez J., Molina-Barceló A., Valverde-Rojg M.J., Nolasco A., Pérez-Riquelme F., et al. Optimal cut-off value for detecting colorectal cancer with fecal immunochemical tests according to age and sex. *PLoS One.* 2021; 16(7):e0254021. DOI: 10.1371/journal.pone.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Шульга А.С.^{1,2}, Крайнова Н.Н.^{1,2}, Бурцев Д.В.^{1,2}

СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕМОЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия;
²ГАУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр», 344000, г. Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы - определение изменений, происходящих в показателях автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы крови при хранении образцов цельной крови в течение 3 дней при комнатной температуре (25 °С), охлаждении до 4 °С и нагревании до 35 °С. 60 проб цельной крови измеряли в режиме развернутого общего анализа крови с лейкоцитарной формулой в различные временные точки: сразу после взятия крови и через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов. Использовали вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₂EDTA, результаты получены с применением гематологического анализатора UniCel DxH 800 (Beckman Coulter Inc., USA, Miami, FL). Изменения значений параметров относительно исходного уровня для каждой комбинации времени и температуры оценивали с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона.

Среди лейкоцитарных показателей относительное процентное и абсолютное количество нейтрофилов, базофилов и эозинофилов при отсроченном исследовании проб крови имело тенденцию к увеличению, а моноцитов и лимфоцитов – к снижению. При этом чем больше времени прошло от момента забора крови до проведения гемоцитометрии и чем выше была температура хранения, тем значительнее были обнаруженные изменения.

На основании результатов данного исследования можно сделать заключение, что при использовании технологии VCS даже через 12 ч от момента взятия крови результаты автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы могут быть недостоверными, если образец хранился при 25 °С или 4 °С, а при 35 °С отдельные лейкоцитарные параметры нестабильны уже через 6 часов.

Ключевые слова: стабильность образцов; хранение пробирок с цельной кровью; гематологические исследования; гематологические анализаторы

Для цитирования: Шульга А.С., Крайнова Н.Н., Бурцев Д.В. Стабильность гемоцитометрических показателей лейкоцитарной формулы при различных условиях хранения образцов венозной крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 579-591.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-579-591>

Для корреспонденции: Шульга Александр Сергеевич, канд. мед. наук, ассистент каф. персонализированной и трансляционной медицины; e-mail: contrarius@yandex.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2024
Принята к печати 26.09.2024
Опубликовано 25.10.2024

Shulga A.S.^{1,2}, Kraynova N.N.^{1,2}, Burtsev D.V.^{1,2}

STABILITY OF HEMOCYTOMETRIC INDICES OF LEUKOCYTE FORMULA UNDER DIFFERENT STORAGE CONDITIONS OF VENOUS BLOOD SAMPLES

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia;

²State Autonomous Institution of the Rostov Region "Regional Consultative and Diagnostic Center", Rostov-on-Don, Russia

The aim of the work was to determine the changes occurring in the parameters of automated counting of leukocyte blood formula under the condition of storage of whole blood samples for 3 days at room temperature (25 °C), cooling to 4 °C and heating to 35 °C. 60 whole blood tubes were measured in the unfolded total blood count mode with leukocyte formula at different time points: immediately after blood collection and then sequentially after 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h. Vacuum tubes with anticoagulant K₂EDTA were used, and the results were obtained using a UniCel DxH 800 hematology analyzer. Changes in parameter values relative to baseline for each combination of time and temperature were evaluated using the Wilcoxon matched pairs test.

Among the leukocytic parameters, the relative percentage and absolute number of neutrophils, basophils and eosinophils tended to increase, while monocytes and lymphocytes tended to decrease. At the same time, the more time elapsed from the moment of blood collection to hemocytometry and the higher the storage temperature was, the more significant were the changes detected.

Based on the results of this study, it can be concluded that when using VCS technology, even after 12 h from the time of blood collection to the measurement of the total blood count, the automated leukocyte count report may contain an unreliable result if the sample was stored at 25 or 4 °C. When tubes are stored at 35 °C, the stability of individual leukocyte parameters is already lost after 6 h.

Key words: sample stability; storage of whole blood tubes; hematological studies; hematological analyzers

For citation: Shulga A.S., Kraynova N.N., Burtsev D.V. Stability of hemocytometric indices of leukocyte formula under different storage conditions of venous blood samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 579-591 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-579-591>

For correspondence: Shulga Alexander Sergeevich, PhD (medical sciences), assistant of the Department of Personalized and Translational Medicine; e-mail: contrarius@yandex.ru

Information about authors:

Shulga A.S., <https://orcid.org/0009-0003-3202-4875>;

Kraynova N.N., <https://orcid.org/0009-0000-6791-4219>;

Burtsev D.V., <https://orcid.org/0000-0002-4673-7003>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 13.06.2024.

Accepted 26.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Централизованные клинические лаборатории, оснащенные современными автоматическими анализаторами, способны эффективно и своевременно обрабатывать большие объемы поступивших для гемцитометрии образцов. Надежность результатов, выдаваемых гематологическим анализатором, в первую очередь зависит от соблюдения всех процедур как внутреннего, так и внешнего контроля качества исследований, а также своевременного технического обслуживания прибора. С другой стороны, необходимы гарантии соблюдения всех преаналитических требований: сбор образцов надлежащим образом в пробирки с соответствующим антикоагулянтом, безошибочная маркировка пробирок, их хранение и транспортировка согласно установленным правилам, а также анализ образцов в сроки, которые считаются подходящими или рекомендованы производителем. Нередко в централизованные лаборатории поступают образцы, хранившиеся несколько суток от момента забора и зачастую с нарушением температурного режима – т.е. при комнатной температуре и выше. В таких условиях важно установить пределы достоверности результатов при обработке старых образцов на автоматическом анализаторе.

Производители гематологических анализаторов и данные, приводимые в научной литературе, указывают, что образцы крови, хранящиеся при температуре от 3 до 8 °С, обычно дают надежные результаты по большинству параметров при сроке хранения до двух суток [1–4]. Однако известные мнения о пригодности для оценки различных показателей гемограммы тех образцов, которые хранились более 1–2 дней, неоднозначны, в особенности при различных температурных режимах хранения образцов.

Цель настоящего исследования – определить изменения, происходящие в параметрах автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы на гематологическом анализаторе при хранении проб крови в различных температурных режимах.

Материал и методы. Для исследования использовались образцы цельной крови от 20 здоровых амбулаторных пациентов без известных заболеваний. Участник исследования считался здоровым, если человек сам заявлял о своем здоровье и в течение месяца, предшествующего венепункции, не было острых заболеваний, а также сообщал об отсутствии сахарного диабета, почечной недостаточности, повышенного кровяного

давления и не получал антиагрегантную или антикоагулянтную терапию на момент взятия крови.

От каждого пациента были собраны в пробирки с K₂EDTA 3 образца крови объемом по 6 мл, т. е. всего 60 пробирок. В течение 30 минут после сбора трижды выполнялся развернутый общий анализ каждой пробы крови с лейкоцитарной формулой на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA, Miami, FL) со строгим соблюдением инструкции для оператора из руководства по эксплуатации анализатора. Исследовали показатели лейкоцитарной формулы в общем клиническом анализе крови (CBC/Diff): количество лейкоцитов (WBC), относительное количество (%) нейтрофилов (NE%), эозинофилов (EO%), базофилов (BA%), моноцитов (MO%), лимфоцитов (LY%), нормобластов (NRBC/100 лейкоцитов) и абсолютное количество (x10⁹/л) нейтрофилов (NE#), эозинофилов (EO#), базофилов (BA#), моноцитов (MO#), лимфоцитов (LY#) и нормобластов (NRBC#).

Для каждого из этих параметров было рассчитано среднее значение по 9 исходным измерениям; эти средние значения были приняты в качестве исходных (базовых).

После определения исходных значений образцы подлежали хранению: из трех образцов крови, взятых от каждого из 20 доноров, один хранился при комнатной температуре (25 °С), второй — в холодильнике при 4 °С, третий — в термостате при 35 °С. Образцы анализировали после 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов хранения. В каждой из этих временных точек для каждого из 20 образцов на гематологическом анализаторе проводились три измерения параметров CBC/Diff, после чего пробирки продолжали храниться при указанных температурах. По результатам трех измерений рассчитывалось медианное и среднее значение каждого параметра, которое принималось как исходное для данного образца и данных значений времени и температуры хранения.

Нормальность данных оценивалась с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Большинство переменных не имели нормального распределения, поэтому использовались методы непараметрической статистики. Различия между образцами оценивались с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона, *p*-значения менее 0,05 считались статистически значимыми.

Во всех временных точках каждого из режимов хра-

нения образцов были приготовлены микроскопические препараты для качественной оценки морфологических изменений лейкоцитов с применением автоматической системы клеточной визуализации «Vision Nema Pro Cell Imaging Analyzer®» компании West Medica.

Удовлетворительные результаты внутрилабораторного контроля качества в оценке работы геманализатора были получены на протяжении всего исследования. Температура хранения образцов контролировалась и поддерживалась в заданных пределах на протяжении всего эксперимента.

Результаты. В табл. 1–3 представлены медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при трех исследуемых режимах хранения. Для удобства восприятия данные таблиц интерпретированы также на рис. 1 (А–Н).

Независимо от температурного режима хранения образцов через 3 часа отмечались первые статистически значимые различия количества нормобластов, которые с увеличением времени хранения только усиливались. Во временной точке 3 часа, кроме роста содержания нормобластов, других достоверных изменений не отмечалось при всех режимах хранения.

Через 6 часов от момента получения исходных значений в нулевой точке проверка статистической значимости различия показателей с помощью теста совпадающих пар Уилкоксона выявила достоверные изменения как относительного, так и абсолютного содержания базофилов при хранении пробирок в термостате (35 °С); в дальнейшем эти изменения увеличивались.

По истечении 12 часов от начала эксперимента и далее, достоверный рост абсолютной и относительной концентрации базофилов наблюдался при любом режиме хранения образцов. Кроме того, в условиях нагревания образцов в термостате (35 °С) также повышалось относительное содержание эозинофилов и снижалось как относительное, так и абсолютное количество моноцитов.

После 24 часов хранения при комнатной температуре (25 °С) отмечалось снижение относительного содержания моноцитов и увеличение относительного количества эозинофилов и базофилов; в абсолютных значениях наблюдался прирост числа базофилов и снижение количества лимфоцитов. В образцах, подвергшихся охлаждению, регистрировался относительный прирост количества эозинофилов, базофилов и относительное снижение числа лимфоцитов; в абсолютных значениях увеличивалось содержание нейтрофилов и базофилов. В образцах из термостата через 24 ч изменялись все относительные значения исследуемых параметров: снижалось содержание лимфоцитов и моноцитов, увеличивалось количество нейтрофилов, эозинофилов и базофилов, а также снижалось общее количество лейкоцитов; в абсолютном выражении отмечено снижение количества лимфоцитов и моноцитов, продолжающееся увеличение концентрации базофилов.

Через 48 часов хранения пробирок при комнатной температуре и в относительном, и в абсолютном выражении определялось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. В пробах, подвергшихся нагреванию, отмечалось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов и эозинофилов. При этом достоверно снизилось процентное и

абсолютное содержание базофилов. При охлаждении образцов в течение двух суток отмечено снижение относительного содержания лимфоцитов и моноцитов на фоне нарастания количества эозинофилов и базофилов, также увеличивались концентрации нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. Общая концентрация лейкоцитов снизилась в образцах, подвергшихся нагреванию, а при режимах хранения с комнатной температурой или в холодильнике – оставалась неизменной.

Спустя 72 часа от начала исследования при комнатной температуре, равно как и при нагревании, в относительном и в абсолютном выражении определялось снижение количества лимфоцитов и моноцитов, увеличение числа нейтрофилов и эозинофилов. При этом процентное и абсолютное содержание базофилов при нагревании образцов достоверно снижалось, а при хранении в условиях комнатной температуры – повышалось. В результате охлаждения образцов в течение трех суток снижалось относительное содержание лимфоцитов и моноцитов на фоне нарастания количества нейтрофилов, эозинофилов и базофилов, также увеличивались концентрации нейтрофилов, эозинофилов и базофилов на фоне снижения содержания моноцитов. Установлено, что общая концентрация лейкоцитов снизилась в образцах, подвергшихся нагреванию, а при режимах хранения с комнатной температурой или в холодильнике она оставалась неизменной.

Обсуждение. Большинство клеток кроветворной системы имеют короткий срок жизни – менее суток для нейтрофилов и несколько недель или месяцев для моноцитов и лимфоцитов [5]. Но эти сроки приведены для лейкоцитов, находящихся в трех естественных средах их пребывания – костном мозге, крови и тканях. Если учесть известные данные, что сроки гибели лейкоцитов регулируются внешними факторами [6], то продолжительность жизни белых клеток крови сокращается *in vitro* при сборе образцов в пробирки. В результате клеточной дегенерации, имеющей место при старении клеток, происходит потеря отдельных клеточных характеристик, измеряемых анализатором. Вероятно, наблюдаемые в нашем эксперименте изменения в лейкоцитарных параметрах есть следствие утраты одной или нескольких морфологических особенностей клеточных популяций, что приводит к ошибочной идентификации анализатором одного типа клеток вместо другого. Результаты настоящего исследования продемонстрировали нестабильность большинства параметров автоматизированного подсчета лейкоцитарной формулы, выдаваемых гематологическим анализатором DxH 800, начиная с 24 часов хранения образцов вне зависимости от температуры хранения.

Концентрация лейкоцитов не отличалась от базовой для всех временных точек при температуре хранения образцов 25 и 4 °С. Эффект хранения пробирок с кровью при 35 °С сказывался на количестве лейкоцитов спустя 24 ч от момента взятия. Кроме того, в препаратах, приготовленных через 24–48 часов, фиксировалось увеличенное количество неклассифицированных клеток и разрушенных клеток-теней (рис. 10). Это сопровождалось выдачей анализатором системных уведомлений типа «избыток неклеточных элементов» в проточной ячейке («Excessive Debris») и «старый образец» («Aged Sample»). Предыдущие исследования показали, что общее количество лейкоцитов стабильно при 4 °С

в течение 72 ч при измерении на нескольких гематологических анализаторах, но при комнатной температуре наблюдается разница результатов в зависимости от используемого оборудования: Advia 120 со стабильностью до 48 ч, Sysmex XE 2100 со стабильностью до 24 ч и Sysmex XE-5000 со стабильностью до 72 часов [7, 8].

В нашем эксперименте количество полиморфноядерных лейкоцитов — самых многочисленных и самых короткоживущих из всех лейкоцитов — имело тенденцию к неуклонному увеличению при любом режиме хранения образцов. Одновременно с этим относительное и абсолютное содержание мононуклеаров (как моноцитов, так и лимфоцитов) неуклонно снижалось.

Известно, что уже через 30 минут после взятия начинаются морфологические изменения клеток крови, которые усиливаются с увеличением времени и условий хранения крови [9]. После взятия образцов клетки крови начинают испытывать кислородное голодание, что приводит к снижению окислительного фосфорилирования и падению уровня аденозинтрифосфата (АТФ). Снижение АТФ вызывает нарушение работы Na^+ -насоса, что приводит к увеличению поступления Ca^{2+} , H_2O и Na^+ , а также к увеличению эффлюкса K^+ в результате набухания клеток [10, 11]. Снижение АТФ также приводит к активации анаэробного гликолиза, который сопровождается сокращением запасов гликогена, увеличением концентрации молочной кислоты и снижением pH, что способствует кластеризации хроматина. В итоге нарушается морфологическая целостность клеток крови, т.е. изменяется форма клеточных стенок, хроматина, ядра и размер клеток. Изменения в ядре протекают в трех последовательных стадиях и сопровождаются повреждением дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и хроматина. На первом этапе базофильная окраска хроматина выцветает (кариолизис), что, возможно, происходит под действием дезоксирибонуклеазы (ДНКазы). Далее происходит кариопикноз — дегенерация клетки, при которой ядро уменьшается в размере, ДНК превращается в твердую массу, хроматин конденсируется и ядро приобретает насыщенно базофильную окраску. На третьем этапе наблюдается фрагментация ядра — кариорексис.

При микроскопии препаратов крови нами наблюдался ряд характерных дегенеративных повреждений лейкоцитов, которые условно можно разделить на начальные и поздние. К ранним апоптотическим изменениям нейтрофилов относятся набухание ядер с изменениями хроматина, который за счет приобретаемого разряжения и снижения плотности упаковывания в ядре окрашивается более однородно и гомогенно по сравнению с нативными функционально активными ядрами. Микроскопическим подтверждением этого процесса является обнаружение нами аномальных и «псевдомолодых» форм, имитирующих облик миелоцитов и метамиелоцитов (рис. 3), а также появление «псевдопалочкоядерных» нейтрофилов (рис. 2). В данном контексте примечательна работа J.-L. Vives-Corrons соавт. [10], в которой международная группа из 14 экспертов в области лабораторной гематологии микроскопически оценила суммарно 490 мазков крови, исследуя признаки старения лейкоцитов, и определила снижение относительного количества сегментоядерных нейтрофилов в пользу палочкоядерных форм как результат апопто-

тических изменений в нейтрофильном ряду. В нашей работе при микроскопии препаратов крови также наблюдалось перераспределение в пользу увеличения содержания палочкоядерных форм, что было наиболее выражено для термостатируемых образцов. При этом внутренние алгоритмы системы клеточного анализа DxH800 сигнализировали уведомлениями оператору о подозрении на сдвиг лейкоцитарной формулы влево до палочкоядерных форм — «Left Shift», присутствии юных гранулоцитов — «Imm Grans», включая промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты.

Наблюдаемые нами более поздние дегенеративные изменения гранулоцитов включали уменьшение размеров клетки в целом и ядра, конденсацию хроматина в темные пикнотичные массы и потерю сегментированной структуры ядра вплоть до разделения долей (кариорексис; рис. 5). Цитоплазматический ободок плазмолеммы может выглядеть неровным или нечетко очерченным, т.к. плазматическая мембрана становится активной и «взъерошенной» в процессе, называемом зейозом (zeiosis) [6]. В цитоплазме наблюдается вакуолизация и потеря гранул (дегрануляция) (рис. 4, 8). В итоге клетка может разорваться на связанные с мембраной фрагменты, называемые апоптотическими телами, плотно заполненные клеточными органеллами и фрагментами ядра. Таким образом, структуры с провоспалительным содержанием, включая лизосомы и митохондрии, хорошо сохраняются внутри телец, которые фагоцитируются макрофагами [12].

Мононуклеарные клетки подвергались аналогичным морфологическим изменениям, как и нейтрофилы: в них также наблюдались вакуоли и усиленная ядерная лобуляция вплоть до дезинтеграции ядер (рис. 9). J. V. Kennedy и соавт. [9], ранжируя степень вакуолизации в лейкоцитах, установили следующие закономерности: незначительная цитоплазматическая вакуолизация в моноцитах может быть обнаружена через 1 ч, прогрессирующая до умеренной — через 4 ч; вакуолизация в нейтрофильных гранулоцитах появляется через 3–4 ч и прогрессирует до умеренной через 6 часов. Лимфоциты претерпевают аналогичные изменения — такие, как образование цитоплазматических вакуолей, уплотнение и гомогенное окрашивание пикнотичного хроматина, расщепление ядра.

Апоптоз моноцитов и неправильная идентификация анализатором дегенерированных моноцитов как нейтрофилов может объяснить наблюдаемое в нашем эксперименте снижение относительного и абсолютного содержания моноцитов при одновременном увеличении концентрации и процентной доли нейтрофилов.

Некоторые из описанных изменений лейкоцитов имитируют те, что наблюдаются при миелодиспластических синдромах (МДС), и если врач-микроскопист не знает о нарушениях сроков и условий хранения крови, то это может в отдельных случаях стать причиной ошибочных интерпретаций результатов общего анализа крови. Это касается псевдопельгеризации, вакуолизации цитоплазмы, дегрануляции клеток и потери четкости цитоплазматических границ. В связи с этим крайне важно для клинической диагностики гематологических заболеваний с применением микроскопического наблюдения морфологии клеток в мазках периферической крови и, в первую очередь, оценки

диспластических изменений то, чтобы мазки были приготовлены как можно скорее. Авторы «Классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей» Всемирной организации здравоохранения и в издании 2008 года [13], и в редакции 2017 [14] года рекомендуют, чтобы «слайды для оценки дисплазий были сделаны из свежеполученных образцов, образцы же, подвергавшиеся воздействию антикоагулянтов более 2 часов, являются непригодными».

В нашей работе абсолютные и относительные значения эозинофилов имели тенденцию к увеличению с течением времени, при том, чем выше была температура хранения пробирок, тем раньше проявлялся достоверный прирост количества. При оценке концентрации и относительной доли базофилов нами было отмечено во всех трех температурных режимах хранения статистиче-

ски значимое нарастание значений. Однако, начиная со вторых суток хранения образцов в термостате и далее мы наблюдали достоверное снижение числа базофилов как в абсолютном, так и в относительном выражении. Это уменьшение в отчетах гематологического анализатора может свидетельствовать о критическом влиянии высокой температуры, приводящей к дегрануляции базофилов, т.е. к утрате зернистости цитоплазмы (пожалуй, самой характерной морфологической особенности базофилов) и, в конечном итоге, к их лизису (рис. 8).

Концентрация нормобластов достоверно увеличивалась, начиная с 3 часов с момента взятия крови независимо от режима хранения. Среднее медианное значение ядродержащих нормобластов для всех образцов в базовой точке составило 0,11/ 100 лейкоцитов. При этом медианные значения выходили за верхний рефе-

Таблица 1

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 25 °С

Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); p в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
WBC, x10 ⁹ /л	6,4 (5,20-7,10)	6,4 (5,20-7,10) p=0,4343	6,45 (5,25-7,10) p=0,3595	6,20 (5,20-7,00) p=0,3651	6,50 (5,30-6,90) p=0,5280	6,1 (5,05-6,80) p=0,7657	6,3 (5,10-6,90) p=0,7445
NE%	54,34 (51,70-61,07)	54,11 (51,29-60,31) p=0,0725	54,96 (51,56-61,74) p=0,1521	55,09 (51,50-62,06) p=0,5559	55,39 (53,18-63,48) p=0,0754	60,75 (58,14-68,04) p<0,0001	65,70 (63,67-75,95) p<0,0001
LY%	31,51 (23,78-35,14)	31,68 (23,62-35,31) p=0,0911	31,66 (23,87-35,33) p=0,2647	30,67 (23,21-34,78) p=0,3163	30,81 (22,75-33,78) p=0,2271	29,39 (21,54-32,18) p<0,0001	26,51 (18,41-30,08) p<0,0001
MO%	9,54 (7,12-10,91)	9,46 (7,55-10,99) p=0,6210	9,57 (7,41-11,25) p=0,6401	9,46 (7,46-10,42) p=0,4820	8,51 (7,18-10,32) p=0,0077	4,67 (3,53-6,46) p<0,0001	2,63 (2,03-3,54) p<0,0001
EO%	1,74 (1,30-3,19)	1,79 (1,33-3,39) p=0,4686	1,75 (1,30-3,30) p=0,8473	1,82 (1,31-2,84) p=0,3233	2,04 (1,38-3,18) p<0,0001	2,37 (1,69-3,24) p<0,0001	2,59 (1,90-3,69) p<0,0001
BA%	0,68 (0,53-0,89)	0,67 (0,53-0,83) p=0,7840	0,70 (0,55-0,82) p=0,5946	0,96 (0,64-1,14) p<0,0001	0,91 (0,56-1,07) p<0,0001	1,03 (0,68-1,29) p<0,0001	1,01 (0,83-1,18) p<0,0001
NRBC /100 лейкоцитов	0,10 (0,06-0,16)	0,19 (0,14-0,32) p<0,0001	0,28 (0,16-0,46) p<0,0001	0,42 (0,29-0,60) p<0,0001	0,63 (0,27-0,63) p<0,0001	0,70 (0,41-0,99) p<0,0001	0,78 (0,55-1,76) p<0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,46 (2,77-4,34) p=0,7487	3,49 (2,80-4,36) p=0,7515	3,46 (2,85-4,27) p=0,5826	3,49 (2,85-4,38) p=0,4763	3,74 (3,07-4,63) p<0,0001	4,07 (3,31-5,02) p<0,0001
LY#	1,69 (1,52-2,25)	1,66 (1,53-2,29) p=0,0575	1,68 (1,52-2,27) p=0,0778	1,61 (1,52-2,24) p=0,0608	1,59 (1,48-2,17) p<0,0001	1,53 (1,42-1,96) p<0,0001	1,35 (1,24-1,91) p<0,0001
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,55 (0,47-0,64) p=0,5411	0,56 (0,49-0,64) p=0,4944	0,54 (0,49-0,60) p=0,3403	0,50 (0,45-0,58) p=0,2058	0,29 (0,23-0,36) p<0,0001	0,18 (0,11-0,21) p<0,0001
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,10 (0,08-0,26) p=0,3479	0,11 (0,08-0,26) p=0,5960	0,11 (0,08-0,23) p=0,3682	0,13 (0,08-0,26) p=0,1931	0,14 (0,10-0,25) p<0,0001	0,15 (0,11-0,28) p<0,0001
BA#	0,042 (0,03-0,05)	0,043 (0,04-0,05) p=0,9608	0,044 (0,03-0,06) p=0,3901	0,054 (0,04-0,07) p<0,0001	0,060 (0,04-0,07) p<0,0001	0,058 (0,03-0,07) p<0,0001	0,063 (0,05-0,07) p<0,0001
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	0,012 (0,01-0,02) p<0,0001	0,017 (0,01-0,03) p<0,0001	0,025 (0,02-0,04) p<0,0001	0,024 (0,02-0,04) p<0,0001	0,033 (0,02-0,07) p<0,0001	0,052 (0,03-0,12) p<0,0001

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: статистическая значимость изменений p<0,05, тест совпадающих пар Уилкоксона. Полу жирным курсивом выделена статистически значимая разница.

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 4 °С

Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); р в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0ч	3ч	6ч	12ч	24ч	48ч	72ч
WBC, x10 ⁹ /л	6,4 (5,20-7,10)	6,40 (5,30-7,05) <i>p</i> =0,2447	6,40 (5,30-7,20) <i>p</i> =0,0595	6,50 (5,50-7,50) <i>p</i> =0,1827	6,40 (5,50-7,20) <i>p</i> =0,1026	6,60 (5,60-7,40) <i>p</i> =0,0984	6,70 (5,50-7,60) <i>p</i> =0,0647
NE%	54,45 (52,22-62,17)	53,89 (52,00-62,05) <i>p</i> =0,2787	54,22 (52,46-61,32) <i>p</i> =0,7768	54,28 (52,04-61,61) <i>p</i> =0,7825	53,82 (52,13-61,38) <i>p</i> =0,7766	55,03 (52,25-62,98) <i>p</i> =0,4703	59,66 (55,54-70,58) <i>p</i> <0,0001
LY%	32,06 (24,20-34,73)	31,17 (24,22-34,27) <i>p</i> =0,0788	31,75 (23,72-33,96) <i>p</i> =0,0519	31,43 (23,94-34,05) <i>p</i> =0,0622	30,90 (23,54-33,79) <i>p</i> <0,0001	31,06 (22,8-34,06) <i>p</i> =0,0052	28,94 (21,29-32,8) <i>p</i> <0,0001
MO%	9,85 (7,59-10,76)	9,58 (7,90-10,97) <i>p</i> =0,4054	9,99 (7,36-10,91) <i>p</i> =0,6114	9,28 (7,31-11,17) <i>p</i> =0,9120	9,32 (7,60-11,24) <i>p</i> =0,5986	7,8 (6,31-10,98) <i>p</i> =0,0004	6,15 (4,75-8,8) <i>p</i> <0,0001
EO%	1,66 (1,45-3,12)	1,86 (1,32-3,26) <i>p</i> =0,3096	1,65 (1,37-3,40) <i>p</i> =0,4982	1,87 (1,42-3,42) <i>p</i> =0,5608	1,99 (1,58-3,36) <i>p</i> <0,0001	2,25 (1,72-4,15) <i>p</i> <0,0001	2,59 (1,97-3,70) <i>p</i> <0,0001
BA%	0,68 (0,54-0,86)	0,73 (0,57-0,89) <i>p</i> =0,2423	0,88 (0,63-1,19) <i>p</i> =0,7742	1,10 (0,84-1,34) <i>p</i> =0,0010	1,04 (0,82-1,31) <i>p</i> <0,0001	1,10 (0,82-1,51) <i>p</i> <0,0001	1,19 (0,96-1,41) <i>p</i> <0,0001
NRBC/100 лейкоцитов	0,11 (0,06-0,16)	0,26 (0,14-0,37) <i>p</i> <0,0001	0,33 (0,20-0,54) <i>p</i> <0,0001	0,47 (0,34-0,67) <i>p</i> <0,0001	0,69 (0,39-1,11) <i>p</i> <0,0001	0,92 (0,63-1,54) <i>p</i> <0,0001	1,47 (0,61-2,16) <i>p</i> <0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,54 (2,81-4,49) <i>p</i> =0,0918	3,61 (2,84-4,48) <i>p</i> =0,0620	3,60 (2,87-4,53) <i>p</i> =0,0642	3,66 (2,86-4,63) <i>p</i> =0,0154	3,63 (2,88-4,61) <i>p</i> =0,0251	4,03 (3,09-4,88) <i>p</i> =0,0070
LY#	1,69 (1,48-2,25)	1,68 (1,46-2,24) <i>p</i> =0,3996	1,71 (1,47-2,26) <i>p</i> =0,5986	1,70 (1,51-2,23) <i>p</i> =0,6283	1,69 (1,52-2,19) <i>p</i> =0,6901	1,73 (1,52-2,27) <i>p</i> =0,0570	1,63 (1,46-2,13) <i>p</i> =0,1221
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,57 (0,49-0,65) <i>p</i> =0,5123	0,55 (0,50-0,65) <i>p</i> =0,7487	0,57 (0,51-0,65) <i>p</i> =0,2054	0,59 (0,47-0,66) <i>p</i> =0,2087	0,52 (0,40-0,66) <i>p</i> =0,2964	0,43 (0,33-0,60) <i>p</i> <0,0001
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,11 (0,08-0,27) <i>p</i> =0,7567	0,11 (0,07-0,27) <i>p</i> =0,8556	0,11 (0,08-0,28) <i>p</i> =0,2906	0,12 (0,09-0,30) <i>p</i> =0,0985	0,14 (0,10-0,30) <i>p</i> =0,0067	0,16 (0,12-0,31) <i>p</i> <0,0001
BA#	0,045 (0,03-0,05)	0,042 (0,03-0,07) <i>p</i> =0,0568	0,053 (0,04-0,07) <i>p</i> =0,4912	0,067 (0,04-0,10) <i>p</i> =0,0132	0,067 (0,05-0,08) <i>p</i> =0,0006	0,069 (0,05-0,09) <i>p</i> <0,0001	0,078 (0,06-0,10) <i>p</i> <0,0001
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	0,015 (0,01-0,02) <i>p</i> <0,0001	0,018 (0,01-0,03) <i>p</i> <0,0001	0,030 (0,02-0,04) <i>p</i> <0,0001	0,043 (0,02-0,07) <i>p</i> <0,0001	0,056 (0,04-0,10) <i>p</i> <0,0001	0,068 (0,04-0,12) <i>p</i> <0,0001

ренный предел в 0,6/ 100 лейкоцитов, используемый в нашей лаборатории, через сутки от момента взятия крови. Увеличение абсолютных и относительных значений нормобластов можно связать с ошибочной идентификацией анализатором апоптотически измененных лейкоцитов. На рис. 6 можно заметить морфологическое сходство дегенерировавших лейкоцитов с характеристиками истинных оксифильных нормобластов, изображенных на рис. 7: размер немногим больше эритроцита, эксцентрично расположенное небольшое пикнотичное ядро, эозинофилия цитоплазмы. Пожалуй, единственный признак, свидетельствующий в пользу нейтрофильного происхождения клеток на рис. 6 – это цитозольная азурофильная зернистость. С учетом того, что дегрануляция является одним из основных

апоптотических процессов, то, вероятно, со временем формируется пул таких дегенерировавших лейкоцитов, утративших цитоплазматические гранулы и, тем более становящихся похожими на нормобласты.

В научных работах, посвященных исследованию стабильности клеток крови при хранении, нам было интересно в первую очередь сравнить результаты нашей работы с выводами исследований, проведенных на том же оборудовании, или же на гематологическом анализаторе фирмы Beckman Coulter, отличном от нашей модели. Полученные нами результаты отчасти согласуются с исследованием В. Oztas и соавт. [15], в котором 30 образцов крови с ЭДТА инкубировались при комнатной температуре 25 °С и в интервалы 2, 4, 8 и 24 ч выполнялось измерение на приборе Beckman Coulter Unicel DxH 800.

