

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 70
2 • 2025

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

ФЕВРАЛЬ

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 18.01.2025
Подписано в печать 25.01.2025

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. 2025. Том 70. № 2.
75-151

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 70
2 • 2025

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

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

Лямина С.В., Маев И.В., Кожевникова Е.О.

Молекулярные биомаркеры для неинвазивной диагностики и мониторинга активности воспалительных заболеваний кишечника: сегодня и завтра (обзор литературы) 79

Костина О.В., Галова Е.А., Преснякова М.В.

Особенности влияния гормонов на увеличение риска спортивного травматизма и развитие синдрома перетренированности у детей и подростков-спортсменов (обзор литературы) 89

Альникин А.Б., Максимов А.Ю., Енгибарян М.А., Демидова А.А.

Оптимизация тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы с помощью методов лабораторной диагностики 97

ГЕМАТОЛОГИЯ

Вареха Н.В., Стуклов Н.И., Гимадиев Р.Р., Варакина-Митрай К.А.

Искусственный интеллект в лабораторной диагностике железодефицитной анемии (обзор литературы) 102

КОАГУЛОЛОГИЯ

Берковский А.Л., Бабкеева Э.Р., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Сапунова И.Д., Каримова И.Н.

Предотвращение возможных ошибок лабораторной детекции волчаночного антикоагулянта 108

ИММУНОЛОГИЯ

Александрова Е.Н., Новиков А.А., Кулакова П.И., Кольцова Е.Н., Савенкова Н.А., Волнухин Е.В., Ковшик А.Н., Лукина Г.В.

Антитела, ассоциированные с воспалительными заболеваниями кишечника, при анкилозирующем спондилите 112

Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Мануйлов В.А., Свитич О.А., Борисова О.В.

Разработка и оценка диагностических характеристик иммуноферментного метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 и ACE₂ 119

Шпилева М.В., Чикин В.В., Носов Н.Ю., Арбузова Н.В.

Лабораторная диагностика аутоиммунных буллезных дерматозов: возможности тест-систем для иммуноферментного анализа (обзор литературы) 126

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ильин И.И., Беляков И.С., Марданлы С.Г.

Генотипирование вирусов папилломы человека в урогенитальных мазках методом прямой ПЦР в реальном времени 135

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Ивойлов О.О., Кочетов А.Г., Сальникова Ю.П., Велицкая О.А.

Трудозатраты персонала автоматизированной медицинской лаборатории на проведение гематологических исследований 141

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

Lyamina S.V., Maev I.V., Kozhevnikova E.O.

Molecular biomarkers for noninvasive diagnosis and monitoring of inflammatory bowel disease: today and tomorrow (review of literature)79

Kostina O.V., Galova E.A., Presnyakova M.V.

Features of the effect of hormones on increasing the risk of sports injuries and the development of overtraining syndrome in children and adolescent athletes (review of literature)89

Alnikin A.B., Maksimov A.Yu., Engibaryan M.A., Demidova A.A.

Optimization of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodes using laboratory diagnostics methods97

HEMATOLOGY

Varekha N.V., Stuklov N.I., Gimadiev R.R., Varakina-Mitrail K.A.

Artificial intelligence in laboratory diagnostics of iron deficiency anemia (review of literature)102

COAGULOLOGY

Berkovsky A.L., Babkeeva E.R., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Sapunova I.D., Karinova I.N.

Prevention of possible errors in laboratory detection of lupus anticoagulant.108

IMMUNOLOGY

Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Kulakova P.I., Koltsova E.N., Savenkova N.A., Volnukhin E.V., Kovschik A.N., Lukina G.V.

Antibodies associated with inflammatory bowel diseases in ankylosing spondylitis. 112

Cherepovich B.S., Kudryashova A.M., Manuilov V.A., Svitich O.A., Borisova O.V.

Development and evaluation of diagnostic characteristics of an enzyme immunoassay for the determination of antibodies blocking the interaction of RBD SARS-CoV-2 and ACE₂. 119

Shpilevaya M.V., Chikin V.V., Nocoov N.Yu., Arbuzova N.V.

Laboratory diagnosis of autoimmune bullous dermatoses: capabilities of test systems for enzyme immunoassay (review of literature) 126

MICROBIOLOGY

Ilyin I.I., Beliakov I.S., Mardanly S.G.

Genotyping of HPV in urogenital smears by real-time direct PCR 135

ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

Ivoylov O.O., Kochetov A.G., Salnikova Yu.P., Velitskaya O.A.

Labor costs of automated medical laboratory staff for performing hematological tests. 141

БИОХИМИЯ



<https://elibrary.ru/uovufd>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Лямина С.В., Маев И.В., Кожевникова Е.О.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА АКТИВНОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА: СЕГОДНЯ И ЗАВТРА (обзор литературы)

ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава РФ, 127006, Москва, Россия

Пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) – это особая категория лиц, для которых тактика диагностики и лечения часто требует внимания и участия врачей разного профиля, поскольку большинство клинических симптомов неспецифичны для ВЗК и часто могут встречаться при других заболеваниях с воспалительным компонентом, таких как кишечные инфекции, лекарственно-индуцированный колит и моногенные заболевания. Кроме того, к настоящему времени непростой задачей как для клиницистов, так и для пациентов остается мониторинг течения ВЗК, поскольку отсутствуют верифицированные неинвазивные критерии оценки достижения клинической и эндоскопической ремиссии заболеваний, а также биомаркеры эффективности проводимой лекарственной терапии. Данный обзор посвящён анализу существующих подходов оценки биомаркеров при ВЗК, а также выбору их возможных сочетаний с учетом данных о специфичности и чувствительности, для целей прецизионной диагностики и персонализации подходов терапии. Поиск литературных источников проводился по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, РИНЦ.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника; биомаркеры; серологические маркеры; фекальные биомаркеры; протеомика; прецизионная диагностика; персонализация; обзор

Для цитирования: Лямина С.В., Маев И.В., Кожевникова Е.О. Молекулярные биомаркеры для неинвазивной диагностики и мониторинга активности воспалительных заболеваний кишечника: сегодня и завтра (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 79-88.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-79-88>

EDN: UOVUFD

Для корреспонденции: Лямина Светлана Владимировна, д-р мед. наук, доц., зав. лабораторией молекулярной патологии пищеварения научно-исследовательского центра биомедицинских исследований; e-mail: svlvs@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России в рамках реализации научной тематики кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии, научно-исследовательского центра биомедицинских исследований.

Поступила 12.09.2024

Принята к печати 17.09.2024

Опубликовано 25.01.2025

Lyamina S.V., Maev I.V., Kozhevnikova E.O.

MOLECULAR BIOMARKERS FOR NONINVASIVE DIAGNOSIS AND MONITORING OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: TODAY AND TOMORROW (review of literature)

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian University of Medicine" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127006, Moscow, Russia

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) are a special category of individuals for whom diagnostic and treatment tactics often require attention and participation of physicians of different specialties, since most clinical symptoms are not specific for IBD and can often occur in other diseases with an inflammatory component, such as intestinal infections, drug-induced colitis, and monogenic diseases. In addition, monitoring the course of IBD remains a difficult task for both clinicians and patients, since there are no verified non-invasive criteria for assessing the achievement of clinical and endoscopic remission of diseases, as well as biomarkers for the effectiveness of drug therapy. This review is devoted to the analysis of existing approaches to assessing biomarkers in IBD, as well as the choice of their possible combinations, taking into account data on specificity and sensitivity, for the purposes of precision diagnostics and personalization of therapeutic approaches. The search for literary sources was conducted using the following databases: Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, and RSCI.

Key words: inflammatory bowel diseases; biomarkers; serologic biomarkers; fecal biomarkers; proteomics; precision diagnostics; personalization; review

For citation: Lyamina S.V., Maev I.V., Kozhevnikova E.O. Molecular biomarkers for noninvasive diagnosis and monitoring of inflammatory bowel disease: today and tomorrow (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 79-88 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-79-88>

EDN: UOVUFD

For correspondence: Lyamina Svetlana Vladimirovna, MD, PhD, Doct of Med. Sci. (Russ), head of the Molecular pathology of digestion laboratory; e-mail: svlvs@mail.ru

Information about authors:

Lyamina S.V., <https://orcid.org/0000-0001-8300-8988>;

Maev I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6114-564X>;

Kozhevnikova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-9835-694X>.

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

Acknowledgment. *The work was carried out with the financial support of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian University of Medicine" of the Ministry of Health of Russia within the framework of the scientific study of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Gastroenterology and the Scientific Center for Biomedical Research.*

Received 12.09.2024

Accepted 17.09.2024

Published 25.01.2025

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) на сегодняшний день прочно продолжают занимать одно из ведущих мест в структуре заболеваний органов пищеварения и остаются одной из актуальных проблем клинической медицины. Это обусловлено не только особенностями развития, но и вариабельностью течения заболеваний, частотой их осложнений, летальностью. ВЗК сегодня объединяет группу идиопатических хронических воспалительных заболеваний кишечника, которые, с одной стороны, характеризуются тесной взаимосвязью с функциональными заболеваниями кишечника (до 30% ВЗК), а, с другой стороны, с онкологическими заболеваниями или их наличием в анамнезе [4,6]. Несомненно, это требует особого внимания уже на этапе диагностики, поскольку сопряжено с необходимостью анализа индивидуальных клинических и лабораторных характеристик пациента, позволяющих сформировать оптимальные для пациента протоколы лечения. Учитывая значимость ранней и дифференциальной диагностики, мониторинга активности ВЗК на фоне проводимой терапии [1,2], очевидна особая ценность биомаркеров, которые позволили бы наиболее точно и с минимальной инвазивностью оценивать состояние пациентов.