Таблица 3

Медианные значения и статистическая значимость изменений параметров лейкоцитарной формулы при температуре хранения 35 °С

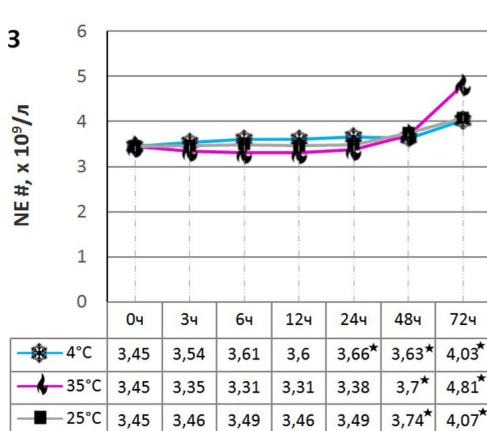
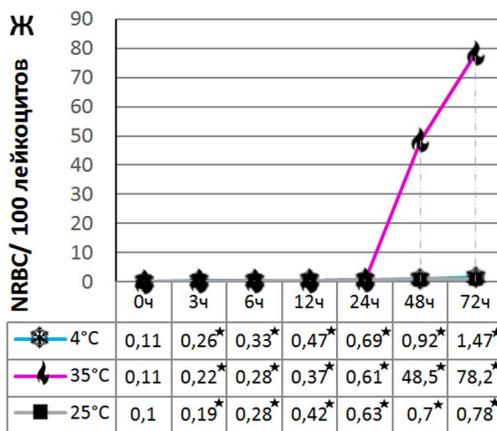
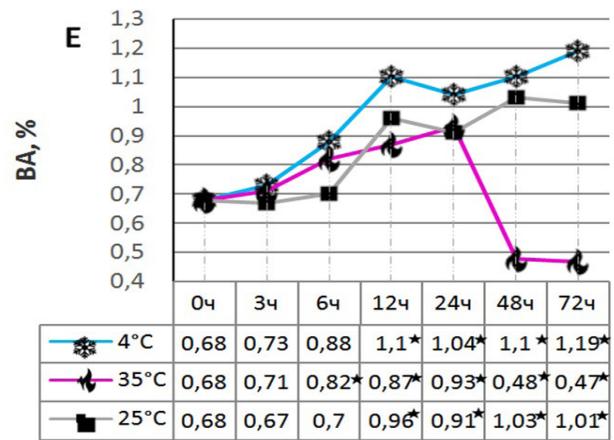
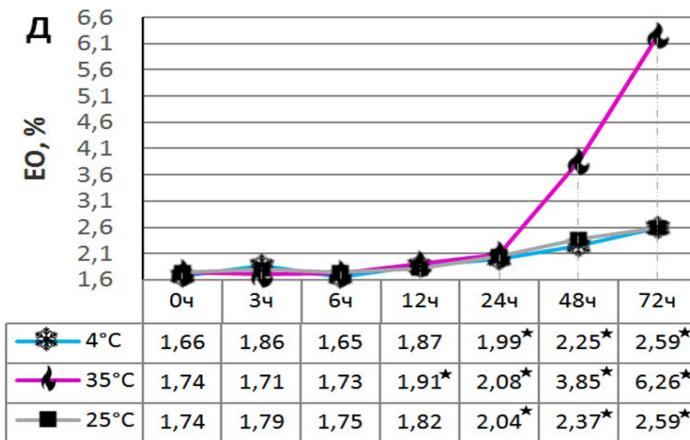
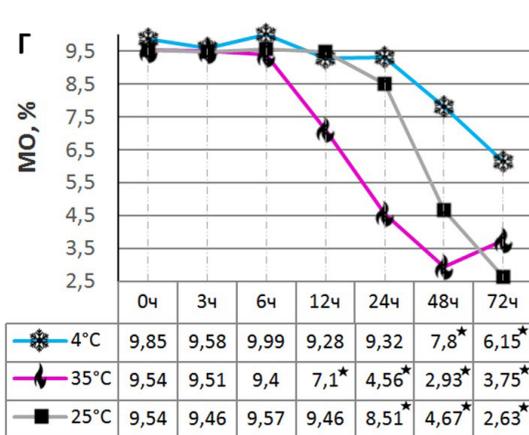
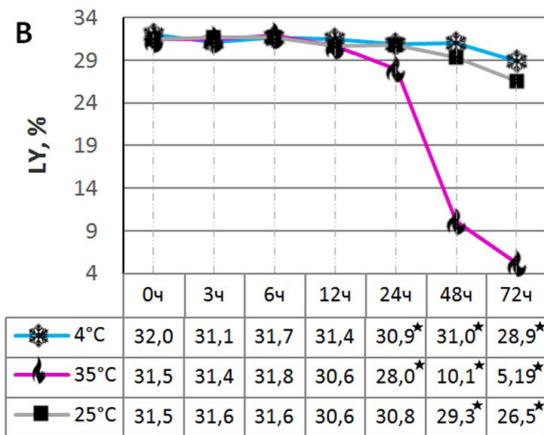
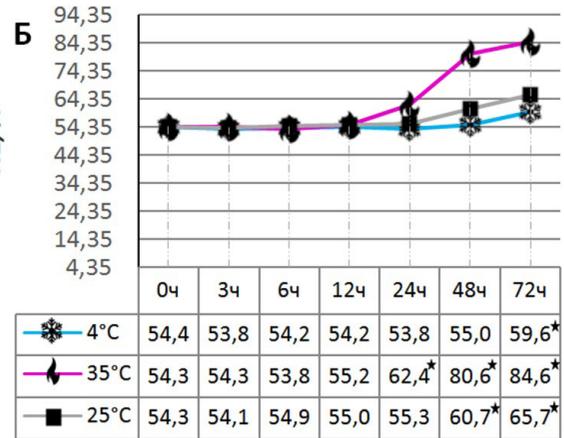
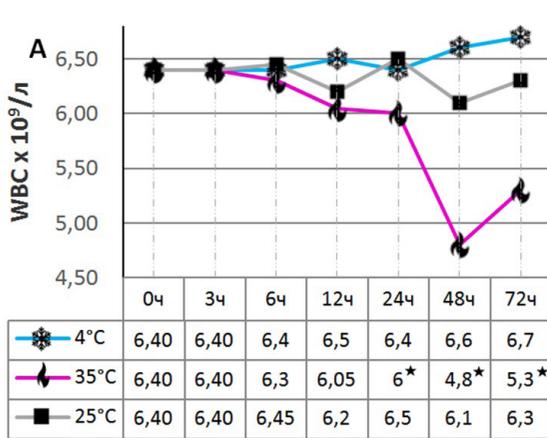
Показатель	Медиана; (межквартильный интервал); p в сравнении с исходным образцом (0 ч):						
	0 ч	3 ч	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
WBC, x10 ⁹ /л	6,4 (5,20-7,10)	6,4 (5,10-6,90) p=0,7568	6,30 (5,10-6,80) p=0,8385	6,05 (4,90-6,70) p=0,1262	6,00 (4,80-6,60) p=0,0355	4,80 (4,40-6,30) p=0,0002	5,30 (4,80-6,40) p=0,0308
NE%	54,34 (51,70-61,07)	54,35 (52,05-60,98) p=0,9232	53,88 (52,01-60,63) p=0,4748	55,26 (52,23-62,75) p=0,8800	62,40 (59,46-70,45) p<0,0001	80,61 (75,22-83,93) p<0,0001	84,69 (54,86-89,75) p<0,0001
LY%	31,51 (23,78-35,14)	31,48 (23,57-34,85) p=0,2761	31,88 (24,64-35,20) p=0,4417	30,68 (24,45-35,72) p=0,1221	28,06 (21,32-31,30) p=0,0072	10,14 (6,61-15,63) p<0,0001	5,19 (3,27-14,86) p<0,0001
MO%	9,54 (7,12-10,91)	9,51 (7,61-10,91) p=0,4243	9,40 (7,40-10,91) p=0,3479	7,10 (5,85-9,41) p<0,0001	4,56 (2,97-5,95) p<0,0001	2,93 (2,28-4,56) p<0,0001	3,75 (0,94-9,87) p<0,0001
EO%	1,74 (1,30-3,19)	1,71 (1,18-2,88) p=0,7533	1,73 (1,30-3,49) p=0,9325	1,91 (1,40-3,19) p=0,0002	2,08 (1,59-3,25) p<0,0001	3,85 (2,50-6,77) p<0,0001	6,26 (2,48-10,24) p<0,0001
BA%	0,68 (0,53-0,89)	0,71 (0,58-0,85) p=0,3106	0,82 (0,61-1,11) p<0,0001	0,87 (0,69-1,21) p<0,0001	0,93 (0,68-1,46) p<0,0001	0,48 (0,34-0,87) p=0,0005	0,47 (0,25-0,64) p=0,0216
NRBC/100 лейкоцитов	0,11 (0,06-0,16)	0,22 (0,15-0,31) p<0,0001	0,28 (0,20-0,40) p<0,0001	0,37 (0,26-0,57) p<0,0001	0,61 (0,41-2,16) p<0,0001	48,57 (31,24-63,09) p<0,0001	78,25 (50,0-175,1) p<0,0001
NE#	3,45 (2,81-4,43)	3,35 (2,78-4,34) p=0,8373	3,31 (2,72-4,25) p=0,9914	3,31 (2,59-4,23) p=0,7293	3,38 (2,89-4,55) p=0,0506	3,70 (3,19-5,17) p=0,0094	4,81 (1,95-5,52) p<0,0001
LY#	1,69 (1,52-2,25)	1,68 (1,47-2,28) p=0,7918	1,68 (1,50-2,19) p=0,7601	1,66 (1,48-2,09) p=0,6863	1,39 (1,21-1,80) p=0,0028	0,49 (0,36-0,74) p<0,0001	0,38 (0,21-0,84) p<0,0001
MO#	0,55 (0,49-0,63)	0,57 (0,48-0,64) p=0,6825	0,54 (0,46-0,62) p=0,3454	0,42 (0,34-0,51) p<0,0001	0,23 (0,17-0,33) p<0,0001	0,18 (0,12-0,24) p<0,0001	0,21 (0,06-0,57) p=0,0003
EO#	0,11 (0,07-0,25)	0,10 (0,07-0,23) p=0,8128	0,10 (0,08-0,24) p=0,8971	0,11 (0,08-0,25) p=0,9278	0,11 (0,08-0,23) p=0,6402	0,22 (0,14-0,38) p<0,0001	0,44 (0,16-0,84) p<0,0001
BA#	0,041 (0,03-0,05)	0,044 (0,04-0,05) p=0,3832	0,052 (0,04-0,06) p=0,0002	0,057 (0,04-0,07) p=0,0001	0,058 (0,04-0,09) p=0,0001	0,027 (0,02-0,04) p=0,0047	0,031 (0,02-0,05) p=0,0400
NRBC#	0,007 (0,004-0,01)	0,013 (0,01-0,02) p<0,0001	0,015 (0,01-0,03) p<0,0001	0,023 (0,01-0,04) p<0,0001	0,036 (0,02-0,12) p<0,0001	2,296 (1,63-3,08) p<0,0001	4,401 (2,38-10,12) p<0,0001

В этой работе также отмечался прирост концентрации нейтрофилов и значительное нарастание количества базофилов. Однако содержание лимфоцитов и моноцитов — в противоположность нашим данным — увеличивалось, а содержание эозинофилов оставалось стабильным на протяжении всего эксперимента.

G.L. Gulati и соавт. [16] также исследовали стабильность 40 образцов крови с ЭДТА в течение одной недели при комнатной температуре с использованием Beckman Coulter GenS. Они обнаружили, что согласуется с нашими выводами, увеличение количества нейтрофилов и эозинофилов, прогрессивное снижение числа моноцитов. Однако они не наблюдали такого же увеличения содержания базофилов, которые оставались без статистически значимых сдвигов, и концентрация лимфоци-

тов в их работе возрастала.

Еще раньше В.А. Warner и D.M. Reardon [17] проанализировали 25 образцов крови здоровых людей, используя анализатор Beckman Coulter STKS, который наряду с Beckman Coulter GenS и DxH 800 использует технологию VCS, т.е. комбинацию измерений импеданса/объема, проводимости и светорассеяния для дифференциального подсчета лейкоцитов. В отличие от обнаруженного нами увеличения числа нейтрофилов, эозинофилов и снижения содержания лимфоцитов, В.А. Warner и D.M. Reardon, используя Beckman Coulter STKS, напротив, отметили статистически значимые снижение числа нейтрофилов и эозинофилов, прирост лимфоцитов. В этой работе также, как и в наших исследованиях, были зафиксированы увеличение количества



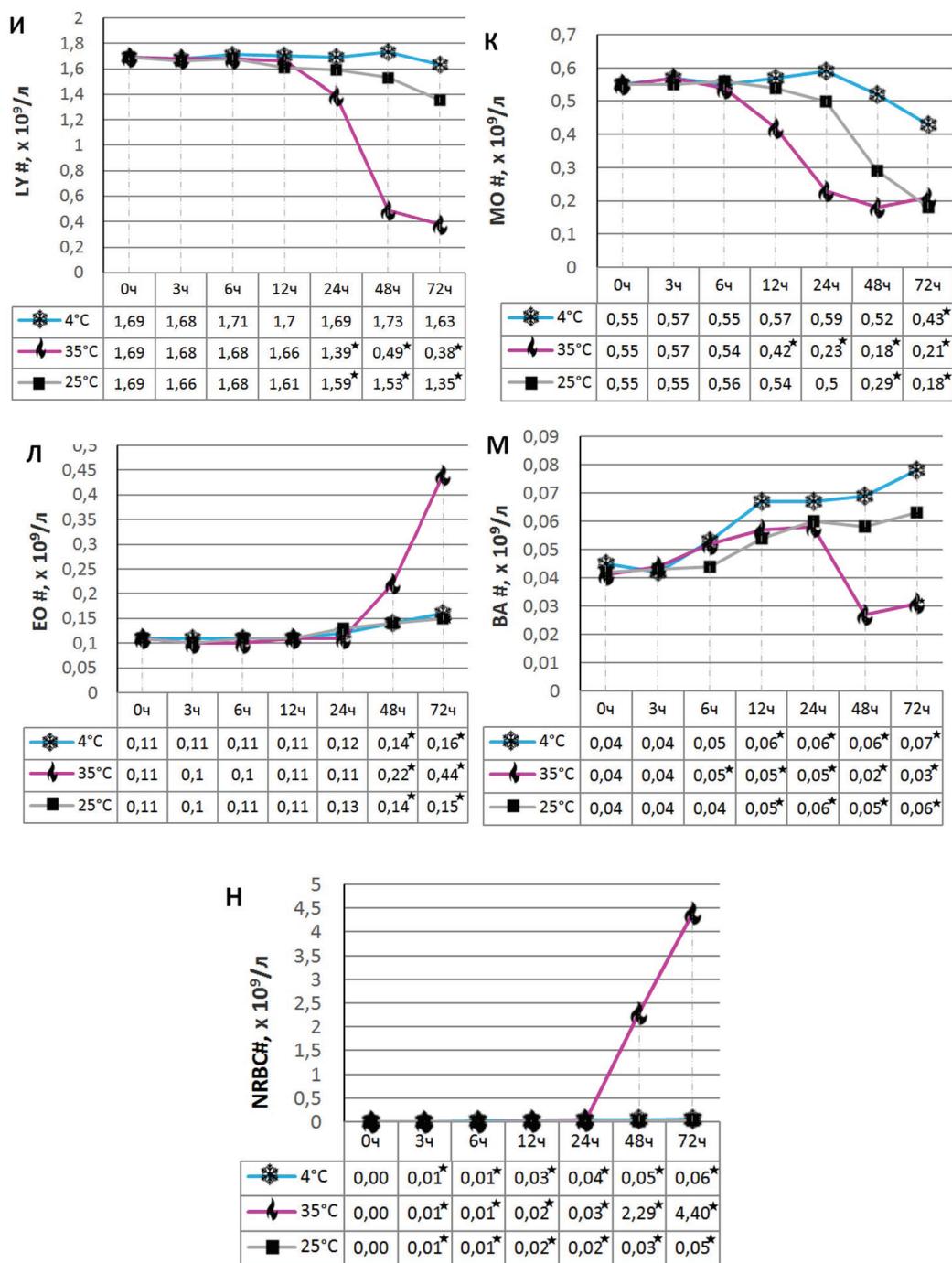


Рис. 1. Сравнение медианных значений лейкоцитарных показателей между исходным образцом (0 ч) и образцами, хранившимися 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа при различных режимах: комнатная температура 25 °С (серая кривая), нагревание до 35 °С (красная кривая) и охлаждение до температуры 4 °С (синяя кривая).

★ — статистически значимая разница, $p < 0,05$ (тест совпадающих пар Уилкоксона).

базофилов и снижение содержания моноцитов с течением времени.

Исследования, проведенные с использованием линейки приборов фирмы Sysmex, частично подтверждают выводы из нашего эксперимента. Изменения, наблюдавшиеся нами в количественных и качественных характеристиках нейтрофилов и моноцитов согласуются с теми, о которых сообщали E. Monica de Vasca и соавт. [18], используя Sysmex ХЕ-2100 с выдержкой

образцов в течение 4 дней при комнатной температуре. Однако концентрация и относительное количество лимфоцитов в этой работе оставались без статистически значимых изменений. Содержание эозинофилов, базофилов, относительное и абсолютное число нормобластов показали наименьшую степень изменения в течение всего периода исследования.

Сходные с нашими выводами результаты получены в работе A. Joshi и соавт. [7], проведенной на анализа-

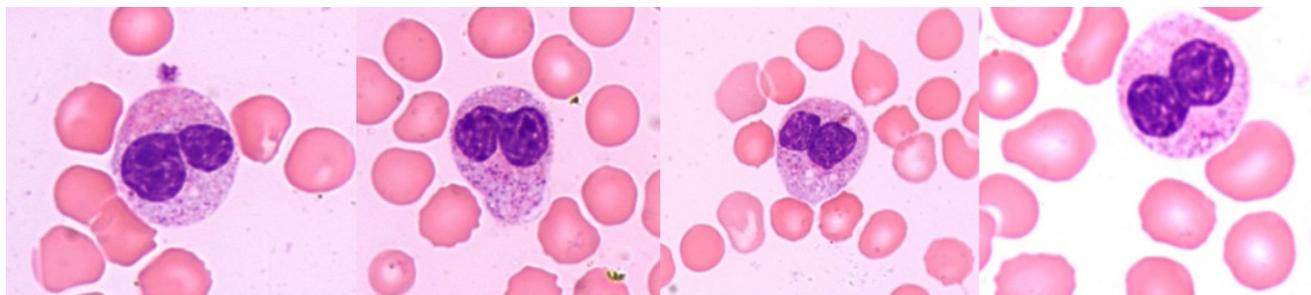


Рис. 2. «Псевдопельгеризация» нейтрофилов.
Здесь и на рис. 3-10: окраска по Романовскому – Гимзе. Ув. x1000.

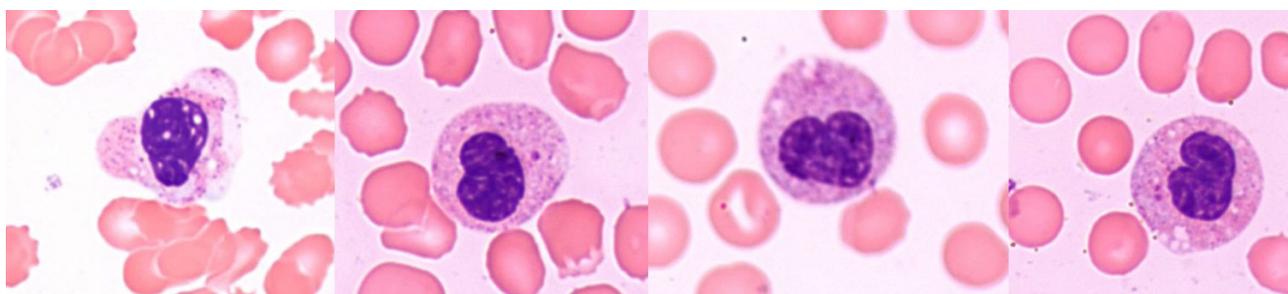


Рис. 3. «Псевдомолодые» формы нейтрофилов.

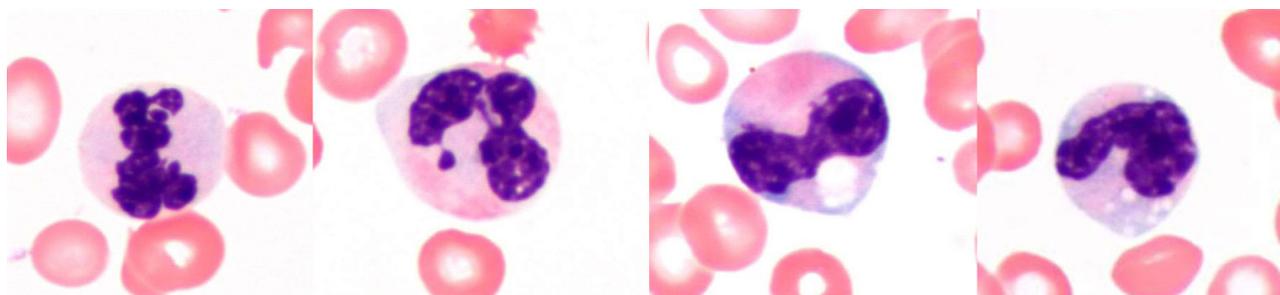


Рис. 4. Дегрануляция и вакуолизация нейтрофилов.

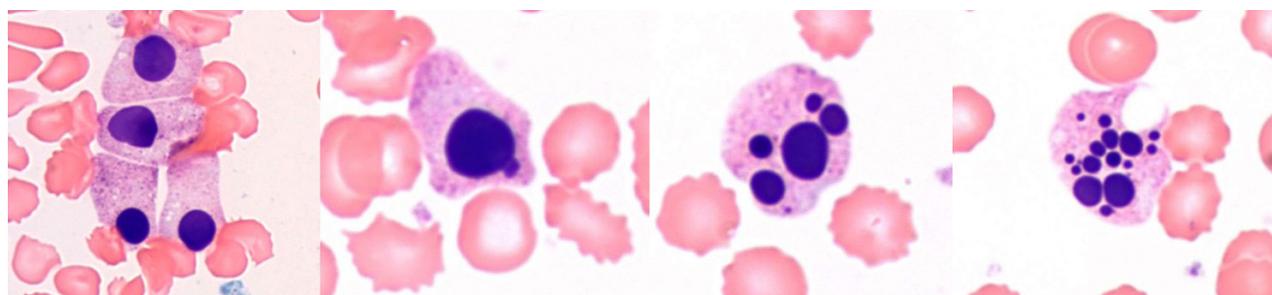


Рис. 5. Кариопикноз и кариорексис нейтрофилов.

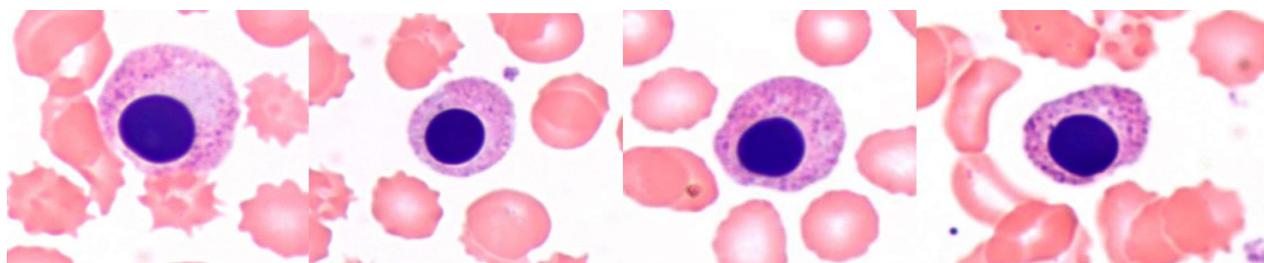


Рис. 6. NRBC-подобные клетки нейтрофильного происхождения. Заметны остатки нейтрофильной цитоплазматической гранулярности.

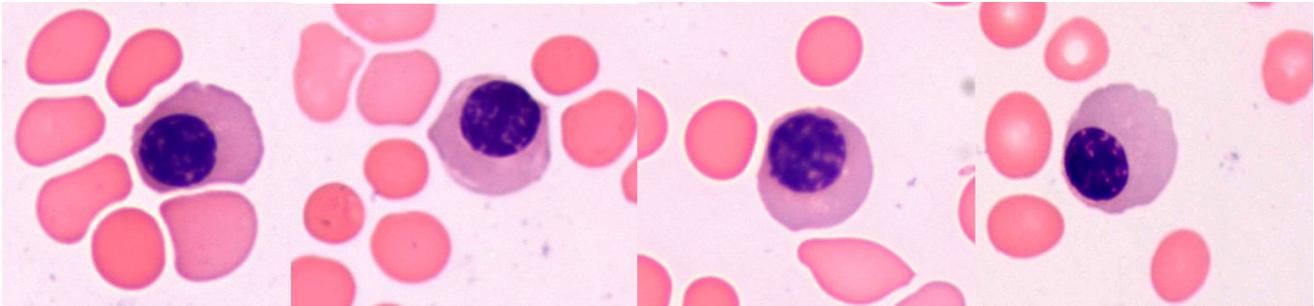


Рис. 7. Оксифильные нормобласты.

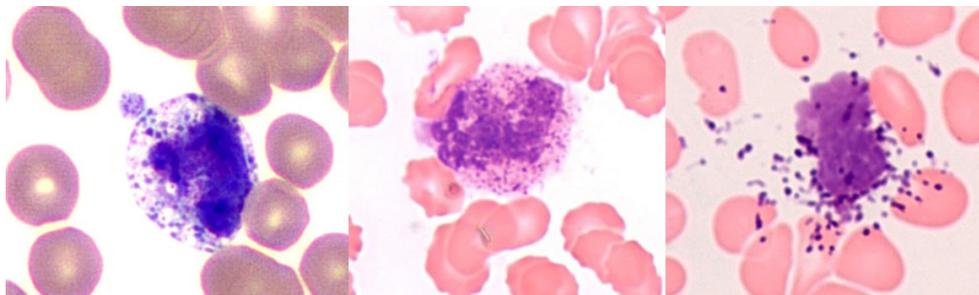


Рис. 8. Дегенерация базофилов: дегрануляция, разрушение плазмолеммы, цитоллиз.

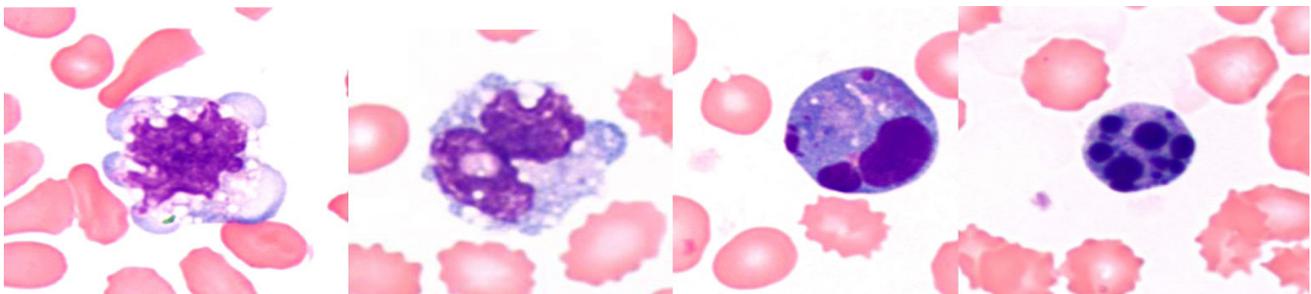


Рис. 9. Разные стадии дегенеративных изменений моноцитов: вакуолизация, усиленная ядерная лобуляция, дезинтеграции ядер, кариопикноз и кариорексис.

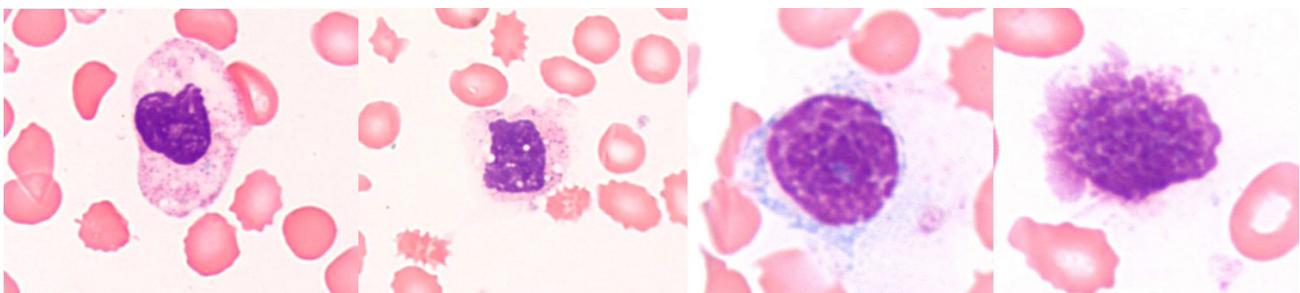


Рис. 10. Неклассифицированные клетки и клетки-тени.

торе SYSMEX XE-5000. Данные автоматизированных дифференциальных лейкоцитарных параметров были стабильными до 72 ч в условиях хранения образцов при 4 °С в холодильнике, тогда как стабильность лейкоцитарных показателей при комнатной температуре хранения (25 °С) до 72 ч была приемлемой только для эозинофилов и базофилов. После 24 часов выдержки образцов при 25 °С А. Joshi и соавт. наблюдали прогрессивное снижение количества моноцитов и лимфо-

цитов, на фоне чего содержание нейтрофилов неуклонно росло. Количество ядросодержащих эритроцитов (NRBC) оставалось стабильным с течением времени вне зависимости от условий хранения.

D. Gunawardena и соавт. [19], используя Sysmex XS-500i, определили, что при температуре 23 ± 2 °С количество нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов оставалось стабильным вплоть до окончания эксперимента (48 часов). Было показано снижение количества

моноцитов, которое не было статистически значимым ($p > 0,05$). Статистически значимое увеличение было обнаружено лишь в количестве базофилов после 24 ч хранения в условиях комнатной температуры. При температуре хранения 32 ± 2 °C достоверное снижение количества моноцитов и увеличение эозинофилов начались через 24 ч хранения, тогда как содержание базофилов возросло через 6 часов.

S. Vuolo и соавт. [20] исследовали 10 нормальных и 40 аномальных образцов крови с выполнением измерений на Sysmex XN-9000 через 2, 4, 6, 8, 24, 36 и 48 часов, храня пробирки при комнатной температуре (25 °C) и при 4 °C. Они обнаружили, что исходные значения количества лейкоцитов и параметры лейкоцитарной формулы не демонстрировали статистически значимых изменений в течение всего периода исследования в подгруппе нормальных образцов. В группе аномальных образцов статистический анализ выявил значимое увеличение содержания эозинофилов после 8 ч хранения при 4 °C.

При анализе научной литературы были приняты во внимание несколько исследований, в которых применялись приборы Cell-Dyn корпорации Abbott Diagnostics. В работе O.S. Unali и соавт. [2] с использованием Cell-Dyn 3700 указывается, что количество нейтрофилов и эозинофилов уменьшилось, а содержание лимфоцитов и базофилов увеличилось после 12 ч хранения при 23 °C. При этом концентрация в крови лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов была стабильна в течение 48 часов, если образцы крови хранились при 4 °C или 10 °C.

Ранее В.L. Wood и соавт. [21], используя Cell-Dyn 3500, также отметили снижение количества нейтрофилов и увеличение лимфоцитов и базофилов через 24 ч хранения при комнатной температуре.

Довольно высокие результаты стабильности показателей лейкоцитарной формулы получены в другой работе при использовании анализатора BC-6800 фирмы Mindray. Авторами установлено, что при хранении образцов в условиях комнатной температуры (25 °C) статистически значимые изменения регистрировались лишь для количества эозинофилов через 8 ч и концентрации моноцитов в 48-часовой временной точке [20].

Как видно, при сравнении результатов, приведенных в указанных выше статьях, обнаруживаются многочисленные расхождения. Это может объясняться различиями в используемых технологиях гемцитометрии, размере выборки и/или типе выборки – (собирались нормальные и/или патологические образцы), а также отличиями преаналитических процедур в разных исследованиях. В анализаторах Mindray BC-6800 и Sysmex XN-2000 используются флуоресценция и светорассеяние, а в анализаторе Beckman Coulter LH750 – импеданс, электропроводность и светорассеяние. Аналогично O. Cierpela и соавт. [22] показали, что результаты подсчета лейкоцитов плохо согласуются между тремя гематологическими анализаторами: Mindray BC-6800, Sysmex XN-2000 и Beckman Coulter LH750. Также в этой работе подсчет моноцитов не показал удовлетворительного согласия между тремя исследованными анализаторами, а корреляция между гемцитометрами по количеству базофилов была низкой. Исходя из этого, напрашивается вывод о том, что образцы

от одного пациента в динамике должны анализироваться в одной и той же лаборатории с измерением на том же оборудовании.

Заключение. На основании полученных результатов гемограммы и, в частности, дифференцировки анализатором лейкоцитов на популяции, врачом-лаборантом принимается решение о проведении ручного микроскопического анализа периферической крови. Таким образом, информация, полученная с гематологического анализатора, не должна оставлять сомнений, поскольку ручная проверка полученного результата трудоемка и занимает много времени.

Поэтому задача современных гематологических лабораторий состоит в том, чтобы оптимизировать отбор образцов, для которых необходим дальнейший микроскопический анализ мазка, причем количество ложноположительных результатов должно быть минимальным.

Следует подчеркнуть, что получение образцов «с истекшим сроком хранения» встречается относительно часто в практике централизованной лаборатории, что может показывать ненадежные результаты, которые зачастую не отражают фактического состояния здоровья человека и могут поставить под сомнение клинические решения.

На основании результатов данного исследования можно сделать заключение, что при использовании технологии VCS даже через 12 ч образец может дать недостоверный результат дифференциального анализа лейкоцитов, если образец хранился при 25 °C или 4 °C. В условиях хранения пробирок при 35 °C стабильность отдельных параметров теряется уже через 6 часов.

Информация о стандартизации сбора, хранения и передачи образцов крови в лабораторию для гематологических исследований была опубликована ICSH еще в 2002 году [23]. В ней говорится, что поскольку морфологические изменения клеток в образцах крови с антикоагуляцией начинаются в течение 30 мин после взятия, то анализы должны быть выполнены в течение максимум 4-х часов, если кровь хранится при комнатной температуре (18-25 °C), и в течение 6 ч, если образец хранится при 4 °C. В данной работе мы подкрепляем эти рекомендации экспериментальными исследованиями влияния продолжительности хранения крови на показатели, и полученные нами результаты являются аргументом в пользу установления ограничений, необходимых для транспортировки образцов крови.

Из результатов нашего исследования вытекает ряд практических советов для лабораторий, использующих гематологические анализаторы с технологией VCS для дифференциального анализа лейкоцитов:

- на этапе приема и регистрации пробирок сотрудники лаборатории могут принять решение о выбраковке отдельных «старых» образцов;
- для образцов, взятых более 24 часов, которые не маркируются флагом с анализатора «Aged sample», в отчете по результатам ОАК с лейкоцитарной формулой можно сообщать только значения стабильных параметров. В этом случае вместо результатов нестабильных параметров может быть помещен комментарий типа «образец хранился __ часов/дней, результаты __ тестов могут быть недостоверны» или «не удалось получить достоверные результаты по __ параметрам/тестам из-за того, что забор образца был __ часов/дней назад»;
- для образцов, которые флагируются сигнальным

сообщением с анализатора «Aged sample» целесообразно выдавать результат только клинического анализа крови «СВС» без лейкоцитарной формулы. Исходя из результатов данного эксперимента и опыта нашей лаборатории, во всех подобных образцах при микроскопии определяется разрушение и дегенерация подавляющего числа лейкоцитов. При неопытности врача обнаружение «псевдомолодых» апоптотически измененных лейкоцитов и псевдопельгеризация гранулоцитов при микроскопии могут быть расценены как сдвиг лейкоцитарной формулы влево до палочкоядерных или более молодых форм;

- взятие образцов крови от гематологических пациентов необходимо осуществлять в пункте забора медицинской организации, в лаборатории которой и будет выполняться общий анализ крови. Должны быть исключены хранение и транспортировка в централизованную лабораторию таких проб. В первую очередь, это касается пациентов с подозрением на МДС;

- так, как наши результаты доказывают, что хранение крови при 4 °С продлевают стабильность образца для всех показателей лейкоцитарной формулы, то необходимо использовать системы охлаждения при транспортировке пробирок, в особенности из отдаленных мест и, тем более, в летний сезон;

- в продолжение данного эксперимента возможно формулирование и исследование новых количественных коэффициентов, отражающих возраст образцов и, соответственно, достоверность результатов ОАК;

- для настоящего исследования мы отбирали только здоровых пациентов. В патологических образцах, вероятно, разрушение клеток наступает раньше и выражено в большей степени, что является предметом дальнейшего научного поиска.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Doelman M.J., Esseveld A., Huisman A., de Roock S., Tiel Groenestege W.M. Stability and comparison of complete blood count parameters between capillary and venous blood samples. *International journal of laboratory hematology* [Internet]. 2023 May 2; 45(5):659–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.14080>.
- Unalli O., Ozarda Y. Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer. *Journal of medical biochemistry* [Internet]. 2021; 40(3):252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.5937/jomb0-27945>.
- Kadam P., Patil N., Mane V.P. Study of refrigerated storage of blood at 4°C on automated hematological parameters and morphological changes in peripheral blood smear: A prospective study. *Indian journal of pathology and oncology* [internet]. 2023 Mar 15; 10(1):9–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.18231/j.ijpo.2023.003>.
- Kayadibi H., Acar I.A., Cam S. Stability of complete blood count parameters depends on the storage temperature, storage time, transport position and selected stability criterion. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* [internet]. 2020 Jun 28; 80(6):470–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00365513.2020.1783570>.
- Tak T., Tesselaar K., Pillay J., Borghans J.A., Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology* [internet]. 2013 Oct 1; 94(4):595–601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1112571>.
- Squier M.K., Sehnert A.J., Cohen J.J. Apoptosis in leukocytes. *Journal of leukocyte biology* [internet]. 1995 Jan 1; 57(1):2–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.57.1.2>.
- Joshi A., McVicker W., Segalla R., Favaloro E., Luu V., Vanniasinkam T. Determining the stability of complete blood count parameters in stored blood samples using the SYSMEX XE5000 automated haematology analyser. *International journal of laboratory hematology* [internet]. 2015 Jun 6; 37(5):705–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12389>.
- Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbeitsleitner C., Zerlauth M., Risch G.M. et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica chimica acta* [internet]. 2008 Nov; 397(1–2):68–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.07.018>.
- Kennedy J.B., Machara K.T., Baker A.M. Cell and platelet stability in disodium and tripotassium EDTA. *American Journal of Medical Technology*. 1981 Feb; 47(2):89–93. PMID: 6784575.
- Vives Corrons J., Briggs C., Simon Lopez R., Albareda S., de la Salle B., Flegar Meatrii Z. et al. Effect of EDTA anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *International journal of laboratory hematology* [internet]. 2013 Dec 12; 36(2):222–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12170>.
- Lestari A.A., Karyana I.P., Wande I.N. Difference in sodium and potassium reading by blood gas analyzer and electrolyte analyzer at Sanglah Hospital Denpasar, Bali, Indonesia. *Journal of global pharmaceutical technology*. 2018; 10(7):44–48.
- Saraste A. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* [internet]. 2000 Feb; 45(3):528–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3).
- WHO classification: tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues (2008). *Postgraduate haematology* [internet]. 2015 Nov 6; 885–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118853771.ch51>.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Thiele J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). *IARC, Lyon: International agency for research on cancer*, 2017. 585 c.
- Oztas B. Leukocyte stability in hemogram samples waiting at room temperature. *International journal of medical biochemistry* [internet]. 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.14744/ijmb.2020.14622>.
- Gulati G.L., Hyland L.J., Kocher W., Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Archives of pathology and laboratory medicine* [internet]. 2002 Mar 1; 126(3):336–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/2002-126-0336-ciabc>.
- Warner B.A., Reardon D.M. A Field Evaluation of the Coulter STKS®. *American journal of clinical pathology* [internet]. 1991 Feb 1;95(2):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/95.2.207>.
- Baca M.E. de, Gulati G., Kocher W., Schwarting R. Effects of storage of blood at room temperature on hematologic parameters measured on Sysmex XE-2100. *Laboratory medicine* [internet]. 2006 Jan 1; 37(1):28–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1309/1eer-k1m0-2qfj-rx6p>.
- Gunawardena D., Jayaweera S., Madhubhashini G., Lokumarakkala D.D., Senanayake S.J. Reliability of parameters of complete blood count with different storage conditions. *Journal of clinical laboratory analysis* [internet]. 2016 Aug 27; 31(2):e22042. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22042>.
- Buoro S., Mecca T., Seghezzi M., Manenti B., Cerutti L., Dominoni P. et al. Assessment of blood sample stability for complete blood count using the Sysmex XN-9000 and Mindray BC-6800 analyzers. *Revistabrasileira de hematologia e hemoterapia* [internet]. 2016 Jul; 38(3):225–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.010>.
- Wood B.L., Andrews J., Miller S., Sabath D.E. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. *American journal of clinical pathology* [internet]. 1999 Nov 1; 112(5):687–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/112.5.687>.
- Ciepiela O., Kotuła I., Kierat S., Sieczkowska S., Podsiadłowska A., Jenczelewska A. et al. A comparison of Mindray BC6800, Sysmex XN2000, and Beckman Coulter LH750 automated hematology analyzers: a pediatric study. *Journal of clinical laboratory analysis* [internet]. 2016 May 17; 30(6):1128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21992>.
- Tatsumi N., Miwa S., Lewis S.M. Specimen collection, storage, and transmission to the laboratory for hematological tests. *International journal of hematology* [internet]. 2002 Apr; 75(3):261–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02982039>.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Бызова Н.А.¹, Жердев А.В.¹, Горбатов А.А.², Бикетов С.Ф.², Дзантиев Б.Б.¹

РАЗРАБОТКА И СОПОСТАВЛЕНИЕ ТРЕХ ВИДОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ТУЛЯРЕМИИ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СОСТАВУ ДЕТЕКТИРУЕМЫХ МЕЧЕНЫХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва, Россия;

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, пос. Оболensk Московской области, Россия

Иммунохроматография (ИХ) активно используется в современной практике серодиагностики – выявления в крови антител, специфичных к определённому патогену. Возможно несколько вариантов формирования в ходе ИХ меченых иммунных комплексов, выбор между которыми требует экспериментальных оценок применительно к разным инфекциям. В статье представлены разработка и сравнение трёх схем ИХ для выявления антител против возбудителя туляремии, отличающихся по составу детектируемых комплексов: антиген – специфические антитела – меченый антиген (схема I); антиген – специфические антитела – меченые антивидовые антитела (схема II) и антивидовые антитела – специфические антитела – меченый антиген (схема III). Для сравнения тест-систем использованы сыворотки крови больных туляремией, боррелиозом и здоровых доноров (n=31). Для всех схем в выбранных условиях отсутствовали ложноположительные результаты, степени выявления больных характеризовались рядом: схема II > схема III > схема I. Продолжительность ИХ для всех схем – 10 мин.

Ключевые слова: серодиагностика; иммунохроматография; тест-полоски; меченые иммунные комплексы; туляремия; *Francisella tularensis*

Для цитирования: Бызова Н.А., Жердев А.В., Горбатов А.А., Бикетов С.Ф., Дзантиев Б.Б.

Разработка и сопоставление трех видов иммунохроматографических тест-систем для серодиагностики туляремии, отличающихся по составу детектируемых меченых иммунных комплексов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 592-600.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-592-600>

Для корреспонденции: Дзантиев Борис Борисович, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. иммунобиохимии; e-mail: dzantiev@inbi.gas.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКР 1.1.17 по государственному заданию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Поступила 11.09.2024

Принята к печати 23.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Byzova N.A.¹, Zherdev A.V.¹, Gorbatov A.A.², Biketov S.F.², Dzantiev B.B.¹

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF THREE TYPES OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR SERODIAGNOSIS OF TULAREMIA, DIFFERING IN THE COMPOSITION OF DETECTED LABELED IMMUNE COMPLEXES

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russia;

²State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russia

Immunochromatography (IC) is widely used in modern practice of serodiagnostics, detection of antibodies specific to a certain pathogen in the blood. Several variants of labeled immune complexes formation during IC are possible; the choice between them requires experimental assessments in relation to different infections. The article presents the development and comparison of three IC schemes for revealing antibodies against the causative agent of tularemia, differing in the composition of the detected complexes: antigen – specific antibodies – labeled antigen (scheme I); antigen – specific antibodies – labeled anti-species antibodies (scheme II) and anti-species antibodies – specific antibodies – labeled antigen (scheme III). Blood sera of patients with tularemia, borreliosis and healthy donors (n=31) were applied to compare the test systems. For all schemes, there were no false positive results under the selected conditions, and the revealing of sick patients was characterized by the following row: scheme II > scheme III > scheme I. The testing time for all schemes was 10 min.

Key words: serodiagnostics; immunochromatography; test strips; labeled immune complexes; tularemia; *Francisella tularensis*

For citation: Byzova N.A., Zherdev A.V., Gorbatov A.A., Biketov S.F., Dzantiev B.B. Development and comparison of three types of immunochromatographic test systems for serodiagnosis of tularemia, differing in the composition of detected labeled immune com-

plexes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 592-600 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-592-600>

For correspondence: *Dzantiev Boris Borisovich*, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Immunobiochemistry; e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Information about authors:

Byzova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-0025-8370>;

Zherdev A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3008-2839>;

Gorbatov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0799-893X>;

Biketov S.F., <https://orcid.org/0000-0003-1179-6895>;

Dzantiev B.B., <https://orcid.org/0000-0003-4008-4918>.

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

Acknowledgments. *The work was carried out within the framework of the research and development project 1.1.17 under the state assignment of the State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology.*

Received 11.09.2024

Accepted 23.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Туляремия - зоонозная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*. Частая встречаемость возбудителя туляремии в объектах окружающей среды сочетается с разнообразием путей инфицирования [1]. Опасность инфекции для людей обусловлена высокой восприимчивостью к возбудителю, значительной смертностью при отсутствии терапии и рисками серьезных осложнений [2].

Для клинической лабораторной диагностики туляремии применяют две группы методов, направленных на выявление либо возбудителя инфекции (культуральный [3], молекулярно-генетический [4,5], иммунологический [6] методы), либо специфических антител к возбудителю (серологический метод, прежде всего – иммуноферментный анализ [7-10]). Эти методы, как правило, весьма продолжительны (несколько часов) и требуют использования специализированного оборудования, что ограничивает возможности оперативного принятия решений, и проведения массовых скрининговых тестирований.

Одним из самых быстрых и методически простых иммунологических методов является иммунохроматография (ИХ), продолжительность которой составляет 10-15 минут [11,12]. ИХ позволяет выявлять как возбудителя инфекции, так и антитела к нему. Хотя выработка антител в организме требует времени, их мониторинг в крови имеет определённые преимущества из-за простого отбора проб для тестирования с хорошей воспроизводимостью получаемых результатов [13]. Результаты ИХ серодиагностики просто интерпретировать: присутствие в пробе антител к возбудителю инфекции определяется по окрашиванию определённого участка (аналитической зоны) тест-полоски вследствие формирования специфических иммунных комплексов, меченных окрашенными частицами, чаще всего – наночастицами золота (НЧЗ) [14].

Для серодиагностики могут быть использованы схемы ИХ, отличающиеся компонентами образующихся в аналитической зоне комплексов и ходом их формирования при проведении ИХ. Эти возможности описаны в ряде публикаций [15-17], однако вопрос о наиболее диагностически эффективной схеме ИХ серодиагностики продолжает оставаться открытым. Немногие проводившиеся сравнительные исследования свидетельствуют

о том, что выбор зависит от особенностей иммунного ответа на тот или иной патоген, от способа получения меченых иммунореагентов [17,18].

Цель исследования - разработка и сравнение трёх схем иммунохроматографической серодиагностики туляремии (рис. 1): схема I – иммобилизация антигена *F. tularensis* в аналитической зоне тест-полоски и на поверхности НЧЗ; схема II – иммобилизация антигена в аналитической зоне и антивидовых антител на поверхности НЧЗ; схема III – иммобилизация антивидовых антител в аналитической зоне и антигена на поверхности НЧЗ.

Материал и методы. В работе использованы моноклональные антитела клона Fb11 к липополисахариду (ЛПС) штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Согласно [19] ЛПС выделяли из клеток *F. tularensis* фенольной экстракцией и лиофилизировали.

Для синтезов готовили деионизованную воду с удельным сопротивлением при 25° С не менее 18,2 МОм·см с помощью системы Simplicity Milli-Q (фирма «Millipore», США). Наночастицы золота синтезировали методом G. Frens [20] с использованием золотохлористоводородной кислоты и цитрата натрия (оба реагента фирмы «Sigma-Aldrich», США). ЛПС и иммуноглобулины класса IgG (IgG) козы к IgG человека (IgG_{к/ч}, фирма «Arista Biologicals», США) конъюгировали с НЧЗ адсорбционной иммобилизацией. Для получения конъюгатов ЛПС-НЧЗ наночастицы с оптической плотностью (ОП) при 522,5 нм, равной 1,0, доводили до pH 7,0 добавлением 0,1 М K₂CO₃. ЛПС (pH 7,0) разбавляли до 1 мг/мл и вносили 300, 100, 30, 10, 3 или 1 мкл ЛПС в 10 мл НЧЗ. Смеси инкубировали 30 минут при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили 0,25 мл 10% бычьего сывороточного альбумина (БСА, фирма «Sigma-Aldrich», США). Конъюгаты ЛПС-НЧЗ с разной нагрузкой по ЛПС обозначали ЛПС(30-0.1)-НЧЗ. При конъюгировании IgG_{к/ч} к НЧЗ добавляли 61,2 мкл IgG_{к/ч} (1 мг/мл), а остальные стадии проводили также, как для ЛПС. В качестве контроля в тех же условиях получали конъюгат НЧЗ с БСА. Для всех синтезов, несвязавшиеся с НЧЗ молекулы отделяли 15-минут центрифугированием при 20 тыс. g и 4 °С (центрифуга Allegra 64R, «Beckman Coulter», США). После удаления надосадочных жидкостей осадки перерастворили в 20 мМ

трис-НСI буфере, рН 7,6, содержащем 1,0% БСА, 1,0% сахарозы, 0,1% детергента Твин-20 и 0,1% NaN_3 (все препараты – фирмы «Sigma-Aldrich», США), и хранили при 4-6 °С.

При спектрофотометрической характеристике НЧЗ и их конъюгатов с ЛПС и $\text{IgG}_{\text{K}\chi}$ использован спектрофотометр Biochrom Libra S80 (фирма «Biochrom», Великобритания). Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) проводили согласно [21] с помощью микроскопа CX-100 (фирма «Jeol», Япония), микрофотографии анализировали в цифровой форме, используя программу Image Tool (University of Texas Health Science Center at San Antonio, США). Для регистрации динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) применяли прибор Zetasizer Nano (фирма «Malvern», Великобритания), проводя измерения (три 30-сек. цикла в трёх повторностях) с углом рассеяния 173° и обрабатывая данные с помощью программы Malvern Softwarever (фирма «Malvern», Великобритания).

Функциональная активность конъюгатов характеризовалась методом иммуноферментного анализа (ИФА) в прозрачных микропланшетах фирмы «Corning Costar» (США) с использованием фотометра Zenyth 3100 («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Для конъюгатов ЛПС-НЧЗ проверяли способность ЛПС в их составе конкурировать с ЛПС, иммобилизованным в лунках микропланшета, за связывание с антителами Fb11. Для этого в лунки вносили по 100 мкл ЛПС (1 мкг/мл) в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,6, содержащем 100 мМ NaCl (ФБС), и инкубировали при 4° С в течение ночи. Микропланшет четырёхкратно промывали ФБС, содержащим 0,05% детергента Тритон X-100 фирмы «Sigma-Aldrich», США (ФБСТ). Затем в лунки вносили по 50 мкл растворов конъюгатов ЛПС-НЧЗ (от 0,001 до 2,0 опт. ед.) и антител Fb11 (1 мкг/мл) в ФБСТ и инкубировали 1 час при 37 °С. Четырёхкратно про-

мывали микропланшет ФБСТ, вносили в лунки по 100 мкл пероксидазного конъюгата антител быка против IgG мыши (разведение 1:3000 в ФБСТ; фирма «Имтек», Россия) и инкубировали 1 час при 37 °С. После четырёхкратной промывки определяли активность связанной пероксидазы. Для этого в лунки вносили по 100 мкл 40 мМ натрий-цитратного буфера, рН 4,0, с 0,4 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлоридом (ТМБ, «Sigma-Aldrich», США) и 3 мМ H_2O_2 , инкубировали 15 минут при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и измеряли ОП при 450 нм.

Для конъюгата $\text{IgG}_{\text{K}\chi}$ -НЧЗ проверяли способность антител $\text{IgG}_{\text{K}\chi}$ в его составе связываться с IgG человека («Имтек», Россия). Для этого IgG человека (1 мкг/мл) иммобилизовали в лунках в тех же условиях, что и ЛПС. Далее с такими же продолжительностями стадий, буферами и отмывками последовательно инкубировали в лунках конъюгат $\text{IgG}_{\text{K}\chi}$ -НЧЗ (от 0,001 до 2,0 опт. ед.) и пероксидазный конъюгат антител быка против IgG козы (разведение 1:3000 в ФБСТ; «Имтек», Россия). Активность связанной пероксидазы определяли, как описано выше.

Сыворотки с антителами к *F. tularensis* и без них получали взятием крови у пациентов и доноров на основании их письменного добровольного информированного согласия на исследование. Для выявления в сыворотках антител к *F. tularensis* методом ИФА в лунках микропланшета иммобилизовали ЛПС (1 мкг/мл) и последовательно добавляли сыворотку (разведения от 1:25 до 1:50000) и пероксидазный конъюгат антител быка против IgG человека (разведение 1:3000 в ФБСТ; «Имтек», Россия) при тех же условиях инкубаций, отмывок и регистрации активности пероксидазы, что и описанных выше методиках ИФА.

ИХ тест-полоски изготавливали из нитроцеллюлоз-

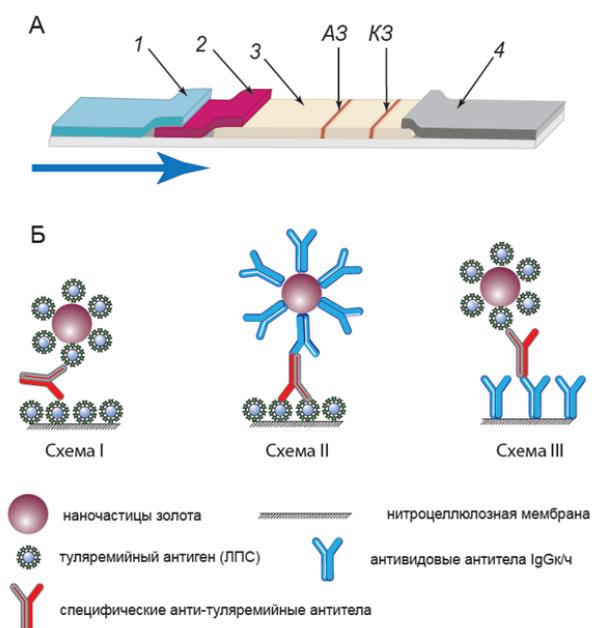


Рис. 1. Три схемы ИХ серодиагностики. А – строение ИХ тест-полоски (1 – мембрана для впитывания пробы; 2 – стекловолоконная мембрана с маркерным конъюгатом; 3 – нитроцеллюлозная мембрана; 4 – конечная абсорбирующая мембрана; АЗ – аналитическая зона; КЗ – контрольная зона) и иммуноаналитические реагенты. Стрелкой показано направление движения пробы и реагентов во время ИХ. Б – комплексы, образующиеся в аналитических зонах при проведении ИХ по схемам I-III.

ной мембраны CNPC-15, стекловолоконной мембраны РТ-Р7, мембраны для впитывания пробы GFB-R4 и конечной абсорбирующей мембраны AP045 фирмы «Advanced Microdevices» (Индия) (рис. 1, А). Аналитическую и контрольную зоны (АЗ и КЗ) нитроцеллюлозной мембраны формировали нанесением реагентов с помощью дозатора IsoFlow («Image Technology», США) из ФБС с расходом 0,12 мкл/мм: для схемы I – ЛПС (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела Fb11 (0,5 мг/мл) в КЗ, для схемы II – ЛПС (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела кролика против IgG козы (0,5 мг/мл; фирма «Имтек», Россия) в КЗ, для схемы III – IgG_{кч} (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела Fb11 (0,5 мг/мл) в КЗ. На стекловолоконную мембрану с расходом 0,8 мкл/мм наносили конъюгаты с ОП 4,0: ЛПС(3)-НЧЗ для схем I и III и IgG_{кч}-НЧЗ для схемы II. Мембраны высушивали при комнатной температуре в течение 12 часов и все четыре компонента наклеивали на пластиковую подложку. Полученные композиты разрезали на тест-полоски шириной 3,5 мм, используя гильотинный резак Index Cutter-1 («A-Point Technologies», США), и хранили при комнатной температуре в zip-пакетах с силикагелем.

ИХ детекция антител к *F. tularensis* проводили по следующей методике. Конец тест-полоски окунали в 50 мкл пробы (сыворотки, разведенные в 10, 30 или 100 раз в ФБСТ) в лунке микропланшета. Через 10 минут тест-полоску извлекали, сканировали с помощью сканера CanoScan 9000F («Canon», Япония) и использовали программу TotalLab TL120 («Nonlinear Dynamics», Великобритания) для определения интенсивности

сформированных окрашенных зон.

Результаты. Синтез и характеристика НЧЗ.

Для получения НЧЗ использовали вариант методики Френса [20], соответствующий ожидаемому среднему диаметру наночастиц 20-30 нм. Спектр поглощения продукта синтеза (рис. 2А) имел широкий пик с максимумом при 522,5 нм. Наличие этого пика обусловлено эффектом поверхностного плазмонного резонанса между частотами световой волны и коллективных колебаний свободных электронов на поверхности НЧЗ [22]. Согласно [23], средний диаметр НЧЗ (y) определяется на основании длины волны этого пика (x) по формуле $y = -1330 + 2,6 \cdot x$. Соответствующий расчёт даёт величину 28,5 нм. Результаты этого простого и нетрудоёмкого измерения сопоставлены с данными ПЭМ и ДЛС. Как видно из представленного фрагмента микрофотографии (рис. 2, Б), препарат НЧЗ не содержал агрегаты, форма частиц близка к сферической. По данным измерений, проведенных для 95 изображений НЧЗ на микрофотографии (рис. 2, В), средний диаметр НЧЗ составил $(28,1 \pm 2,3)$ нм, что хорошо соответствует результатам спектрофотометрии. Коэффициент эллиптичности, вычисляемый как отношение большой и малой осей частицы, равнялся $1,08 \pm 0,04$, что свидетельствует о близости формы НЧЗ к сферической. Измерения ДЛС также дали близкие значения среднего гидродинамического диаметра, 31,4 нм, при относительно низком индексе полидисперсности ($Pdi = 0,183$), отражающем высокую гомогенность препарата НЧЗ по размерам.

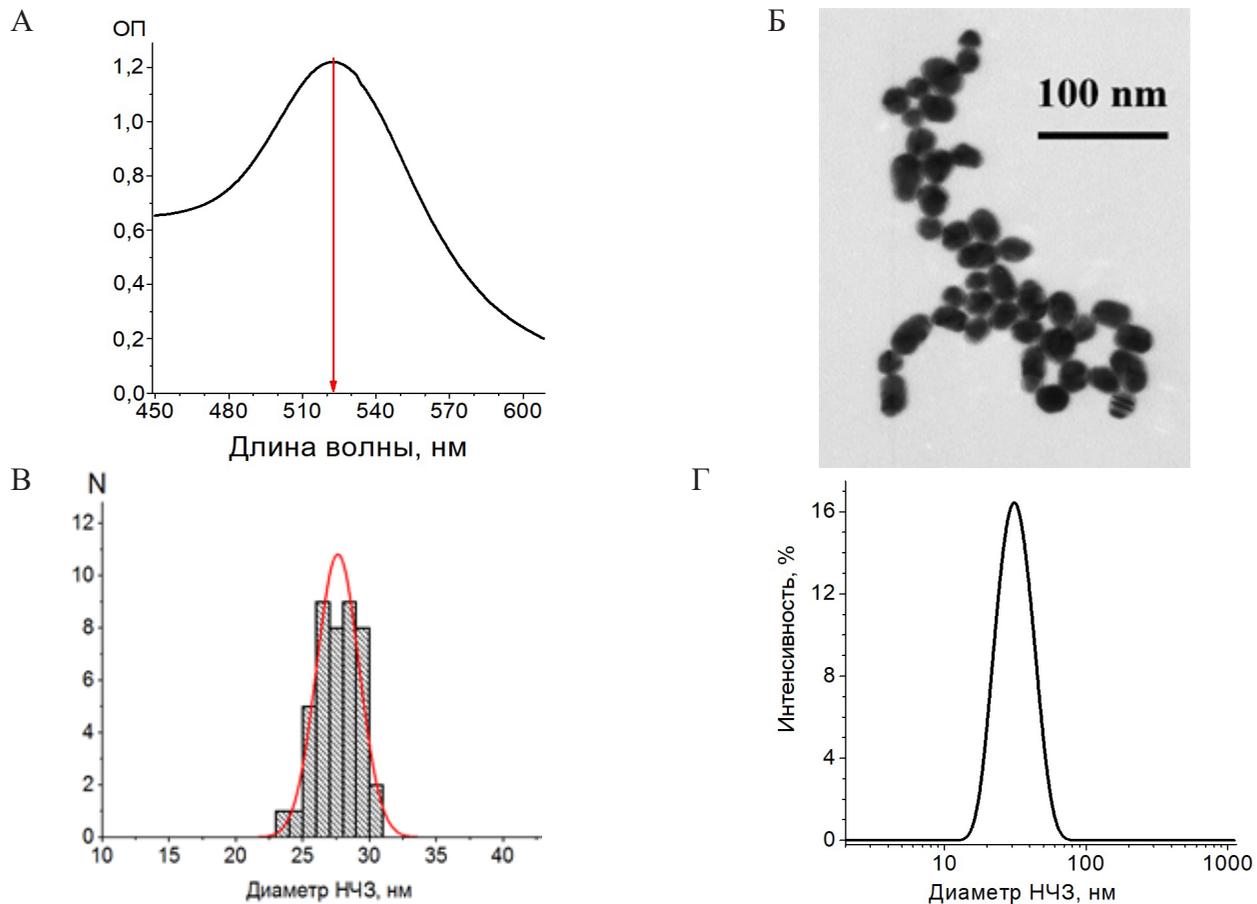


Рис. 2. Характеристика препарата НЧЗ. А - спектр поглощения (стрелкой показано положение пика); Б - фрагмент электронной микрофотографии; В - гистограмма распределения диаметров НЧЗ по данным ПЭМ (выборка из 95 частиц); Г - распределение гидродинамических диаметров.

Синтез и характеристика конъюгатов НЧЗ с антигеном и антителами. Конъюгаты IgG_{к/ч}-НЧЗ и ЛПС-НЧЗ получены посредством адсорбционной иммобилизации. Для IgG_{к/ч} согласно рекомендациям [24], вычислена концентрация, обеспечивающая монослойное покрытие поверхности НЧЗ. Для установленного среднего диаметра частиц 28,5 нм она равнялась 6,12 мкг/мл. Для ЛПС, в связи с отсутствием данных о его конъюгировании с НЧЗ, получена серия препаратов, варьируя концентрации ЛПС от 0,1 до 30 мкг/мл.

Для проверки успешности конъюгирования пре-

параты охарактеризованы методами спектрофотометрии и ДЛС и полученные результаты сопоставлены с данными для нативных НЧЗ. Как следует из табл. 1, максимумы спектров поглощения продуктов синтезов сдвигаются в длинноволновую область на 3,0-3,5 нм, что соответствует возрастанию средних диаметров по сравнению с нативными НЧЗ на 4,5-5,5 нм. Близкие сдвиги диаметров наблюдались и при измерениях ДЛС. Величины Pdi при конъюгировании достоверно не изменялись, что свидетельствует о стабильности полученных препаратов.

Таблица 1

Характеристика нативных и конъюгированных НЧЗ методами спектрофотометрии и ДЛС

Препарат	Пик поглощения, нм	Диаметр (спектрофотометрия), нм	Диаметр (ДЛС), нм	Pdi (ДЛС)
НЧЗ	522,5	28,5	31,4	0,183
IgG _{к/ч} -НЧЗ	525,5	33,0	34,8	0,189
ЛПС(3)-НЧЗ	526,0	34,0	35,9	0,192

Для конъюгата IgG_{к/ч}-НЧЗ подтверждена способность антител в его составе связываться с IgG человека, иммобилизованными в лунках микропланшета. На рис. 3, А показано наличие этого связывания и его специфический характер.

Для конъюгатов ЛПС-НЧЗ функциональную активность характеризовали методом ИФА в конкурентном формате, когда препараты ЛПС, конъюгированного с НЧЗ и иммобилизованного в лунках

микропланшета, конкурировали за связывание со специфическими антителами. На рис. 3, Б отражена реакционная способность всех полученных конъюгатов, причём содержание в них реакционно-способных молекул ЛПС возрастало с увеличением концентрации ЛПС при конъюгировании. Для изготовления тест-полосок по схемам I и III выбран конъюгат ЛПС(3)-НЧЗ, соответствующий концентрации ЛПС при синтезе, равный 3 мкг/мл.

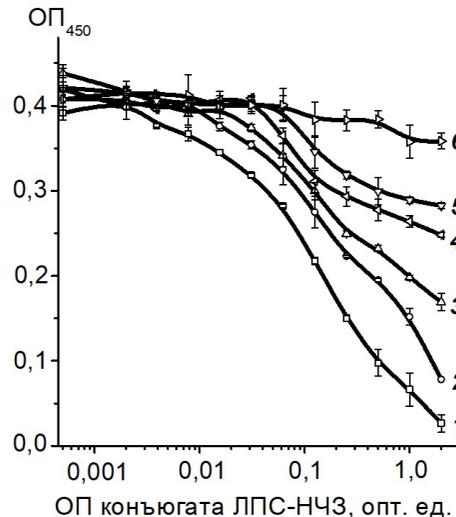
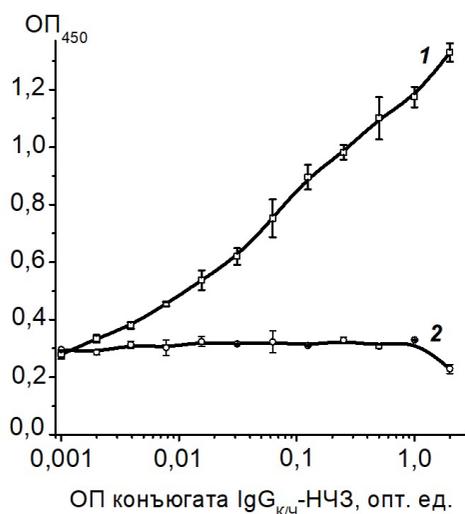


Рис. 3. Характеристика в ИФА функциональной активности конъюгатов НЧЗ с IgG_{к/ч} (А) и ЛПС (Б). А - кривые сэндвич-ИФА 1,2 соответствуют конъюгату IgG_{к/ч}-НЧЗ и контрольному препарату БСА-НЧЗ; Б - кривые конкурентного ИФА 1-6 соответствуют препаратам ЛПС-НЧЗ, полученным при концентрациях ЛПС 30, 10, 3, 1, 0,3 и 0,1 мкг/мл.

Реализация трёх схем иммунохроматографической серодиагностики туляремии. Тест-системы, изготовленные в соответствии с тремя рассматриваемыми схемами серодиагностики и выбранными оптимальными условиями, представленными в разделе «Материал и методы», применены для тестирования сывороток пациентов с положительными и отрицательными диагнозами по туляремии. Рассмотрена 31 сыворотка, из них 16 взяты у пациентов, больных туляремией (1т-16т), 5 - у пациентов, больных боррелиозом (1б-5б) и 10 - у доноров без

симптомов заболеваний (1зд-10зд). Помимо использования данных о клинической картине, проведена проверка сывороток методом ИФА с иммобилизованным антигеном (ЛПС) *F. tularensis*. В качестве порога статистически достоверного отличия положительных и отрицательных проб установлена величина ОП₄₅₀ в ИФА при разведении сывороток 1:300, равная 0,2 опт.ед. Результаты ИФА для всех сывороток (табл. 2) соответствовали клиническим диагнозам применительно к туляремии.

Результаты серодиагностики для трёх схем ИХ,

Серодиагностика туляремии методами ИФА и тремя вариантами ИХ

№ сыворотки	ИФА	ИХ								
		Схема I			Схема II			Схема III		
	Разведения									
	1:300	1:10	1:30	1:100	1:10	1:30	1:100	1:10	1:30	1:100
ОП ₄₅₀	Интенсивности окрашивания АЗ									
Клинический диагноз – туляремия										
1Т	0,633 ± 0,014	13,2 ± 1,7	5,5 ± 1,75	3,6 ± 0,15	26,65 ± 2,65	24,05 ± 1,35	23,65 ± 1,15	3,35 ± 0,45	4,1 ± 0,2	3,65 ± 0,05
2Т	0,995 ± 0,045	16,9 ± 2,45	10,1 ± 1,3	5,7 ± 0,85	67,05 ± 1,65	61,45 ± 1,95	67,3 ± 2,5	3,45 ± 0,15	9,9 ± 0,8	8,25 ± 0,15
3Т	0,981 ± 0,002	14,1 ± 1,8	8,1 ± 0,45	2,7 ± 0,4	41,95 ± 0,95	42,7 ± 0,5	42,05 ± 1,65	2,73 ± 0,03	5,25 ± 0,25	4,7 ± 0,2
4Т	0,750 ± 0,026	15,3 ± 0,55	6,2 ± 0,35	2,1 ± 0,25	60,4 ± 0,6	60,55 ± 0,35	57,25 ± 1,25	5,7 ± 0,3	6,6 ± 0,2	6,2 ± 0,4
5Т	0,804 ± 0,03	25,9 ± 0,5	8,15 ± 0,35	0	33,7 ± 2,7	37,8 ± 3,3	30,75 ± 0,75	5,75 ± 0,05	6,05 ± 0,15	6,3 ± 0,3
6Т	0,382 ± 0,025	8,6 ± 0,3	5,8 ± 0,25	0	77,6 ± 2,4	51,05 ± 4,15	25,3 ± 0,4	17,4 ± 4,9	15,8 ± 2,0	15,35 ± 0,75
7Т	0,344 ± 0,010	37,1 ± 1,75	5,1 ± 0,35	0	67,95 ± 3,25	56,85 ± 0,95	21,85 ± 0,95	30,85 ± 1,15	23,7 ± 0,5	28,75 ± 1,35
8Т	0,818 ± 0,061	58,3 ± 0,65	21,5 ± 0,45	5,3 ± 1,5	82,1 ± 1,9	79,0 ± 1,0	76,8 ± 4,8	6,0 ± 0,5	14,65 ± 0,35	9,45 ± 0,05
9Т	0,798 ± 0,072	27,5 ± 0,15	12,5 ± 0,25	6,35 ± 0,25	54,65 ± 0,35	54,0 ± 1,5	48,2 ± 0,2	2,05 ± 0,15	4,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1
10Т	0,560 ± 0,013	21,2 ± 0,2	9,6 ± 0,35	2,5 ± 0,5	65,55 ± 1,15	61,45 ± 1,65	73,15 ± 0,25	5,8 ± 0,4	5,85 ± 0,45	5,75 ± 0,05
11Т	0,693 ± 0,019	23,45 ± 0,55	7,5 ± 0,45	2,3 ± 0,25	35,0 ± 1,5	46,95 ± 1,05	49,2 ± 0,3	2,25 ± 0,05	4,25 ± 0,55	3,8 ± 0,5
12Т	0,312 ± 0,025	2,4 ± 0,45	0	0	28,95 ± 1,35	8,05 ± 1,65	3,15 ± 1,05	4,5 ± 0,8	8,25 ± 1,15	11,85 ± 1,25
13Т	0,240 ± 0,016	8,5 ± 0,25	1,85 ± 0,15	0	35,6 ± 0,45	22,5 ± 1,2	13,25 ± 1,05	6,6 ± 1,4	4,25 ± 0,4	2,7 ± 0,45
14Т	0,200 ± 0,017	3,8 ± 0,4	0	0	32,3 ± 2,6	11,7 ± 3,1	6,6 ± 0,75	11,35 ± 0,85	8,1 ± 0,55	2,2 ± 0,25
15Т	0,250 ± 0,007	3,1 ± 0,35	0	0	30,0 ± 1,35	12,9 ± 0,8	5,3 ± 0,5	2,5 ± 0,25	1,65 ± 0,15	0
16Т	0,234 ± 0,019	4,2 ± 0,35	1,3 ± 0,05	0	38,0 ± 3,2	26,7 ± 0,7	9,2 ± 1,3	29,6 ± 0,7	14,6 ± 1,75	7,4 ± 0,6
Клинический диагноз – боррелиоз										
1б	0,165 ± 0,026	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2 ± 0,3
2б	0,040 ± 0,006	0	0	0	0	0	0	2,0 ± 0,15	0	0
3б	0,108 ± 0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4б	0,131 ± 0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5б	0,122 ± 0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Клинический диагноз – здоровые доноры										
1зд	0,14 ± 0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2зд	0,135 ± 0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3зд	0,048 ± 0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4зд	0,128 ± 0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5зд	0,145 ± 0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6зд	0,084 ± 0,004	6,4 ± 0,55	0	0	0	0	0	0	0	0
7зд	0,104 ± 0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8зд	0,115 ± 0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9зд	0,134 ± 0,035	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10зд	0,157 ± 0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Все измерения проводились в двух повторностях.

каждая из которых реализована при трёх разведениях сывороток: 1:10, 1:30, 1:100 (см. рис. 4 с примерами тестирования проб из разных групп). представлены в табл. 2. Величины интенсивности окрашивания АЗ, начиная с 2 отн. ед., в соответствии с непосредственной визуальной оценкой и данными предыдущих применений данного протокола цифровой обработки изображений [17,18], интерпретировались как положительные результаты ИХ - наличие визуально выявляемой окрашенной полосы, величины интенсивности окрашивания АЗ, меньшие 2 отн. ед., - как отрицательные результаты ИХ - отсутствие визуально выявляемой окрашенной полосы.

При выборе разведений сывороток исключены варианты, дававшие ложноположительные результаты, что сопровождалось более высоким неспецифическим фоновым окрашиванием всей поверхности нитроцеллюлозных мембран. С учётом этого требования, а также минимизации неспецифического окрашивания, выбранные рабочие разведения для всех схем серодиагностики

составили 1:30. В этих условиях в схеме I наблюдалось 11 положительных результатов, в схеме II – 16 положительных результатов, в схеме III - 15. Все результаты - истинно положительные (подтверждённые данными ИФА и клинической картиной). Все отрицательные сыворотки при тестировании в разведении 1:30 дали отрицательные результаты для всех трёх схем ИХ. Величины диагностических чувствительностей и специфичностей серодиагностической ИХ туляремии, вычисленные на основании этих данных, суммированы в табл. 3.

Обсуждение. Наиболее известный подход в ИХ серодиагностике заключается в нанесении в АЗ антигена соответствующего патогена и иммобилизации на поверхности НЧЗ иммуноглобулинсвязывающих реагентов - антивидовых антител, белков бактерий A, G, L и др. [17,25]. Образующиеся на мембране комплексы представлены в схеме II на рис. 1. Однако при этом с конъюгатом НЧЗ взаимодействуют все иммуноглобулины пробы, из которых лишь несколько процентов или

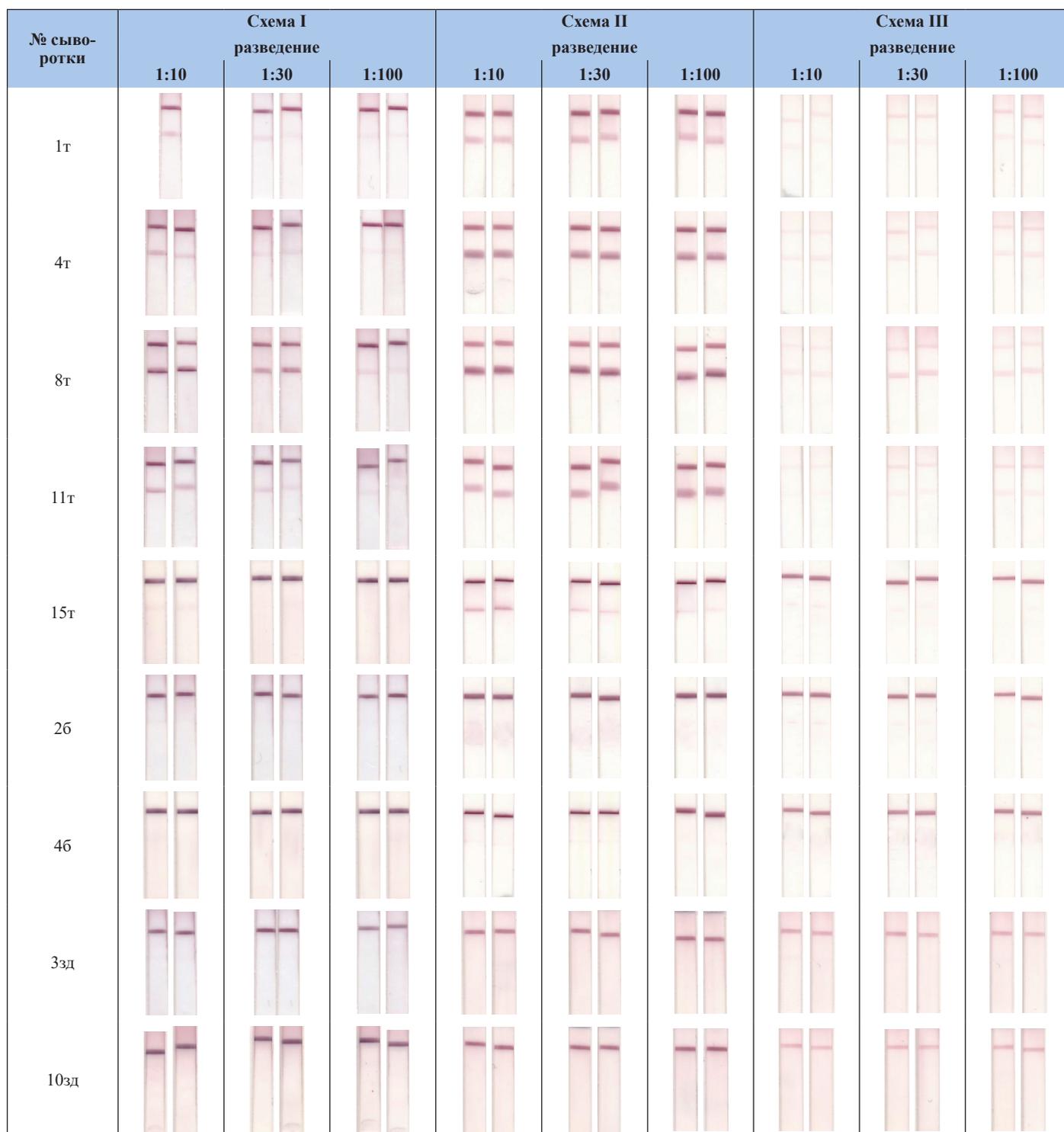


Рис. 4. Тестирование сывороток методом ИХ по схемам I, II и III: изображения аналитических и контрольных зон. Для каждой пробы использовали по две тест-полоски.

Таблица 3

Диагностическая эффективность трёх схем серодиагностики туляремии

Схема ИХ	I	II	III
Подтвержденный положительный результат	11	16	15
Ложноположительный результат	0	0	0
Подтвержденный отрицательный результат	15	15	15
Ложноотрицательный результат	5	0	1
Диагностическая чувствительность	68,75%	100%	93,75%
Диагностическая специфичность	75%	100%	93,75%

доли процента приходится на антитела, специфичные к антигену [26]. В результате большая часть иммуноглобулинсвязывающих белков блокируется неспецифическими иммуноглобулинами. Это блокирование снижает связывание метки в АЗ и затрудняет серодиагностику при низком содержании специфических антител [26].