В настоящее время «золотым стандартом» диагностики продолжает оставаться эндоскопическое исследование с последующим выполнением морфологического анализа, что в силу инвазивности и затрат на проведение может выступать фактором, ограничивающим их частое применение прежде всего для мониторинга активности заболевания на фоне проводимой терапии. Очевидно, что дополнительные существенные преимущества в виде неинвазивного характера исследований, более коротких сроков получения результатов, экономической эффективности и возможности стандартизации результатов сегодня могли бы быть получены при применении дополнительных лабораторных методов исследования доступного биологического материала пациентов (крови, мочи, образцов кала). Также для диагностики и мониторинга активности ВЗК предложено применение сочетания лабораторных маркеров и эндоскопических и/или визуализирующих методик, при этом изолированное применение минимально инвазивных биомаркеров в настоящее время не используется в качестве самостоятельного диагностического или верификационного метода. В связи с этим, одной

из актуальных задач современной медицинской и биологической наук является поиск новых, обладающих достаточной специфичностью и чувствительностью биомаркеров, позволяющих обеспечить не только прецизионную диагностику ВЗК, но и обосновать выбор персонализированной тактики терапии.

Актуальный статус исследований и разработок.

С целью выявления наиболее часто и эффективно используемых биомаркеров для диагностики и, потенциально, мониторинга терапии при ВЗК был выполнен поиск литературных источников, патентов, а также данных клинических исследований в международных базах Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, РИНЦ, международных патентных базах The Lens, Questel Orbit, патентных базах ФИПС с глубиной поиска 20 лет.

Два последних десятилетия отмечены прогрессирующим увеличением числа работ и патентов по поиску диагностически значимых биомаркеров при ВЗК (рис. 1, А). Текущее распределение количества патентов по типу используемых биомаркеров представлено на кольцевой диаграмме, при этом обращает внимание наибольший интерес к биомаркерам, свойственным для конкретных типов заболеваний – болезни Крона (БК) или язвенного колита (ЯК), а также использующихся с целью диагностики или тераностики. Также обращает внимание незначительное число работ, в которых были представлены биомаркеры, использующиеся для возможностей дифференциальной диагностики БК и ЯК (рис. 1, А). По данным проанализированных патентов, как для диагностики, так и мониторинга активности заболеваний наиболее широко используются 20 биомаркеров. Среди них обращают внимание, помимо фекального кальпротектина, антитела против *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) и перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические антитела (p-ANCA) (рис. 1, Б). Результаты анализа клинических исследований также подтверждают весьма ограниченный набор используемых биомаркеров для диагностики, стратификации и мониторинга ВЗК (рис. 1, В). Так, в качестве дополняющих эндоскопическую картину заболеваний и количественную оценку симптомов при ВЗК (например, индекс активности БК (СДАИ), шкалу Мейо для ЯК), среди биомаркеров наиболее часто используются фекальный кальпротектин и С-реактивный белок (СРБ). Другие оцениваемые биомаркеры (ASCA/ANCA, лак-

тоферрин и липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов (NGAL)/липокалин 2 (LCN2)) лишь

изредка применялись как дополнительные параметры оценки [51].

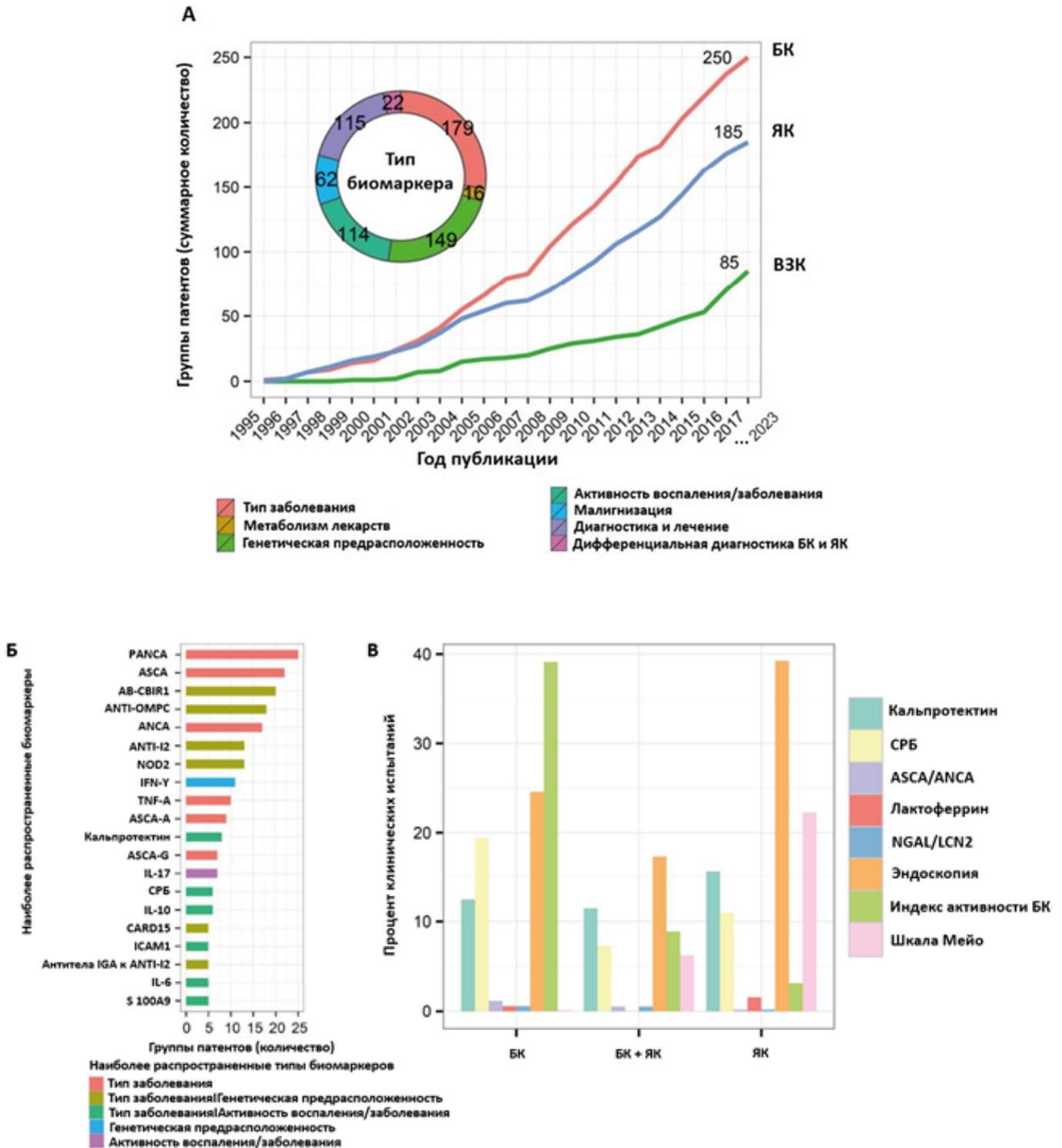


Рис. 1. Обзор биомаркеров ВЗК.
 А - зарегистрированные патенты по применению биомаркеров для диагностики ВЗК;
 Б - топ-20 групп патентов, в которых представлены ассоциированные с ВЗК биомаркеры;
 В - биомаркеры ВЗК, применяемые в клинических исследованиях в мире (по данным ClinicalTrials.gov, проанализировано ЯК: 512 КИ, БК: 695 КИ, ЯК+БК: 191 КИ (адаптировано [51])).
 ab-CIBR1 - антитела к бактериальному флагеллину *Clostridium CIBR1*, anti-OMPC - антитела к порину С мембраны *Escherichia coli*, anti-I2 - антитела к компонентам *Pseudomonas fluorescens*, NOD2 - нуклеотид-связывающий домен олигомеризации 2, ASCA-A - антитела к *Saccharomyces cerevisiae* классов IgA, ASCA-G - антитела к *Saccharomyces cerevisiae* классов IgG, CARD15 - протеин 15, содержащий домен активации каспазы, ICAM1 - молекула межклеточной адгезии 1, S 100A9 - S100 кальций-связывающий белок A9.

Проведенный анализ продемонстрировал устойчивую тенденцию применения общеизвестных молекулярных биомаркеров в клинической практике для диагностики и мониторинга активности ВЗК. Тем не менее, учитывая современные возможности молекулярной биологии, очевидно, необходимым и перспективным является поиск новых потенциальных биомаркеров, в том числе омиксных, для реализации и совершенствования подходов прецизионной диагностики и терапии.

Наиболее известные неинвазивные молекулярные биомаркеры ВЗК. Биомаркеры играют решающую роль в раннем выявлении ВЗК, мониторинге прогрессирования заболевания и оценке терапевтического ответа на проводимую терапию (рис. 2). В качестве одного из подходов оценки активности заболевания сегодня активно применяются лабораторные тесты, по-

зволяющие оценить циркулирующие биомаркеры в крови (сыворотке или плазме), тканях или фекалиях [3]. Несмотря на достаточное количество кандидатных биомаркеров, эффективность оцениваемого параметра для целей диагностики или мониторинга обеспечивается соответствием ряду характеристик: неинвазивность, экономическая эффективность, возможность забора проб, воспроизводимость, а также специфичность для конкретного заболевания. Кроме того, очевидно, что для идеального биомаркера значимо также время, затрачиваемое на выполнение теста до получения результата, возможность стандартизации результатов тестирования, доступность и стабильность параметров при хранении образцов, связь с изменением воспалительного статуса [43].