Предложены два варианта проведения ИХ серодиагностики, исключающие блокирование связывающих центров на поверхности НЧЗ. Один из них состоит в «переворачивании» детектируемых комплексов: в АЗ иммобилизован иммуноглобулин-связывающий реагент, а с НЧЗ конъюгирован антиген [27-29] - см. схему III на рис. 1. Поскольку общая площадь поверхности пористой мембраны в АЗ значительно превышает предельно возможную для ИХ суммарную поверхность НЧЗ на тест-полоске [17], связывание в АЗ неспецифических иммуноглобулинов не препятствует формированию детектируемых меченых комплексов. При проведении ИХ может быть использована поливалентность антител. В этом случае антиген наносят как в АЗ, так и на поверхность НЧЗ. В результате в формировании детектируемых комплексов участвуют только специфические антитела - см. схему I на рис. 1, а остальные иммуноглобулины не влияют на результаты анализа [16,23,30].

Сравнение разных схем ИХ проводилось лишь в немногих исследованиях. В работе [17] при изучении серодиагностики COVID-19 показана наибольшая эффективность схемы III. Очевидно, что выявляемые тенденции не могут быть перенесены на все остальные задачи серодиагностики. В рамках данного исследования показано, что для серодиагностики туляремии наиболее эффективной оказалась схема II. Хотя ограниченное число доступных протестированных препаратов сывороток не позволяет провести строгий статистический сравнительный анализ, важным достоинством схемы II является значительно большая - для разведения 1:30 в среднем в 8 раз - интенсивность окрашивания АЗ, что облегчает визуальную оценку результатов тестирования. Отметим, что для схемы I возможно улучшение аналитической чувствительности при работе с меньшими разведениями проб (1:10), но оно сопровождается появлением ложноположительных результатов. Схема III, характеризуясь невысокими интенсивностями окрашивания, тем не менее, показала эффективность при работе со слабоположительными (ОП₄₅₀ в ИФА в интервале 0,2-0,3) пробами.

Заключение. Серодиагностика различных заболеваний имеет свои особенности, связанные со свойствами антигенов и с распределением по аффинности вырабатываемых специфических антител. Выводы о наилучшем формате ИХ серодиагностики конкретных инфекций можно сделать только на основе экспериментальных сравнений. Применительно к серодиагностике туляремии наибольшую эффективность показала схема с формированием комплексов антиген – специфические антитела – меченые антивидовые антитела.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-8, 10-30 СМ.
 REFERENCES)

9. Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарёва Г.М., Куликалова Е.С., Бикетов С.Ф., Мазепа А.В. Сравнительное ис-

следование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018; 63: 630-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635.

REFERENCES

1. Sjostedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 1–29. DOI: 10.1196/annals.1409.009.
2. Wawszczak M., Banaszczak B., Rastawicki W. Tularaemia – A diagnostic challenge. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2022; 29: 12–21. DOI: 10.26444/aaem/139242.
3. Hepburn M.J., Simpson A.J.H. Tularemia: Current diagnosis and treatment options. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2008; 6: 231–40. DOI: 10.1586/14787210.6.2.231.
4. Banada P., Deshpande S., Chakravorty S., Russo R., Occi J., Meister G. et al. Sensitive detection of *Francisella tularensis* directly from whole blood by use of the GeneXpert system. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55: 291–301. DOI: 10.1128/JCM.01126-16.
5. Shchit I.Yu., Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N., Biketov S.F. Detection of tularemia agent DNA by loop mediated isothermal amplification. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2022; 37: 202–8. DOI: 10.3103/S0891416822040085.
6. Ziegler I., Vollmar P., Knüpfer M., Braun P., Stoecker K. Reevaluating limits of detection of 12 lateral flow immunoassays for the detection of *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, and *Bacillus anthracis* spores using viable risk group-3 strains. *J. Appl. Microbiol.* 2020; 130: 1173–80. DOI: 10.1111/jam.14863.
7. Spletstoeser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1629–34. DOI: 10.1128/JCM.01475-09.
8. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W. et al. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 234. DOI: 10.1186/1471-2334-14-234.
9. Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Biketov S.F., Mazepa A.V. Comparative study of experimental and commercial serological tests for determining anti-tularemia antibodies in humans. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2018; 63: 630–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635. (in Russian)
10. Boehringer H.R., O'Farrell B.J. Lateral flow assays in infectious disease diagnosis. *Clin. Chem.* 2022; 68: 52–8. DOI: 10.1093/clinchem/hvab194.
11. Rosati G., Idili A., Parolo C., Fuentes-Chust C., Calucho E., Hu L.M. et al. Nanodiagnosics to face SARS-CoV-2 and future pandemics: From an idea to the market and beyond. *ACS Nano.* 2021; 15: 17137–49. DOI: 10.1021/acsnano.1c06839.
12. Wang Z.X., Zhao J., Xu X.X., Guo L.L., Xu L.G., Sun M.Z. et al. An overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay. *Small Methods.* 2022; 6: 2101143. DOI: 10.1002/smt.202101143.
13. Abduljalil J.M. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: Available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.* 2020; 36: 100713. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100713.
14. Su Z., Dou W., Liu X., Ping J., Li D., Ying Y. et al. Nano-labeled materials as detection tags for signal amplification in immunochromatographic assay. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2022; 154: 116673. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116673.
15. Zhu W., Meng K., Zhang Y., Bu Z., Zhao D., Meng G. Lateral flow assay for the detection of African swine fever virus antibodies using gold nanoparticle-labeled acid-treated p72. *Front. Chem.* 2022; 9: 804981. DOI: 10.3389/fchem.2021.804981.
16. Zhang Y., Chen Y., He Y., Li Y., Zhang X., Liang J. et al. Development of receptor binding domain-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay for the detection and evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibody in clinical sera samples compared with the conventional virus neutralization test. *Talanta.* 2023; 255: 124200. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124200.
17. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Xu Y., Dzantiev B.B. Comparison of three lateral flow immunoassay formats for the detection of antibodies against the SARS-CoV-2 antigen. *Biosensors.* 2023; 13: 750. DOI: 10.3390/bios13070750.

18. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics. *Sensors*. 2018; 18: 36. DOI: 10.3390/s18010036.
19. Byzova N.A., Zherdev A.V., Gorbato A.A., Shevyakov A.G., Biketov S.F., Dzantiev B.B. Rapid detection of lipopolysaccharide and whole cells of *Francisella tularensis* based on agglutination of antibody-coated gold nanoparticles and colorimetric registration. *Micromachines*. 2022; 13: 2194. DOI: 10.3390/mi13122194.
20. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241: 20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
21. Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Khlebtsov N.G., Dzantiev B.B. Advantages of highly spherical gold nanoparticles as labels for lateral flow immunoassay. *Sensors*. 2020; 20: 3608. DOI: 10.3390/s20123608.
22. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectr. Rad. Trans.* 2010; 111: 1–35. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2009.07.012.
23. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow serodiagnosis in the double-antigen sandwich format: Theoretical consideration and confirmation of advantages. *Sensors*. 2021; 21: 39. DOI: 10.3390/s21010039.
24. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ability of antibodies immobilized on gold nanoparticles to bind small antigen fluorescein. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24: 16967. DOI: 10.3390/ijms242316967.
25. Srivastav S., Dankov A., Adanalic M., Grzeschik R., Tran V., Pagel-Wieder S. et al. Rapid and sensitive SERS-based lateral flow test for SARS-CoV2-specific IgM/IgG antibodies. *Anal. Chem.* 2021; 93: 12391–9. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c02305.
26. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay. *Anal. Chem.* 2017; 89: 4419–27. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03635.
27. Wang C., Yang X., Gu B., Liu H., Zhou Z., Shi L. et al. Sensitive and simultaneous detection of SARS-CoV-2-specific IgM/IgG using lateral flow immunoassay based on dual-mode quantum dot nanobeads. *Anal. Chem.* 2020; 92: 15542–9. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03484.
28. Peng T., Sui Z., Huang Z., Xie J., Wen K., Zhang Y. et al. Point-of-care test system for detection of immunoglobulin-G and -M against nucleocapsid protein and spike glycoprotein of SARS-CoV-2. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 331: 129415. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129415.
29. Liu H., Dai E., Xiao R., Zhou Z., Zhang M., Bai Z. et al. Development of a SERS-based lateral flow immunoassay for rapid and ultra-sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG in clinical samples. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 329: 129196. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129196.
30. Zhou Y., Chen Y., Liu W., Fang H., Li X., Hou L. et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot nanobead-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay and its clinical performance for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 343: 130139. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130139.

© ГЛАДКОВА Е.В., УЛЬЯНОВ В.Ю., 2024

Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю.

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МЕТОДОВ ПРЕДИКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ ПЕРВИЧНОГО ГОНАРТРОЗА

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410002, Саратов, Россия

Актуальность. Разработка лабораторных предикторов, позволяющих объективизировать различные аспекты процессов ремоделирования опорных соединительных тканей при ранних проявлениях остеоартроза, является активно развивающимся направлением научно-практического поиска. При создании диагностических алгоритмов, учитывающих метаболические и клеточные изменения как отражение основных патогенетических аспектов в дебюте первичного остеоартроза коленных суставов, перспективным направлением могут стать технологии математического моделирования.

Цель исследования – разработать математическую модель лабораторных предикторов ремоделирования субхондральной кости у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов.

Материал и методы. У 200 пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов и 100 здоровых лиц в возрасте 42,4 (35,64; 49,10) лет изучены популяции лимфоцитов в крови, концентрации белков системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови.

Результаты. Методом пошаговой упорядоченной логистической регрессии выведена формула изменений биомаркеров, ассоциированных с процессами субхондрального ремоделирования у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза: $X=6,37-(0,005*\text{Содержание в крови } CD3+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0,006*\text{Содержание в крови } CD3+ CD8+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0,062*\text{Концентрация в сыворотке крови } C3, \text{ г/л})+(0,25*\text{Концентрация в сыворотке крови } C4, \text{ г/л})+(0,36*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ФНО-альфа}, \text{ пг/мл})+(0,44*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ИЛ-4}, \text{ пг/мл})-(0,38*\text{Концентрация в сыворотке крови } \text{ИЛ-1 бета}, \text{ пг/мл})$, прогностические критерии которой составили: чувствительность – 75,4%; специфичность – 85,7%; точность – 80,9%.

Заключение. Вычислена математическая модель соотношений количественных изменений $CD3+$ и $CD3+CD8+$, $C3$ и $C4$ компонентов комплемента, ФНО-альфа, ИЛ-4 и ИЛ-1 бета у пациентов с ранними проявлениями первичного гонартроза в зависимости от выраженности процессов субхондрального ремоделирования.

Ключевые слова: первичный гонартроз; ранняя диагностика; предиктивная математическая модель; субпопуляции лимфоцитов; белки комплемента $C3$ и $C4$; интерлейкин-1 бета; интерлейкин-10; фактор некроза опухоли-альфа

Для цитирования: Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю. Применение математического моделирования в разработке методов предиктивной диагностики ранних стадий первичного гонартроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 601-609.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-601-609>

Для корреспонденции: Гладкова Екатерина Вячеславовна, канд. биол. наук, начальник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР «Разработка цифровой персонализированной интеллектуальной системы объективизации субхондрального ремоделирования для ранней диагностики остеоартроза на основе математической модели прогнозирования прогрессирования воспалительно-дегенеративных изменений в опорных соединительных тканях», номер государственной регистрации НИОКТР 122022700115-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2024

Принята к печати 17.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu.

MATHEMATICAL SIMULATION FOR THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSIS METHODS IN USED TO PREDICT EARLY PRIMARY GONARTHROSIS

Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, the Russian Federation Ministry of Healthcare, Saratov, Russia

Relevance. The development of the laboratory predictors ensuring objectification of various aspects of supporting connective tissues remodeling in early osteoarthritis manifestations is an actively developing area of the scientific and applied research. Mathematical simulations might present a promising trend in creating diagnostic algorithms that account metabolic and cellular changes as a reflection of the main pathogenetic aspects in the onset of primary knee osteoarthritis.

The objective of this research is designing a mathematical simulation of laboratory predictors for subchondral bone remodeling in patients with early manifestations of primary knee osteoarthritis.

Material and methods. We studied blood lymphocyte populations, complement protein concentrations and serum cytokines in 200 patients with early manifestations of primary knee osteoarthritis as well as 100 healthy individuals aged 42,4 (35,64; 49,10) years.

Results. We used the step-by-step ordered logit regression model to develop a formula for changes in biomarkers associated with subchondral remodeling in patients with early manifestations of primary osteoarthritis: $X=6.37-(0.005*\text{blood } CD3+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0.006*\text{blood } CD3+ CD8+, \text{ cells}/\mu\text{l})-(0.062*\text{serum } C3, \text{ g/l})+(0.25*\text{serum } C4, \text{ g/l})+(0.36*\text{serum } \text{TNF-alpha}, \text{ pg/ml})+(0.44*\text{serum } \text{IL-4}, \text{ pg/ml})-(0.38*\text{serum } \text{IL-1 beta}, \text{ pg/ml})$ with the prognostic criteria of sensitivity 75.4%; specificity 85.7%; accuracy 80.9%.

Conclusion. We calculated the mathematical simulation to define the correlation between quantitative changes in $CD3+$ and $CD3+CD8+$, $C3$ and $C4$ complement components, TNF-alpha, IL-4 and IL-1 beta in patients with early manifestations of primary

gonarthrosis depending on the severity of subchondral remodeling.

Key words: *primary gonarthrosis; early diagnosis; predictive mathematical simulation; lymphocyte subpopulations; C3 and C4 complement proteins; IL-1beta; IL-10; TNF-alpha*

For citation: Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu. Mathematical simulation for the development of diagnosis methods in used to predict early primary gonarthrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 601-609 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-601-609>

For correspondence: *Gladkova E.V.*, Cand. Biol. Sci. (PhD), Head of the Fundamental, Clinical and Experimental Research Dept., e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Information about authors:

Gladkova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6207-2275>;

Ulyanov V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9466-8348>.

Funding. *This study is a part part of the research project Designing the digital personalized intelligent system for objectifying subchondral remodeling and early osteoarthritis diagnosis based on a mathematical model of predicting inflammation and degeneration progress in supporting connective tissues, R&D state registration No. 122022700115-5.*

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

Received 16.05.2024

Accepted 17.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Остеоартроз (ОА) относят к наиболее значимым заболеваниям опорно-двигательной системы, охватывающим крупные суставы, который на сегодняшний день выявлен более чем у 500 миллионов человек в мире [1]. В силу биомеханических особенностей распределения осевой нагрузки в теле человека, наиболее подвержены данному заболеванию коленные суставы, на долю которых приходится порядка 260 миллионов случаев прогрессирующих форм ОА. Согласно общемировым статистическим данным, прирост заболеваемости ОА коленных суставов или гонартроза (ГА) за тридцатилетний период, предшествовавший в 2017 году, составил более 9% [2]. Причины столь негативных тенденций многообразны вследствие полиэтиологического характера данного заболевания и существования значительного числа модифицируемых и немодифицируемых факторов риска, среди которых ведущее значение принадлежит особенностям возрастной структуры человеческой популяции с преобладанием лиц пожилого и старческого возраста, малоподвижному образу жизни, увеличению доли лиц с избыточной массой тела, накоплению генетических факторов и т.п. Немаловажным аспектом, влияющим на распространенность ГА, является также его низкая выявляемость на ранних стадиях заболевания, что обусловлено скудной клинической симптоматикой и недостаточной разработкой существующих диагностических стратегий.

На сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики ГА остается выполнение стандартной рентгенографии коленных суставов и оценка полученных изображений по шкале J.N. Kellgren, J.S. Lawrence [3], позволяющим определять стадию заболевания на основании таких признаков, как сужение суставной щели вследствие истончения субхондральной кости (СХК), наличие остеофитов и появление участков остеосклероза как отражения процессов аномального ремоделирования костной ткани [3].

Однако большинство исследователей склоняются к мнению о возможности использования данного способа оценки состояния суставных структур преимущественно у пациентов с прогрессирующими стадия-

ми ГА, характеризующимися развитием выраженных структурных нарушений в системе СХК. Известно, что при начальных же стадиях заболевания чувствительность данного диагностического подхода остается низкой, что требует разработки дополнительных методологических подходов, в том числе к анализу полученных цифровых изображений [4].

Установлено, что в реализацию патогенетических событий при ГА вовлечены все суставные компоненты, включая суставной гиалиновый хрящ (СГХ), костные структуры, связочный аппарат, а также окружающие мышечные ткани. Вместе с тем, большинство исследователей придерживаются мнения о первостепенной роли структурно-метаболических нарушений в системе СХК как основного инициирующего механизма возникновения и прогрессирования ГА вследствие возникновения микропереломов под воздействием хронических механических нагрузок избыточной силы [5]. Аберрантное субхондральное ремоделирование и ангиогенез, сопровождающиеся патологической иннервацией, способствуют воспалительно-дегенеративным изменениям СГХ с утратой им ключевых высокомолекулярных компонентов, одновременными фенотипическими изменениями хондроцитов и формированием у пациентов стойкого болевого синдрома [6].

Процессы субхондрального ремоделирования при рентгеннегативном ГА могут быть визуализированы более чем у половины пациентов с бессимптомными ранними проявлениями заболевания при помощи Т2-взвешенных МРТ изображений, позволяющих выявлять признаки поражения костного мозга в виде аномалий некистозного характера с высоким уровнем МРТ-сигнала и расположенных в зонах, прилегающих к кальцинированному СГХ [7]. Данный способ оценки состояния суставных структур обладает достаточно высокой информативностью и биологической безопасностью, обеспечиваемой использованием магнитного излучения радиочастотных волн, не оказывающих инвазивного воздействия на живые объекты, однако он остается относительно малодоступным.

Кроме того, до настоящего времени протоколы МРТ-исследований не стандартизованы применительно-

но к начальным проявлениям воспалительно-дегенеративных заболеваний суставов [8].

Достаточно широко используются исследования изменений показателей биохимического состава биологических жидкостей как предикторов развития ОА. На основании многочисленных исследований, проведенных как за рубежом, так и в России, были определены группы биохимических маркеров, отражающих те или иные патогенетические аспекты прогрессирования ОА различной локализации, что позволило сформировать систему «Бремя заболеваний, исследовательские, прогностические показатели, эффективность вмешательства и диагностика» (Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention and Diagnostic/ VIPED) [9]. Применение тестов, объединенных в данную систему, позволяет осуществить оценку обменных процессов в коллагеновых структурах, оценить уровень деструкции СГХ на основании уровня накопления в биологических жидкостях молекул агрекана и гиалуронана, компонентов неколлагеновых белков, формирующих экстрацеллюлярный матрикс опорных соединительных тканей. Научно-практическим сообществом рекомендовано также изучение ряда сигнальных молекул и медиаторов, отражающих основные патогенетические механизмы прогрессирования ОА: цитокинов, хемокинов, белков системы комплемента, показателей окислительного и нитрозативного стресса, факторов роста, отдельных показателей метаболизма СГХ и СХК, и целого ряда других параметров [10]. Вместе с тем, несмотря на наличие глубокого систематизированного подхода при создании данной диагностической системы, в настоящее время вопросы верификации полученных в клинике лабораторных данных, остаются зачастую нерешенными.

Известно, что действие цитокинов при ГА осуществляется как системно, так и короткодистантно, что обеспечивает иммунный ответ как совокупный результат неспецифических и специфических реакций, неотъемлемым участником которых являются лимфоциты, циркулирующие в системном кровотоке, а также мигрирующие в очаг воспалительной деструкции. С изменением уровней цитокинов, факторов комплемента и нарастанием концентраций молекулярных паттернов, связанных с повреждением соединительнотканых структур при ГА, связана активация врожденных иммунных реакций с участием нейтрофилов и макрофагов с вовлечением Toll-подобных рецепторов. Количественные изменения в пулах Т- и В-лимфоцитов, сопровождающих воспалительно-дегенеративные заболевания крупных суставов, обусловлены необходимостью осуществления адаптивного иммунного ответа [11]. Вместе с тем, сведения, касающиеся дебюта ГА, размещенные в доступных реферативных базах, носят достаточно противоречивый характер, что ставит под сомнение возможность применения данных маркеров в клинической практике для верификации диагноза и требует осуществления ранжирования референсных значений в зависимости от возрастной принадлежности пациентов [12]. Таким образом, создание новых диагностических подходов, основанных на применении лабораторных технологий, позволяющих оценить особенности отдельных звеньев патогенеза ранних стадий первичного ГА, является приоритетным направлением

исследований.

Цель исследования – разработка математической модели лабораторных предикторов ремоделирования субхондральной кости у пациентов с ранними проявлениями первичного остеоартроза коленных суставов.

Материал и методы. Исследование было проведено на базе клиничко-диагностического отделения, отделения лучевой диагностики, клиничко-диагностической лаборатории и отдела фундаментальных и клиничко-экспериментальных исследований НИИТОН "СГМУ им. В.И. Разумовского" Минздрава России. В состав основной группы были включены 100 мужчин и 100 женщин, у которых, по данным клиничко-лабораторных исследований, УЗИ, МРТ и КТ-визуализации компонентов коленных суставов, были выявлены признаки начальных проявлений первичного ГА. В зависимости от наличия инструментальных признаков структурных изменений в СХК пациенты были разделены две подгруппы: подгруппа 1 – с признаками нарушения микроархитектоники костной ткани и подгруппа 2 – без таковых. Контрольную группу составили 100 лиц без признаков заболеваний опорно-двигательной системы. Средний возраст пациентов составил 42,4 (35,64; 49,10) года. Соотношение мужчин и женщин в каждой из групп соответствовало 50:50%.

Критерии включения: соответствие параметрам отбора в каждую из групп и информированное письменное добровольное согласие.

Критерии исключения: наличие травм коленных суставов в анамнезе, семейные случаи заболевания ГА, что могло свидетельствовать о наличии его наследственных детерминант, прием НПВС, иммунодепрессантов, а также других препаратов, способных оказать влияние на уровни исследуемых параметров, данные об иммунодефицитных состояниях, недавних хирургических вмешательствах (в течение ближайших 6 месяцев), состоянии менопаузы у женщин, а также наличие соматической патологии, затрагивающей особенности клеточного и биохимического состава крови.

Оценка ортопедического статуса пациентов и верификация диагноза были осуществлены тремя независимыми травматологами-ортопедами на основании клиничко-анамнестического исследования, результатов лабораторных и лучевых методов обследования. При рассмотрении результатов диагностических процедур применяли действующие на территории РФ клинические рекомендации «Гонартроз» в редакции 2021-2023 гг. Кроме того, принимали во внимание обновленные критерии Международного общества исследований остеоартрита OARSI [13].

Стандартная рентгенография коленных суставов была выполнена при помощи рентгеноскопического комплекса OPERA Swing (GMM S.P.A., Италия). Стадирование полученных цифровых изображений проводили по шкале J.H. Kellgren, J.S. Lawrence [3]. УЗИ мягкотканых компонентов коленных суставов выполняли датчиком с частотой 7 МГц на аппарате ACUSON S2000 (Siemens Medical Solutions USA, Inc., США). О начальных дегенеративных изменениях мягких тканей свидетельствовали изменения параметров сигнала, поступающего от СГХ, менисков, связок и мышечных тканей. Учитывали также выраженность синовита как признака локальной воспалительной активности патологического процесса.

Для выполнения МРТ применяли магнитно-резонансный томограф ECHELON 1.5T, (Hitachi Medical Corp., Япония). Были выполнены импульсные последовательности T1, T2 и Pd в режиме сатурации жировой ткани (FSE) в трех проекциях: фронтальной, сагитальной и аксиальной пошагово с толщиной среза 3 мм. Помимо оценки состояния СГХ, в том числе при помощи проведения его T2-релаксометрии, обращали внимание на такие структурные признаки субхондрального ремоделирования, как истончение или уплотнение участков костной ткани, признаки наличия остеофитов, просматривая 14 условных областей в соответствии со стандартными рекомендациями. Кроме того, учитывали наличие признаков отека костного мозга. Наличие остеофитов, краевых заострений СХК и участков остеосклероза осуществляли также при помощи томографа Aquilion (Toshiba Medical Systems, Япония).

Лабораторные методы включали в себя изучение количественного состава основных фенотипов лимфоцитов в образцах стабилизированной антикоагулянт-ом литиевым гепарином крови на цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) по проточной технологии производителя. Дифференциация клеток проводилась при помощи флуоресцентных красителей FITS, PE, APC, PerCP, представленных в готовом наборе Multitest 6-Color TNBK (Becton Dickinson, США). Обработку полученных количественных результатов осуществляли в клинической программе BD FACSDiva 8.0.

С целью изучения состояния гуморального звена врожденного иммунитета в условиях ранних проявлений первичного ГА в сыворотке крови участников исследования учитывали концентрации компонентов системы комплемента C3 и C4 методом иммунотурбидиметрии на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 400 (Hirose Electronic System Co., Ltd., Япония).

Концентрации в образцах сыворотки крови члена суперсемейства фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) и интерлейкинов: ИЛ-1 бета, ИЛ-4, -6 и -10 были определены методом твердофазного ИФА на анализаторе Stat Fax 4200 (Awareness Technology Inc., США). В работе были использованы готовые наборы реактивов производства АО «Вектор Бест» (Россия).

Статистическая обработка проведена при помощи прикладного пакета программ Statistica-10, SPSS-6 и Gretl. Поскольку распределение данных было отличным от нормального по результатам вычисления критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилкса, в данном исследовании использовали непараметрические методы. Результаты представляли в виде медианы (Me) и квартилей 25% и 75%. Для попарного сравнения групп был применен критерий Манна-Уитни. Уровень статистически значимых различий составил $p < 0,05$. Диагностическая значимость разработанного лабораторного алгоритма оценивалась на основании определения чувствительности, специфичности, площади под характеристической кривой AUC. Для разработки математической модели соотношения лабораторных параметров, отражающих процессы ремоделирования СХК, применяли уравнение упорядоченной логистической регрессии. В отношении предложенного способа диагностики провели процедуру внутренней валидации на тренировочной выборке из 100 пациентов и внешней cross-валидации с разделением модели на

блоки в процессе машинного обучения.

Уровень статистической значимости различий составил $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты. При проведении обследования обращало на себя внимание наличие лишь скудной клинической симптоматики у пациентов основной группы, проявлявшейся единичными жалобами на состояние дискомфорта в области коленных суставов при повышенных физических нагрузках. У большинства пациентов врачом-травматологом-ортопедом были выявлены отдельные признаки функциональной недостаточности коленных суставов в виде небольшого ограничения подвижности и крепитации в коленных суставах. Признаков болезненности при пальпации и повышения локальной температуры не отмечали. Никаких изменений качества жизни, связанных с начальными проявлениями ГА, пациенты не отмечали.

Рентгенография коленных суставов пациентов основной группы была малоинформативной, что соответствовало 0-I стадиям заболевания. УЗИ-визуализация продемонстрировала начальные признаки дегенеративных изменений СХК, менисков, компонентов связочного аппарата. Следует отметить, что у 11 пациентов основной группы (подгруппа 1) при выполнении УЗИ были выявлены единичные остеофиты.

По данным МРТ у пациентов основной группы отмечали гипергидратацию хрящевого матрикса вследствие дегенеративных изменений коллагенового каркаса, что сопровождалось увеличением параметров его T2 релаксации. На КТ у ряда пациентов основной подгруппы 1 также выявляли те или иные структурные изменения СХК в виде субхондральных кист, костномозгового отека и наличия единичных заострений костных поверхностей.

Начальные изменения опорных соединительных тканей коленных суставов у пациентов основных подгрупп сопровождались изменениями ряда изученных показателей (табл. 1).

Ранние стадии ГА сопровождались повышением концентрации белков системы комплемента, поступающих в сыворотку крови 1 и 2 подгрупп основной группы (на 23 и 26%, соответственно) (см. табл. 1). У пациентов с ранними стадиями ОА отмечали уменьшение количества Т-лимфоцитов преимущественно за счет уменьшения численности цитотоксических клеток с фенотипом CD3+CD8+. Статистически значимые различия параметров в основной группе затрагивали популяцию CD3+CD4+, снижение численности которой в подгруппе 2 превышало аналогичные значения в подгруппе 1 на 15%. В то же время, число клеток, несущих кластеры дифференцировки CD3+CD8+, у пациентов в основной подгруппе 2 было ниже, чем в основной подгруппе 1 на 23,3%.

Обращали на себя внимание также более высокие значения циркулирующих в крови Т-хелперов у пациентов основной подгруппы 1. У пациентов обеих основных групп было выявлено повышение концентрации в сыворотке крови C3 и C4 белков системы комплемента, составившее 17% и 31,5% в основной подгруппе 1 и 28% и 21% в основной подгруппе 2, соответственно. Различия между основными подгруппами по данным показателям составили порядка 9 и 8%.

Таблица 1

Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови, концентраций С3 и С4 компонентов системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия структурных изменений в субхондральной кости

Параметры / Группа	Контрольная группа 0, n=100	Основная подгруппа 1, n=100	Основная подгруппа 2, n=100	p
Содержание в крови CD3+, cells/ μ l	1596,0 (1468; 638,5)	1226 (1179; 1275)	1179 (1094,86; 1254)	* p_{0-1} <0,0001 p_{1-2} =0,0667 * p_{0-2} <0,0001
Содержание в крови CD3+ CD4+, cells/ μ l	709 (658,5; 752,5)	755 (715; 791)	643,6 (598,68; 713)	p_{0-1} =0,1931 * p_{1-2} =0,000276 * p_{0-2} =0,042486
Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/ μ l	904 (807,5; 973,5)	456,5 (412,7; 502,86)	595 (311,19; 652,24)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,01471044 p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови С3, г/л	113 (101,5; 117)	132 (127; 140)	144,5 (139; 152)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,00041 * p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови С4, г/л	19 (17; 21)	25 (24; 27)	23 (20; 27)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,0202785 * p_{0-2} =0,0004138
Концентрация в сыворотке крови ФНО-альфа, пг/мл	3,24 (2,625; 3,395)	6,36 (5,99; 7,13)	5,32 (4,73; 6,860)	* p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,0107626 * p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-4, пг/мл	5,0 (4,75; 5,25)	4,4 (4,1; 4,8)	3,95 (3,7; 4,31)	p_{0-1} =0,000042 * p_{1-2} =0,0098834 p_{0-2} <0,0001
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-10, пг/мл	6,83 (5,07; 7,22)	9,31 (8,91; 10,11)	8,34 (7,78; 9,08)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,00003 p_{0-2} =0,358267786
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-6, пг/мл	2,75 (2,25; 2,94)	2,77 (2,61; 3,11)	2,88 (2,66; 3,07)	p_{0-1} =0,788741 p_{1-2} =0,636149 p_{0-2} =0,358268
Концентрация в сыворотке крови ИЛ-1 бета, пг/мл	2,78 (2,485; 3,3)	6,1 (5,18; 6,64)	5,13 (4,13; 6,36)	p_{0-1} <0,0001 * p_{1-2} =0,033258 p_{0-2} <0,0001

Примечание: * - Статистически значимая разница показателей при попарном сравнении с использованием критерия Манна-Уитни между: p_{0-1} – контрольной группой и основной подгруппой 1; p_{1-2} – основными подгруппами 1 и 2; p_{0-2} – контрольной группой и основной подгруппой 2 при $p < 0,05$.

Дебют ОА сопровождался дисбалансом цитокинов, циркулирующих в сыворотке крови, что нашло свое отражение в двухкратном повышении концентрации ИЛ-1 бета, увеличении значений ФНО-альфа на 95% в основной подгруппе 1, и на 64% в основной подгруппе 2. Нарастание содержания ИЛ-10 было менее выраженным, в обеих основных подгруппах оно составляло порядка 36,3%, что на 22% выше нормальных показателей. Концентрация же ИЛ-4, напротив, снижалась – на 14% и 26,5% соответственно по сравнению с результатами контрольных измерений.

С целью определения диагностической значимости отдельных лабораторных показателей, примененных в данной работе, с точки зрения ранжирования пациентов основной группы был выполнен ROC-анализ, результаты которого представлены в табл. 2. Учитывая отсутствие достоверных различий концентраций ИЛ-6 в сыворотке крови у пациентов всех групп, при проведении дальнейших вычислений данный параметр не рассматривали.

Согласно полученным результатам, все избранные переменные демонстрируют различные уровни чувствительности и специфичности. Исходя из значений AUC, все использованные в исследовании тесты демонстрируют наличие необходимого уровня классификационной способности, т. е. пригодность для решения поставленной задачи – разделения пациентов с ранними проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия струк-

турных проявлений ремоделирования СХК.

С целью создания математической модели, основанной на изученных лабораторных переменных, отражающих наличие у пациентов признаков структурных проявлений вовлечения в патологический процесс СХК, было использовано уравнение пошаговой упорядоченной логистической регрессии. Данный методологический подход был основан на последовательном исключении переменных в соответствии с критериями значимости для модели в целом и для искомых коэффициентов. С помощью данного математического инструмента было определено наличие/отсутствие связей между исследованными бинарными и непрерывными переменными с уровнем значимости для каждого из компонентов ($p < 0,05$).

Таким образом, для описания соотношения значений изученных лабораторных параметров у пациентов с инструментально подтвержденными структурными изменениями костной ткани было получено следующее выражение: $X = 6,37 - (0,005 * \text{Содержание в крови CD3+, cells/}\mu\text{l}) - (0,006 * \text{Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/}\mu\text{l}) - (0,062 * \text{Концентрация в сыворотке крови С3, г/л}) + (0,25 * \text{Концентрация в сыворотке крови С4, г/л}) + (0,36 * \text{Концентрация в сыворотке крови ФНО-альфа, пг/мл}) + (0,44 * \text{Концентрация в сыворотке крови ИЛ-4, пг/мл}) - (0,38 * \text{Концентрация в сыворотке крови ИЛ-1 бета, пг/мл})$.

Показатели диагностической ценности определения субпопуляционного состава лимфоцитов крови, концентраций С3 и С4 компонентов системы комплемента и цитокинов в сыворотке крови у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия признаков структурных изменений субхондральной кости

Параметры / критерии	Чувстви-тельность, %	Специ-фичность %	AUC, %	95СІ% нижний-верхний для AUC	p
Содержание в крови CD3+, cells/μl	76,6	56,7	0,638	0,500-0,778	p=0,0929
Содержание в крови CD3+ CD4+, cells/μl	83	73	0,773	0,654-0,893	*p=0,00235
Содержание в крови CD3+ CD8+, cells/μl	98	63,3	0,683	0,548-0,810	*p=0,0360
Концентрация в сыворотке кро-ви С3, г/л	63,3	86,7	0,808	0,697-0,919	*p=0,00053
Концентрация в сыворотке кро-ви С4, г/л	93,3	56,7	0,674	0,538-0,811	*p=0,0441
Концентрация в сыворотке кро-ви ФНО-альфа, пг/мл	90	63,3	0,692	0,558-0,826	*p=0,02956
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-4, пг/мл	56,7	73,3	0,694	0,560-0,827	*p=0,02799
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-10, пг/мл	60	95,75	0,814	0,704-0,923	*p=0,0004
Концентрация в сыворотке кро-ви ИЛ-1 бета, пг/мл	83,3	50	0,660	0,522-0,798	*p=0,05999

Примечание. AUC (Area Under Curve) – площадь под кривой, ограниченная ROC-кривой и осью доли положительных результатов; *p – статисти-чески значимая разница значений, достигнутая между основными подгруппами 1 и 2 (p<0,05).

На основании изучения уровней переменных, отме-ченных у пациентов основной группы, рассчитывали вероятность наличия структурных изменений СХК по следующей формуле:

$$p=1-1/(1+\exp(X)).$$

При полученном значении $p<0,5$ прогнозировали отсутствие структурных изменений СХК у пациентов с начальными проявлениями первичного ГА, при $p\geq 0,5$ – наличие.

Таким образом, о наличии структурных изменений СХК можно судить на основании совокупных измене-ний следующих лабораторных параметров: содержа-ние в крови CD3+, cells/μl; CD3+ CD4+, cells/μl; кон-центрация в сыворотке крови С3, г/л; С4 г/л; ИЛ-10 пг/мл; ИЛ-1 бета, пг/мл. Данное выражение характери-зует изменения изученных лабораторных параметров у пациентов с ранними проявлениями первичного ГА со структурными изменениями СХК (положительный результат) – в 81,7% случаев, и указывает на пациентов без инструментально подтвержденных структурных изменений костной ткани (отрицательный результат) – в 80,5% случаев.

При помощи уравнения логитрегрессии прове-дена оценка прогностической значимости выражения X, согласно которому:

$$\text{Чувствительность } Se = \frac{TP}{TP+FN} * 100\% = \frac{49}{49+16} * 100\% = 75,4\%;$$

$$\text{Специфичность } Sp = \frac{TN}{TN+FP} * 100\% = \frac{66}{66+11} * 100\% = 85,7\%;$$

$$\text{Точность } = 80,9\%. \text{ Acc} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} * 100\% = 80,9\%.$$

Прогностичность положительного результата

$$PVP = \frac{TP}{TP+FP} * 100\% = 81,7\%.$$

Прогностичность отрицательного результата

$$PVN = \frac{TN}{TN+FN} * 100\% = 80,5\%.$$

Была проведена внутренняя валидация вычислен-ной математической модели на случайной тренировоч-ной выборке (Tr), состоящей из 100 архивных историй болезни пациентов с ранними проявлениями первич-ного ГА, а также тестовой выборке (Tst). Чувствитель-ность, специфичность и точность Tr составила: 0,76; 0,84 и 0,79 соответственно. В выборке Tst данные пока-затели составили: 0,75; 0,85 и 0,80. Полученные резуль-таты свидетельствовали о стабильности вычисленной модели и возможности ее клинического использования для описания целевых объектов в соответствии с по-ставленными задачами, а именно – оценки особен-ностей изменений лабораторных параметров у пациен-тов с ранними проявлениями первичного ГА в зависимости от наличия инструментально подтверждаемых струк-турных изменений в системе субхондральной кости.