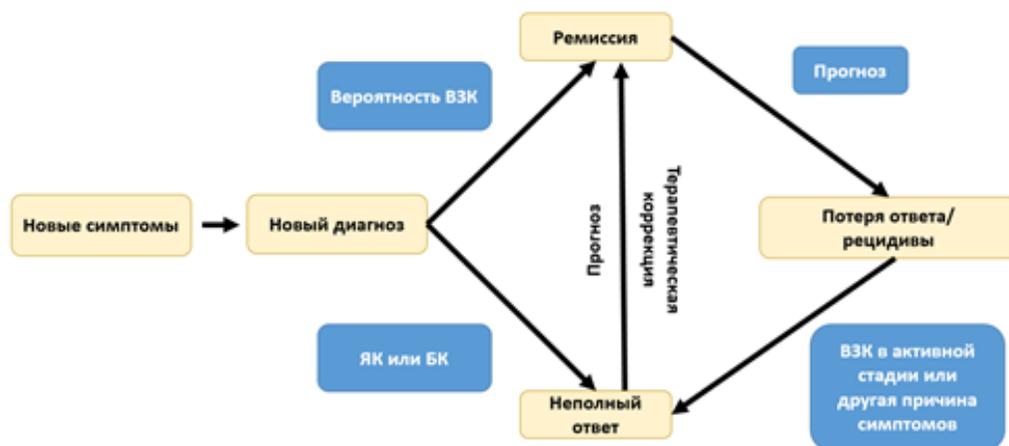


Рис. 2. Потенциальная роль биомаркеров для диагностики и оценки эффекта проводимой терапии у пациентов с предполагаемым или установленным диагнозом ВЗК [адаптировано [29]].

В качестве наиболее значимых и надежных для оценки активности заболевания при ВЗК в настоящее время используются молекулярные биомаркеры сыворотки крови, мочи, фекальные биомаркеры [43,54].

Сывороточные биомаркеры. Сегодня сывороточные биомаркеры уже являются частью рутинных лабораторных исследований, особенно, в части определения выраженности воспалительного процесса при ВЗК. Несмотря на отсутствие специфичности именно для ВЗК, они, как правило, применяются для диагностики на начальных этапах из-за простоты использования, их низкой стоимости и хорошо зарекомендовавших себя лабораторных протоколов. К наиболее распространенным тестам среди сывороточных сегодня могут быть отнесены определение СРБ и скорости оседания эритроцитов (СОЭ).

СРБ - пентамерный белок, вырабатываемый гепатоцитами, уровень которого в сыворотке при физиологических условиях не превышает 1 мг/л. Его концентрация возрастает по мере развития острой фазы воспалительного ответа, коррелируя с такими провоспалительными цитокинами, как IL-6, фактор некроза опухоли (TNF- α), а другой цитокин с провоспалительной активностью, IL-1, стимулирует его продукцию в гепатоцитах. СРБ имеет относительно короткий пери-

од полувыведения (около 19 часов) [52], что делает его лучшим индикатором воспаления, чем большинство других белков острой фазы воспалительного ответа. Согласно многочисленным исследованиям, повышение уровня СРБ более характерно для активных случаев БК, тогда как при ЯК повышение СРБ может не отмечаться [44]. Этот факт может объясняться особенностями выработки СРБ брыжеечными адипоцитами у пациентов с болезнью Крона [40]. Однако, несмотря на широкое использование биомаркера СРБ в качестве значимого диагностического показателя и критерия мониторинга, он не является специфичным для ВЗК [37]. Тем не менее, концентрация СРБ меняется быстрее и имеет более широкий диапазон отклонений от референсных показателей при минимальных возраст-ассоциированных колебаниях, чем значение другого провоспалительного сывороточного маркера - скорости оседания эритроцитов (СОЭ) [17]. СОЭ же в контексте действенного маркера дополнительной или дифференциальной диагностики ВЗК является абсолютно не специфичным, поскольку его изменения могут быть вызваны любым воспалительным стимулом и определенными физиологическими состояниями (беременность, возраст и пол, изменение уровня гематокрита у пациентов с анемией и полицитемией) [33].

Серологическое тестирование является хорошо зарекомендовавшим себя диагностическим инструментом для различных заболеваний с аутоиммунным компонентом. При подозрении на ВЗК наибольшее внимание сегодня привлекают р-ANCA и ASCA. ANCA представляют собой группу антител, вырабатываемых против антигенов в цитоплазме нейтрофилов. ASCA продуцируются против маннана и других компонентов клеточной стенки дрожжей. По имеющимся на настоящее время данным, оба антитела обладают клинически значимыми положительными или отрицательными прогностическими значениями. Так, р-ANCA+/ASCA- более характерны для пациентов при ЯК, тогда как р-ANCA-/ASCA+ наблюдаются преимущественно у пациентов с БК. Однако, несмотря на имеющиеся данные о возможности использования указанных антител для проведения дифференциальной диагностики ЯК и БК в рамках ВЗК, они оба статистически имеют низкую точность и чувствительность [46]. Положительные результаты для любого из данных антител не являются уникальными для ВЗК и могут быть ассоциированы с рядом других заболеваний с воспалительным компонентом, например, глютенная энтеропатия, болезнь Бехчета, кистозный фиброз, ревматоидный артрит [21].

Фекальные биомаркеры. Сегодня к ключевым фекальным биомаркерам - белкам, обнаруживаемым в образцах кала пациентов с ВЗК, относят прежде всего кальпротектин, кальгранулин С, лактоферрин и LCN-2. Они обладают рядом преимуществ перед биомаркерами крови, включая простоту доступа к образцам, высокий уровень биомаркеров вследствие прямого контакта образца фекалий с очагом воспаления, а также более высокую специфичность для ВЗК, поскольку они отражают воспаление ЖКТ (в отличие от сывороточных биомаркеров, уровень которых повышается в ответ на развивающееся воспаление любой локализации) [32].

Наиболее широко используемым фекальным биомаркером ВЗК сегодня является кальпротектин. Это кальций- и цинк-связывающий белок, содержащийся в значительном количестве в нейтрофилах, эозинофилах и макрофагах. Изменения его концентрации характерны для различных секреторных и экскреторных продуктов организма при активации гранулоцитов и мононуклеарных фагоцитов [22]. Повышенные уровни фекального кальпротектина характерны для пациентов с активным ВЗК из-за наличия большого количества нейтрофилов в ЖКТ [52]. Кальпротектин устойчив к деградации и стабилен в течение 7 дней в образцах фекалий, хранящихся при комнатной температуре. Тем не менее, изменения уровня кальпротектина в кале не являются абсолютно специфичными для ВЗК; изменения его уровня могут наблюдаться и при иных заболеваниях толстой кишки и кишечника.

Биомаркеры мочи. Биомаркеры мочи в настоящее время не применяются в рутинной клинической практике для диагностики и мониторинга активности ВЗК. Однако проведенный поиск выявил ряд исследований, которые были посвящены изучению мочи как потенциальному источнику неинвазивных биохимических индикаторов активности ВЗК [43]. В качестве наиболее перспективного среди них отмечены метаболиты простагландина E2 (PGE2). Простагландины синтезируются под действием фосфолипазы A2, катализирующей

фосфорилирование арахидоновой кислоты. Этот процесс запускается различными воспалительными триггерами. PGE2 выводится с мочой в виде нескольких переработанных метаболитов, в первую очередь метаболита тетрабор-простагландина E. По данным Y. Arai и соавт. [5], концентрация метаболита тетрабор-простагландина E в моче коррелирует с уровнем фекального кальпротектина при активном воспалении у пациентов с ЯК ($p < 0,01$), а также согласуется с данными достижения гистологической и эндоскопической ремиссии. У детей с ВЗК уровень PGE2 в моче также положительно коррелировал как с эндоскопическими, так и с клиническими показателями активности при ЯК ($r = 0,594$ и $r = 0,462$ соответственно) [18]. В работе N. Ishida и соавт. [20] изучался потенциал PGE2 в прогнозировании рецидива ВЗК, при этом в качестве прогностически значимого критерия предложено значение PGE2 25,2 мкг/г и AUC 0,721 (95% доверительный интервал: 0,556–0,886). У пациентов со значениями PGE2 $\geq 25,2$ мкг/г наблюдался значительно более короткий безрецидивный период (логарифмический ранговый критерий: $p < 0,001$). Накопленные данные позволяют рассматривать PGE2 и его метаболиты как потенциальные, но требующие более детального изучения неинвазивные биомаркеры ВЗК.

Кандидатные биомаркеры ВЗК: перспективы и новые тренды клинической диагностики. Все больше внимание в последнее время уделяется доступным в рутинной практике и не требующим специализированного оборудования и реактивов соотношениям, основанным на изменении количества клеток крови, таким как отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) и отношение тромбоцитов к лимфоцитам (PLR), а также их потенциальной связи с различными иммуноопосредованными воспалительными заболеваниями [8]. В недавно опубликованной работе I. Soufli и соавт. [48] выполнена оценка показателей NLR и PLR у пациентов с осложненной БК по сравнению со здоровыми лицами, по данным которой выявлены статистически значимые различия указанных маркеров между двумя группами ($p < 0,001$) до и после терапии кортикостероидами или анти-TNF препаратами. Определены пороговые значения для прогнозирования заболевания (NLR $> 2,43$; PLR $> 156,4$, соответственно). Кроме того, в ряде работ отмечается потенциал еще одного соотношения - коэффициент "альбумин/глобулин" (AGR), который предлагается для тестирования в дифференциальной диагностике ВЗК и оценке активности заболевания. AGR заметно снижен у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами без ВЗК. У лиц с ЯК наблюдается обратная корреляция между сывороточным AGR и оценкой по шкале Мейо ($r = -0,413$, $p < 0,001$) [56].

В последние годы также все более активно появляются данные о новых кандидатах-биомаркерах ВЗК [30]. Так, одним из имеющих перспективы клинического применения является новый потенциальный серологический биомаркер ВЗК - богатый лейцином альфа-2-гликопротеин (LRG). LRG представляет собой белок с молекулярной массой 50 кДа, секретируется гепатоцитами, нейтрофилами, макрофагами и эпителиальными клетками кишечника [35]. По имеющимся экспериментальным данным, уровни LRG повышены у пациентов с активным ЯК, при этом снижение активности забо-

левания сопровождается тенденцией к падению показателей LRG [47]. Более того, повышение уровня LRG более значимо коррелирует с клиническими и эндоскопическими показателями у пациентов с активными ЯК и БК, чем значения СРБ [24,25]. Также есть данные о возможности использования LRG в качестве предиктора заживления слизистой оболочки как при ЯК, так и при БК при наличии показателей СРБ в пределах референсных значений [59].

В качестве еще одного потенциального фекального биомаркера ВЗК, относящегося к семейству низкомолекулярных кальций связывающих белков S100, активирующих путь NF- κ B и увеличивающих высвобождение цитокинов во время воспалительных процессов, можно выделить кальгранулин С (S100A12) [33]. Концентрация кальгранулина С у пациентов с ВЗК высока и в сыворотке, однако его концентрация в кале выше, что делает его определение более чувствительным для диагностики ВЗК. Тем не менее, повышение уровня кальгранулина С может отмечаться и при других воспалительных состояниях, например, при артрите [38].

Еще одним потенциальным биомаркером, уровни которого значительно повышены при активном ВЗК, является лактоферрин. Это железосвязывающий гликопротеин содержится только в нейтрофилах, что значительно отличает его от широко применяемого для диагностики кальпротектина, который обнаруживается в нескольких типах клеток. Данный факт позволяет говорить о достаточной специфичности и чувствительности лактоферрина для диагностики активного ВЗК [23].

Липокалин-2 (LCN-2), также известный как липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL) или сидерокалин (Scn), представляет собой бактериостатический белок, также хранящийся в гранулах нейтрофилов [10,27]. LCN-2 - это высокостабильный белок, чья повышенная экспрессия эпителиальными клетками кишечника была выявлена в биоптатах толстой кишки из воспаленных участков у пациентов с ВЗК. Предположительно, активация LCN-2 индуцируется IL-22 и IL-17A. LCN-2 уже успешно применялся в качестве биомаркера ЯК в ряде экспериментальных и клинических работ [49].

Новые тенденции в неинвазивной диагностике ВЗК представлены оценкой микроРНК в образцах кала [55]. МикроРНК представлены группой небольших некодирующих РНК с переменной экспрессией при различном спектре заболеваний, от неврологических расстройств до онкологических заболеваний. Неоспоримым преимуществом анализа микроРНК является возможность их определения в биологическом материале любого типа различными методами молекулярной диагностики, в первую очередь, методом ПЦР и секвенирования нового поколения [11]. Одной из наиболее значимых микроРНК является микроРНК 21, повышение которой при ВЗК четко отмечается в сравнении с контрольными пациентами без ВЗК [41]. Также уровни микроРНК 21 и микроРНК 223 оценивали в стуле пациентов с ВЗК, при этом более высокие уровни наблюдались при ЯК по сравнению с БК (микроРНК 223 была в 5,7 раза выше для БК и в 10,2 раза выше для ЯК по сравнению с контрольной группой) [45]. Эти данные позволяют рассматривать определение микроРНК как одно из перспективных для дальнейшего изучения биомаркеров

ВЗК направлений.

За последние десятилетия уже накоплено существенное количество данных о преобладающих цитокиновых профилях при БК и ЯК, а также описаны ключевые различия направленности Th1/Th2 ответов при различных формах ВЗК. Тем не менее, до настоящего времени определение цитокинов и интерлейкинов при ВЗК не является рутинным способом диагностики заболевания, являясь дополнительными исследованиями [16]. Одним из ключевых кандидатных биомаркеров среди цитокинов остается уровень TNF α . Имеются данные о его повышении в слизистой оболочке толстой кишки и подвздошной кишки у пациентов, страдающих ВЗК [12]. Несмотря на противоречивые результаты в ранее проведенных исследованиях на образцах сыворотки крови, М. Komatsu и соавт. [26] выявили статистически значимое увеличение сывороточных концентраций TNF α у пациентов с ВЗК (и при БК, и при ЯК) в сравнении со здоровыми лицами ($p < 0,0001$). Эти результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использования уровней TNF α в сыворотке крови в качестве биомаркера для оценки активности ВЗК. Также более подробно проанализированы сывороточные концентрации IL-10 у пациентов с ВЗК. В работах Т. Kucharzik и соавт. [28] отмечены более высокие концентрации сывороточного IL-10 у пациентов с активными БК и ЯК в сравнении с группой контроля ($p < 0,001$). Мицуяма и соавторы [34] представили анализ трех воспалительных биомаркеров — IL-6, CRP и IL-10, у пациентов с ЯК, БК в сравнении со здоровыми лицами. Согласно полученным результатам, повышение уровней сывороточных IL-6 и CRP при активных ЯК и БК в сравнении со здоровыми лицами было значимым ($p < 0,0001$), тогда как более высокие сывороточные концентрации IL-10 наблюдались только при активном ЯК в сравнении с группой контроля ($p = 0,0086$) [34]. Представленные данные дают основание для продолжения исследований по формированию панели цитокинов и интерлейкинов, изменение которых может иметь диагностически значимое значение при ВЗК, а также для дифференциальной диагностики БК и ЯК.

Также в качестве двух новых серологических кандидатов-биомаркеров при ВЗК в последние годы рассматриваются ST2 (стимулирующий фактор роста, экспрессируемый геном 2, так же известный как IL1RL1) и TNFAIP6 (индуцированный фактором некроза опухоли альфа белок 6). ST2 — интерлейкин, относящийся к надсемейству IL-1 [36], положительно коррелирующий с эндоскопической и клинической активностью при ЯК и БК в сравнении со здоровыми лицами [9]. Кроме того, сывороточные уровни ST2 были ниже у лиц с ЯК с ответом на проводимую терапию (производные 5-АСК, глюкокортикостероиды или иммуномодуляторы) в сравнении с пациентами ЯК, у которых не достигался надлежащий ответ на проводимую терапию ($p < 0,05$) [14]. Также в ряде работ представлены данные о схожем потенциале анализа уровня TNFAIP6 при ВЗК [60]. Еще одним представителем семейства цитокинов и регуляторов роста является онкостатин М, значение которого для диагностики ВЗК и, потенциально, прогнозирования ответа на проводимую терапию активно обсуждаются. Пациенты с ВЗК экспрессируют более высокие уровни цитокинов OSM и их рецепторов

(OSMR) в воспаленной ткани кишечника в сравнении со здоровыми лицами, что коррелирует с гистологической тяжестью заболевания. Также OSM предложено использовать в качестве предиктора эффектов антител против TNF α : пациенты с низким уровнем OSM плазмы крови до начала лечения имели достоверно более высокую частоту клинической ремиссии через 1 год после терапии TNF [53].

Одним из наиболее активно рассматриваемых в качестве перспективного метода исследования для поиска биомаркеров сегодня является протеомика. Исследование потенциальных биомаркеров при ВЗК, как правило, проводят в образцах сыворотки или плазмы, или в биоптатах толстой кишки. К наиболее широко используемым протеомным методам при ВЗК относятся высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (LC-ESI-MS/MS) и двумерный гель-электрофорез в сочетании с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI)-MS и иммунофлуоресцентная микроскопия.

Учитывая наличие выраженных корреляций между уровнем экспрессии белков и активностью заболевания, применение протеомики как диагностического инструмента - перспективная и активно развивающаяся область исследований [58]. Впервые протеомные подходы при ВЗК были использованы в работах U. Berndt и соавт. [7], что позволило выявить различия в экспрессии белков различными популяциями Т-клеток при БК и ЯК. Этот экспериментальный подход продемонстрировал высокую чувствительность (70%) и специфичность (72,5%) при БК.

Скрининг биоптатов слизистой оболочки детей с подозрением на ВЗК, позволил составить две различные панели белков, которые включали 5 (панель 1) и 12 (панель 2) биомаркеров, для дифференциальной диагностики между пациентами с ВЗК и здоровыми лицами, а также дифференцировки БК и ЯК, соответственно. Панель 1 включала белок, связывающий жирные кислоты 5 (FABP5), урацилдифосфатглюкоза-6-дегидрогеназа (UGDH), богатый лейцином митохондриальный белок, содержащий PPR-мотив (LRPPRC), висфатин или никотинамидфосфорибозилтрансфераза (NAMPT), неорганическая пирофосфатаза (PPA1), притом уровень последних двух белков был значимо повышен у пациентов с ВЗК. Панель 2 включала митохондриальную бета-субъединицу трифункционального фермента, (HADHB), цитозольную аминопептидазу (LAP3), лейкотриен-А-4 гидролазу (LTA4H), металлотионеин-2 (MT2A), митохондриальный транспортный белок трикарбоксилата (SLC25A1), гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H3 (HNRNP3), митохондриальную дельта(3,5)-дельта(2,4)-диеноил-КоА-изомеразу (ECH1), белок-рецептор трансферрина 1 (TFRC), бета-2-микроглобулин (B2M), альфа-изоформу 1 субъединицы транспортного белка Sec61 (SEC61A1), содержащий стафилококковый нуклеазный домен белок 1 (SND1), трансферрин (TF). Первые девять белков панели были значимо повышены при БК в сравнении с пациентами ЯК. Эти белковые биомаркеры рассматриваются как кандидаты для оценки их потенциала при дифференциальной диагностике БК и ЯК, что может быть проверено в дальнейших исследованиях. Иденти-

фицированные биомаркеры в обеих панелях по своему функциональному значению в основном являются компонентами метаболизма жирных кислот [50]. Это является дополнительным обоснованием целесообразности проведения липидомных исследований при ВЗК, что может быть использовано для углубленного изучения патогенеза заболеваний и с целью дополнительной диагностики.