Таким образом, диагностическая и прогностическая значимость вычисленной математической модели яв-ляется удовлетворительной, и позволяет рассматривать ее в качестве диагностического инструмента, который дает возможность выявлять пациентов с начальными проявлениями первичного ГА, имеющих структурные проявления нарушений ремоделирования СХК.

Обсуждение. Раннее выявление начальных стадий первичного ГА является сложной задачей, поскольку клиническая симптоматика у данной категории паци-ентов практически не проявляет себя, а скрининговые исследования ограничиваются малоинформативной на данном этапе стандартной рентгенографией коленных суставов [14]. Поздняя обращаемость пациентов с сим-птоматическими формами ОА к специалистам травма-толого-ортопедического и ревматологического профи-лей существенно снижает эффективность проводимых

лечебных мероприятий, поскольку развернутые стадии заболевания являются скорее объектом паллиативной медицины, основной задачей которой является купирование выраженного болевого синдрома и обеспечение функциональности конечности, что достигается в результате полной замены пораженного сустава при проведении его первичной артропластики [15].

Возрастной спектр пациентов с более высокой вероятностью обнаружения ранних стадий ОА, по мнению большинства авторов, очерчен 50-летним возрастом, однако разработка скрининговых тестов для данной категории потенциальных пациентов остается дискуссионной задачей, во многом из-за отсутствия стандартизированных подходов [16]. По мнению R. Aggarwal и соавт. [17], существенным препятствием для разработки парадигмы патогенеза раннего ОА и подбора соответствующих лабораторных тестов, направленных на выявление начальных стадий заболевания, в настоящее время являются действующие классификационные критерии, разработанные для однородных групп пациентов без учета индивидуальных особенностей ремоделирования СГХ и СХК, и охватывающих лишь рентгенопозитивные стадии заболевания. Анализируя сложность разработки ранних диагностических критериев ОА, российские исследователи Л.И. Алексеева Л.И. и К.А. Тельшев [18] в 2020 году выделили такие причины сравнительно низкой их эффективности, как полиэтиологическая природа заболевания, несоответствие результатов диагностических исследований его клиническим проявлениям, а также отсутствие биохимических предикторов прогрессирования воспалительной деструкции опорных соединительных тканей, формирующих систему пораженного сустава.

Под эгидой экспертной группы CREDO представители различных стран ведут разработку CHECK – совокупности прогностических критериев ранней диагностики остеоартрита, применительно к когортам «коленный сустав» и «тазобедренный сустав». По итогам наблюдений созданы модели раннего ОА, основанные на: 1) совокупности данных анкетирования и физической оценки состояния суставов; 2) дополнительных рентгенологических критериев; 3) исследований уровней белка острой фазы воспаления - С-реактивного протеина. Как указывают результаты ретроспективного 10-летнего наблюдения, данная совокупность параметров демонстрирует наличие положительных корреляционных взаимосвязей с особенностями течения заболевания и имеет прогностическую значимость [19].

Предложенный итальянским Обществом ревматологов набор критериев выявления раннего ГА предназначен преимущественно для симптоматических форм заболевания, основан на опросе, осмотре и анкетировании пациентов без учета лабораторных данных, что существенно ограничивает сферу его применения [20]. Было установлено, что методы лучевой визуализации, такие как МРТ, КТ и УЗИ, значительно превосходят рентген для визуализации мягких тканей суставов и оценки состояния СХК [21]. Использование в нашем исследовании данных методов объективизации состояния суставных компонентов позволило осуществить отбор пациентов с начальными проявлениями ОА, и провести их последующее деление на группы в зависимости от наличия признаков структурных изменений

СХК. Таким образом, следует признать, что высокочувствительные методы лучевой диагностики ранних стадий заболевания позволяют выявлять структурные нарушения как в мягкотканых суставных компонентах, так и в костных структурах.

Вместе с тем, большинство исследователей сходятся во мнении относительно актуальности исследования нарушений метаболических процессов в опорных соединительных тканях как инициальных факторов развития данного вида суставной патологии. Известно, что парадигма патогенеза ранних стадий ОА претерпевает определенные изменения, что обусловлено новыми данными, свидетельствующими о процессах ремоделирования костной ткани под воздействием механической микротравматизации как наиболее ранних механизмах развития ОА [22]. Большинство исследователей считают, что данное обстоятельство обусловлено быстрой адаптацией процессов репарации СХК к меняющимся биомеханическим соотношениям в суставе, тогда как СГХ является более инертной тканью с низким уровнем восстановительных реакций. Рассогласование активности остеокластов и остеобластов при начальных стадиях ОА сопровождается нарушениями поступления в биологические среды соответствующих молекулярных маркеров, где они могут быть выявлены и количественно измерены [23].

Ведущее патогенетическое значение в формировании дисбаланса процессов субхондрального ремоделирования принадлежит остеобластам, функциональная активность которых находится под регуляторным воздействием цитокинов сыворотки крови. Известно, что под влиянием повышенной механической нагрузки в хондроцитах избыточно синтезируется ИЛ-1 бета, который способствует повышению экспрессии RANKL, что косвенно индуцирует образование остеокластов [24].

Полученные в результате проведенных нами исследований данные также свидетельствовали о нарастании уровней провоспалительных цитокинов как ИЛ-1 бета и ФНО- α , что носило наиболее выраженный характер у пациентов с ОА основной группы 1, и свидетельствовало о влиянии данных медиаторов на возникновение структурных изменений СХК. Большинство исследователей считают, что данные регуляторные молекулы способствуют усилению дифференцировки остеокластов посредством активации сигнальных путей NF- κ B и Jun-N-терминальных киназ (JNK), что сопровождается изменениями микроархитектоники СХК [25].

Поддержание хронических низкоуровневых воспалительных реакций в суставных тканях при ОА является результатом активации системы врожденного иммунитета, к которой относят и систему комплемента, участвующей в процессах фагоцитоза и лизиса поврежденных клеток, а также обеспечивающих хемотаксические реакции лейкоцитов [26]. При проведении иммуногистохимической оценки уровней синтеза белков системы комплемента под влиянием триггеров выявили значительное усиление выработки С3 и менее выраженное – С4 у пациентов с ОА. Данная группа авторов отметила, что наиболее значимые показатели экспрессии провоспалительных медиаторов отмечались в зонах отека костного мозга, что способствует поддержанию высокого уровня воспалительной активности [27]. В условиях эксперимента и при проведе-

нии клинических наблюдений было подтверждено, что именно в участках повреждения СХК отмечается не только усиление воспалительных реакций, но и сверхактивация костного ремоделирования [28]. Дисбаланс метаболических процессов в костной ткани в дебюте ОА во многом является результатом экспрессии стимулирующих остеокласты молекул, синтезируемых остеоклестами, расположенными в поврежденных участках СХК, отличающихся высоким уровнем апоптотических процессов [29].

Несмотря на то, что роль иммунной регуляции в процессах ремоделирования СХК при ОА не вызывает сомнений, многие авторы сходятся во мнении, что особенности состояния системы иммунитета в условиях воспалительно-дегенеративных изменений опорных соединительных тканей на сегодняшний день изучены недостаточно [30].

В частности, в доступной литературе нами не было встречено обобщенных математических моделей, отражающих взаимосвязь между ключевыми процессами иммунного регулирования и структурными нарушениями СХК в дебюте первичного ГА.

Использованные нами в процессе проведения исследования методы логистической регрессии позволили выявить соотношение ключевых параметров клеточного иммунитета, соотношения белков системы комплемента и цитокинов, содержащихся в сыворотке крови, взаимосвязанных с формированием структурных нарушений в системе СХК, что позволяет рассматривать данную математическую модель как один из способов малоинвазивной диагностики ранних проявлений первичного ГА, имеющий патогенетическое обоснование.

Выводы. Ранние проявления первичного ГА сопровождаются системными нарушениями количественных соотношений параметров субпопуляций лимфоцитов крови, активацией про- и противовоспалительного звена цитокинов сыворотки крови и системным повышением концентрации С3 и С4 компонентов системы комплемента.

Получена математическая формула соотношений количественных изменений CD3⁺ и CD3⁺CD8⁺ в крови, С3 и С4 компонентов комплемента, ФНО- α , ИЛ-4 и ИЛ-1 бета в сыворотке крови у пациентов с ранними проявлениями первичного гонартроза в зависимости от выраженности процессов субхондрального ремоделирования.

Выбор оптимальных лабораторных маркеров начальных стадий первичного гонартроза, основанный на использовании ROC-анализа данных и применения методологии логистической регрессии, позволяет существенно повысить прогностическую значимость разрабатываемых диагностических алгоритмов.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-3, 5-15, 17, 19-30 СМ. REFERENCES)

4. Кабалык М.А. Спектральные и текстурные характеристики субхондральной кости при гонартрозе. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (2):150.
18. Алексеева Л.И., Тельшев К.А. Ранний остеоартрит: разработка критериев диагностики. *Современная ревматология*. 2020; 14(3):140-5. DOI: 10.14412/1996-7012-2020-3-140-145.

REFERENCES

1. Hunter D.J., March L., Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission. *The Lancet*. 2020; 396(10264): 1711-2. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32230-3.
2. Safiri S., Kolahi A.A., Smith E., Hill C., Bettampadi D., Mansournia M.A. et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann. Rheum. Dis*. 2020; 79(6):819-28. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216515.
3. Kellgren J.H., Lawrence J.S. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 1957; 16(4):494-502. DOI: 10.1136/ard.16.4.494.
4. Kabalyk M.A. Spectral and textural characteristics of subchondral bone in gonarthrosis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (2):150. (in Russian)
5. Holzer L.A., Kraiger M., Talakic E., Fritz G.A., Avian A., Hofmeister A., Leithner A., Holzer G. Microstructural analysis of subchondral bone in knee osteoarthritis. *Osteoporos Int*. 2020; 31(10):2037-45. DOI: 10.1007/s00198-020-05461-6.
6. Su W., Liu G., Liu X., Zhou Y., Sun Q., Zhen G. et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development. *JCI Insight*. 2020; 5(8):e135446. DOI: 10.1172/jci.insight.
7. Hu Y., Chen X., Wang S., Jing Y., Su J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res*. 2021;9(1):20. DOI: 10.1038/s41413-021-00147-z.
8. Sifre V., Ten-Esteve A., Serra C.I., Soler C., Alberich-Bayarri A., Segarra S., Martí-Bonmatí L. Knee cartilage and subchondral bone evaluations by magnetic resonance imaging correlate with histological biomarkers in an osteoarthritis rabbit model. *Cartilage*. 2022; 13(3). DOI: 10.1177/19476035221118166.
9. Boffa A., Merli G., Andriolo L., Lattermann C., Salzmann G.M., Fialdo G. Synovial fluid biomarkers in knee osteoarthritis: a systematic review and quantitative evaluation using BIPEDs criteria. *Cartilage*. 2021; 13(Suppl. 1):82S-103S. DOI: 10.1177/1947603520942941.
10. Henrotin Y. Osteoarthritis in year 2021: biochemical markers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022; 30(2):237-48. DOI: 10.1016/j.joca.2021.11.001.
11. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press; 2012:452-74.
12. Ponchel F., Burska A.N., Hensor E.M., Raja R., Campbell M., Emery P., Conaghan P.G. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23(11):1870-8. DOI: 10.1016/j.joca.2015.06.018.
13. Bannuru R.R., Osani M.C., Vaysbrot E.E., Arden N.K., Bennell K., Bierma-Zeinstra S.M.A. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019; 27(11):1578-89. DOI: 10.1016/j.joca.2019.06.011.
14. Mahmoudian A., Van Assche D., Herzog W., Luyten F.P. Towards secondary prevention of early knee osteoarthritis. *RMD Open*. 2018; 4(2):e000468. DOI: 10.1136/rmdopen-2017-000468.
15. Emery C.A., Whittaker J.L., Mahmoudian A., Lohmander L.S., Roos E.M., Bennell K.L., et al. Establishing outcome measures in early knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2019; 15(7):438-48. DOI: 10.1038/s41584-019-0237-3.
16. Im G.I. The Concept of Early Osteoarthritis and Its Significance in Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Regen. Med*. 2022; 19(3):431-6. DOI: 10.1007/s13770-022-00436-6.
17. Aggarwal R., Ringold S., Khanna D., Neogi T., Johnson S.R., Miller A., Brunner H.I., Ogawa R., Felson D., Ogdie A., Aletaha D., Feldman B.M. Distinctions between diagnostic and classification criteria? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015; 67(7):891-7. DOI: 10.1002/acr.
18. Alekseeva L.I., Telyshev K.A. Early osteoarthritis: development of diagnostic criteria. *Sovremennaya revmatologiya*. 2020; 14(3):140-5. DOI: 10.14412/1996-7012-2020-3-140-145. (in Russian)
19. Runhaar J., Kloppenburg M., Boers M., Bijlsma J.W.J., Bierma-Zeinstra S.M.A., the CREDO expert group. Towards developing diagnostic criteria for early knee osteoarthritis: data from the CHECK study. *Rheumatology(Oxford)*. 2021; 60(5):2448-55. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa643.
20. Migliore A., Scirè C.A., Carmona L., Herrero-Beaumont G., Bizzi E., Branco J. et al. The challenge of the definition of early symptomatic knee

- osteoarthritis: a proposal of criteria and red flags from an international initiative promoted by the Italian Society for Rheumatology. *Rheumatol. Int.* 2017; 37(8):1227-36. DOI: 10.1007/s00296-017-3700-y.
21. Emanuel K.S., Kellner L.J., Peters M.J.M., Haartmans M.J.J., Hooijmans M.T., Emans P.J. The relation between the biochemical composition of knee articular cartilage and quantitative MRI: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022; 30(5):650-62. DOI: 10.1016/j.joca.2021.10.016.
 22. Kim K.I., Lee M.C., Lee J.H., Moon Y.W., Lee W.S., Lee H.J., Hwang S.C., In Y., Shon O.J., Bae K.C., Song S.J., Park K.K., Kim J.H. Clinical Efficacy and Safety of the Intra-articular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Sports Med.* 2023; 51(9):2243-53. DOI: 10.1177/03635465231179223.
 23. Chu L., Liu X., He Z., Han X., Yan M., Qu X., Li X., Yu Z. Articular Cartilage Degradation and Aberrant Subchondral Bone Remodeling in Patients with Osteoarthritis and Osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 2020; 35(3):505-15. DOI: 10.1002/jbmr.3909.
 24. Hu W., Chen Y., Dou C., Dong S. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80(4):413-22. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218089.
 25. Zhong L., Cao L., Song R., Yang X.F., Li J.L., Yang H.T., Zhou H.X., Fan H.T. Glutamine exerts a protective effect on osteoarthritis development by inhibiting the Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa-B signaling pathways. *Sci Rep.* 2022; 12(1):11957. DOI: 10.1038/s41598-022-16093-7.
 26. Sarma J.V., Ward P.A. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(1):227-235. DOI: 10.1007/s00441-010-1034-0.
 27. Assirelli E., Pulsatelli L., Dolzani P., Mariani E., Lisignoli G., Adimanda O., Meliconi R. Complement Expression and Activation in Osteoarthritis Joint Compartments. *Front Immunol.* 2020; 11:535010. DOI: 10.3389/fimmu.2020.535010.
 28. Lacourt M., Gao C., Li A., Girard C., Beauchamp G., Henderson J.E., Laverty S. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20(6):572-83. DOI: 10.1016/j.joca.2012.02.004.
 29. Kennedy O.D., Laudier D.M., Majeska R.J., Sun H.B., Schaffler M.B. Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo. *Bone.* 2014; 64:132-7. DOI: 10.1016/j.bone.2014.03.049.
 30. Weber A., Chan P.M.B., Wen C. Do immune cells lead the way in subchondral bone disturbance in osteoarthritis? *Prog Biophys Mol Biol.* 2019; 148:21-31. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.12.00.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Авдеева А.С.¹, Алексанкин А.П.^{1,2}, Горбунова Ю.Н.¹, Панафидина Т.А.¹, Попкова Т.В.¹

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВНЯ CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАННЕЙ СТАДИЕЙ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им В.А. Насоновой, 115522, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 117418, Москва, Россия

Цель: изучить особенности субпопуляций В-лимфоцитов и уровень CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией системной красной волчанки (СКВ).

Материал и методы. В исследование включены 139 пациентов (123 женщины (88%) и 16 мужчин (12%)), с достоверным диагнозом системной красной волчанки (СКВ); медиана длительности СКВ составила 3,0 [0,3;12,0] года - 84 были с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев); активность заболевания соответствовала средней - SLEDAI-2K 7 [4;11] баллов, индекс повреждения – низкому: SDI 0 [0;1] баллов. Субпопуляции В-лимфоцитов - включая определение В-клеток (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), не переключенных (CD19+IGD+CD27+) и переключенных (CD19+IGD-CD27+) В-клеток памяти, наивных (CD19+IGD+CD27-), транзиторных (CD19+IGD+CD10+CD38++CD27-) В-клеток, плазмобластов (CD19+CD38+++IGD-CD27+CD20-) и плазматических клеток (CD19+CD38+) и уровень CD4+ Т-лимфоцитов оценивались методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий.

Результаты. Число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ составило (ПК 42,0(35,9-49,6) абс 0,78 (0,46-0,96) и было ниже, чем у здоровых доноров (ПК 52,3 (48,4-56,2), абс 0,9 (0,7-1,2), соответственно, $p < 0,05$). Пациенты с меньшей длительностью заболевания имели более высокое содержание В-лимфоцитов, абсолютное содержание В-клеток памяти (переключенных и не переключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов. Отмечалась позитивная корреляция SLICC с числом двойных негативных В-лимфоцитов ($r=0,3$), отрицательная корреляция с числом транзиторных клеток ($r=-0,33$). Среди пациентов с нефритом был выявлен более высокий уровень В-клеток памяти (0,04 (0,02-0,09) и 0,02 (0,01-0,03)); переключенных В-клеток памяти (17,8 (9,6-29,0) 0,04 (0,01-0,08) и 10,17 (5,87-16,11) 0,01 (0,007-0,02)), $p < 0,05$ во всех случаях.

Заключение. Была установлена взаимосвязь между субпопуляциями В-лимфоцитов, активностью и тяжестью СКВ. Уровень общей популяции клеток памяти, «переключенных» клеток памяти, двойных негативных клеток коррелирует с содержанием аутоантител, развитием нефрита и индексом повреждения SLICC.

Ключевые слова: системная красная волчанка; субпопуляции В-лимфоцитов; аутоантитела; активность заболевания

Для цитирования: Авдеева А.С., Алексанкин А.П., Горбунова Ю.Н., Панафидина Т.А., Попкова Т.В. Изучение особенностей субпопуляции В-лимфоцитов и уровня CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией системной красной волчанки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 610-616.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-610-616>

Для корреспонденции: Авдеева Анастасия Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лаб. иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний; e-mail: 9056249400@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы № 1021051402790-6 «Изучение иммунопатологии, диагностики и терапии на ранних стадиях системных ревматических заболеваний».

Поступила 03.05.2024

Принята к печати 04.10.2024

Опубликовано 25.10.2024

Avdeeva A.S., Aleksankin A.P., Gorbunova Y.N., Panafidina T.A., Popkova T.V.

STUDYING B-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND CD4+ T-LYMPHOCYTE LEVEL IN PATIENTS WITH EARLY STAGE OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia;

²Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery" Moscow, Russia

Objective: to study the characteristics of B lymphocyte subpopulations and the level of CD4+ T lymphocytes in patients with early stage systemic lupus erythematosus (SLE).

Material and methods. The study included 139 patients (123 women (88%) and 16 men (12%)) with a definite diagnosis of SLE; the median duration of SLE was 3.0 [0.3; 12.0] years - 84 patients had a disease duration of more than 18 months, 50 patients had early SLE (disease duration of less than 18 months); medium disease activity - SLEDAI-2K 7 [4;11] points, damage index - low: SDI 0 [0;1] points. Subpopulations of B lymphocytes - including determination of B cells (CD19+), general population of memory B cells (CD19+CD27+), non-switched (CD19+IGD+CD27+) and switched (CD19+IGD-CD27+) memory B cells, naive (CD19+IGD+CD27-), transient (CD19+IGD+CD10+CD38++CD27-) B cells, plasmablasts (CD19+CD38+++IGD-CD27+CD20-) and plasma cells (CD19+CD38+) and the level of CD4+ T-lymphocytes was assessed by multicolor flow cytometry using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA). For each analysis, 50,000 events were counted.

Results. The number of CD3+CD4+ T lymphocytes in patients with SLE was (% 42.0 (35.9-49.6) abs 0.78 (0.46-0.96) and was lower than in healthy donors (% 52.3 (48.4-56.2), abs 0.9 (0.7-1.2), respectively, $p < 0.05$. Patients with early SLE had a higher content of B lymphocytes, absolute content of B cells. memory (switched and not switched), plasma, transient and double negative cells, as well as a lower level of plasmablasts. There was a positive correlation of SLICC with the number of double negative B lymphocytes ($r = 0.3$), a negative correlation with the number of transient cells ($r = -0.33$). Among patients with nephritis, a higher level of memory B cells was detected (0.04 (0.02-0.09) and 0.02 (0.01-0.03)); (17.8 (9.6-29.0) 0.04 (0.01-0.08) and 10.17 (5.87-16.11) 0.01 (0.007-0.02)), $p < 0.05$ in all cases.

Conclusion. A relationship was established between B lymphocyte subsets and SLE activity and severity. The level of total memory cell population, switched memory cells, and double negative cells correlates with the level of autoantibodies, the development of nephritis, and the SLICC damage index.

Key words: systemic lupus erythematosus; subpopulations of B-lymphocytes; autoantibodies; disease activity

For citation: Avdeeva A.S., Aleksankin A.P., Gorbunova Y.N., Panafidina T.A., Popkova T.V. Studying B-lymphocyte subpopulations and CD4+ T-lymphocyte level in patients with early stage of systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 610-616 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-610-616>

For correspondence: Avdeeva Anastasia Sergeevna, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunology and Molecular Biology of Rheumatic Diseases; e-mail: 9056249400@mail.ru

Information about authors:

Avdeeva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3057-9175>;

Aleksankin A.P., <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>;

Gorbunova Y.N., <https://orcid.org/0000-0002-2024-6927>;

Panafidina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-1053-6952>;

Popkova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-5793-4689>.

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

Acknowledgment. The article was prepared under the program no. 1021051402790-6 "Study of Immunopathology, Diagnosis and Therapy in the Early Stages of Systemic Rheumatic Diseases".

Received 03.05.2024

Accepted 04.10.2024

Published 25.10.2024

Системная красная волчанка (СКВ) – системное аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и развитием иммуновоспалительного повреждения внутренних органов [1]. Ключевую роль в развитии и прогрессировании СКВ играют В-лимфоциты, активация и дифференцировка которых регулируется Т-лимфоцитами. В то же время, В-лимфоциты нельзя рассматривать как исключительно эффекторные клетки, синтезирующие антитела, они способны презентировать антигены Т-лимфоцитам, продуцировать широкий спектр цитокинов и костимуляторных молекул, рекрутировать субпопуляции Т-лимфоцитов и дендритных клеток [1,2]. Несмотря на успехи в изучении роли В лимфоцитов и подробной характеристики отдельных субпопуляций, по-прежнему остается целый ряд нерешенных вопросов. Это связано с тем, что часть данных о роли В-лимфоцитов получена при изучении животных моделей и не дает полного представления о В-лимфоцитах человека; постоянное совершенствование методов лабораторной диагностики позволяет выявлять новые субпопуляции клеток, требующих изучения; существуют определенные сложности с выделением отдельных фенотипов В-лимфоцитов, связанные с наличием общих поверхностных маркеров, а также остается ряд вопросов дифференцировки В-лимфоцитов и связи субпопуляций между собой. Известно, что фенотип лимфоцитов периферической крови значительно отличается от лимфоцитов, находящихся в очаге воспаления,

однако, учитывая технические сложности, связанные с забором биоматериала, изучение именно иммунофенотипа клеток периферической крови позволяет получить важную информацию о патологических процессах, уточнив стадию дифференцировки лимфоцитов, функциональные различия клеток, статус активации и участие в клеточном сигналинге. [3].

Метод многоцветной проточной цитометрии является наиболее информативным инструментом для изучения иммунофенотипа клеток периферической крови. Основными поверхностными маркерами, используемыми для классификации периферических В клеток человека являются мембранные антигены CD19, IgD, CD38, CD27. CD27 – универсальный маркер клеток памяти, позволяющий отличить их от наивных В-лимфоцитов (CD27-/IgD+). CD27+ клетки памяти подразделяются на IgD+/IgM+ - клетки памяти до переключения и IgD-/IgG+, IgA+ - клетки памяти после переключения [4].

Особенности субпопуляций В- и Т-лимфоцитов широко изучаются у пациентов с СКВ. Большинство авторов указывают на снижение содержания не переключенных клеток памяти и повышение числа переключенных клеток памяти, а также эффекторных клеток памяти (двойных негативных) при СКВ по сравнению со здоровыми донорами [5-8]. Что касается Т-клеточного звена иммунитета, для пациентов с СКВ, в отличие от здоровых доноров, характерно повышение содержания эффекторных CD3+CD4+CCR7-CD45RA-Т-клеток памяти и уменьшение доли CCR7+ CD45RA-CD4+ Т-клеток центральной памяти [9-11].

В последнее время в литературе широко обсуждается регуляторная роль В-лимфоцитов. Интерес

ученых сосредоточен на В –регуляторных клетках (Vreg) [12,13]. Однако учитывая низкий уровень Vreg в периферическом кровотоке, сложность их детекции, интерес исследователей сосредоточен на сходной по функциям клеточной субпопуляции – транзиторных В-лимфоцитах. Транзиторные В-клетки (TrV-клетки) представляют собой незрелые В-клетки костномозгового происхождения, которые могут быть предшественниками зрелых В-лимфоцитов [14]. TrV лимфоциты составляют примерно 4% всех CD19+ В-лимфоциты у здоровых людей [14]. TrV лимфоциты имеют фенотип CD24^{hi}CD38^{hi} и функционально и физиологически тесно связаны с регуляторными В-клетками, продуцирующими ИЛ-10. TrV лимфоциты также способны продуцировать ИЛ-10 и регулировать пролиферацию и дифференцировку CD4+ Т-лимфоцитов в Т-хелперные или эффекторные клетки [15]. Таким образом, целью работы стало изучение особенностей субпопуляций В лимфоцитов и CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией СКВ

Материал и методы. В наблюдательное проспективное исследование включены 139 пациентов: 123 женщины (88%) и 16 мужчин (12%), с достоверным диагнозом СКВ, соответствующим классификационным критериям Международного объединения клиник по СКВ (Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 2012г [16]. Медиана возраста на момент включения составила 34 (26;41) года. Все пациенты наблюдались в клинике ФГБНУ НИИР им. В.А.Насоновой и подписали информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом. Критерии не-включения: возраст моложе 18 лет или старше 70 лет, применение любых генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) в течение последних 2-х лет, наличие беременности/лактации, тяжелой сопутствующей патологии (острые инфекции и обострение хронических инфекционных заболеваний, тяжелое поражение центральной нервной системы (ЦНС) (судороги, психоз, делирий, галлюцинации, кома), любые злокачественные новообразования или предраковые состояния на момент обследования и в анамнезе за последние 5 лет, алкогольная и наркотическая зависимости, параллельное участие в клинических исследованиях различных препаратов.

При включении в исследование медиана длительности СКВ составила 3,0 (0,3;12,0) года, активность заболевания соответствовала средней - SLEDAI-2K 7 (4;11) баллов, индекс повреждения – низкому: SDI 0 (0;1) баллов. Среди включенных в исследование пациентов 84 были с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев). На момент включения в исследование основными клиническими проявлениями СКВ являлись: гематологические нарушения (57%) с преобладанием лейкопении (37%), поражение суставов (артриты/артралгии) (40%), волчаночный нефрит (27%) с преобладанием IV (35%) и V (31%) классов по данным нефробиопсии, нерубцовая алопеция (25%), livedo reticularis (19%) и интерстициальное поражение легких (16%). Подавляющее большинство пациентов (94%) имели положительные антинуклеарный фактор (АНФ), антитела к двуспиральной ДНК (анти-дс-ДНК) (70%)

и гипокомплементемии по С3 и/или С4 компонентам комплемента (64%). Из лекарственных препаратов наибольшее число пациентов, включенных в исследование, принимали преднизолон (84%) в низких дозах (Ме 10,0 [6,25; 20,0] мг/сут) в сочетании с гидроксихлорохином (ГХ) (81%) в дозе 200 мг/сут. Кроме того, 19/139 (14%) пациентов не получали терапию — это были как впервые заболевшие, так и длительно болеющие СКВ, но самостоятельно отменившие лечение.

Всем пациентам проводилось общепринятое клиническое, лабораторное и инструментальное обследование с использованием стандартных методов. Активность СКВ определили с помощью индекса Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index в модификации 2К (SLEDAI-2K) [17]. Для оценки необратимых органических повреждений применяли индекс Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index (SDI) [18]. Уровень антинуклеарного фактора (АНФ) определялся методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием коммерческого набора реагентов «IMMCO Diagnostics», США. Специфические АНА к отдельным ядерным антигенам определялись с использованием коммерческих наборов реагентов («ORGENTEC Diagnostika», Германия). По рекомендации фирмы-изготовителя нормальные значения составляли: анти-дс ДНК – 0,0-20,0 МЕ/мл, анти-Sm – 0,0-25,0 Ед/мл, анти-Ro/SS-A – 0,0-25,0 Ед/мл, анти-La/SS-B – 0,0-25,0 Ед/мл, aКЛ-IgG – 0,0-10,0 GPL, aКЛ-IgM – 0,0-7,0 MPL, aβ2-ГП I IgG – 0,0-8,0 Ед/мл, aβ2-ГП I IgM – 0,0-8,0 Ед/мл.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение процентного и абсолютного количества общей популяции Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), В-клеток (CD19+), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуорометрии на анализаторе Navios (“Beckman Coulter”, США). Использовались коммерческие наборы моноклональных антител: CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (“Beckman Coulter”, США) и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (“Beckman Coulter”, США). Для подсчета абсолютного количества (абс) Т, В-лимфоцитов использовался набор реагентов для прямого определения лимфоцитов Flow-Count™ Fluorospheres (“Beckman Coulter”, США) которые являются измеряемой суспензией флуоресцирующих микросфер.

Имунофенотипирование В-лимфоцитов периферической крови, включая определение В-клеток (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), непереключенных (CD19+IGD+CD27+) и переключенных (CD19+IGD-CD27+) В-клеток памяти, наивных (CD19+IGD+CD27-), транзиторных (CD19+IGD+CD10+CD38++CD27-) В-клеток, плазмобластов (CD19+CD38+++IGD-CD27+CD20-) и плазматических клеток (CD19+CD38+), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуорометрии. Использовались конъюгированные моноклональные антитела (mAT): CD19-ECD (r phycoerythrin-Texas red®-X, IgG1, фикоэритрин тexasский красный); CD45-PC7 (r phycoerythrin cyanin 7, IgG1, фикоэритрин цианин 7), CD38-PC5 (r phycoerythrin cyanin 5.1, IgG1, фикоэритрин цианин 5.1); CD20-PC5 (Beckman Coulter, США); CD10-PE (IgG1, hi10a), CD27-PE (IgG1, mT271) (Becton

Dickinson, США), а также человеческие мАТ: IgD-FITC (fluorescein isothiocyanate, ia62, флуоресцеинизотиоцианат) (Becton Dickinson, США). Изотипический (негативный) контроль проводился для определения границ неспецифического связывания рецепторов В-лимфоцитов с мАТ с помощью набора реагентов simultest imK plus Kit (CD45-FITC, CD14-PE, CD3-FITC, CD19-PE, CD4-FITC, CD8-PE) и IgG1-FITC, IgG2a-PE (Becton Dickinson, США).

Оценку результатов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. В-клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США). При гейтировании по горизонтальной и вертикальной осям определяли процентная концентрация (ПК) лимфоцитов (CD45+) и В-клеток (CD19+), а на основании экспрессии поверхностных мембранных маркеров IgD, CD20, CD27, CD38, CD10 проводили количественное измерение субпопуляций В-клеток.

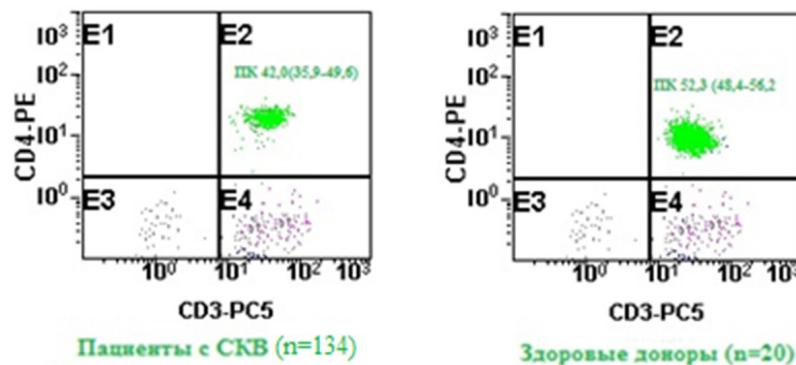
Контрольную группу составили 20 здоровых доно-

ров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна–Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела–Уоллеса, результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом [25–75-й процентиля]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Субпопуляции лимфоцитов были проанализированы в группе из 134 пациентов, у 5 пациентов их определить не удалось по техническим причинам. Число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ составило (ПК 42,0(35,9-49,6) абс 0,78 (0,46-0,96) у здоровых доноров (ПК 52,3 (48,4-56,2), абс 0,9 (0,7-1,2), что было достоверно выше по сравнению с пациентами с СКВ, $p < 0,05$ (см. рисунок).

Т хелперы CD3+CD4+



Относительное содержание CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров.

Таблица 1

Содержание В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров, Me (25-75 перцентиль)

Параметры		Пациенты с СКВ, (n=134)	Доноры (n=20)
CD19+В-лимфоциты	ПК	9,5 (4,1- 12,5)	8,7 (7,2- 11,0)
	абс	0,2 (0,1- 0,2)	0,2 (0,1- 0,2)
В-клетки памяти CD19+CD27+	ПК	22,9 (12,1- 26,9)	2,2 (1,1- 3,0)*
	абс	0,03 (0,01- 0,03)	0,004 (0,001- 0,007)*
Не переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD+	ПК	15,8 (7,1- 20,7)	8,4 (3,7- 11,1)*
	абс	0,02 (0,004- 0,03)	0,002 (0,005- 0,02)
Переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD-	ПК	15,7 (6,5- 21,5)	13,6 (9,3- 17,0)
	абс	0,03 (0,006- 0,03)	0,02 (0,01- 0,04)*
Плазматические клетки CD19+CD38+	ПК	72,4 (67,3- 82,5)	0,08 (0,05- 0,1)*
	абс	0,1 (0,04- 0,2)	0,0001 (0,0- 0,004)*
Наивные клетки CD19+CD27-IgD+	ПК	55,1 (44,4- 69,0)	64,5 (57,6- 72,4)*
	абс	0,05 (0,02- 0,1)	0,1 (0,06- 0,1)*
Плазмобласты CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-	ПК	3,4 (0,9-4,6)	0,2 (0,1- 0,2)*
	абс	0,003 (0,001- 0,004)	0,0003 (0,0001- 0,0004)*
Транзиторные клетки CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-	ПК	16,2 (6,0- 19,7)	0,08 (0,0- 0,1)*
	абс	0,03 (0,01- 0,03)	0,0001 (0,0- 0,0003)*
Двойные негативные В-клетки CD19+CD27-IgD-	ПК	13,3 (7,4- 15,3)	13,7 (7,1- 19,3)
	абс	0,02 (0,01- 0,02)	0,02 (0,01- 0,02)

Примечание. Здесь и в табл.2: * - $p < 0,05$ между группами.

Была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь ПК CD3+CD4+ Т- лимфоцитов с анти-дс-ДНК ($r=-0,59$, $p=0,02$) и абс. уровня CD3+CD4+ Т-лимфоцитов с активностью заболевания по SLEDAI-2K ($r=-0,61$, $p=0,009$). Достоверных различий в уровне CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в зависимости от активности заболевания и наличия органических поражений получено не было.

Сравнение субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров представлено в табл.1.

Как видно из табл.1, у пациентов с СКВ отмечалась более высокая ПК и абс. уровень В-клеток памяти; ПК не переключенных клеток памяти, абс уровень пере-

ключенных В- клеток памяти, ПК и абсолютного уровня плазматических клеток, плазмобластов и транзиторных В-лимфоцитов, а также более низкая ПК и абс. наивных В- лимфоцитов ($p<0,05$).

Среди включенных в исследование пациентов 84 больных был с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев). В этих двух группах были оценены субпопуляции В-лимфоцитов (табл.2). Учитывая меньшую длительность иммуносупрессивной терапии в группе ранней СКВ, а также включенные в нее 19 пациентов не получавших терапию, дальнейший анализ данной группы представляется крайне интересным.

Таблица 2

Содержание субпопуляций В- лимфоцитов у пациентов с СКВ в зависимости от длительности заболевания, Ме (25-75 перцентиль)

Параметры		Пациенты с СКВ с длительностью более 18 мес (n=84)	Пациенты с СКВ с длительностью менее 18 мес (n=50)
		Значение	Значение
CD19+В-лимфоциты	ПК	6,24 (3,6-10,02)	12,455 (8,09-19,4)*
	абс	0,075 (0,05-0,15)	0,152 (0,06-0,33)*
В-клетки памяти CD19+CD27+	ПК	17,94 (12,2-26,9)	15,9 (11,98-25,8)
	абс	0,015 (0,07-0,03)	0,03 (0,01-0,06)*
Не переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD+	ПК	14,46 (7,89-20,7)	12,27 (6,73-20,1)
	абс	0,009 (0,004-0,02)	0,016 (0,008-0,03)*
Переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD-	ПК	14,4 (6,21-21,9)	11,19 (8,03-19,9)
	абс	0,01 (0,004-0,02)	0,0145 (0,009-0,04)*
Плазматические клетки CD19+CD38+	ПК	77,26 (66,0-82,6)	77,465 (72,2-82,2)
	абс	0,067 (0,03-0,014)	0,1345 (0,07-0,25)*
Наивные клетки CD19+CD27-IgD+	ПК	57,2 (14,5-68,9)	59,025 (49,2-69,7)
	абс	0,035 (0,02-0,09)	0,09 (0,03-0,2)*
Плазмобласты CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-	ПК	2,92 (1,15-4,96)	1,65 (0,53-2,9)*
	абс	0,002 (0,001-0,004)	0,002 (0,001-0,004)
Транзиторные клетки CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-	ПК	9,97 (6,02-21,2)	11,645 (5,9-16,8)
	абс	0,009 (0,004-0,02)	0,0165 (0,008-0,04)*
Двойные негативные В-клетки CD19+CD27-IgD-	ПК	11,6 (7,45-15,6)	10,145 (7,1-14,9)
	абс	0,008 (0,005-0,016)	0,015 (0,009-0,03)*
CD4+ Т-клетки	П.К.	44,88 (35,7-51,2)	45,96 (33,9-51,2)
CD4+	абс	0,77443 (0,46-0,93)	0,69375 (0,36-0,83)

Как видно из табл. 2, пациенты с меньшей длительностью заболевания имели более высокое содержание В-лимфоцитов, абсолютное содержание В- памяти (переключенных и не переключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов.

Среди пациентов с ранней СКВ выявлено достоверное отличие уровня транзиторных В-лимфоцитов в зависимости от активности болезни: в группе с низкой активностью - 13,02 (7,6-21,5) и 0,02 (0,009-0,05) у пациентов с высокой активностью - 10,2 (4,2-13,9) и 0,01 (0,005-0,02).

Был выявлен ряд корреляций: позитивная корреляция SLICC с числом двойных негативных В-лимфоцитов ($r=0,3$), отрицательная корреляция в числом транзиторных клеток ($r=-0,33$); положительная корреляция анти-Ro/SS-A с числом клеток памяти ($r=0,38$), позитивная корреляция протеинурии с числом В-лимфоцитов ($r=0,35$), В-клеток памяти ($r=0,38$), переключенных В-клеток памяти ($r=0,42$), плазматиче-

ских клеток ($r=0,35$), двойных негативных лимфоцитов ($r=0,42$), $p<0,05$ во всех случаях.

Среди пациентов с нефритом был выявлен более высокий уровень В-клеток памяти (0,04 (0,02-0,09) и 0,02 (0,01-0,03)); переключенных В-клеток памяти (17,8 (9,6-29,0) 0,04 (0,01-0,08) и 10,17 (5,87-16,11) 0,01 (0,007-0,02)) и более низкий уровень наивных В-лимфоцитов (53,9 (41,4-65,4) и 61,5 (56,1-73,9), $p<0,05$ во всех случаях.

Обсуждение. Был проведен анализ содержания ряда субпопуляций В- лимфоцитов, а также уровня CD4+ Т-лимфоцитов в периферическом кровотоке пациентов с СКВ в зависимости от длительности заболевания. Особый интерес представляет группа ранней СКВ, учитывая меньшую продолжительность иммуносупрессивной терапии в данной группе пациентов. Среди пациентов с ранней СКВ, по сравнению с больными с большей длительностью заболевания отмечалось более высокое содержание В- лимфоцитов, абсолютное содержание В-клеток памяти (переключенных и не пе-

реключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов. Полученные нами данные согласуются с литературными. Большинство авторов указывает на повышение уровня переключенных клеток памяти [5,19-22]. Уровень не переключенных клеток памяти в меньшей степени коррелирует с активностью заболевания, содержанием аутоантител; их уровень как правило не изменяется в зависимости от стадии заболевания [22]. Содержание переключенных клеток памяти, напротив, значительно повышено у пациентов с СКВ, для них характерна гиперэкспрессия CXCR3 и более низкая экспрессия CXCR5 по сравнению со здоровыми донорами, что может объяснить их меньшую чувствительность к терапии [11].

Еще одна субпопуляция В-клеток памяти – это двойные негативные В-лимфоциты. Уровень данных В-лимфоцитов как правило повышен у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами [23]; коррелирует с поражением почек, активностью заболевания, и наличием аутоантител. [24] Для этих клеток характерна более высокая экспрессия маркеров активации (CD86, HLA-DR), хемокиновых рецепторов (CXCR3 и CD71) [25], что указывает на связь с aberrантной экстрафолликулярной дифференцировкой. В нашей работе уровень двойных негативных В-лимфоцитов в целом по группе не отличался у пациентов с СКВ и здоровых доноров, однако в подгруппе пациентов с меньшей длительностью заболевания, было выявлено их более высокое содержание, а также позитивная корреляция со SLICC и степенью протеинурии.

Отдельно следует остановиться на роли ТгВ лимфоцитов. ТгВ-клетки представляют собой незрелые В-клетки костномозгового происхождения, которые могут быть предшественниками зрелых В-лимфоцитов [14,15]. ТгВ-лимфоциты способны продуцировать ИЛ-10 и регулировать пролиферацию и дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов в Т-хелперные или эффекторные клетки [26-28]. Содержание CD24^{hi}CD38^{hi} ТгВ-клеток повышено у больных СКВ, болезнью и синдромом Шегрена, системной склеродермией и дерматомиозитом [27-29]. В литературе широко обсуждается выделение различных подтипов ТгВ-лимфоцитов на основании экспрессии ряда поверхностных маркеров, таких как CD27, IgM, IgD, CD10, CD21 и CD32; некоторые исследования показали, что клетки CD27⁺ ТгВ служат своего рода типом Врег и могут быть не просто транзиторными В-клетками [30-32]. Основные функции ТгВ-лимфоцитов заключаются в продукции ИЛ-10, данные клетки способны ограничивать пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и Th17, снижая таким образом уровень провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ФНО α , ИЛ-17), Транзиторные В-лимфоциты способны сдвигать дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов с сторону Трег клеток, также ТгВ-клетки влияют на CD8⁺Т-лимфоциты [33,34]. Помимо синтеза противовоспалительных факторов, ТгВ-клетки также могут секретировать провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-6 и ФНО- α . Данные ряда исследований показали, что частота ИЛ-6-продуцирующих ТгВ-клеток повышена при СКВ, ССД и других аутоиммунных заболеваниях [35-37]. ИЛ-6 ограничивает дифференцировку CD4⁺Т-клеток в Трег и индуцирует аутореактивные

Т-клеточные ответы Т1/Т17 типа [38]. Таким образом, про- и противовоспалительные цитокины, вырабатываемые ТгВ-клетками могут влиять на их функциональную стабильность. Следует отметить, что ТгВ-клетки состоят из ряда подмножеств с различными фенотипическими и регуляторными функциями. В нашей группе пациентов с ранней СКВ выявлено достоверно более высокое содержание данной клеточной субпопуляции в группе пациентов с низкой активностью по SLEDAI-2К, а также отрицательная корреляция со SLICC, что позволяет говорить о регуляторной роли данной клеточной субпопуляции.

Заключение. Была установлена взаимосвязь между субпопуляциями В-лимфоцитов, активностью и тяжестью СКВ. У пациентов с ранней стадией СКВ наблюдается значимое повышение практически всех анализируемых субпопуляций В-лимфоцитов и снижение содержания CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов. Уровень клеток памяти, «переключенных» клеток памяти, двойных негативных клеток коррелирует с содержанием аутоантител, развитием нефрита и индексом повреждения SLICC. Транзиторные В-лимфоциты можно рассматривать как регуляторные клетки, их содержание обратно коррелирует со SLICC и ассоциируется с более низкой активностью по SLEDAI-2К.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 2-5, 9-38 СМ. REFERENCES)

1. Насонов Е.Л., Соловьев С.К., Аршинов А.В. Системная красная волчанка: история и современность. *Научно-практическая ревматология*. 2022; 60(4): 397–412. DOI: 10.47360/1995-4484-2022-397-412.
6. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Меснянкина А.А., Александрова Е.Н., Панафилина Т.А., Соловьев С.К. Характеристика субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у больных активной системной красной волчанкой. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62: 418-22. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-7-418-422.
7. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Меснянкина А.А., Панафилина Т.А., Соловьев С.К., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Корреляция высокого уровня двойных негативных в-лимфоцитов периферической крови с активностью системной красной волчанки. *Медицинский алфавит*. 2016; 19: 27-8.
8. Меснянкина А.А., Соловьев С.К., Александрова Е.Н. Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами. *Научно-практическая ревматология*. 2017; 55(3): 252-60. DOI: 10.14412/1995-4484-2017-252-260.

REFERENCES

1. Nasonov E.L., Soloviev S.K., Arshinov A.V. Systemic lupus erythematosus: history and modernity. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*. 2022; 60(4): 397–412. DOI: 10.47360/1995-4484-2022-397-412. (in Russian)
2. Dörner T, Giesecke C., Lipsky P. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13(5): 243. DOI: 10.1186/ar3433.
3. Tanaka Y, Kubo S, Iwata S, Yoshikawa M., Nakayama S. B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 2018;186: 21-5. DOI: 10.1016/j.clim.2017.07.010.
4. Kaminski D.A., Wei C., Rosenberg A.F., Lee F., Sanz I. Multiparameter flow cytometry and bioanalytics for B cell profiling in systemic lupus erythematosus. *Methods Mol. Biol.* 2012;900: 109-34. DOI: 10.1007/978-1-60761-720-4_6.
5. Kubo N.S., Yoshikawa M., Miyazaki Y., Sakata K., Nakano K., Iwata

- S. et al. Peripheral immunophenotyping identifies three subgroups based on T cell heterogeneity in lupus patients. *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69(10): 2029-37. DOI: 10.1002/art.40180.
6. Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Mesnyankina A.A., Alexandrova E.N., Panafidina T.A., Soloviev S.K. The characteristic of sub-populations of B-lymphocytes of peripheral blood in patients with systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2017; 62 (7): 418-22. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-7-418-422. (in Russian)
 7. Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Mesnyankina A.A., Panafidina T.A., Soloviev S.K., Alexandrova E.N., Nasonov E.L. Association of increased frequencies of peripheral blood double-negative (IgD-CD27-) B-cell subset with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Meditsinskiy alfavit.* 2016; 19: 27-8. (in Russian)
 8. Mesnyankina A.A., Solovyev S.K., Aleksandrova E.N. The time course of changes in B lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus during therapy with biological agents. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya.* 2017; 55(3): 252-60. DOI: 10.14412/1995-4484-2017-252-260. (in Russian)
 9. Becker A.M., Dao K.H., Han B.K. SLE peripheral blood B cell, T cell and myeloid cell transcriptomes display unique profiles and each subset contributes to the interferon signature. *PLoS One.* 2013; 24;8(6): e67003. DOI: 10.1371/journal.pone.0067003.
 10. Nakayamada S., Takahashi H., Kanno Y., O'Shea J.J. Helper T-cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24(3): 297-302. DOI: 10.1016/j.coi.2012.01.014.24.
 11. Nakayamada S., Iwata S., Tanaka Y. Relevance of lymphocyte subsets to B-cell targeted therapy in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Rheum. Dis.* 2015;18(2): 208-18. DOI: 10.1111/1756-185X.12534.18.
 12. Catalán D., Mansilla M.A., Ferrier A., Soto L., Oleinika K. Immunosuppressive mechanisms of regulatory B-cells. *Front. Immunol.* 2021; 29:12: 611795. DOI: 10.3389/fimmu.2021.611795.
 13. Jansen K., Cevhertas L., Ma S., Satitsuksanoa P., Akdis M., van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy.* 2021; 76(9): 2699-2715. DOI: 10.1111/all.14763.
 14. Marie-Cardine A., Divay F., Dutot I., Green A., Perdrix A., Boyer O. et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Immunol.* 2008; 127(1): 14-25. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.013.
 15. Simon Q., Pers J.O., Cornec D., Pottier L., Mageed R.A., Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;137(5): 1577-1584.e10. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.09.014.
 16. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and Validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8): 2677-86. DOI: 10.1002/art.34473.
 17. Gladman D.D., Ibanez D., Urowitz M.B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.* 2002; 29: 288-91.
 18. Gladman D.D., Ginzler E., Goldsmith C., Fortin P., Liang M., Urowitz M. et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthr. Rheum.* 1996; 39(3): 363-9. DOI: 10.1002/art.1780390303
 19. Tipton C.M., Fucile C.F., Darce J., Chida A., Ichikawa T. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 2015; 16(7): 755-65. DOI: 10.1038/ni.3175.
 20. Kosalka J., Jakiela B., Musial J. Changes of memory B- and T-cell subsets in lupus nephritis patients. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2016; 54(1): 32-41. DOI: 10.5603/FHC.a2016.0005.
 21. Rodríguez-Bayona B., Ramos-Amaya A., Pérez-Venegas J.J., Rodríguez C., Brieva J.A. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(3): R108. DOI: 10.1186/ar3042.
 22. Iwata S., Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus.* 2016; 25(8): 850-6. DOI: 10.1177/0961203316643172.
 23. Wehr C., Eibel H., Masilamani M., Illges H., Schlesier M. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin. Immunol.* 2004; 113(2): 161-71. DOI: 10.1016/j.clim.2004.05.010.
 24. Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2007; 178(10): 6624-33. DOI: 10.4049/jimmunol.178.10.6624.
 25. Korganow A.S., Knapp A.M., Nehme-Schuster H., Soulas-Sprauel P., Poindron V. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J. Autoimmun.* 2010; 34(4): 426-34. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.11.002.
 26. Blair P.A., Norena L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R. et al. CD19(+)/CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010; 32(1): 129-40. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
 27. Carvajal Alegria G., Gazeau P., Hillion S., Daïen C.I., Cornec D. Could lymphocyte profiling be useful to diagnose systemic autoimmune diseases? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017; 53(2): 219-36. DOI: 10.1007/s12016-017-8608-5.
 28. Taher T.E., Ong V.H., Bystrom J., Hillion S., Simon Q., Denton C.P. et al. Association of defective regulation of autoreactive interleukin-6-producing transitional B lymphocytes with disease in patients with systemic sclerosis. *Arthr. Rheumatol.* 2018; 70(3): 450-61. DOI: 10.1002/art.40390.
 29. Piper C.M., Wilkinson M.L., Deakin C.T., Otto G.W., Dowle S., Durland C.L. et al. CD19(+)/CD24(hi)CD38(hi) B cells are expanded in juvenile dermatomyositis and exhibit a proinflammatory phenotype after activation through toll-like receptor 7 and interferon-alpha. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1372. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01372.
 30. Pieper K., Grimbacher B., Eibel H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(4): 959-71. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
 31. Suryani S., Tangye S.G. Therapeutic implications of advances in our understanding of transitional B-cell development in humans. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2010; 6(5): 765-75. DOI: 10.1586/eci.10.55.
 32. Suryani S., Fulcher D.A., Santner-Nanan B., Nanan R., Wong M., Shaw P.J. et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood.* 2010;115(3): 519-29. DOI: 10.1182/blood-2009-07-234799.
 33. Nova-Lamperti E., Fanelli G., Becker P.D., Chana P., Elgueta R., Dodd P.C. et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+ T-cell responses. *Sci. Rep.* 2016;6: 20044. DOI: 10.1038/srep20044.
 34. Flores-borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M.R., Isenberg D.A. et al. CD19+ CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(173): 173ra23. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005407.
 35. Liu M., Guo Q., Wu C., Sterlin D., Goswami S., Zhang Y. et al. Type I interferons promote the survival and proinflammatory properties of transitional B cells in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Mol. Immunol.* 2019; 16(4): 367-79. DOI: 10.1038/s41423-018-0010-6.
 36. Lino A.C., Dorner T., Bar-Or A., Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* 2016; 269(1): 130-44. DOI: 10.1111/imr.12374.
 37. Dieudonne Y., Gies V., Gufroy A., Keime C., Bird A.K., Liesveld J. et al. Transitional B cells in quiescent SLE: An early checkpoint imprinted by IFN. *J. Autoimmun.* 2019; 102: 150-8. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.05.002.
 38. Zhou Y., Zhang Y., Han J., Yang M., Zhu J., Jin T. Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *J. Transl. Med.* 2020; 18(1): 131. DOI: 10.1186/s12967-020-02289-w.



Экспресс-диагностика антибиотикорезистентности
бактериальных штаммов

ИХА-CARBA-5

Быстрый мультиплексный иммуноанализ
для фенотипического обнаружения
и дифференциации пяти распространенных
семейств карбапенемаз с целью выявления
устойчивости колоний микроорганизмов
к антибиотикам группы карбапенемов

Выявление и дифференциация карбапенемаз типов KPC, OXA, VIM, IMP и NDM
— мультирезультат на одной тест-полоске

Исследуемый образец — суточная бактериальная культура, выделенная из биологического материала человека (кровь, моча, фекалии, гной и др.).

Помощь в выборе противомикробной терапии

- своевременного назначения антибиотикотерапии
- коррекция антибиотикотерапии в отсутствие эффекта

Легко внедрить в любые лабораторные условия

- Необходимо только стандартное оснащение микробиологической лаборатории

Удобная комплектация

- для исследования 1 и 20 образцов

Быстрый результат

- определение карбапенемаз через 10 минут
- сокращение преаналитического этапа по сравнению со стандартными методами определения антибиотикорезистентности



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



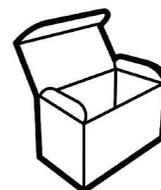
www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

ИНОЗИТОЛ МЕТИЛФОЛАТ

- Улучшает гормональный фон
- Регулирует работу репродуктивной системы
- Восстанавливает подвижность сперматозоидов
- Корректирует метаболические нарушения



на курс

Покупайте
на маркетплейсах

БАД. Не является лекарственным средством

Точный диагноз не выходя из дома



Экспресс-тест
для диагностики
АНГИНЫ
«ИХА-СтрептоА»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для определения
уровня Витамина Д
«ИХА-Витамин D»



Исследуемый
материал:
Капля крови
из пальца

Экспресс-тест
для диагностики
Гриппа А и В
«ИХА-Грипп А и В»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для диагностики
COVID-19
«ИХА-SARS-CoV-2-Ag»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для диагностики
кишечных паразитов
«ИХА-Лямблии»



Исследуемый
материал:
Образцы кала

WILDBERRIES

OZON



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

ЭКОФРИН

Средство для слизистой оболочки носа



Увлажняет



Защищает



Заживляет

Витамин

E

эфирное
масло
лимона

гиалуро-
новая
кислота



Не имеет
побочных
эффектов

Выгодный
объем 50 мл

Без привыкания

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Огиенко О.Н.¹, Бондаренко А.П.¹, Катаева Л.В.², Степанова Т.Ф.², Голубева А.О.¹, Троценко О.Е.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ПНЕВМОНИЯХ (ХРОМОГЕННЫЙ АГАР, БАКАНАЛИЗАТОР VITEK2 СОМПАКТ 30, МАСС-СПЕКТРОМЕТР MICROFLEX)

¹ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, 680610, г. Хабаровск, Россия;

²ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, 625026, г. Тюмень, Россия

Цель работы – сравнительный анализ трех методов идентификации грибов рода *Candida*: с помощью хромогенного агара, баканализатора Vitek 2 Compact 30, масс-спектрометра MicroFlex.

Материал и методы. Исследовано 106 штаммов дрожжевых грибов, выделенных из респираторных образцов больных пневмонией и аутопсийных проб при болезни с летальным исходом в 2022 – 2023 годах.

Результаты. Первоначальная скрининговая идентификация проведена на HiCrome агаре, в результате чего все 106 изолятов разделены на 4 вида *Candida* (*C. albicans* – 54,7%, *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*) – 16,0%, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) – 12,3%, *C. tropicalis* – 11,3%) и изоляты с сомнительной таксономической принадлежностью (5,7%). Последующая идентификация с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex показала сходимость результатов для *C. albicans*: 93,7 – 96,6%, дополнительно выявлены с помощью двух уточняющих методов *C. dubliniensis* и *Clavispora lusitanae* (*Candida lusitanae*). Сходимость результатов для *N. glabrata* (*C. glabrata*): 41,7 – 41,2%, дополнительно выявлены виды *Kluveromyces marxianus*, *P. kudriavzevii* (ранее известные как *C. kefir* и *C. krusei* соответственно), *C. inconspicua*. Для *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) сходимость результатов: 55,6 – 69,2%, дополнительно выявлены виды *C. tropicalis*, *K. marxianus* (*C. kefir*), *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*. Для *C. tropicalis* сходимость результатов равна 100%.

Выводы. Скрининговый метод идентификации грибов рода *Candida* на хромогенном агаре наиболее надежен для *C. albicans* и *C. tropicalis*. В уточняющей идентификации нуждаются изоляты *N. glabrata* (*C. glabrata*) и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*). Дополнительное использование баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex позволило в 14,1% случаев выявить участие грибов *Candida* non-*albicans* в развитии пневмоний. В 1,9% случаев выявлены грибы, не относящиеся к роду *Candida*.

Ключевые слова: дрожжевые грибы; идентификация; хромогенный агар; баканализатор Vitek 2; MALDI-TOF масс-спектрометрия

Для цитирования: Огиенко О.Н., Бондаренко А.П., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Голубева А.О., Троценко О.Е. Сравнительный анализ трех методов идентификации грибов рода *Candida*, выделенных при пневмониях (хромогенный агар, баканализатор Vitek2 Compact 30, масс-спектрометр MicroFlex). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 617-626. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-617-626>

Для корреспонденции: Огиенко Ольга Николаевна, мл. науч. сотр. лаборатории бактериальных инфекций; e-mail: baclab_hniiem@bk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2024
Принята к печати 20.09.2024
Опубликовано 25.10.2024

Ogienko O.N.¹, Bondarenko A.P.¹, Kataeva L.V.², Stepanova T.F.², Golubeva A.O.¹, Trotsenko O.E.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE METHODS FOR IDENTIFYING *CANDIDA* YEAST ISOLATED FROM PNEUMONIA (CHROMOGENIC AGAR, VITEK2 COMPACT 30 BACTERIAL ANALYZER, MICROFLEX MASS SPECTROMETER)

¹FBUN Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 680610, Khabarovsk city, Russia;

²FBUN Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of the Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 625026, Tyumen city, Russia

The purpose of the work is a comparative analysis of three methods for identifying fungi of the genus *Candida*: using chromogenic agar, a Vitek 2 Compact 30 bacterial analyzer, and a MicroFlex mass spectrometer.

Material and methods. We studied 106 strains of yeast fungi isolated from respiratory samples of patients with pneumonia and autopsy samples from a fatal disease in 2022–2023. **Results.** Initial screening identification was carried out on HiCrome agar, as a result of which all 106 isolates were divided into 4 *Candida* species (*C. albicans* - 54.7%, *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*) - 16.0%, *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) - 12.3%, *C. tropicalis* – 11.3%) and isolates with questionable taxonomic affiliation (5.7%).

Subsequent identification using Vitek 2 Compact 30 bacterial analyzer and MicroFlex mass spectrometer showed the convergence of results for *C. albicans*: 93.7 – 96.6%; *C. dubliniensis* and *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*) were additionally identified using two clarifying methods. Convergence of results for *N. glabrata* (*C. glabrata*): 41.7 – 41.2%, additionally identified species were *Kluyveromyces marxianus*, *P. kudriavzevii* (previously known as *C. kefyri* and *C. krusei*, respectively), *C. inconspicua*. For *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), the convergence of results: 55.6 – 69.2%, additionally identified species were *C. tropicalis*, *K. marxianus* (*C. kefyri*), *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*. For *C. tropicalis*, the convergence of results is 100%.

Conclusions. The screening method for identifying fungi of the genus *Candida* on chromogenic agar is most reliable for *C. albicans* and *C. tropicalis*. Isolates of *N. glabrata* (*C. glabrata*) and *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) require further identification. The additional use of Vitek 2 Compact 30 bacterial analyzer and MicroFlex mass spectrometer made it possible to identify the involvement of *Candida non-albicans* fungi in the development of pneumonia in 14.1% of cases. In 1.9% of cases, fungi not belonging to the genus *Candida* were detected.

Key words: yeast fungi; identification; chromogenic agar; bacterial analyzer Vitek 2; MALDI-TOF mass spectrometry

For citation: Ogienko O.N., Bondarenko A.P., Kataeva L.V., Stepanova T.F., Golubeva A.O., Trotsenko O.E. Comparative analysis of three methods for identifying *Candida* yeast isolated from pneumonia (chromogenic agar, Vitek2 Compact 30 bacterial analyzer, Microflex mass spectrometer). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 617-626 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-617-626>

For correspondence: Ogienko O.N., junior researcher, laboratory of bacterial infections, FBUN Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology; e-mail: baclab_hniiem@bk.ru

Information about authors:

Ogienko O.N., <https://orcid.org/0000-0003-3872-0006>;

Bondarenko A.P., <https://orcid.org/0000-0002-9197-8519>;

Kataeva L.V., <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>;

Stepanova T.F., <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>;

Golubeva A.O., <https://orcid.org/0000-0002-7598-7343>;

Trotsenko O.E., <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 16.05.2024

Accepted 20.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. В последние годы отмечается тенденция к возрастанию участия грибов в развитии опасных для жизни инфекций, проявляющихся чаще в форме грибковых коинфекций и суперинфекций.

В современный период установлен рост случаев микотического поражения легких, которое исследователи связывают с пандемией новой коронавирусной инфекции COVID-19 [1, 2]. При резком снижении иммунного статуса организма на фоне вирусной патологии грибы колонизируют слизистые оболочки и различные органы человека. При повторном обследовании коронапозитивных пациентов, после их пребывания в стационаре, выявлена тенденция к увеличению количества и интенсивности проявления кандидозных поражений [3, 4].

Причины, по которым в течение последних лет грибковые инфекции наблюдаются все чаще, окончательно не ясны. Известно, что факторами, предрасполагающими к развитию микоза, являются антибиотикотерапия, угнетение иммунитета в результате агрессивной цитостатической и адренкортикостероидной терапии, наличие хронических заболеваний, иммунодепрессивные состояния (СПИД), онкогематологические болезни, гипергликемия, ацидоз, парентеральное питание, повреждение анатомических барьеров – кожи, слизистых, пребывание в отделениях интенсивной терапии и т.д. [5].

В настоящее время более 100 видов дрожжевых грибов, выделенных из локусов организма человека, способны участвовать в патологических процессах с вовлечением различных систем и органов [6].

Candida albicans остается основным возбудителем микозов. В то же время, вследствие некорректного и профилактического применения противогрибковых препаратов, изменился видовой состав возбудителей микозов, заметно увеличивается роль других, менее распространенных оппортунистических дрожжевых грибов, в том числе *Candida non-albicans* (*C. parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae* – ранее *Candida lusitaniae*), а также *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* [5, 7 – 10].

Точная и быстрая идентификация дрожжей является залогом успеха терапии: зная видовую принадлежность возбудителя и его видоспецифическую и штаммовую чувствительность к противогрибковым препаратам, можно своевременно корректировать лечение. Так, в отделениях интенсивной терапии при развитии инфекций кровотока, ассоциированных с *Candida* (кандидемия), задержка этиотропной терапии на каждые 12 часов увеличивает показатели летальности в 3 раза. Удлинение периода идентификации возбудителей кандидемии и фунгемии также ведет к увеличению летальных исходов [7]. Поэтому оперативное слежение за изменениями в структуре возбудителей микозов, формированием их резистентности к антимикотическим препаратам (АМП), ранняя идентификация возбудителя очень важны.

Классическая фенотипическая идентификация и коммерческие биохимические тест-системы (например, Auxacolor II, BioRad, Франция) способны устанавливать видовую принадлежность большинства дрожжевых

грибов с определенной степенью достоверности, позволяют сократить сроки идентификации. В настоящее время выпускаются коммерческие наборы, пригодные для идентификации отдельных или нескольких видов дрожжевых грибов, чаще иных, чем *C. albicans*. Использование этих систем считается нетрудоемким, удобным и требует достаточно мало времени. Следует заметить, что с помощью этих систем пока не всегда можно идентифицировать все виды тестируемых дрожжевых грибов, а лишь только наиболее распространенные из них.

К наиболее новым скрининговым диагностическим приемам, получившим широкое применение, относятся так называемые хромогенные среды. Основным принципом конструирования хромогенных сред заключается во введении в питательную среду хромогенных или флуоресцирующих гексозамидных субстратов, облегчающих дифференциацию грибов по цвету колоний уже при первичном их выделении. В лабораторной практике используются хромогенные среды разных производителей: HiCrome (HiMedia Laboratories, Индия), Candida Chromogenic Agar (Laboratorios Conda, Испания), ChromID Candida (Biomerieux, Франция), CHROMagar™ Candida Plus (CHROMagar Candida, Франция), Агар хромогенный для Candida (ООО «Средофф», Россия) и др. Однако, несмотря на несомненные достоинства использования хромогенных сред, иногда этот метод дает ошибочный результат, особенно, когда это касается видов, отсутствующих в базах данных [11, 12].

Для установления точной видовой принадлежности грибов также находят применение современные биохимические методы с использованием автоматического баканализатора Vitek 2 (Biomerieux, Франция) и диагностических карт для идентификации большинства клинически значимых дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов на данном анализаторе (YST – Systems for the automated identification of most clinically significant yeasts and yeast-like organisms). Идентификация на карте YST основана на стандартных биохимических методах – учете ферментативной активности и утилизации углерода и азота (флуоресцентные тесты) на 46 субстратах. Перед загрузкой необходимо подготовить гомогенную суспензию из суточной культуры. Система автоматически заполняет, запечатывает и переносит карты в инкубатор. Учет результата основан на колориметрическом методе. Каждые 15 минут карты автоматически считываются с помощью трех различных длин волн для обеспечения точности. Каждый профиль интерпретируется по определенному алгоритму. После 5-6 часов инкубации при 35 °С метаболические профили сравниваются с имеющейся базой данных системы. Если полученному биохимическому профилю не соответствует ни один патоген из имеющихся в базе данных, система выдает список вероятных микроорганизмов или сообщение о невозможности идентификации. В таком случае, лабораторный отчет содержит перечень дополнительных тестов, необходимых для окончательной идентификации. Виды, входящие в составной таксон, имеют одинаковый биохимический профиль на картах YST, для их дифференцировки можно использовать дополнительные тесты. Время получения окончательного результата – около 6 часов.

Для преодоления неточностей и ограниченных возможностей классических и других фенотипических методов идентификации применяются молекулярно-генетиче-

ские методы, обладающие высокой достоверностью.

ПЦР-диагностика относится к методам молекулярно-генетической диагностики, позволяет обнаруживать фрагменты ДНК грибов даже в случаях с отрицательным посевом. Как и другие молекулярно-генетические методы, ПЦР рассчитана на определение видовой принадлежности. Однако ее не рассматривают в качестве метода выбора в силу ограниченной доступности, значительного времени пробоподготовки, дорогостоящих реагентов и необходимости особой квалификации персонала [13, 14].

В последнее десятилетие в практику бактериологических лабораторий внедряется метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с использованием времяпролетной масс-спектрометрии – MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), который позиционируется как быстрая, надежная и экономически выгодная альтернатива перечисленным выше методам идентификации [15 - 18]. Метод основан на экстракции пептидов и белков из клеток гриба и масс-спектрометрии белков исследуемого штамма с последующим сравнением полученного спектра с эталонными спектрами в базе MALDI biotyper (справочными данными). Принадлежность микроорганизма к определенному роду или виду проводится на основании степени соответствия сравниваемых масс-спектров, что оценивается по шкале Score (Score Value): хорошая видовая идентификация оценивается от 3 до 2-х баллов, значения от 1,99 до 1,70 соответствует идентификации до рода [20]. Процедура может быть выполнена на масс-спектрометрах различных производителей: Andromas (Andromas SAS, Париж, Франция), Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) и Vitek MS (Biomerieux, Marcy L Etoile, Франция). Время идентификации с момента загрузки масс-спектрометра составляет около 6 минут [20, 21].

Совершенствование лабораторной базы, внедрение новых технологий позволяют улучшать качество диагностики, сокращать время проведения исследований. В связи с широким применением молекулярных технологий в таксономии, виды грибов претерпели и продолжают претерпевать значительные номенклатурные изменения, устраняющие прошлые таксономические ошибки, основанные на фенотипической классификации. Это привело к изменениям наименований важных с медицинской точки зрения видов грибов рода *Candida*. Так, названия распространенных видов *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* и *Candida rugosa* были заменены на *Pichia kudriavzevii*, *Nakaseomyces glabrata*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Clavispora lusitaniae* и *Diutina rugosa* соответственно. Новые названия должны быть обновлены в лабораторной информационной системе и руководствах, как только это будет возможно [22, 23].

Таким образом, видовая идентификация грибов является важной составляющей диагностики заболеваний и определяет стратегию лечения больных. Для точной идентификации грибов в практику лабораторных исследований введены баканализаторы, масс-спектрометрия. Молекулярные методы также являются перспективными для идентификации видов *Candida*

в клинических лабораториях. Но в настоящее время в рутинной лабораторной практике для видовой идентификации грибов по-прежнему широко используются хромогенные *Candida*-агары.

Цель исследования – сравнение трех методов определения видовой принадлежности грибов рода *Candida*: с помощью хромогенного агара, путем использования баканализатора Vitek 2 и с помощью масс-спектрометра.

Материал и методы. Сравнительное исследование проведено для 106 штаммов грибов рода *Candida*, в том числе изолятов, выделенных из респираторных образцов (мазки, мокрота) от больных, госпитализированных в лечебные учреждения Хабаровского края (88 штаммов), а также из аутопсийных проб (ткань легкого) при летальных исходах болезни в 2022 – 2023 годах (18 изолятов).

Выделение грибов проводили классическим бактериологическим методом. Материал засеивали на среду Сабуро (Питательная среда №2 ГРМ, ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) с добавлением гентамицина и инкубировали при 37 °С в течение 18 (72) часов.

Изолированные культуры изучали традиционными микробиологическими методами (учет морфологии колоний на среде Сабуро и световая микроскопия окрашенных по Граму мазков из выросших колоний). Далее колонии пересевали на хромогенный агар для видовой дифференциации грибов рода *Candida* (HiCrome Candida agar, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) и инкубировали при 30-37 °С в течение 24 (48) часов. Видовая принадлежность оценивалась согласно рекомендациям производителя: *Candida albicans* – гладкие с четким краем светло-зеленые колонии, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*) – колонии от кремового до белого цветов, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) – расплывчатые колонии пурпурного цвета, *Candida tropicalis* – выпуклые синие или синие с металлическим оттенком колонии.

Изоляты грибов разных видов, выделенные в 2022 – 2023 гг., сохраняли на 0,6% полужидком агаре под слоем вазелинового масла.

Для более точной идентификации часть штаммов (78 изолятов из 106) идентифицирована с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Франция) с картами ID YST (автоматическая идентификация большинства клинически значимых дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов). Для корректной работы карты очень важно подготовить гомогенную суспензию из суточной исследуемой культуры, плотность которой должна соответствовать показателям 1,8 – 2,2 по МакФарланду (согласно инструкции).

На следующем этапе сравнительного исследования все 106 штаммов грибов идентифицировали с помощью масс-спектрометра MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH, Германия) на базе ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора).

Процедура идентификации возбудителей микозов методом MALDI-TOF MS состоит из нескольких этапов: получения чистой культуры микромицета, подготовки проб, нанесения образца на MALDI-мишень, проведения исследования и анализа полученных спек-

тров протеинов грибковых клеток [20].

Пробоподготовка (лизис клеток и экстракция кислотоустойчивых протеинов), имеющая целью выделение и концентрацию диагностически значимых компонентов, проводилась с использованием 70% муравьиной кислоты и ацетонитрила. По наблюдениям А.С. Анисимовой и др. [1, 2], именно этот прием пробоподготовки является наиболее эффективным.

Для получения наиболее точных диагностических результатов масс-спектрометрии очень важна матрица (специальный реагент), которая обеспечивает получение специфических для анализа спектральных характеристик. Для анализа белков в наших исследованиях применяли матричный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Исследование выполнялось в соответствии с нормативным документом (МР 4.2.0089–14)¹.

Статистическая обработка материала выполнена с помощью сайта <https://medstatistic.ru/>. Анализ результатов проводился с использованием непараметрических методов статистической обработки (критерий χ^2 , в том числе с поправкой Йейтса, и точный критерий Фишера). Для получения данных рассчитывался доверительный интервал (95% ДИ). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты. Для сравнения методов определения видовой принадлежности грибов изоляты первоначально были протестированы на хромогенном агаре, затем – с помощью баканализатора Vitek2 Compact 30 (YST). Далее, для подтверждения, либо для уточнения спорных видовых обозначений все изоляты были проверены на масс-спектрометре MicroFlex.

По результатам теста на хромогенном агаре все 106 штаммов были разделены на 5 групп по цвету и морфологии колоний: *C. albicans* – 58 (54,7%), *N. glabrata* (*C. glabrata*) – 17 (16,0%), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) – 13,0 (12,3%), *C. tropicalis* – 12 (11,3%), *unidentified* – 6 (5,7%).

Для сравнительной оценки двух наиболее распространенных в диагностической практике методов определения видовой принадлежности грибов 78 изолятов из 106 были протестированы с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что для *C. albicans* совпадение с первоначальной меткой отмечено для 45 штаммов – 93,7% случаев. Оставшиеся 3 штамма получили новое видовое обозначение: *C. dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (панее *C. lusitaniae*).

Из 12 штаммов *N. glabrata* (*C. glabrata*) совпадение было получено в 5 случаях, что составило 41,7%. Новые наименования получили 7 штаммов: *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *K. marxianus* (*C. kefir*) и штаммы (2 изолята *Papiliotrema laurentii*, ранее этот вид был известен как *Cryptococcus laurentii*), не относящиеся к роду *Candida*.