Результаты работы S.Y. Hsieh и соавт. [19] на основании данных протеомного анализа биоптатов толстого кишечника позволяют предположить вовлечение митохондриальной дисфункции в этиологию ЯК. Так, авторами были выявлены 13 белков с пониженной экспрессией, из которых 6 (зависящий от напряжения анион-селективный каналный белок 1 (VDAC1), белок теплового шока 60 (HSPD1), тиоредоксинпероксидаза (PRDX1), белок теплового шока 70 (HSPA9B), тиол-специфический антиоксидант (PRDX2), прохитин (PHB)) вовлечены в реакции на стрессовое воздействие, 3 (PRDX1, PRDX2, селен-связывающий белок 1 (SELENBP1)) выполняют роль клеточных антиоксидантов, а 8 относились к митохондриальным белкам (H⁺-транспортирующая двухсекторная АТ-Фаза (ATP5B), митохондриальная малатдегидрогеназа (MDH2), белок теплового шока 90 (HSPA9B), VDAC1, PRDX1, HSPD1, PRDX2, PHB). Ключевой белок митохондриального комплекса, PHB, оказался сниженным и у пациентов с ремиссией, и с обострением ЯК в слизистой оболочке толстой кишки, что позволяет предполагать возможные ранние митохондриальные изменения при ЯК. Три других потенциальных белка-биомаркера с нарушенной функциональностью (ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT), антиген отторжения опухоли 1, белок, связанный с рецептором полиовируса 1) были выявлены в слизистой толстой кишки при ЯК.

Таким образом, полученные результаты многочисленных исследований могут быть использованы не только для потенциальной трансляции в клиническую практику и определения кандидатных протеомных биомаркеров для неинвазивной диагностики, но и для расширения имеющихся данных о патогенезе БК и ЯК. При этом результаты анализа протеома в ряде случаев демонстрируют ассоциативные связи с другими технологиями омиксной диагностики, например, липидомикой, что позволяет говорить о неполностью раскрытом потенциале протеомики для диагностических целей при ВЗК.

Диагностическая/прогностическая точность сывороточных, серологических и фекальных биомаркеров. Одним из ключевых вопросов для практикующих специалистов сегодня остается возможность применения тех или иных уже известных биомаркеров для прецизионной диагностики ВЗК. Так, на основании результатов целого ряда работ, выявлены коэффициенты корреляции биомаркеров с данными эндоскопического исследования, при этом обращает на себя внимание их выраженная вариабельность. Так, коэффициент корреляции для кальпротектина составляет 0,48 - 0,83, для лактоферрина - 0,19 - 0,87 (см. таблицу). Уточняющие данные были получены при сопоставлении эндоскопических результатов с данными гистопатологического исследования. Так, высокая достоверность была получена при сопоставлении уровней экспрессии онкоста-

тина M (OSM) или рецептора онкостатина M (OSMR) в воспаленной ткани кишечника пациентов с активным ВЗК - для OSM ($n = 42$) - $p < 0,001$ и для OSMR ($n = 86$) - $p < 0,05$, соответственно [57].

Корреляция биомаркеров с активностью ВЗК по данным эндоскопического исследования и определения потенциальных наиболее значимых неинвазивных биомаркеров [адаптировано, 29]

Заболевание	Оценка эндоскопически определенного заболевания	Лактоферрин (коэффициент корреляции)	Фекальный кальпротектин (коэффициент корреляции)	СРБ (коэффициент корреляции)
Болезнь Крона	SES-CD	0,19	0,48	Нет данных
	SES-CD	0,63	0,64	0,52
	SES-CD	0,76	0,72	0,46
	CDEIS	0,87	0,83	0,61
	CDEIS	Нет данных	0,75	0,53
	CDEIS	0,77	0,73	0,55
Язвенный колит	Шкала Мейо	0,35	0,51	Нет данных
	Шкала Мейо	Нет данных	0,57	Нет данных
	Шкала Мейо	Нет данных	0,81	Нет данных
	Индекс Рахмилевича	Нет данных	0,83	0,5

Примечание. CDEIS - эндоскопический индекс тяжести БК. SES-CD - простая эндоскопическая шкала БК. Шкала Мейо, индекс Рахмилевича - индексы клинической и эндоскопической активности ЯК.

ASCA-положительный статус обычно наблюдался у пациентов с БК с чувствительностью 100%, однако специфичность для диагностики БК составила 50%. p-ANCA был достоверно выше у пациентов с ЯК и БК толстой кишки. По данным метаанализа чувствительность и специфичность отношения ASCA+/p-ANCA- составили 0,55 и 0,93 для диагностики БК и 0,63 и 0,93 для диагностики ВЗК, соответственно [46]. Таким образом, это может помочь отличить БК от ЯК или выявить лиц с ВЗК. Однако следует помнить, что его чувствительность относительно низкая, за исключением диагностики БК у детей, где чувствительность и специфичность ASCA+/p-ANCA- составили 0,70 и 0,93 соответственно.

Обсуждение. Ранняя диагностика и своевременная оценка активности ВЗК имеют решающее значение для мониторинга заболевания и оценки ответа на проводимую терапию [39]. В связи с этим особую клиническую значимость приобретают сегодня неинвазивные биомаркеры, являющиеся наиболее простыми инструментами диагностики, позволяющие оптимизировать и своевременно выявлять изменения состояния пациентов ВЗК [31]. Учитывая совокупность имеющихся научных, экспериментальных и практических данных, СРБ и фекальный кальпротектин оправданно являются наиболее надежными на сегодняшний день биомаркерами активности ВЗК [15], также достаточно часто в клинической практике применяют лактоферрин [42]. Повышение точности диагностики с помощью многоцелевых панелей биомаркеров сегодня постепенно становится новым трендом диагностики ВЗК. Появляющиеся результаты вновь проводимых исследований позволяют расширить имеющийся перечень кандидатными биомаркерами для использования в рутинной клинической практике. К новым таргетам диагностики сегодня можно отнести оценку сывороточных провоспалительных цитокинов, интерлейкинов, микроРНК, кальгранулина С, LCN2, биомаркеров мочи (особенно PGE2). Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для их потенциального внедрения в клини-

ческую практику [31]. Расширение репертуара биомаркеров может сыграть ключевую роль в реализации тактики прецизионной диагностики и достижения возможностей непрерывного мониторинга как активности заболевания, так и ответа на проводимую терапию при ВЗК [13]. Тем не менее, несмотря на многообещающие результаты, следует дополнительно отметить необходимость стандартизации получаемых результатов, определение соответствующих пороговых значений и установление единых критериев интерпретации, поскольку соблюдение этих условий необходимо для интеграции предлагаемых методов в рутинную клиническую практику. Внедрение дополнительных неинвазивных биомаркеров открывает возможности для раннего выявления, оценки активности заболевания и разработки индивидуальных подходов к лечению. По мере того, как продолжающиеся исследования раскрывают сложность генеза ВЗК и необходимость подбора персонализированной терапии пациентам для достижения клинического эффекта, интеграция неинвазивных биомаркеров в тактику диагностики и дальнейшего ведения лиц с ВЗК становится все более целесообразной.

Заключение. Диагностика и активный мониторинг течения ВЗК продолжают оставаться непростой задачей для клиницистов и пациентов, при этом часто оценка активности заболевания имеет решающее значение для прогнозирования, понимания ответов на проводимую терапию, своевременной корректировки тактики ведения пациента и достижения долгосрочных результатов. Биомаркеры сегодня являются оптимальными неинвазивными инструментами для диагностики и мониторинга течения ВЗК. Динамично развивающийся ландшафт этих индикаторов состояния пациентов с ВЗК предоставляет обширные перспективы для возможностей прецизионной диагностики заболеваний данной группы и реализации целей персонализированной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации РФ 2024. Болезнь Крона. 25.08.2024. https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/176_2.
2. Клинические рекомендации РФ 2024. Язвенный колит. 25.08.2024. https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/193_2.