При испытании 9 штаммов *C. krusei* (*P. kudriavzevii*) совпадения получены для 5 штаммов – 55,6% случаев, дополнительно выявлены *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus* (*C. kefir*).

¹Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2015.

Таблица 1

Сравнительный анализ двух методов видовой идентификации грибов рода *Candida* (хромогенный агар и баканализатор Vitek 2 Compact 30) (n=78)

Хромогенный агар		Баканализатор Vitek 2 Compact 30 (YST)																	
Виды грибов	Число штаммов	<i>C. albicans</i>		<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)		<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>)		<i>C. parapsilosis</i>		<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyr</i>)		Прочие *	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	48	45	93,7 [86,8-99,4]	-	-	-	-	-	-	2	4,2 [0,4-11,6]	1	2,1	-	-	-	-	-	-
<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)	12	-	-	5	41,7 [16,6-69,4]	4	33,3 [10,6-61,2]	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8,3	2	16,7 [1,9-41,9]
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	9	-	-	-	-	5	55,6 [24,2-84,6]	1	11,1	1	11,1	-	-	1	11,1	1	11,1	-	-
<i>C. tropicalis</i>	7	-	-	-	-	-	-	7	100 [86,9-100]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сомнит. результат	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0
Всего:	78	45		5		9		8		3		2		1		2		3	

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: n- количество исследованных штаммов. В скобках указаны устаревшие (предыдущие) названия. В квадратных скобках указан 95% доверительный интервал.

* - Прочие – род *Cryptococcus*, род *Geotrichum*.

Из 7 штаммов *C. tropicalis* подтверждение получено для всех 7 изолятов – 100%.

Два штамма, протестированные на хромогенном агаре, дали сомнительную окраску. По испытаниям тех же штаммов на баканализаторе Vitek 2 Compact 30 (YST) установлено, что один штамм принадле-

жит *Clavispora lusitaniae* (ранее известный как *C. lusitaniae*), второй – не относится к роду *Candida* – *Geotrichum klebahnii*.

В табл. 2 представлены результаты сравнительной идентификации грибов на хромогенном агаре и методом масс-спектрометрии.

Таблица 2

Сравнительный анализ двух методов видовой идентификации грибов рода *Candida* (хромогенный агар и масс-спектрометр MicroFlex) (N=106)

Хромогенный агар		Масс-спектрометр MicroFlex																	
Виды грибов	Число штаммов	<i>C. albicans</i>		<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)		<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>)		<i>C. inconspicua</i>		<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyr</i>)		Прочие *	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	58	54,7	56	96,6 [46,5-62,3]	-	-	-	-	-	2	3,4 [0,3-9,5]	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)	17	16,0	-	-	7	41,2 [19,6-64,7]	-	-	-	-	-	-	7	41,2 [19,6-64,7]	3	17,6 [3,8-38,6]	-	-	
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	13	12,3	-	-	-	-	9	69,2 [42,6-90,3]	2	15,4 [1,7-39,1]	-	-	-	1	7,7	1	7,7	-	-
<i>C. tropicalis</i>	12	11,3	-	-	-	-	-	-	12	100 [92,2-100]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сомнительный результат	6	5,7	-	-	-	-	-	-	3	50,0 [14,1-85,9]	-	1	16,7	-	-	-	-	2	33,3 [4,6-72,2]
Всего:	106		56		7		9		17		2		1		8		4		2

Примечание. * - Прочие – род *Trichosporon*, род *Geotrichum*;

Первоначально протестированные на хромогенном агаре 106 штаммов были разделены на 4 вида: 58 штаммов - *C. albicans*, 17 – *N. glabrata* (*C. glabrata*), 13 – *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), 12 – *C. tropicalis*. Шесть штам-

мов дали сомнительную окраску.

По испытаниям тех же штаммов на масс-спектрометре MicroFlex установлено, что для *C. albicans* совпадение с первоначальной меткой отме-

чено для 56 штаммов – 96,6% случаев. Оставшиеся 2 штамма получили новое видовое обозначение (*C. dubliniensis*).

Из 17 штаммов *N. glabrata* (*C. glabrata*) совпадение было получено лишь в 7 случаях, что составило 41,2%. Новые наименования получили 10 штаммов: *C. inconspicua*, *K. marxianus* (*C. kefyri*).

При испытании 13 штаммов *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) совпадения получены для 9 штаммов – 69,2% случаев, дополнительно выявлены *C. tropicalis*, *C. inconspicua*, *K. marxianus* (*C. kefyri*).

Из 12 штаммов *C. tropicalis* подтверждение получено для 12 -100%.

Совершенно очевидно, что применение хромогенного агара не обеспечивает надежную видовую идентификацию, а современные методы исследования представляют новые возможности для диагностики и мониторинга грибковой флоры.

В табл. 3 приведены результаты сравнительной идентификации грибов двумя современными автоматическими методами: с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex.

Таблица 3

Сравнение видовой идентификации дрожжевых грибов с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex (n=78)

Баканализатор Vitek 2 Compact 30		Масс-спектрометр MicroFlex																	
Виды грибов	Число штаммов	<i>C. albicans</i>		<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)		<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>Clavispora lusitanae</i> (<i>C. lusitanae</i>)		<i>C. inconspicua</i>		<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>)		Прочие*	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. albicans</i>	45	45	100 [97,9-100]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)	5	-	-	4	80,0 [38,5-99,9]	-	-	-	-	-	-	-	1	20,0	-	-	-	-	
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	9	-	-	-	-	4	44,4 [15,4-75,8]	-	-	-	-	-	-	5	55,6 [24,2-84,6]	-	-	-	
<i>C. tropicalis</i>	8	-	-	-	-	-	-	8	100 [88,5-100]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. dubliniensis</i>	3	-	-	-	-	1	33,3	-	-	2	66,7 [14,4-99,8]	-	-	-	-	-	-	-	
<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100 [59,2-100]	-	
<i>Clavispora lusitanae</i> (<i>C. lusitanae</i>)	2	1	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	
<i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. laurentii</i> (<i>C. laurentii</i>)	2	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100
Всего:	78	46		5		5		9		2		2		6		2		1	

Примечание. * - Прочие – род *Geotrichum*.

Первоначально протестированные с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 штаммы (78 изолятов) были разделены на 10 видов: 45 штаммов - *C. albicans*, 5 – *N. glabrata* (*C. glabrata*), 9 – *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), 8 – *C. tropicalis*, 3 – *C. dubliniensis*, 2 – *K. marxianus* (*C. kefyri*), 2 – *Clavispora lusitanae* (*C. lusitanae*), 1 – *C. parapsilosis*, 2 – *P. laurentii* (*C. laurentii*), 1 – *Geotrichum klebahnii*.

При испытании тех же штаммов на масс-спектрометре MicroFlex установлено, что совпадение с первоначальной меткой отмечено для всех 45 штаммов *C. albicans* – 100% случаев, для всех 8 штаммов *C. tropicalis* – 100% и 2 штаммов *K. marxianus* (*C. kefyri*) – 100%.

Из 5 штаммов *N. glabrata* (*C. glabrata*) совпадение было получено в 4 случаях, что составило 80,0%. Новое наименование получил 1 штамм (*C. inconspicua*).

При испытании 9 штаммов *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) совпадения получены для 4 штаммов – 44,4% случаев, дополнительно выявлены *C. inconspicua*.

Из 3-х штаммов *C. dubliniensis* совпадение было получено в 2 случаях, что составило 66,7%. Новое наименование получил 1 штамм (*P. kudriavzevii*, ранее известный как *C. krusei*).

Из 2-х штаммов *C. lusitanae* (*Clavispora lusitanae*) подтверждение получено для 1 штамма. Второй штамм

определился как *C. albicans*.

Штамм *C. parapsilosis*, определенный на баканализаторе Vitek 2 Compact 30, подтверждение не получил. Масс-спектрометр MicroFlex определил его как *C. tropicalis*.

Два штамма *P. laurentii* (*C. laurentii*) на масс-спектрометре оказались *C. inconspicua* и *N. glabrata* (*C. glabrata*).

Один штамм *Geotrichum klebahnii* после определения на масс-спектрометре получил новое видовое обозначение – *Geotrichum silvicola*.

Таким образом, при сравнительной идентификации 10 видов грибов, выполненной сначала с помо-

щью баканализатора Vitek 2 Compact 30, а затем масс-спектрометра MicroFlex, полное совпадение результатов нами отмечено при тестировании только трех видов грибов (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *K. marxianus* (*C. kefyri*)).

Неполное подтверждение результатов (от 44,4% до 80%) установлено для грибов *N. glabrata* (*C. glabrata*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*), *C. parapsilosis*, а также для микромицетов, не относящихся к роду *Candida* (*Cryptococcus*, *Geotrichum*).

Результаты сравнительных испытаний трех методов идентификации грибов отражены в табл. 4.

Таблица 4

Сравнительная оценка трех методов идентификации грибов

Виды грибов	Хромогенный агар (n=100)		Баканализатор Vitek 2 Compact 30 (n=78)		Масс-спектрометр MicroFlex (n=106)	
	Абс.	%	Сходимость результатов, %	Дополнительно идентифицированы	Сходимость результатов, %	Дополнительно идентифицированы
<i>C. albicans</i>	58	54,7	93,7	<i>C. dubliniensis</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>)	96,6	<i>C. dubliniensis</i>
<i>N. glabrata</i> (<i>C. glabrata</i>)	17	16,0	41,7	<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) <i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>) <i>Cr. laurentii</i> (<i>P. laurentii</i>)	41,2	<i>C. inconspicua</i> <i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>)
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	13	12,3	55,6	<i>C. tropicalis</i> <i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>) <i>C. dubliniensis</i> <i>C. parapsilosis</i>	69,2	<i>C. tropicalis</i> <i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyri</i>) <i>C. inconspicua</i>
<i>C. tropicalis</i>	12	11,3	100	-	100	-
Сомнительный результат	6	5,7		<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>) <i>G. klebahnii</i>		<i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>C. lusitaniae</i>) <i>C. tropicalis</i> <i>G. silvicola</i> <i>T. coremiiforme</i>
Всего:	106	100				

Примечание. В скобках указаны устаревшие (предыдущее) названия.

Определение видовой принадлежности грибов тремя методами показало, что совпадение результатов идентификации разных видов достигает 41,2 – 100%.

При оценке идентификации видов грибов на хромогенном агаре, в сравнении с другими методами, сходимость результатов наиболее высока для грибов синей цветовой гаммы (*C. tropicalis* 100%), довольно высока для грибов светло-зеленого цвета – *C. albicans* (93,7 – 96,6%). Наиболее низкие показатели сходимости установлены для грибов кремовой и пурпурной цветовой гаммы – *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (55,6 – 69,2%) и *N. glabrata* (*C. glabrata*) (41,2 – 41,7%).

Обсуждение. Исследовательские работы по сравнительной оценке методов идентификации дрожжевых грибов проводились у нас в стране и за рубежом.

Так, по данным В.В. Муравьевой и соавт. [6] при тестировании методом MALDI-TOF 2304 изолятов дрожжевых грибов, выделенных при кандидозном вульвовагините, определены 19 видов дрожжевых грибов, относящихся к четырем родам. Затем 1294 из 2304 изолятов (1009 *C. albicans* и 286 *Candida non-albicans* видов) для сравнения были продублированы в баканализаторе Vitek 2 Compact 30 (биохимические панели YST).

Совпадения отмечены у всех *C. albicans* и у 97,5% штаммов *Candida non-albicans*: 7 штаммов четырех редких видов грибов (*Nakaseomyces nivariensis* – ранее *Candida nivariensis*, *Candida lambica*, *Debaryomyces hansenii* – ранее *Candida famata*, *Pichia fabianii*) не получили подтверждение в баканализаторе Vitek 2 Compact 30. Штаммы *Nakaseomyces nivariensis* (ранее *Candida nivariensis*) отсутствовали в базе данных Vitek 2 Compact 30. Один штамм *Candida lambica* не удалось дифференцировать от видов *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) и *Candida norvegica*. Штамм *Pichia fabianii* определен как *Candida utilis* с оценкой приемлемой идентификации. Для уточнения видовой принадлежности *Pichia fabianii* потребовалось секвенирование гена 18s рРНК.

Приведенные исследования позволили прийти к выводу, что биохимический метод идентификации (с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30) показал высокую достоверность (98,6%). Но длительность исследований (до 48 часов), ограниченность базы данных и высокая стоимость расходных материалов снижают ценность этого метода идентификации. Существенные преимущества имеет метод масс-спектрометрии: быстрота выполнения, низкая стоимость реагентов и гиб-

кая система пополнения базы данных.

В другом исследовании, проведенном А.В. Веселовым [23], сравнительная идентификация 71 штамма дрожжевых грибов методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF, Microflex LT (Biotyper), «Bruker Daltonics», Германия) и с помощью автоматического биохимического анализатора Microscan Walk Away («Siemens» WA) показала следующее. Биохимическим методом из 71 штамма идентифицированы 69 изолятов (97,2%), относящихся к 12 видам. Масс-спектрометрическим методом идентифицирован 71 изолят (100%), относящийся к 11 видам. При этом идентификация дрожжевых грибов двумя методами имела расхождение в 15 случаях из 71 (21,1%). Методом масс-спектрометрии не подтверждено наличие грибов вида *Meyerozyma guilliermondii* – ранее *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* – ранее *Candida famata*, *B. capitatus*, *P. wickerhamii*, определенных WA. Расхождения выявлены при идентификации практически всех 12 видов грибов. Авторы приходят к выводу, что традиционные методы идентификации грибов не соответствуют современным требованиям клинической микробиологии.

В наших испытаниях первоначальная скрининговая идентификация 106 штаммов грибов, выделенных из респираторных образцов больных пневмонией и аутопсийных проб при болезни с летальным исходом в 2022 – 2023 гг., проведена на HiCrome агаре. Все 106 изолятов разделены на 4 вида (*C. albicans* – 54,7%, *N. glabrata* (*C. glabrata*) – 16,0%, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) – 12,3%, *C. tropicalis* – 11,3%) и «неопределяемые» изоляты с сомнительной таксономической принадлежностью (5,7%).

Последующая идентификация с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex показала сходимость результата для *C. albicans* – 93,7 – 96,6%, дополнительно выявлены с помощью двух уточняющих методов – *C. dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*). Для *N. glabrata* (*C. glabrata*) сходимость результатов – 41,7 – 41,2%, дополнительно выявлены виды – *K. marxianus* (*C. kefir*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. inconspicua*. Сходимость результатов для *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) – 55,6 – 69,2%, дополнительно выявлены виды – *C. tropicalis*, *K. marxianus* (*C. kefir*), *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*. Для *C. tropicalis* сходимость результатов равна 100%.

В данном исследовании установлено, что скрининговый метод идентификации грибов рода *Candida* с помощью хромогенного агара наиболее надежен для *C. albicans* и *C. tropicalis*. В уточняющей идентификации нуждаются изоляты *N. glabrata* (*C. glabrata*) и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*).

В иностранной и отечественной научной литературе приводятся материалы исследований по обоснованию роли редких видов *Candida* в развитии различных патологических состояний.

Так, в обзоре S.C. Chen и соавт. [8] изложены эпидемиологические, клинические и микробиологические особенности 57 случаев кандидемии в Австралии, вызванной UCS (*Uncommon Candida Species*). Этот термин включал в себя другие виды грибов, кроме *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*). Наиболее распространенный возбудитель в этиологии 57 случаев кандидемии – *C.*

dubliniensis (39%). Далее следовали *M. guilliermondii* (*C. guilliermondii*) (19%), *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*) (12%), *K. marxianus* (*C. kefir*) (9%). Редкие виды *Candida* эпидемиологически были связаны с отдельными лечебными учреждениями, конкретными группами пациентов, чаще амбулаторными. При этом наблюдались летальные исходы у стационарных пациентов. Приведенные материалы убеждают в том, что точная видовая идентификация *Candida* позволяет выявить конкретные факторы риска кандидоза, свойственные редким видам грибов, что важно для понимания патогенеза кандидоза, выявления эпидемиологических и клинических особенностей заболевания и определения тактики противодействия.

В сообщении Ю. Л. Криворутченко и соавт. [25] приводятся сведения о выделении у больных с различной патологией в 2010 – 2016 гг. в Крыму, наряду с *C. albicans* (48%), редких видов грибов (40% от общего числа изолятов): *C. dubliniensis* (12%), *C. parapsilosis* (8%), *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*) (8%), *D. hansenii* (*C. famata*) (4%), *M. guilliermondii* (*C. guilliermondii*) (4%), *K. marxianus* (*C. kefir*) (4%). Видовая идентификация была проведена с помощью тест-систем «Auxocolor-2» (Biorad, Франция). Выявлена устойчивость изолятов *C. dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*) к флуконазолу и антисептику мирамистину.

В настоящем исследовании дополнительное к идентификации на хромогенном агаре использование баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex позволило при изучении 106 штаммов грибов в 14,1% случаев выявить участие грибов *Candida non-albicans* (*C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*), *K. marxianus* (*C. kefir*)) в развитии пневмонии. В 1,9% случаев были определены микромицеты, не относящиеся к роду *Candida* (*Trichosporon*, *Geotrichum*). В структуре 18 изолятов, выделенных из аутопсийных проб при летальных исходах пневмонии, 3 изолята (16,7% случаев) идентифицированы как *K. marxianus* (*C. kefir*), *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*), *C. inconspicua*.

Таким образом, мы получили новые знания об участии редких видов грибов и в развитии фатальных пневмоний.

Выводы:

Скрининговый метод идентификации грибов рода *Candida* на хромогенном агаре наиболее надежен для *C. albicans* и *C. tropicalis*. В уточняющей идентификации нуждаются изоляты *N. glabrata* (*C. glabrata*) и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*).

Дополнительное использование баканализатора Vitek 2 compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex позволило в 14,1% случаев выявить участие грибов *Candida non-albicans* в развитии пневмоний. В 1,9% случаев выявлены грибы, не относящиеся к роду *Candida*.

Низкая реактивность штаммов могла стать причиной «неопределяемых» видов при фенотипической идентификации изолятов с помощью баканализатора Vitek 2 compact 30, поскольку отсутствие положительных реакций привело бы к появлению неизвестных в базе данных профилей.

При сравнительной идентификации 10 видов грибов (78 штаммов) с помощью баканализатора Vitek 2 Compact 30 и масс-спектрометра MicroFlex полное со-

впадение результатов нами отмечено при тестировании только трех видов грибов: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *K. marxianus* (ранее *C. kefyr*).

Клиническая эффективность метода масс-спектрометрии заключается в диагностической точности, высокочувствительности, специфичности, быстром получении ответа (от 6 минут) и экономической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 8 – 18, 21, 22 СМ. REFERENCES)

1. Анисимова А. С., Полеева М. В., Аронова Н. В., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности идентификации грибов рода *Candida* с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(4): 244-9. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249.
2. Анисимова А. С., Аронова Н. В., Полеева М. В. Идентификации дрожжей рода *Candida* и других дрожжеподобных грибов с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS). *Бактериология*. 2021; 6(3): 16-7.
3. Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май–июнь 2020 г.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3: 43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49.
4. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалев Е.В., Чемисова О.С. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4: 99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105.
5. Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Шулакова Н.И. Микологический айсберг: современные сдвиги в эпидемиологии микозов. *Инфекционные болезни*. 2022; 20(1): 120-6. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126.
6. Муравьева В.В., Припутневич Т.В., Завьялова М.Г., Анкирская А.С., Ильина Е.Н. Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI-TOF MS и традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16 (1): 10-7.
7. Мальчикова А.О., Клясова Г.А. In house метод ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры с помощью матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2022; 24(2): 171-9. DOI: 10.36488/cmasc.2022.2.171-179.
19. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 249-56. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256.
20. Суркова Р. С., Шаров Т. Н., Половец Н. В., Липницкий А. В., Мургуова А. А. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации возбудителей микозов. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2021; 3: 73. DOI: 10.14427/jipai.2021.3.73.
23. Веселов А.В. Изменения в номенклатуре патогенных для человека микромицетов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2022; 24(4): 292-4. DOI: 10.36488/cmasc.2022.4.292-294.
24. Багирова Н. С., Дмитриева Н. В. Сравнительная оценка идентификации дрожжеподобных грибов различными методами в условиях онкологической клиники. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2014; 8: 53-8.
25. Криворучченко Ю. Л., Кирсанова М. А., Постникова О. Н., Андроновская И. Б., Шейко Е. А. Полирезистентность к флуконазолу, амфотерицину В и антисептику мирамистину у дрожжевых грибов рода *Candida*, выделенных в Крыму от пациентов с различной патологией. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2021; 3: 79. DOI: 10.14427/jipai.2021.3.79.

REFERENCES

1. Anisimova A.S., Poleeva M.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Peculiarities of candida yeast identification by mass spectrometric analysis (maldi-tof ms). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(4): 244-9. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249. (in Russian)
2. Anisimova A.S., Aronova N.V., Poleeva M.V. Identification of *Candida* yeast and other yeast-like fungi using mass spectrometric analysis (MALDI-TOF MS). *Bakteriologiya*. 2021; 6(3): 16-7. (in Russian)
3. Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Butakova L.V., Bazykina E.A. Characteristics of Bacterial Microflora Isolated from Sputum of Patients with Pneumonia Registered in Khabarovsk City and Khabarovsk Territory in the Initial Period of COVID-19 Pandemic in May–June, 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; 3: 43-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-43-49. (in Russian)
4. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Noskov A.K., Kovalev E.V., Chemisova O.S. et al. Features of Etiology of Community-Acquired Pneumonia Associated with COVID-19. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; 4: 99-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105. (in Russian)
5. Akimkin V.G., Tutelyan A.V., Shulakova N.I. Medical mycological iceberg: recent trends in the epidemiology of mycoses. *Infektsionnye bolezni*. 2022; 20(1): 120-6. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126. (in Russian)
6. Muravyova V.V., Priputnevich T.V., Zavyalova M.G., Ankiorskaya A.S., Il'ina E.N. Comparative assessment of types of identification of vaginal yeast isolates using MALDI-ToF MS and long-term (biochemical and phenotypic) methods. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16 (1): 10-7. (in Russian)
7. Malchikova A.O., Klyasova G.A. In house method for rapid identification of fungi from fungus-positive bottles by MALDI-ToF mass spectrometry in patients with bloodstream infection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2022; 24(2): 171-9. DOI: 10.36488/cmasc.2022.2.171-179. (in Russian)
8. Chen S.C., Marriott D., Playford E.G. *Candidaemia* with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15: 662-9 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02821.x.
9. Walsh T. J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (Suppl. 1): 48-66. DOI: 10.1111/j.1470-9465.2004.00839.x.
10. Miceli M.H., Diaz J.A., Lee S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11 (2): 142-51. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70218-8.
11. Sanguinetti M., Porta R., Sali M., et al. Evaluation of VITEK 2 and RapID Yeast Plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 1343-6. DOI: 10.1128/JCM.02469-06.
12. Massonet C., Eldere J.V., Vaneechoutte M., DeBaere T., Verhaegen J., and Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5): 2209-11. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2209-2211.2004.
13. Lau A., Chen S., Sorrell T., et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 380-5. DOI: 10.1128/JCM.01862-06.
14. Montero C. I., Shea Y.R., Jones P.A., et al. Evaluation of pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27: 821-30. DOI: 10.1007/s10096-008-0510-x.
15. Marklein M., Josten U., Klanke E., et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(9): 2912-7. DOI: 10.1128/JCM.00389-09.
16. Stevenson L.G., Drake S.K., Shea Y.R., Zelazny A.M., and Murray P.R. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for the identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 3482-6. DOI: 10.1128/JCM.00687-09.

17. Dhiman N., Hall L., Wohlfiel S.L., Buckwalter S.P., and Wengenack N.L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(4): 1614-6. DOI: 10.1128/JCM.02381-10.
18. van Veen S. Q., Claas E.C., and Kuijper E. J. Highthroughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 900-7. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.
19. Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Mayansky N.A. The possibilities, problems and perspectives of mass spectrometry in medical microbiology: publications review. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2016; 61(4): 249-56. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256. (in Russian)
20. Surkova R. S., Sharov T. N., Polovets N. V., Lipnitsky A. V., Murugova A. A. The use of MALDI-TOF mass-spectrometry for the identification of pathogens of mycoses. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2021; 3: 73. DOI: 10.14427/jipai.2021.3.73. (in Russian)
21. Patel R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *Journal of Fungi.* 2019; 5(1): 4. DOI: 10.3390/jof5010004.
22. Kidd S. E., Abdolrasouli A., Hagen F. "Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game." *Open forum infectious diseases.* 2023; 10(1): 559. DOI: 10.1093/ofid/ofac559.
23. Veselov A.V. Changes in the nomenclature of human pathogenic micromycetes. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2022; 24(4): 292-4. DOI: 10.36488/cmacc.2022.4.292-294. (in Russian)
24. Bagirova N. S., Dmitriyeva N. V. Evaluation of yeasts identification by different methods in oncology clinic. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii.* 2014; 8: 53-8. (in Russian)
25. Krivorutchenko Yu. L., Kirsanova M. A., Postnikova O. N., Andronovskaya I. B., Sheiko E. A. Multidrug resistance to fluconazole, amphotericin b and antiseptic miramistin in *Candida* fungi isolated from patients with various pathologies in Crimea. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2021; 3: 79. DOI: 10.14427/jipai.2021.3.79. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Мехтиев Э. Р. О.¹, Радугина Н. В.¹, Затевалов А. М.^{1,3}, Ильясова Н. А.³, Жиленкова О. Г.¹,
Гудова Н. В.¹, Фёдоров Д. С.², Садеков Т. Ш.¹, Миронов А. Ю.^{1,4}

КРИТЕРИИ МЕТАЭКСПОСОМНОЙ ОЦЕНКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА У ПАЦИЕНТОК АМБУЛАТОРНОГО ПРИЁМА

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ГБУЗ «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения города Москвы», 143423, Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова Минздрава РФ, 117198, Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Введение. Проблема лечения бактериального вагиноза не теряет своей актуальности и нуждается в расширении возможностей по диагностике и мониторингу заболевания. Исследование концентраций липидных компонентов клеточной стенки микроорганизмов в вагинальном секрете с помощью подходов системной биологии и медицины позволяют определить новые критерии для мониторинга лечения бактериального вагиноза у пациенток. Изучены метаэкспосомные профили компонентов клеточной стенки микроорганизмов у пациенток с бактериальным вагинозом по критериям метаэкспосомики.

Цель работы - установить критерии диагностики и мониторинга бактериального вагиноза по метаэкспосомным профилям методом метаэкспосомики.

Материал и методы. Исследованы образцы вагинального отделяемого 72 пациенток амбулаторного приёма Консультационно-диагностического центра при Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского в возрасте от 18 до 65 лет (39±10 лет) методом газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) для определения концентраций компонентов клеточной стенки микроорганизмов в вагинальном отделяемом. Пациентки с установленным бактериальным вагинозом определены в основную группу (n=20), с установленным отсутствием бактериального вагиноза в группу норма (n=52). Диагноз бактериальный вагиноз установлен по результатам ПЦР исследования вагинального мазка на содержание *Lactobacillus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и общего количества бактерий на панели «АмплиСенс Флорце-ноз / Бактериальный вагиноз – FL». Пациентки сопоставимы по возрасту и основным клинико-анамнестическим данным. Методом ГХ-МС определены концентрации 62 химических соединений (малые молекулы микробного происхождения), относящихся к жирным кислотам, альдегидам, гидроксикислотам, стеролам с длиной углеродной цепи от 10 до 26 атомов в вагинальном отделяемом.

Результаты и обсуждение. С помощью факторного анализа, анализа главных компонент, кластерного анализа выбраны 18 соединений кандидатов в маркёры бактериального вагиноза. Методом линейного дискриминантного анализа определено уникальное соотношение концентраций 9 малых молекул микробного происхождения, диагностирующего бактериальный вагиноз с прогностической точностью 88,9%, рассчитан коэффициент уникальности для всех пациенток исследуемой выборки. По сравнению прогностических характеристик соединений кандидатов и корреляции с коэффициентом уникальности бактериального вагиноза выбран маркёр бактериального вагиноза - концентрация изотетрадекановой кислоты в вагинальном секрете.

Выводы. При концентрации в вагинальном секрете изотетрадекановой кислоты выше 0,355 наномоль/г диагностируется бактериальный вагиноз с прогностической точностью 76% с 30% чувствительностью и 94% специфичностью.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз; метаэкспосомика; микробиота; микробиоценоз влагалища; газовая хроматография масс-спектрометрия; метабономика; математическое моделирование

Для цитирования: Мехтиев Э.Р.О., Радугина Н.В., Затевалов А.М., Ильясова Н.А., Жиленкова О.Г., Гудова Н.В., Федоров Д.С., Садеков Т.Ш., Миронов А.Ю. Критерии метаэкспосомной оценки бактериального вагиноза у пациенток амбулаторного приёма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 627-636.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-627-636>

Для корреспонденции: Мехтиев Эмиль Рухуллы Оглы, мл. науч. сотр. лаб. диагностики и профилактики инфекционных заболеваний; e-mail: mer@gabrich.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.08.2024

Принята к печати 04.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Mehitiev E.R.O.¹, Radugina N.V.¹, Zatevalov A.M.^{1,3}, Ilyasova N.A.³, Zhilenkova O.G.¹, Gudova N.V.¹, Fedorov D.S.², Sadekov T.Sh.¹, Mironov A.Yu.^{1,4}

CRITERIA FOR METAEXPOSOMAL ASSESSMENT OF BACTERIAL VAGINOSIS IN OUTPATIENT PATIENTS

¹G. N. Gabrichovsky Research Institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

²State budgetary healthcare institution of the city of Moscow «Moscow City Oncology Hospital № 62 of the Moscow City Health Department», 143423, Moscow, Russia;

³Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russia;

⁴Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

Introduction. The problem of bacterial vaginosis treatment remains relevant and requires expansion of diagnostic and disease monitoring capabilities. Study of concentrations of lipid components of microorganism cell walls in vaginal secretions using systems biology and medicine approaches allows defining new criteria for monitoring bacterial vaginosis treatment in female patients. In this article, metaexposomic profiles of microorganism cell wall components were studied in female patients with bacterial vaginosis using metaexposomics criteria.

The aim of the work is to establish criteria for the diagnosis and monitoring of bacterial vaginosis using metaexposomic profiles.

Material and methods. Vaginal discharge samples from 72 outpatients of the Consultative and Diagnostic Center at the Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky aged 18 to 65 years (39+10 years) were studied using gas chromatography mass spectrometry to determine concentrations of microorganism cell wall components in vaginal discharge. Patients with established bacterial vaginosis were assigned to the main group (20 people), and those with established absence of bacterial vaginosis to the norm group (52 people). The diagnosis of bacterial vaginosis was established based on the results of PCR testing of a vaginal smear for the content of *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and the total number of bacteria on the panel "AmpliSens Florcenosis / Bacterial Vaginosis - FL". Patients were comparable in age and basic clinical and anamnestic data. The concentrations of 62 chemical compounds (small molecules of microbial origin) related to fatty acids, aldehydes, hydroxy acids and sterols with a carbon chain length from 10 to 26 atoms in vaginal discharge were determined using gas chromatography mass spectrometry.

Results and discussion. Using factor analysis, principal component analysis and cluster analysis, 18 compounds of bacterial vaginosis marker candidates were selected. Using the linear discriminant analysis method, the unique ratio of concentrations of 9 small molecules of microbial origin diagnosing bacterial vaginosis with a prognostic accuracy of 88.9% was determined, and the uniqueness coefficient was calculated for all patients in the study sample. Based on the comparison of the prognostic characteristics of the candidate compounds and the correlation with the uniqueness coefficient of bacterial vaginosis, a bacterial vaginosis marker - the concentration of isotetradecanoic acid in vaginal secretion - was selected.

Conclusions. At the concentration of isotetradecanoic acid in vaginal secretion above 0.355 nanomol/g, bacterial vaginosis is diagnosed with a prognostic accuracy of 76% with 30% sensitivity and 94% specificity.

Key words: bacterial vaginosis; metaexposomics; microbiota; vaginal microbiocenosis; gas chromatography mass spectrometry; metabolomics; mathematical modeling

For citation: Mehtiev E.R.O., Radugina N.V., Zatevalov A.M., Il'yasova N.A., Zhilenkova O.G., Gudova N.V., Fedorov D.S., Sadekov T.Sh., Mironov A.Yu. Criteria for metaexposomal assessment of bacterial vaginosis in outpatient patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 627-636 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-627-636>

For correspondence: Mehtiev E.R.O., junior researcher of the laboratory of diagnostics and prevention of infectious diseases; e-mail: mer@gabrich.ru

Information about authors:

Mekhiev E.R.O., <https://orcid.org/0000-0002-9942-2662>;

Radugina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9727-3544>;

Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;

Il'yasova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-0665-3515>;

Zhilenkova O. G., <https://orcid.org/0000-0003-3206-6648>;

Gudova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9579-1102>;

Fedorov D.S., <https://orcid.org/0009-0000-8920-0153>;

Sadekov T. Sh., <https://orcid.org/0000-0001-5337-0054>;

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

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.

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

Received 07.08.2024

Accepted 04.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Проблема лечения бактериального вагиноза не теряет своей актуальности и нуждается в расширении возможностей по диагностике и мониторингу заболевания. Распространённость бактериального вагиноза среди женщин в среднем составляет 40-50% [1]. Частота встречаемости бактериального вагиноза зависит от контингента обследуемых: среди всех пациенток гинекологических отделений 10-35%, среди беременных 10-30%, среди женщин находящихся на лечении по поводу венерических

заболеваний до 20-60% [2]. Бактериальный вагиноз связывают с резким снижением молочно-кислой микрофлоры и колонизацией слизистой оболочки влагалища микроаэрофильными бактериями [3]. Существенное значение в развитии бактериального вагиноза имеют бактериальные эндотоксины за счёт действия липополисахарида (ЛПС), встраивающегося в биологические мембраны клеток органов человека и нарушающего их функции [4].

ЛПС - гетерополимер с молекулярной массой

от 200 до 1000 кДа, состоящий из трёх структурных частей: липида А, Core-фрагмента, O-антигена (специфической цепочки сахаров, отличающихся вариативностью и определяющих антигенность молекулы ЛПС). Фагоцитоз и деградация ЛПС происходит при связывании O-антигена с антителами, с последующей нейтрализацией образовавшегося комплекса. Строение липида А, отвечающего за токсические свойства ЛПС идентично у грамотрицательных бактерий: состоит из жирных кислот, глюкозамина, остатков фосфата [5].

Известны методы количественного определения компонентов клеточной стенки микроорганизмов в различных средах методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС) [6,7]. Методом ГХ-МС в биосубстратах можно определить высшие жирные кислоты, гидроксикислоты, спирты, альдегиды, стерин, имеющие микробное происхождение [8 - 10]. Состав компонентов клеточной стенки микроорганизмов видоспецифичен, что позволяет использовать производные липидов клеточной стенки для родовой и видовой идентификации микроорганизмов в чистой культуре [11]. Исследование заключается в прямом извлечении с помощью химической процедуры оболочек стенок влагилица, их анализа методом ГХ-МС. Наличие 2,3-гидроксикислот связывают с присутствием ЛПС микробного происхождения грамотрицательных микроорганизмов [12]. Малые молекулы микробного происхождения вне зависимости от химической природы, составляют часть метаболома человека, привнесённую извне, но влияющую на метаболические процессы и относящуюся к экспосому. Поскольку малые молекулы, составляющие эту часть экспосомы имеют микробное происхождение, то их следует отнести к метаэкспосому [13]. Концепция реакции микробиоты вагинального тракта предполагает связь между видовым составом и функциональной активностью микробиома, как высоко интегрированного микробного сообщества. Идентификация особенностей функциональной активности микробиоценоза вагинального тракта проводится методами многомерной статистики и математического моделирования, поскольку множество разнонаправленных процессов ведут к высокой дисперсии сильно зашумлённых данных [14].

Цель исследования: установить критерии диагностики и мониторинга бактериального вагиноза по метаэкспосомным профилям методом метаэкспосомики.

Материал и методы. Проведено исследование 72 образцов вагинального секрета у пациенток амбулаторного наблюдения консультативно-диагностического центра при Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Возраст пациенток составил 3910 лет. В основную группу включены пациентки с диагнозом бактериальный вагиноз, установленном на основании клинико-инструментальных данных и критериев ПЦР-анализа мазка, взятого со слизистой оболочки влагилица. Диагноз бактериальный вагиноз установлен по результатам ПЦР исследования вагинального мазка на содержание *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и общего количества бактерий на панели «Ам-

плиСенс Флорценоз/ Бактериальный вагиноз – FL». В группу сравнения включены пациентки, не имеющие в анамнезе диагноза бактериальный вагиноз и имеющие отрицательный результат ПЦР-анализа «АмплиСенс Флорценоз/ Бактериальный вагиноз - FL» [15]. Группы сопоставимы по возрасту и основным клинико-анамнестическим данным. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие об участии в исследовании.

Для определения концентрации химических соединений в вагинальном секрете, относящихся к микробным маркерам, использован метод ГХ-МС. Из вагинального секрета с помощью реакции кислотного метанолиза и экстракции гексаном выделены жирно-кислотные соединения. Разделение, идентификация, расчёт концентрации проведено на хроматографе МАЭСТРО 7820А, совмещённым с квадрупольным селективным масс-спектрометром Agilent Technologies 5975 с диапазоном масс 2-1000 аем, имеющем разрешающую способность 0,5 аем во всём рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг по метил-стеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг в режиме селективных ионов, на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0,20 мм. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки - 5 град/мин в диапазоне 130-320 °С. Масс-спектрометр квадрупольный, с ионизацией электронами (70 эВ) работает в режиме масс-фрагментографии (МФ) селективных ионов (multiple ions monitoring - МИМ), при периодическом детектировании до 30 ионов в пяти интервалах времени. Газ носитель - гелий. Расчёт концентраций проведён по методу внутреннего стандарта с использованием программы, поставляемой производителем хроматографа [8].

Метод ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (ПЦР-РВ) выполнен на коммерческой панели «АмплиСенс Флорценоз/ Бактериальный вагиноз – FL» (АмплиСенс, Москва).

Выявление и дифференциация специфических фрагментов генома бактериальной микрофлоры в соскобах эпителиальных клеток боковых стенок влагилица, вагинального отделяемого пациенток осуществлена методом ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Флорценоз/Бактериальный вагиноз - FL» в соответствии с инструкцией по их применению. Амплификацию осуществляли на термоциклёре Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Определяли общую бактериальную массу (ОБМ), количество фрагментов генома нормофлоры (*Lactobacillus* spp.), факультативно-анаэробных (*Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.), облигатно-анаэробных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corinebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*) в относительных количествах генетически родственных групп микроорганизмов в ОБМ. Определяли абсолютные значения концентраций микоплазм (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma*

(*urialiticum+parvum*)), дрожжеподобных грибов (*Candida* spp.). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения термоциклера Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия) [15].

Статистическая обработка данных проведена методами простой описательной статистики, методами многомерной статистики и математического моделирования. Оценка характера распределения проведена по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Учитывая отклонение от нормальности распределения, применены непараметрические методы с расчётом медианы (Med) и интерквартильного размаха (IQR) (25%-75%), U-критерий Манна-Уитни. Для анализа силы и направленности связи концентраций компонентов клеточной стенки и коэффициентов уникальности использована корреляция Пирсона. Для оценки структуры системы концентраций компонентов клеточной стенки микроорганизмов в вагинальном секрете использован факторный анализ с анализом главных компонент и кластерный анализ корреляций по методу Варда. Определение сигнатуры бактериального вагиноза из

концентраций компонентов клеточной стенки проведено с помощью линейного дискриминантного анализа с кросс-валидацией моделей. Пороговые значения концентраций компонентов клеточной стенки в вагинальном секрете, точность, чувствительность и специфичность критерия определены с помощью бинарной логистической регрессии (ROC-анализа). Уровень статистической значимости для всех расчётов принимался 95% ($p < 0,05$) [16]. Статистические расчёты и математическое моделирование проведено с помощью пакета программ Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. Исследование содержания компонентов клеточной стенки микроорганизмов проведено в вагинальном секрете и смывах со слизистой оболочки стенок влагалища методом ГХ-МС. Исследование характера распределения по критерию Шапиро-Уилка показало отсутствие нормального распределения. Для характеристики средних значений по группам использованы медиана и интерквартильный разброс. Сравнение статистической значимости между группами проведено по критерию Манна-Уитни. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Концентрации компонентов клеточной стенки микроорганизмов во влагалищном секрете у пациенток с бактериальным вагинозом, нмоль/г

Наименование	Основная группа	Группа сравнения	Статистическая значимость
Декановая кислота (10:0)	0,407 [0,329-0,571]	0,349 [0,269-0,523]	0,2019
Додекановая кислота (12:0)	2,152 [1,716-3,498]	1,863 [1,418-3,568]	0,3687
Изодекановая кислота (i12)	0,024 [0,012-0,039]	0,018 [0,01-0,027]	0,2909
Антеизодекановая кислота (a13)	0,059 [0,043-0,085]	0,052 [0,037-0,094]	0,7485
Изотетрадекановая кислота (i14)	0,503 [0,335-1,923]	0,288 [0,172-0,581]	$p < 0,01$
9,10-тетрадеценная кислота (14:1d9)	0,153 [0,104-0,262]	0,163 [0,093-0,299]	0,885
11,12-тетрадеценная кислота (14:1d11)	0,053 [0,03-0,107]	0,079 [0,043-0,133]	0,2398
Цис-7-тетрадекановая кислота (14:1d7)	0,021 [0,015-0,036]	0,023 [0,014-0,038]	0,885
Изопентадекановая кислота (i15)	0,793 [0,399-2,459]	0,539 [0,359-1,116]	0,1235
Антеизопентадекановая кислота (a15)	1,759 [0,803-3,214]	1,027 [0,65-1,789]	0,0311
9,10-пентадеценная кислота (15:1d9)	0,092 [0,06-0,167]	0,094 [0,056-0,152]	0,9649
10-метилпентадекановая кислота (10me15)	0,344 [0,246-0,57]	0,364 [0,245-0,761]	0,5504
Изогексадеценная кислота (i16:1d9)	0,145 [0,106-0,232]	0,153 [0,08-0,281]	0,8553
Изогексадекановая кислота (i16)	3,248 [1,826-6,408]	2,394 [1,626-4,624]	0,3425
7,8-гексадеценная кислота (16:1d7)	2,547 [2,04-4,465]	2,749 [1,817-4,024]	0,8553
Цис-11-гексадекановая кислота (16:1d11)	0,392 [0,261-0,645]	0,433 [0,232-0,617]	0,7773
10-метилгексадекановая кислота (10me16)	4,781 [3,656-7,153]	4,871 [2,783-9,186]	0,7107
Транс-9,10-гексадеценная кислота (16:1d9t)	1,011 [0,711-1,548]	0,935 [0,593-1,679]	0,6284
Гептадекановая кислота (17:0)	82,32 [42,44-111,28]	69,7 [39,14-111,96]	0,7581
Антеизогептадеценная кислота (a17:1)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,3892
Антеизогептадекановая кислота (a17)	6,924 [3,302-10,122]	5,844 [3,62-10,237]	0,9549
Цис-9-изогептадеценная кислота (i17:1d9)	0,859 [0,668-2,167]	0,993 [0,486-1,948]	0,7485
Цис-9-гептадеценная кислота (17:1d9)	2,01 [0,852-3,031]	1,971 [0,924-4,557]	0,6106
Циклогептадекановая кислота (17cyc)	0,071 [0,031-0,195]	0,044 [0,029-0,089]	0,2203
10-метилгептадекановая кислота (10me17)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,5558
Изооктадекановая кислота (i18)	0,013 [0,005-0,052]	0,022 [0,004-0,054]	0,8455
Цис-11-октадеценная кислота (18:1d11)	52,485 [30,21-81,494]	47,4 [28,841-72,412]	0,7014
10-метилоктадекановая кислота (10me18)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,5558
Изонанадекановая кислота (i19)	0,859 [0,623-1,553]	0,647 [0,498-0,996]	0,0732
Антеизонанадекановая кислота (a19)	1,867 [1,116-2,834]	1,736 [1,077-3,494]	0,9749
Циклононадекановая кислота (19cyc)	0,041 [0,01-0,115]	0,022 [0,008-0,053]	0,1806
Эйкозановая кислота (20:1)	4,692 [2,546-6,968]	3,088 [2,169-6,487]	0,2768
Цис-11-эйкозановая кислота (20:1d11)	5,429 [1,927-7,922]	4,844 [2,288-7,748]	0,7869

Наименование	Основная группа	Группа сравнения	Статистическая значимость
3-гидроксидекаановая кислота (3h12)	0,015 [0,011-0,032]	0,012 [0,008-0,015]	0,0585
2-гидроксидекаановая кислота (2h12)	0,009 [0,007-0,015]	0,011 [0,007-0,016]	0,4544
3-гидрокситетрадекановая кислота (3h14)	0,048 [0,035-0,212]	0,037 [0,025-0,047]	0,0197
2-гидрокситетрадекановая кислота (2h14)	0,179 [0,09-0,359]	0,177 [0,1-0,283]	0,9749
3-гидроксиизопентадекановая кислота (3hi15)	0 [0-0,01]	0 [0-0]	p<0,01
2-гидроксиизопентадекановая кислота (2hi15)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,2841
3-гидроксипентадекановая кислота (3h15)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,4798
3-гидроксигексадекановая кислота (3h16)	0,749 [0,384-1,626]	0,495 [0,309-0,782]	0,0536
10-гидроксиоктадекановая кислота (10h18)	2,51 [0,504-5,575]	2,173 [0,216-6,063]	0,8455
3-гидроксиоктадекановая кислота (3h18)	0,157 [0,09-0,218]	0,106 [0,065-0,165]	0,0933
3-гидроксиэйкозановая кислота (3h20)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,023
3-гидроксибегеновая кислота (2h22)	3,935 [2,066-5,399]	3,21 [1,351-5,373]	0,5504
2-гидроксилигноцериновая кислота (2h24)	40,22 [15,03-64,04]	36,26 [12,65-61,01]	0,7773
2-гидроксицеротиновая кислота (2h26)	30,26 [6,50-41,26]	26,64 [8,24-43,76]	0,8357
Тетрадекановый альдегид (14a)	1,251 [0,373-3,061]	0,643 [0,328-1,134]	0,9649
Изотетрадекановый альдегид (i14a)	0,188 [0,066-0,473]	0,127 [0,066-0,331]	0,3961
Изопентадекановый альдегид (i15a)	0,091 [0,061-0,184]	0,073 [0,039-0,115]	0,2203
Антеизопентадекановый альдегид (a15a)	0,088 [0,044-0,137]	0,079 [0,045-0,189]	0,7677
Изо-гексадекановый альдегид (i16a)	2,108 [1,043-2,864]	1,535 [0,897-2,542]	0,3891
Изогепта декановый альдегид (i17a)	0,841 [0,507-2,313]	0,696 [0,404-1,274]	0,2996
Цис-11-октадеценный альдегид (18:1d11a)	0,886 [0,315-2,871]	0,919 [0,401-2,735]	0,985
Цис-9-октадеценный альдегид (18:1d9a)	3,302 [1,97-15,996]	3,214 [2,317-6,298]	0,4697
Холестадиион (cholestandion)	0,057 [0,036-0,137]	0,118 [0,055-0,191]	0,0908
Холестандиенон (cholestadienon)	0,095 [0,06-0,238]	0,142 [0,065-0,331]	0,2824
Холистердиол (cholestendiol)	0,154 [0,098-0,241]	0,152 [0,095-0,297]	0,885
Кампестерол (campesterol)	0,144 [0,132-0,169]	0,132 [0,073-0,2]	0,4697
Копростанол (coprostanol)	0,02 [0,015-0,036]	0,031 [0,012-0,046]	0,5092
β-ситостерол (b-sitosterol)	0,105 [0,043-0,316]	0,203 [0,074-0,332]	0,3115
Холестерол (cholesterol)	4,146 [0,418-10,527]	0,526 [0,22-7,534]	0,3961

Примечание. Полу жирным курсивом обозначены показатели, имеющие статистическую значимость, рассчитанную по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

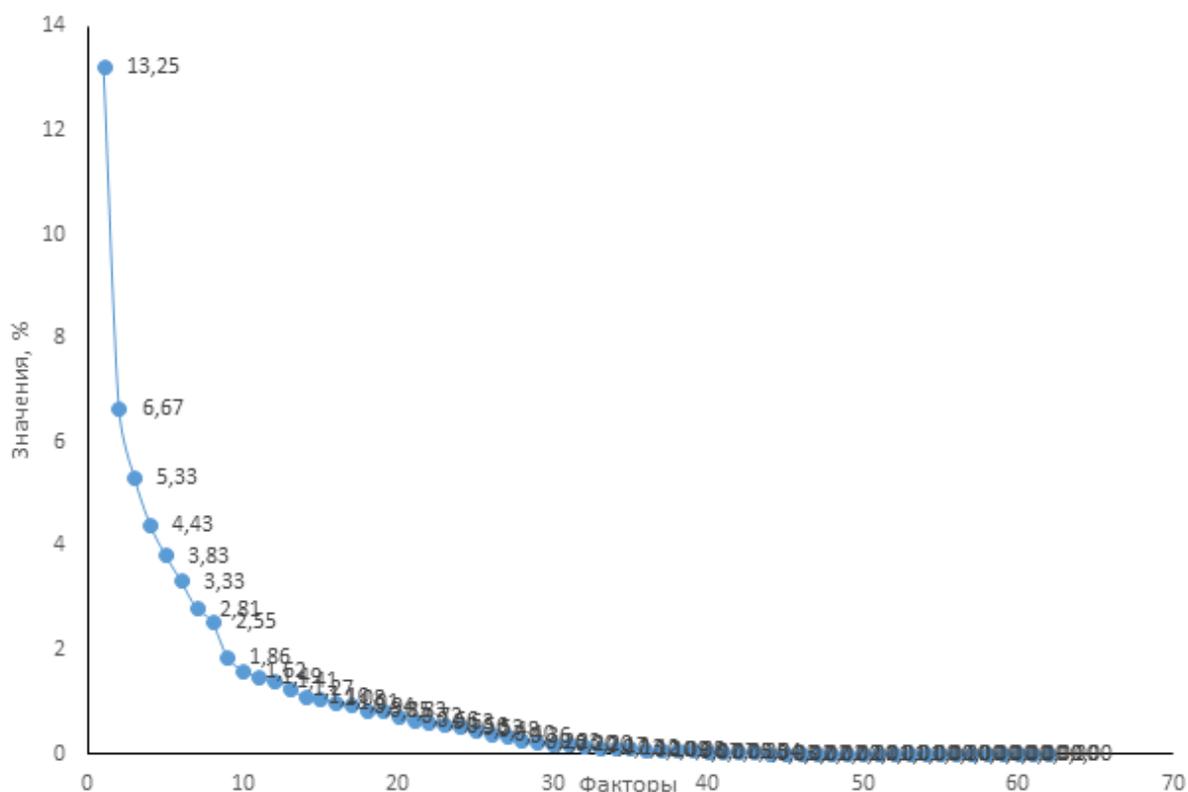


Рис. 1. Оценка количества значимых факторов по методу «каменистой осыпи».

Из данных, представленных в табл. 1 следует, что большинство концентраций компонентов клеточной стенки не имеют статистически значимых различий. В основной группе концентрации изотетрадекановой, антеизопентадекановой, 3-гидрокситетрадекановой, 3-гидроксиизопентадекановой кислоты повышены по сравнению с группой сравнения. Бактериальный вагиноз характеризуется повышением уровня отдельных малых молекул микробного происхождения. Увеличение концентраций компонентов клеточной стенки может быть связано с увеличением количества микроорганизмов, накоплением липидов клеточной стенки в микробно-тканевом комплексе слизистой оболочки влагалища, в том числе в полимикробных биоплёнках. Сложная система взаимодействия организма и микробиоты вагинального тракта, представляет многофакторную динамическую структуру, что отражается в изменении концентраций малых молекул микробного происхождения. Для поиска критериев бактериального вагиноза в системе концентраций в вагинальном секре-

те малых молекул микробного происхождения использована многомерная статистика.

Анализом главных компонент исследована система из 62 компонентов, предварительно нормализуя данные по выборке. Методом «каменистой осыпи» определено 10 значимых факторов системы, описывающих 73,7% всех корреляционных связей в системе (рис. 1).

Проведённый факторный анализ из 10 значимых факторов показал, что значимые корреляции с фактором 1 (13,2% корреляций) наблюдаются для 6 концентраций, для 2 и 6 факторов (6,7%, 3,3% корреляций соответственно) – по одной концентрации.

Для уточнения направленности изменений системы проведён кластерный анализ корреляций Спирмена по методу Варда. Методом «каменистой осыпи» определено 12 кластеров. По результатам кластеризации определены группы концентраций малых молекул, имеющие статистически значимые корреляции в факторном анализе, объединённые в различные кластеры (табл. 2).

Таблица 2

Коэффициенты корреляции факторного анализа распределённые по кластерам

Наименование	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 6
Кластер А			
10-метилгексадекановая кислота (10Me16)	-0,785*	-0,158	-0,009
Антеизогептадекановая кислота (a17)	-0,851*	0,243	0,001
Цис-9-изогептадеценная кислота (i17:1d9)	-0,822*	-0,107	-0,076
Цис-9-гептадеценная кислота (17:1d9)	-0,753*	-0,172	-0,115
Кластер В			
3-гидроксидекадановая кислота (3h12)	-0,058	-0,021	-0,585
Изопентадекановая кислота (i15)	-0,513	0,151	-0,705*
Антеизопентадекановая кислота (a15)	-0,558	0,414	-0,581
3-гидроксигексадекановая кислота (3h16)	-0,521	-0,078	-0,623
3-гидроксиоктадекановая кислота (3h18)	-0,705*	-0,170	-0,334
Изотетрадекановая кислота (i14)	-0,523	0,583	-0,283
3-гидроксиэйкозановая кислота (3h20)	-0,574	-0,135	-0,071
Кластер С			
Гептадекановая кислота (17:0)	-0,720*	-0,148	-0,027
Цис-11-октадеценная кислота (18:1d11)	-0,632	-0,134	0,081
Цис-11-эйкозановая кислота (20:1d11)	-0,682	-0,236	0,218
Изотетрадекановый альдегид (i14a)	-0,260	-0,166	-0,088
Холестерол (Cholesterol)	-0,574	-0,135	-0,071
Кластер D			
Изогексадекановая кислота (i16)	-0,621	0,673	0,090
Изооктадекановая кислота (i18)	-0,505	0,584	0,071
Антеизононадекановая кислота (a19)	-0,599	0,561	0,002
Кампестерол (Campesterol)	-0,430	0,330	-0,041
β-ситостерол (b-Sitosterol)	-0,334	0,100	0,003
Антеизодекановая кислота (a13)	-0,389	0,705*	0,138
11,12-тетрадеценная кислота (14:1d11)	-0,299	0,454	0,106

Примечание. * - Коэффициенты корреляции, имеющие статистическую значимость по критерию Фишера ($p < 0,05$).

Как следует из табл. 2, наибольшей корреляцией в факторе 1 обладает антеизогептадекановая кислота (a17). Другие компоненты, объединённые в кластер А, также имеют высокие показатели коэффициентов корреляции, но статистическая значимость различий между основной группой и группой сравнения не отмечается (см. табл. 1). Соединения 1 фактора объеди-

нённые в кластер А указывают на значительное изменение системы, не связанное с бактериальным вагинозом. В кластере В наблюдаются статистически значимые корреляции для фактора 1 у 3-гидроксиоктадекановой кислоты (3h18) и для фактора 6 у изопентадекановой кислоты (i15). Эти соединения не имеют статистически значимых различий между исследуемыми группа-

ми (см. табл. 1), но в данном кластере присутствуют антеизопентадекановая (a15) и изотетрадекановая (i14) кислоты, которые статистически значимо выше в основной группе относительно группы сравнения. Следовательно, вещества кластера В могут характеризовать изменения системы, связанные с бактериальным вагинозом. В кластере С статистически значимая корреляция отмечена для гептадекановой кислоты (17:0), но статистически значимые различия между исследуемыми группами отсутствуют. В кластере D отмечена корреляция в факторе 2 для антеизодекановой кислоты (a13), но для данного компонента отсутствуют различия между основной группой и группой сравнения. Изменения, выявленные факторным и кластерным анализом для компонентов, объединенных в кластеры С и D не связаны с бактериальным вагинозом.

Для расчёта сигнатуры бактериального вагиноза по концентрациям компонентов клеточной стенки микроорганизмов в вагинальном секрете использован линейный дискриминантный анализ. Для построения модели использован алгоритм пошагового исключения компонентов с анализом сопряжённости. Вся выборка разделена на пять частей для проведения кросс-валидации модели. По результатам кросс-валидации определена модель с наилучшими прогностическими показателями (r^2), а для остальных моделей определена средняя прогностическая точность (q^2). При выполнении соотношения $r^2 - q^2 < 0,2$ модель может быть использована для диагностики бактериального вагиноза и для определения коэффициента уникальности бактериального вагиноза. По результатам дискриминантного анализа в модель включены 9 компонентов (табл. 3).

Таблица 3

Концентрации компонент клеточной стенки микроорганизмов, включенные в модель и их характеристики

Название компонентов клеточной стенки микроорганизмов и их обозначения	λ – Уилкса	Частичная λ – Уилкса	Уровень статистической значимости, $p < 0,05$
Изотетрадекановая кислота (i14)	0,686576	0,721795	0,000008
11,12-тетрадеценная кислота (14:1d11)	0,658463	0,752611	0,000029
Изопентадекановая кислота (i15)	0,631712	0,784482	0,000112
9,10-пентадеценная кислота (15:1d9)	0,6273	0,789999	0,00014
3-гидрокситетрадекановая кислота (3h14)	0,660931	0,749801	0,000026
3-гидроксиизопентадекановая кислота (3hi15)	0,587924	0,84291	0,001186
Цис-11-октадеценная кислота (18:1d11)	0,640806	0,773349	0,00007
Тетрадекановый альдегид (14a)	0,535534	0,925369	0,028951
Антеизопентадекановый альдегид (a15a)	0,541958	0,914401	0,018974

Как следует из табл. 3, самое низкое значение частичной λ – Уилкса отмечено для изотетрадекановой кислоты (i14), что свидетельствует о том, что изотетрадекановая кислота (i14) вносит наибольший вклад в разделение групп. Полу-

ченное уравнение дискриминантной функции позволяет статистически значимо разделить основную группу и группу сравнения с уровнем значимости $p = 0,000001$. Классификационная матрица представлена в табл. 4.

Таблица 4

Классификационная матрица

Исследуемые группы	Определено моделью			
	% корректно определенных	Основная группа	Группа сравнения	Всего
Основная группа	65%	13	7	20
Группа сравнения	98%	1	51	52
Всего	89%	14	58	72

В табл. 4 показано, что прогностическая точность модели составляет 88% при 65% чувствительности и 98% специфичности. Показатели кросс-валидации ($r^2 = 0,89$, $q^2 = 0,72$ $r^2 - q^2 < 0,2$) указывают на возможность использования математической модели для проведения клинической лабораторной диагностики и мониторинга.

Полученный диагностический коэффициент имеет следующий вид:

$$K_d = 2,163 \cdot i14 - 8,608 \cdot 14:1d11 - 1,171 \cdot i15 - 17,637 \cdot 15:1d9 + 19,468 \cdot 3h14 + 33,024 \cdot 3hi15 + 0,057 \cdot 18:1d11 - 0,075 \cdot 14a - 3,207 \cdot a15a - 3,350,$$

где i14, 14:1d11, i15, 15:1d9, 3h14, 3hi15, 18:1d11, 14a, a15a – концентрации соответствующих компонен-

тов клеточных стенок в вагинальном секрете (нмоль/г). Значение K_d больше 0 свидетельствует о бактериальном вагинозе, меньше 0 – об его отсутствии.

Для каждой пациентки рассчитан коэффициент уникальности, указывающий на чёткость метаэкспозомного отпечатка. Для расчёта коэффициента уникальности использованы расстояния Махаланобиса от значения дискриминантной функции анализа пациентки до соответствующего центроида по формуле:

$$KU = \frac{M_{ГС}}{M_{ГС} + M_{ОГ}},$$

где $M_{ГС}$ и $M_{ОГ}$ – расстояния Махаланобиса от значе-

ния дискриминантной функции пациентки до центраида группы сравнения и опытной группы соответственно.

KY - коэффициент уникальности, который изменяется от 0 до 1 и указывает на чёткость сигнатуры бактериального вагиноза.

Использован коэффициент уникальности для выбора компонента клеточной стенки, характеризующего бактериальный вагиноз по силе корреляционной связи концентрации и коэффициента уникальности. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Коэффициенты корреляции факторного анализа, коэффициента уникальности и кратность различий между основной группой и группой сравнения, распределенные по кластерам

Наименование	Факторы	Коэффициент уникальности	Кратность значений
Кластер А			
10-метилгексадекановая кислота (10Me16)	-0,785 ¹	0,22	-
Антеизогептадекановая кислота (a17)	-0,851 ¹	0,39	-
Цис-9-изогептадеценная кислота (i17:1d9)	-0,822 ¹	0,29	-
Цис-9-гептадеценная кислота (17:1d9)	-0,753 ¹	0,18	-
Кластер В			
3-гидроксидодекановая кислота (3h12)	-	0,22	-
Изопентадекановая кислота (i15)	-0,705 ⁶	0,28	-
Антеизопентадекановая кислота (a15)	-	0,34	1,47
3-гидроксигексадекановая кислота (3h16)	-	0,32	-
3-гидроксиоктадекановая кислота (3h18)	-0,705 ¹	0,3	-
Изотетрадекановая кислота (i14)	-	0,34	1,75
Кластер С			
Гептадекановая кислота (17:0)	-0,720 ¹	0,22	-
Цис-11-октадеценная кислота (18:1d11)	-	0,39	-
Цис-11-эйкозановая кислота (20:1d11)	-	0,32	-
Изотетрадекановый альдегид (i14a)	-	0,1	-
Холестерол (Cholesterol)	-	0,25	-
3-гидроксиэйкозановая кислота (3h20)	-	0,19	1,01
Кластер D			
Изогексадекановая кислота (i16)	-	0,3	-
Изооктадекановая кислота (i18)	-	0,22	-
Антеизононадекановая кислота (a19)	-	0,19	-
Кампестерол (Campesterol)	-	0,12	-
β-ситостерол (b-Sitosterol)	-	0,07	-
Антеизодекановая кислота (a13)	0,705 ²	0,12	-
11,12-тетрадеценная кислота (14:1d11)	-	0,12	-

Примечание. В данной таблице обозначены только коэффициенты корреляции факторного анализа, имеющие статистическую значимость, а верхний индекс обозначает номер фактора. Полу жирным курсивом обозначены коэффициенты корреляции коэффициентов уникальности, имеющие статистическую значимость.

Как следует из табл. 5, наибольшее значение коэффициента корреляции коэффициента уникальности отмечено для антеизогептадекановой кислоты (a17) в кластере А и цис-11-октадеценной кислоты (18:1d11) кластера С. Различия между основной группой и группой сравнения для этих компонентов не имеют статистической значимости, что не позволит им служить качественными классификаторами и критериями оценки бактериального вагиноза. Наибольшее число статистически значимых корреляций с коэффициентом уникальности отмечено для компонентов, объединенных в кластер В, а наибольшую кратность увеличения для бактериального вагиноза показывают концентрации антеизопентадекановой (a15) и изотетрадекановой (i14) кислот. При помощи ROC-анализа сравним характеристики логистической регрессии для этих компонентов (рис. 2).

На рис. 2 ROC-кривая находится над диагональю, что указывает на состоятельность классификатора. Разница значений AUC для компонентов незначительна,

что указывает на равное качество классификации бактериального вагиноза по данным концентрациям компонентов клеточной стенки.

Показатели точности концентраций антеизопентадекановой (a15) и изотетрадекановой (i14) кислот имеют одинаковые показатели точности, при этом чувствительность концентрации изотетрадекановой (i14) кислоты выше на 10%, при снижении чувствительности на 3,9% по сравнению с концентрацией изотетрадекановой (i14) кислоты в вагинальном секрете табл. 6.

Учитывая, присутствие в модели дискриминантного анализа концентрации изотетрадекановой (i14) кислоты с наибольшим вкладом в разделение групп (наименьшим значением частичной лямбды Уилкса), можно использовать концентрацию изотетрадекановой (i14) кислоты как диагностический критерий бактериального вагиноза с референсным значением 0,355 нмоль/г. Превышение значения 0,355 нмоль/г указывает на бактериальный вагиноз с точностью 76,4%, специфичностью 94,2%, чувствительностью 30%.

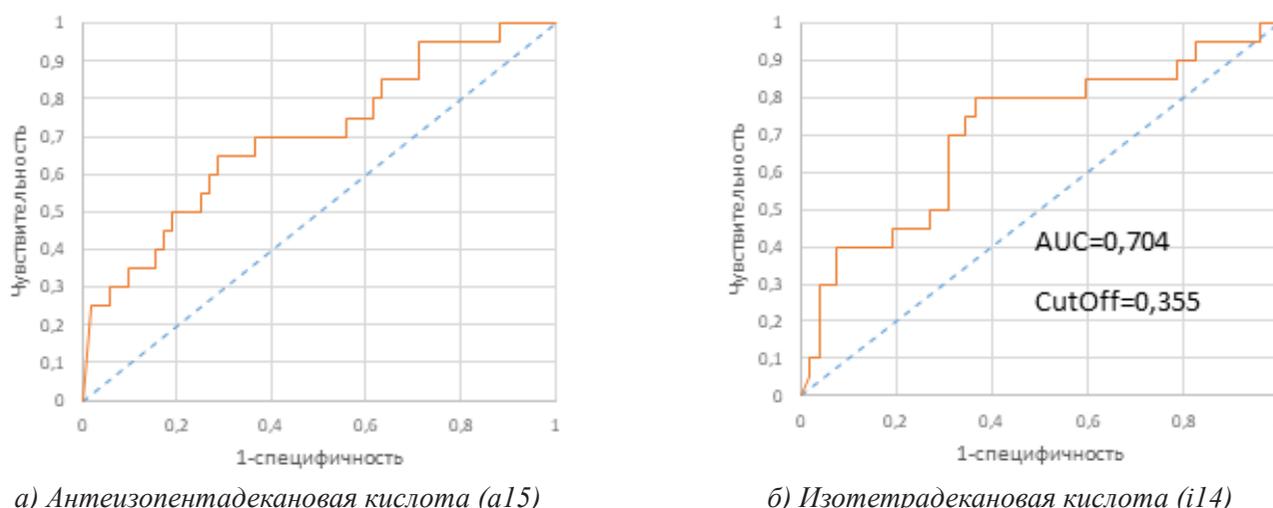


Рис. 2. ROC-кривые классификации бактериального вагиноза по концентрациям компонентов клеточной стенки микроорганизмов в вагинальном секрете.

Таблица 6

Качественные характеристики классификатора бактериального вагиноза для концентраций антеизопентадекановой (a15) и изотетрадекановой (i14) кислот, %

Параметры	Антеизопентадекановая кислота (a15)	Изотетрадекановая кислота (i14)
Чувствительность	20	30
Специфичность	98,1	94,2
Точность	76,4	76,4

Заключение. Продукция эндотоксина микрофлорой вагинального тракта при бактериальном вагинозе происходит за счёт увеличения количества клеточной стенки микроорганизмов. Система микробно-тканевого комплекса - является сложной динамической с множеством различных процессов, которые могут способствовать как увеличению, так и снижению концентраций различных компонентов клеточной стенки. Исследование сложной многофакторной системы требует системного подхода, реализуемого в ОМИК-технологиях. Проведение факторного и кластерного анализа показало 10 значимых факторов изменения системы, с кластеризацией на 12 кластеров. После отсева незначимых концентраций компонентов клеточной стенки выделено 4 кластера. Линейным дискриминантным анализом определён вектор (коэффициент уникальности), позволяющий выделить компоненты, связанные именно с развитием бактериального вагиноза. Кластер В, объединяющий жирные и гидроксикислоты с длинной углеродной цепи от 12 до 18 атомов углерода, показал наибольшую связь с бактериальным вагинозом. Полученный в результате линейного дискриминантного анализа диагностический коэффициент имеет более высокие прогностические характеристики, чем концентрации критерия бактериального вагиноза изотетрадекановой (i14) кислоты.

Использование полученных критериев бактериального вагиноза позволяет расширить возможности клинической лабораторной диагностики, возможности мониторинга лечения и профилактики бактериального вагиноза в результате накопления эндотоксинов на сли-

зистой оболочке стенок влагалища.

ЛИТЕРАТУРА (П. 11 СМ. REFERENCES)

- Ефимов Б.А., Тютюнник В.Л. Бактериальный вагиноз: современный взгляд на проблему. *Русский медицинский журнал*. 2008; 16(1): 18.
- Цветкова А.В., Муртазина З.А., Маркушева Т.В., Мавзютов А. Р. Сравнительный анализ информативности основных клинических критериев, используемых для диагностики бактериального вагиноза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(5): 41-4.
- Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю., Байрамова Г.Р., Межевитинова Е.А. и др. Молекулярное типирование штаммов *Gardnerella vaginalis*, выделенных у женщин репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом бактериального вагиноза. *Бактериология*. 2018; 3(4): 26-32.
- Рябиченко Е. В., Веткова В. М., Бондаренко В. М. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2004; 3: 98-105.
- Гайсина Ю.Р., Ахмадуллина Ю.А., Гильманов А.Ж., Мавзютов А. Р. Эндотоксемия и влияние микробных липополисахаридов на систему гемостаза у женщин с бактериальным вагинозом. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2011; 6(3): 155-9.
- Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М.: Медицина; 1978.
- Радугина Н.В., Миронов А.Ю., Жиленкова О.Г., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Мехтиев Э.Р.О. Сравнительная характеристика состояния микробиоценоза вагинального тракта и его функциональной активности при кандидозной, микоплазменной, ВПЧ-инфекции и бактериальном вагинозе. *Успехи медицинской микологии*. 2018; 18: 52-61.
- Миронов А.Ю., Пашков Е.П. Использование газо-жидкостной хроматографии в анаэробной бактериологии (обзор литературы). *Лабораторное дело*. 1988; 3: 3-9.

9. Воробьев А. А., Миронов А. Ю., Пашков Е. П. Современные методы лабораторной диагностики инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробными бактериями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1996; 1: 14-6.
10. Платонова А.Г., Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Кириллова Н.В., Родионов Г.Г. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микробных жирных кислот в биологических жидкостях человека и их клиническая значимость. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 46-55.
12. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Бойко Н.Б. Количественный in situ анализ микробиоты кишечной стенки и фекалий методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004; 9: 67-8.
13. Затевалов А. М., Безродный С. Л., Марданлы С. Г., Помазанов В. В. Микробиом-ассоциированная экспосомика – новое перспективное направление предиктивной диагностики. Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: Сборник материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной Году науки и технологий (Орехово-Зуево, 26 ноября 2021 г.). С.Г. Марданлы, В.В. Помазанов, В.А. Киселева, ред. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2021: 106-9.
14. Безродный С.Л., Марданлы С.Г., Затевалов А.М., Помазанов В.В., Терешина Е.В. Развитие концепции экспосомы в оценке влияния микробиома на нарушения липидного и углеводного обмена человека. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2021; 4: 26-42.
15. Бактериальный вагиноз: Клинические рекомендации. Общероссийская общественная организация «Российское общество дерматовенерологов и косметологов». М.: Деловой экспресс; 2022.
16. Боровиков В.П., Боровиков И.П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Филинь; 1997.
5. Gaysina Yu.R., Axmadullina Yu.A., Gil'manov A.Zh., Mavzyutov A.R.. Endotoxemia and the effect of microbial lipopolysaccharides on the hemostatic system in women with bacterial vaginosis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2011; 6(3):155-9. (in Russian)
6. Mitruka B.M. Application of gas chromatography in microbiology and medicine. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
7. Radugina N.V., Mironov A.YU., Zhilenkova O.G., Sel'kova Ye.P., Zatevalov A.M., Mekhtiyev E.R.O. Comparative characteristics of the state of microbiocenosis of the vaginal tract and its functional activity in case of candidiasis, mycoplasma, HPV infection and bacterial vaginosis. *Uspekhi meditsinskoj mikologii*. 2018; 18:52-61. (in Russian)
8. Mironov A.Yu., Pashkov Ye.P. Use of gas-liquid chromatography in anaerobic bacteriology (literature review). *Laboratornoye delo*. 1988; 3:3-9. (in Russian)
9. Vorob'yev A.A., Mironov A.Yu., Pashkov Ye.P. Modern methods of laboratory diagnostics of infections caused by non-spore-forming anaerobes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 1996; 1:14-6. (in Russian)
10. Platonova A.G., Osipov G.A., Boyko N.B., Kirillova N.V., Rodionov G.G.. Chromatographic mass spectrometric study of microbial fatty acids in human biological fluids and their clinical significance. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(12):46-55. (in Russian)
11. Axelsson B.-O., Saraf A., Larsson L. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 1995; 666:77-84.
12. Osipov G.A., Parfenov A.I., Verkhovtseva N.V., Ruchkina I.N., Boyko N.B. Quantitative in situ analysis of the microbiota of the intestinal wall and feces by gas chromatography-mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2004; 9:67-8. (in Russian)
13. Zatevalov A.M., Bezrodny S.L., Mardanly S.G., Pomazanov V.V. Microbiome-associated exposomics - a new promising direction in predictive diagnostics. Prospects for the implementation of innovative technologies in medicine and pharmacy: Collection of materials VIII All-Russian scientific and practical conference with international participation, dedicated to the Year of Science and Technology (Orekhovo-Zuevo, November 26, 2021). S.G. Mardanly, V.V. Pomazanov, V.A. Kiseleva, eds. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarnotekhnologicheskii universitet; 2021:106-9. (in Russian)
14. Bezrodny S.L., Mardanly S.G., Zatevalov A.M., Pomazanov V.V., Tereshina Ye.V. Development of the exposome concept in assessing the influence of the microbiome on human lipid and carbohydrate metabolism disorders. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2021; 4:26-42. (in Russian)
15. Bacterial vaginosis. [Klinicheskiye rekomendatsii. Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya «Rossiyskoye obshchestvo dermatovenerologov i kosmetologov». Moscow: Delovoy ekspres; 2022. (in Russian)
16. Borovikov V.P., Borovikov I.P. STATISTICA: STATISTICA: Statistical analysis and data processing in the Windows environment. Moscow: Filin'; 1997. (in Russian)

REFERENCES

1. Yefimov B.A., Tyutyunnik V.L. Bacterial vaginosis: a modern view of the problem. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 16(1):18. (in Russian)
2. Tsvetkova A.V., Murtazina Z.A., Markusheva T.V., Mavzutov A.R. The comparative analysis of information value of main clinical criteria used to diagnose of bacterial vaginosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(5):41-4. (in Russian)
3. Priputnevich T.V., Murav'eva V.V., Donnikov A.E., Trofimov D.Yu., Bay-ramova G.R., Mezhevitina E.A. et al. Molecular typing of *Gardnerella vaginalis* strains isolated in women of reproductive age with a verified diagnosis of bacterial vaginosis. *Bakteriologiya*. 2018; 3(4):26-32. (in Russian)
4. Ryabichenko Ye.V., Vetkova V.M., Bondarenko V.M. Molecular aspects of the damaging effect of bacterial lipopolysaccharides. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2004; 3:98-105. (in Russian)