REFERENCES

1. Clinical guidelines of the Russian Federation. Crohn's disease. 25.08.2024. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/176_2. (in Russian)
2. Clinical guidelines of the Russian Federation. Ulcerative colitis. 25.08.2024. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/193_2. (in Russian)
3. Alghoul Z., Yang C., Merlin D. The Current status of molecular biomarkers for inflammatory bowel disease. *Biomedicine*.2022;10(7):1492.
4. Ami D.S., Bangdiwala S.I., Drossman D.A., Ghoshal U.C., Magnus S., Tack J. et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders. *Results of Rome Foundation Global Study Gastroenterology*. 2021; 160:99–114.
5. Arai Y., Arihiro S., Matsuura T., Kato T., Matsuoka M., Saruta M. et al. Prostaglandin E-major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2014;20(7):1208-16.
6. Aziz I., Simrén M. The overlap between irritable bowel syndrome and organic gastrointestinal diseases. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*.2021;6(2):139-148.
7. Berndt U., Bartsch S., Philipsen L., Danese S., Wiedenmann B., Dignass A.U. et al. Proteomic Analysis of the Inflamed Intestinal Mucosa Reveals Distinctive Immune Response Profiles in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J. Immunol*. 2007; 179:295–304.
8. Bernsmeier C., Cavazza A., Fatourou E.M., Theocharidou E., Akinimehin A., Baumgartner B. et al. Leucocyte ratios are biomarkers of mortality in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *Aliment Pharmacol. Ther*. 2020; 52(5):855-65.
9. Boga S., Alkim H., Koksal A.R., Ozagari A.A., Bayram M., Tekin N.S. et al. Serum ST2 in inflammatory bowel disease: a potential biomarker for disease activity. *J. Investig. Med*. 2016; 64(5):1016-24.
10. Buisson A., Vazeille E., Minet-Quinard R., Goutte M., Bouvier D., Goutorbe F. et al. Fecal matrix metalloprotease-9 and lipocalin-2 as biomarkers in detecting endoscopic activity in patients with Inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Gastroenterol*. 2018; 52:e53–e62.
11. Correia C.N., Nalpas N.C., McLoughlin K.E., Browne J.A., Gordon S.V., MacHugh D.E. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Front. Immunol*.2017;8:118.
12. Cuković-Cavka S., Vucelić B., Urek M.C., Brinar M., Turk N. The role of anti-TNF therapy in ulcerative colitis. *Acta Med. Croatica*. 2013; 67(2):171-7.
13. Danese S., Vermeire S., D'Haens G., Panés J., Dignass A., Magro F., et al. Treat to target versus standard of care for patients with Crohn's disease treated with ustekinumab (STARDUST): an open-label, multicentre, randomised phase 3b trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 2022; 7(4):294-306.
14. Díaz-Jiménez D., De la Fuente M., Dubois-Camacho K., Landskron G., Fuentes J., Pérez T., et al. Soluble ST2 is a sensitive clinical marker of ulcerative colitis evolution. *BMC Gastroenterol*. 2016; 16(1):103.
15. Dragoni G., Innocenti T., Galli A. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease: How Long before Abandoning Single-Marker Approaches? *Dig. Dis*.2020; 39: 190–203.
16. Furfaro F., Ragaini E., Peyrin-Biroulet L., Danese S. Novel therapies and approaches to inflammatory bowel disease (IBD). *J. Clin. Med*.2022;11(15):4374.
17. Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med*.1999; 340:448–54.
18. Hagiwara S.I., Okayasu I., Fujiwara M., Matsuura M., Ohnishi H., Ito S. et al. Prostaglandin E-major urinary metabolite as a biomarker for pediatric ulcerative colitis activity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*.2017;64(6):955-961.
19. Hsieh S.-Y., Shih T.-C., Yeh C.-Y., Lin C.-J., Chou Y.-Y., Lee Y.-S. Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis. *Proteomics*.2006;6(19):5322-5331.
20. Ishida N., Sugiura K., Miyazu T., Tamura S., Suzuki S., Tani S. et al. Prostaglandin E-Major urinary metabolite predicts relapse in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Clin. Transl. Gastroenterol*.2020; 11(12):e00289.
21. Iskandar H.N., Ciorba M.A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: Current practices and recent advances. *Transl. Res*. 2012; 159:313–25.
22. Johné B., Fagerhol M.K., Lyberg T., Prydz H., Brandtzaeg P., Naess-Andresen C.F., Dale, I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol. Pathol*.1997; 50:113–23.
23. Kane S.V., Sandborn W.J., Rufo P.A., Zholudev A., Boone J., Lysterly D. et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am. J. Gastroenterol*.2003;98:1309–14.
24. Kawamoto A., Takenaka K., Hibiya S., Ohtsuka K., Okamoto R., Watanabe M. Serum leucine-rich alpha2 glycoprotein: a novel biomarker for small bowel mucosal activity in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2022; 20:e1196–e1200.
25. Kawamura T., Yamamura T., Nakamura M., Maeda K., Sawada T., Ishikawa E. et al. Accuracy of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein in evaluating endoscopic disease activity in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2023; 29(2):245-53.
26. Komatsu M., Kobayashi D., Saito K., Furuya D., Yagihashi A., Arake H. et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immunoprecipitation. *Clin. Chem*. 2001; 47(7):1297-1301.
27. Krzystek-Korpacka M., Kempinski R., Bromke M., Neubauer K. Biochemical biomarkers of mucosal healing for inflammatory bowel disease in adults. *Diagnostics*. 2020; 10:367.
28. Kucharzik T., Stoll R., Lügering N., Domschke W. Circulating anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol*. 1995;100(3):452-6.
29. Lewis J.D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011; 140:1817-26.
30. Liu D., Saikam V., Skrada K.A., Merlin D., Iyer S.S. Inflammatory bowel disease biomarkers. *Med. Res. Rev*. 2022; 42(5):1856-87.
31. Liu F., Lee S.A., Riordan S.M., Zhang L., Zhu L. Global studies of using fecal biomarkers in predicting relapse in inflammatory bowel disease. *Front. Med. (Lausanne)*.2020; 7:580803.
32. Lopez R.N., Leach S.T., Lemberg D.A., Duvoisin G., Geary R.B., Da A.S. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 32:577–82.
33. Mendoza J.L., Abreu M.T. Biological markers in inflammatory bowel disease: Practical consideration for clinicians. *Gastroentérologie Clin. Biol*. 2009; 33:S158–S173.
34. Mitsuyama K., Tomiyasu N., Takaki K., Masuda J., Yamasaki H., Kuwaki K., et al. Interleukin-10 in the pathophysiology of inflammatory bowel disease: increased serum concentrations during the recovery phase. *Mediators Inflamm*. 2006; 2006(6):26875.
35. Naka T., Fujimoto M. LRG is a novel inflammatory marker clinically useful for the evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. *Immunol. Med*. 2018; 41:62–7.
36. Pascual-Figal D.A., Januzzi J.L. The biology of ST2: the international ST2 consensus panel. *Am. J. Cardiol*. 2015; 115,7:3B-7B.
37. Pepys M.B., Hirschfield G.M. C-reactive protein: A critical update. *J. Clin. Investig*.2003; 111:1805–12.
38. Perera C., McNeil H.P., Geczy, C.L. S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunol. Cell Biol*. 2010; 88:41–9.
39. Peyrin-Biroulet L., Sandborn W., Sands B.E., Reinisch W., Bemelman W., Bryant R.V. et al. Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): determining therapeutic goals for treat-to-target. *Am. J. Gastroenterol*. 2015; 110(9):1324-38.
40. Peyrin-Biroulet L., Gonzalez F., Dubuquoy L., Rousseaux C., Dubuquoy C., Decourcelle C. et al. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*. 2012; 61:78–85.
41. Rashid H., Hossain B., Siddiqua T., Kabir M., Noor Z., Ahmed M., et al. Fecal MicroRNAs as potential biomarkers for screening and diagnosis of intestinal diseases. *Front. Mol. Biosci*. 2020; 7:181.
42. Sakurai T., Saruta M. Positioning and usefulness of biomarkers in inflammatory bowel disease. *Digestion*.2023;104(1):30-41.
43. Sands B.E. Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015; 149(5):1275-85.
44. Saverymuttu S.H., Hodgson H.J., Chadwick V.S., Pepys M.B. Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis.

- Gut*. 1986; 27:809–13.
45. Schönauen K., Le N., von Arnim U., Schulz C., Malferteiner P., Link A. Circulating and fecal microRNAs as biomarkers for inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2018; 24(7):1547-57.
 46. Sellin J.H., Shah R.R. The Promise and Pitfalls of Serologic Testing in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 2012; 41:463–82.
 47. Shinzaki S., Matsuoka K., Iijima H., Mizuno S., Serada S., Fujimoto M. et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a serum biomarker of mucosal healing in ulcerative. *J. Crohn's Colitis.* 2017; 11:84–91.
 48. Soufli I., Hablal A., Bessaad S., Amri M., Labsi M., Boussa R.S. et al. Nitric oxide, neutrophil/lymphocyte, and platelet/lymphocyte ratios as promising inflammatory biomarkers in complicated crohn's disease: outcomes of corticosteroids and anti-TNF- α therapies. *Inflammation.* 2023; 46(3):1091-1105.
 49. Stallhofer J., Friedrich M., Konrad-Zerna A., Wetzke M., Lohse P., Glas J. et al. Lipocalin-2 is a disease activity marker in inflammatory bowel disease regulated by IL-17A, IL-22, and TNF-alpha and modulated by IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015, 21: 2327–40.
 50. Starr A.E., Deeke S.A., Ning Z., Chiang C.-K., Zhang X., Mottawea W. et al. Proteomic analysis of ascending colon biopsies from a paediatric inflammatory bowel disease inception cohort identifies protein biomarkers that differentiate Crohn's disease from UC. *Gut.* 2017; 66:1573–83.
 51. Titz B., Gadaleta R.M., Lo Sasso G., Elamin A., Ekroos K., Ivanov N.V., Peitsch M.C., Hoeng, J. Proteomics and lipidomics in inflammatory bowel disease research: from mechanistic insights to biomarker identification. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19:2775.
 52. Vermeire S., Van Assche G., Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.* 2006; 55:426.
 53. Verstockt S., Verstockt B., Machiels K., Vancamelbeke M., Ferrante M., Cleynen I. et al. Oncostatin M Is a biomarker of diagnosis, worse disease prognosis, and therapeutic nonresponse in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2021; 27(10):1564-75.
 54. Viennois E., Zhao Y., Merlin D. Biomarkers of inflammatory bowel disease: from classical laboratory tools to personalized medicine. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21:2467-74.
 55. Wan T.M., Iyer D.N., Ng L. Roles of microRNAs as non-invasive biomarker and therapeutic target in colorectal cancer. *Histol. Histo-pathol.* 2020; 35(3):225-37.
 56. Wang Y., Li C., Wang W., Wang J., Li J., Qian S. et al. Serum albumin to globulin ratio is associated with the presence and severity of inflammatory bowel disease. *J. Inflamm. Res.* 2022; 15:1907-20.
 57. West N.R., Hegazy A.N., Owens B.M.J., Bullers S.J., Linggi B., Buonocore S. et al. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Nat. Med.* 2017; 23:579–89.
 58. Wright I., Van J.E. A Roadmap to Successful Clinical Proteomics. *Clin. Chem.* 2017; 63: 245–7.
 59. Yasutomi E., Inokuchi T., Hiraoka S., Takei K., Igawa S., Yamamoto S. et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a marker of mucosal healing in inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* 2021; 11:11086.
 60. Yu Q., Zhang S., Wang H., Zhang Y., Feng T., Chen B. et al. TNFAIP6 is a potential biomarker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Biomark. Med.* 2016;10(5):473-83.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Костина О.В., Галова Е.А., Преснякова М.В.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ РИСКА СПОРТИВНОГО ТРАВМАТИЗМА И РАЗВИТИЕ СИНДРОМА ПЕРЕТРЕНИРОВАННОСТИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ-СПОРТСМЕНОВ (обзор литературы)



<https://elibrary.ru/urqsze>

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603155, Нижний Новгород, Россия

Цель исследования - систематизировать публикации современной литературы, касающиеся особенностей влияния стероидных гормонов на развитие травматизма и синдрома перетренированности у детей и подростков-спортсменов при высокоинтенсивных тренировках.

Основные положения. В обзоре литературы суммируются накопленные за последние годы сведения о значимости стероидных гормонов (тестостерона, эстрадиола и кортизола) в адаптации к спортивной нагрузке у детей и подростков. Описаны особенности гендерных отличий спортивного травматизма у юных спортсменов. В статье приводятся данные о сопряженности гормональной дисфункции и развития синдрома перетренированности в результате высокоинтенсивных физических нагрузок, рассмотрена значимость эндокринных нарушений у несовершеннолетних спортсменов. Приводятся сведения о взаимосвязи изменений в содержании стероидных гормонов и развития патологических состояний вследствие физических перегрузок.

Заключение. Таким образом, при планировании тренировочного процесса следует принимать во внимание гендерные, возрастные и индивидуальные особенности организма юных спортсменов. Анализ эндокринного статуса может дать важную информацию о физическом состоянии детей и подростков, их адапционном резерве и помочь в дальнейшей организации профилактических мероприятий, способствующих положительной адаптации несовершеннолетних спортсменов к интенсивным спортивным нагрузкам, не провоцирующих развитие синдрома перетренированности и минимизирующих риск травматизма.

Ключевые слова: обзор; тестостерон; эстрадиол; кортизол; дети; подростки; спортивный травматизм; синдром перетренированности

Для цитирования: Костина О.В., Галова Е.А., Преснякова М.В. Особенности влияния гормонов на увеличение риска спортивного травматизма и развитие синдрома перетренированности у детей и подростков-спортсменов (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 89-96.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-89-96>

EDN: URQSZE

Для корреспонденции: Костина Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. научно-диагностического отдела Университетской клиники; e-mail: olkosta@ Rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.07.2024

Принята к печати 19.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Kostina O.V., Galova E.A., Presnyakova M.V.

FEATURES OF THE EFFECT OF HORMONES ON INCREASING THE RISK OF SPORTS INJURIES AND THE DEVELOPMENT OF OVERTRAINING SYNDROME IN CHILDREN AND ADOLESCENT ATHLETES (review of literature)

Privolzhsky Research Medical University, 603155, Nizhny Novgorod, Russia

The aim - to systematize publications of modern literature concerning the peculiarities of the effect of steroid hormones on the development of injury and overtraining syndrome in children and adolescent athletes during high-intensity training.

The main provisions. The literature review summarizes the information accumulated in recent years on the importance of steroid hormones (testosterone, estradiol and cortisol) in adapting to athletic activity in children and adolescents. The features of gender differences in sports injuries in young athletes are described. The article provides data on the correlation of hormonal dysfunction and the development of overtraining syndrome as a result of high-intensity physical exertion, the importance of endocrine disorders in underage athletes is considered. Information is provided on the relationship between changes in the content of steroid hormones and the development of pathological conditions due to physical overloads.

Conclusion. Thus, when planning the training process, gender, age and individual characteristics of the body of young athletes should be taken into account. The analysis of the endocrine status can provide important information about the physical condition of children and adolescents, their adaptive reserve and help in the further organization of preventive measures that contribute to the positive adaptation of underage athletes to intense sports loads, do not provoke the development of overtraining syndrome and minimize the risk of injury.

Key words: review; testosterone; estradiol; cortisol; children; adolescents; sports injuries; overtraining syndrome

For citation: Kostina O.V., Galova E.A., Presnyakova M.V. Features of the effect of hormones on increasing the risk of sports

injuries and the development of overtraining syndrome in children and adolescent athletes (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 89-96 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-89-96>

EDN: URQSZE

For correspondence: Kostina O.V., candidate of biological sciences, senior researcher of the scientific and diagnostic department of the University clinic; e-mail: olkosta@rambler.ru

Information about authors:

Kostina O.V., <https://orcid.org/0000-0001-7529-2544>;

Galova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-9574-2933>;

Presnyakova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3951-9403>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 16.07.2024

Accepted 19.10.2024

Published 25.01.2025

Введение. Популяризация и массовость детско-юношеского спорта [1] в настоящее время сопряжена с ростом числа случаев перетренированности и травм. Так, в рамках Всероссийского конгресса «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе» (Казань, 2022) акцент экспертов был сделан на двукратном увеличении детского спортивного травматизма в стране за последнее десятилетие. Актуальными факторами риска развития указанных негативных последствий, в том числе следует считать смещение сроков допуска детей к спортивным занятиям в младшем дошкольном возрасте [2], переоценку исходного уровня физической подготовленности в условиях значительного изменения состояния здоровья и двигательной активности детей [3], недооценку биологического возраста и гендерных различий [4] при планировании тренировочного процесса.

Хорошо изучены гендерные анатомические и физиологические различия, обусловленные уровнем эндогенных половых гормонов и определяющие спортивную результативность и адаптивность к физическим нагрузкам [5]. Так, например, показано, что принципиальные различия между мальчиками и девочками начинают проявляться в пубертатный период и зависят от концентрации тестостерона [6]. В то же время чрезмерные физические нагрузки, особенно в сочетании со стрессовыми факторами, могут быть связаны с развитием различных патологических состояний, в том числе увеличением риска травматизма, сердечно-сосудистых изменений, психоэмоциональных расстройств, а также эндокринных нарушений [7]. Очевидно, что высокоинтенсивные физические нагрузки у детей и подростков могут иметь дезадаптивный характер, между тем, зачастую тренировочный процесс для детей и подростков строится аналогично тренировкам взрослых, не учитывая тот факт, что работоспособность юных спортсменов тесно связана с их биологической зрелостью [8]. В связи с этим представляет интерес оценка взаимосвязи эндокринного статуса, спортивного травматизма и развития синдрома перетренированности у детей и подростков.

Цель обзора – систематизировать публикации современной литературы, касающиеся особенностей влияния стероидных гормонов на развитие травматизма и синдрома перетренированности у детей и подростков-спортсменов при высокоинтенсивных спортивных тре-

нировках.

Методология поиска источников литературы. В статье представлен обзор публикаций из отечественных и зарубежных источников литературы. Проведен анализ литературных источников, включавший все статьи в базах данных PubMed, РИНЦ, Google Scholar, MedLine, Elsevier. Поиск данных был проведен с использованием слов: тестостерон, эстрадиол, кортизол, дети, подростки, спорт, синдром перетренированности, спортивный травматизм, testosterone, estradiol, cortisol, children, teenagers, overtraining syndrome, sports injuries. В обзор включено 60 литературных источников.

Особенности спортивного травматизма у детей и подростков. Спортивные травмы у детей случаются реже, чем у взрослых, из-за более высокой степени эластичности связок. Поскольку рост костей у детей еще не завершен, характер спортивных травм может отличаться от травм у взрослых. Ввиду возрастных особенностей гормонального статуса существует ряд болезней, связанных с неравномерностью роста костей, мышц и сухожилий, характерных именно для детей (таких как болезнь Осгуда-Шлаттера, Синдинга-Ларсена-Йоханссона, пяточной апофизит и другие). У детей и подростков связки и сухожилия выдерживают большую нагрузку, чем кости, тогда как область росто-вых пластинок на апофизах является слабым местом в отношении риска перелома из-за сильных сокращений прикрепленных мышц [9]. Несоответствие адаптации мышц и сухожилий приводит к увеличению нагрузки на сухожилия в период скачка роста, создавая неблагоприятное соотношение мышечной силы и нагрузочной способности сухожилий, увеличивая риск спортивных травм. В дальнейшем, по мере роста подростка, наблюдается гипертрофия сухожилий и их механическое укрепление, что должно положительно сказаться на спортивной результативности и снижении риска травм в постпубертатный период [10]. В структуре спортивных травм у детей наиболее часто встречаются повреждения крупных суставов (коленного, голеностопного, локтевого), при этом преобладают нарушения связочного аппарата и повреждения мышц (до 62% спортивного травматизма). Повреждения крупных суставов характерны как для командных видов спорта, так и для индивидуальных и бесконтактных. Анализ частоты травматизации крупных суставов у спортсменов различных возрастных категорий показал, что наиболее

уязвимыми для получения травм являются периоды скачка роста и развития [11, 12]. Особенную тревогу вызывают сведения о том, что до трети всех спортивных травм у подростков приходится на базовый этап тренировочного процесса в период подготовки к соревнованиям [13].

Имеются сведения о гендерных отличиях в частоте травм суставного связочного аппарата. Причины, лежащие в основе таких различий, заключаются в половых анатомических и биомеханических особенностях, различиях в нагрузках и в гормональных особенностях. У девушек отмечается более низкая жесткость связок и сухожилий, связанная с действием эстрогена [14], тогда как тестостерон повышает жесткость сухожилий [15]. При меньшей жесткости сухожилия мышцы сокращаются быстрее, чем сустав меняет свое положение, это увеличивает вероятность альтерации связок и сухожилий. С другой стороны, эстроген, воздействуя на сухожилия и связки, будет косвенно оказывать влияние на функцию скелетных мышц [16]. Приводятся сведения о меньшем риске повреждения мышц у женщин по сравнению с мужчинами, обусловленном меньшей жесткостью сухожилий, что снижает нагрузку на миофиламенты [17]. В случае более жесткого сухожилия усиливается мышечное напряжение: сухожилие не растягивается, мышца вынуждена удлиняться при большей эксцентрической нагрузке, результатом чего будет ее повреждение и альтерация сухожилия [18].

Возрастные гормональные изменения связаны с увеличением риска травматизма коленного сустава у девочек, начиная с 14 лет, после 15 лет он возрастает практически в два раза, максимальный риск наблюдался на 4-й и 5-й стадиях Таннера по сравнению с раннепубертатным периодом [19]. Предполагается также, что существует зависимость спортивного травматизма от фазы менструального цикла. Спортсменки могут быть более предрасположены к повреждениям передней крестообразной связки коленного сустава в предовуляторную фазу менструального цикла, когда происходит увеличение секреции эстрадиола [20]. Приводятся данные о повышенном риске травм в фолликулярную [21] и среднелютеновую фазу, что может быть связано с влиянием эстрогенов на сухожилия [22]. Между тем, существует мнение о том, что риск травмы не зависит от фазы цикла [23]. Разнородность этих сведений, возможно, обусловлена неточной оценкой сроков наступления той или иной фазы, недостаточным количеством выборки обследованных спортсменок, разным уровнем спортивной подготовленности и нагрузок, которые также могли оказать влияние на вероятность травмы. Таким образом, требуются дальнейшие исследования для решения спорного вопроса о роли гормональных изменений в зависимости от фаз менструального цикла.

Еще одной распространенной спортивной травмой является повреждение ахиллового сухожилия. В отличие от повреждения передней крестообразной связки, травма ахиллового сухожилия у детей, занимающихся спортом, встречается реже, чем у взрослых [24]. Сообщается, что распространенность разрыва ахиллового сухожилия у подростков (13-18 лет) среди других спортивных травм составляет у девочек 9%, у мальчиков – 6% [25]. Подростки в возрасте старше 14 лет

с большей вероятностью разрывают ахиллово сухожилие в результате сильного мышечного сокращения, чем дети младше 12 лет [26], что может быть связано с гормональными изменениями, происходящими в пубертатный период. В то же время приводятся сведения о том, что в отличие от подростков, не занимающихся спортом, у подростков-спортсменов по мере полового созревания происходят адаптивные изменения морфологических и биомеханических свойств ахиллового сухожилия, позволяющие минимизировать риск травм [27]. Эффект воздействия эстрогена у женщин проявляется в меньшей способности ахиллового сухожилия растягиваться, чем у мужчин, что снижает вероятность его разрыва [28]. Меньшая мышечная масса у женщин, чем у мужчин, также с меньшей вероятностью приведет к возникновению силы сокращения, превышающей максимальную прочность ахиллового сухожилия на растяжение [29]. Предполагается, что одной из возможных причин разрыва ахиллового сухожилия у подростков-спортсменок может быть развитие гипоестрогемии на фоне интенсивных нагрузок как проявление триады спортсменок, которая описана ниже [30].

В литературе имеются сведения об обратной корреляционной связи умеренной силы уровня тестостерона и маркеров костной резорбции β -CrossLaps, а также о повышенном содержании β -CrossLaps у юниоров [31]. Причины выявленной ассоциации требуют дальнейшего изучения с целью оценки вероятности повышенного риска переломов костей.

Таким образом, половые и возрастные особенности несовершеннолетних атлетов могут играть важную роль в увеличении риска получения спортивных травм. Важно отметить, что причины спортивного травматизма несомненно многофакторны и заключаются не только во влиянии половых гормонов, но, конечно же, и в степени интенсивности тренировочных нагрузок, подготовленности к ним, наличии достаточного восстановительного периода перед тренировками. Эти факторы в совокупности могут играть роль в увеличении риска спортивных травм и развитии синдрома перетренированности.

Гормональная дисфункция при интенсивных тренировочных процессах, синдром перетренированности. Физическое перенапряжение возникает во время или после чрезмерной спортивной нагрузки и проявляется расстройствами функций нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, кроветворной систем. Сигналами развития синдрома перетренированности могут служить психоэмоциональные изменения, в том числе апатия, отсутствие мотивации к занятиям спортом, вялость, потеря аппетита и нарушения сна. Клиническая картина снижения толерантности к физической нагрузке у юных атлетов может включать в себя головную боль, нарушение зрения, парезы, нарушение двигательной координации, одышку, боли в сердце, мышечную слабость [32]. Для определения толерантности к физической нагрузке предлагается оценивать изменения частоты сердечных сокращений и скорости потребления кислорода. Использование биохимических маркеров (например, активности креатинфосфокиназы, трансаминаз, уровня лактата, миоглобина, креатинина, мочевины, оценка уровня гормонов) [33] у детей и подростков-спортсменов может оказаться полезным

в качестве инструмента дозирования тренировочной нагрузки на протяжении тренировочного сезона.

Исследования содержания стероидных гормонов у детей и подростков-спортсменов выявили ряд особенностей. При изучении влияния интенсивных тренировок детей-спортсменов в препубертатный период не выявляется явных изменений ни уровня тестостерона, ни уровня эстрогенов, это, вероятно, связано с тем, что дети еще не достигли периода полового созревания [34]. Однако чрезмерно интенсивные нагрузки могут привести к снижению синтеза половых гормонов и задержать половое созревание, особенно в препубертатный период [35]. Детям, не вошедшим в период скачка роста, не рекомендуются усиленные тренировки, направленные на гипертрофию мышц, в связи с низкой концентрацией анаболических гормонов. В этот период силовые тренировки должны быть дозированы и направлены на повышение мышечной силы. Стоит отметить, что по сравнению с подростками, дети быстрее восстанавливаются после силовых тренировок, вызывающих переутомление [36].

Более выраженные изменения происходят у подростков в пубертатный период. Если умеренный уровень физической активности не влияет на изменения содержания эстрогенов и не вызывает увеличения частоты возникновения нарушений менструального цикла [37], то одним из негативных последствий физического перенапряжения могут быть эндокринные нарушения у девочек-спортсменок, проявляющиеся нарушениями менструального цикла, в том числе аменореей [38]. S. Ravi и соавт. [39] выявили, что аменорея у спортсменок наблюдалась в 4,7% случаев, тогда как в группе девочек, не занимающихся спортом, менструальная дисфункция не регистрировалась. В исследовании K.A. Beals [40] было установлено, что аменорея фиксировалась у 17% подростков-спортсменок, 13% и 48% девочек сообщили об олигоменорее и нерегулярных менструальных циклах соответственно. У юных спортсменок с худощавым телосложением частота нарушений менструального цикла была выше (26,7%), чем у спортсменок с нормальным телосложением (16,6%). Риск возникновения олиго/аменореи был более чем в 2 раза чаще у девочек с дефицитом энергии [41]. Такие нарушения менструального цикла связаны с дисбалансом между потреблением и расходом энергии, крайне низкой массой жировой ткани и нарушением чувствительности гипоталамуса к половым стероидам. Менструальная дисфункция в значительной степени обусловлена ингибирующим влиянием гормонов стресса на продукцию гонадотропин-рилизинг-гормона и, как следствие, снижением секреции гипофизом лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, приводящим к снижению выработки яичниками эстрадиола, прогестерона и тестостерона. Нарушения менструального цикла могут быть связаны с видами спорта, для которых желательна низкая масса тела (гимнастика, фигурное катание, бег, плавание, триатлон, скалолазание).

В 2014 году экспертами Международного олимпийского комитета был предложен термин, характеризующий негативное влияние занятий спортом на организм - синдром относительного дефицита энергии в спорте (RED-S). В основе развития синдрома лежат метаболи-

ческие изменения, нарушения эндокринной системы (репродуктивной функции), сердечно-сосудистой и иммунной систем, состояния костной ткани. В большей степени симптомы RED-S характерны для лиц женского пола, чем для мужского [42]. Раннее начало высокоинтенсивных нагрузок в совокупности с поддержанием сниженной массы тела способствует отсрочке времени наступления менархе и снижению роста костей у девочек-подростков [43]. Учитывая влияние эстрогенов на рост костной ткани, важно отметить вероятность того, что спортсменки с олиго/аменореей могут не достичь своего потенциально возможного роста костной массы. Дефицит эстрогенов влияет на микроархитектуру, минеральную плотность костной ткани, что увеличивает частоту стрессовых переломов у подростков с нарушением менструального цикла [44]. Снижение плотности костной ткани, нарушения менструального цикла и отрицательный энергетический баланс составляют так называемую триаду спортсменок. Если менструальная дисфункция у подростков-спортсменок в совокупности с дефицитом энергии в случае отсутствия необходимой коррекции в ближайшей перспективе может привести к снижению роста костей, то в долгосрочной перспективе - к преждевременному развитию остеопении и остеопороза, поэтому девушки-подростки с такими нарушениями должны в обязательном порядке наблюдаться у гинеколога с коррекцией питания и режима тренировок [45].

Согласно исследованиям, проведенным при участии Федерального научно-клинического центра спортивной медицины и реабилитации ФМБА России [46], верхние границы содержания концентрации общего тестостерона в сыворотке крови у юных спортсменок составляют 2,04 нмоль/л в возрасте 14-15 лет и 2,28 нмоль/л - в возрасте 16-17 лет. Напряженные физические нагрузки в пубертатном периоде у девочек могут сопровождаться андрогенной дисфункцией, поэтому увеличение уровня тестостерона может служить сигналом для пересмотра тренировочного процесса и уменьшения физической нагрузки, а также для консультации эндокринолога и гинеколога с целью выявления причин гормональных изменений (синдром поликистозных яичников, дисфункции коры надпочечников) [47]. До наступления пубертатного возраста снижение уровня тестостерона у мальчиков часто ассоциировано с отставанием в росте/весе и может быть связано с отставанием физического и полового развития. В дальнейшем в большинстве случаев происходит закономерное повышение уровня тестостерона в крови и скачок роста. В случае снижения уровня общего тестостерона у юношей в возрасте 16-17 лет до значений менее 12 нмоль/л целесообразна консультация врача по спортивной медицине для выявления синдрома RED-S. Длительное снижение уровня гормона до значений показателя менее 8 нмоль/л при задержке роста и полового развития и отсутствия данных о наличии синдрома RED-S, является показанием для направления подростка на консультацию к эндокринологу¹.

Для оценки тренировочных нагрузок в спортивной

¹ Столярова С.А., Окорочков П.Л., Гришина Ж.В., Калугина Ю.С. Особенности гормонального статуса и диагностики эндокринной патологии у несовершеннолетних спортсменов. Методические рекомендации. М.: ФГБУ «ФНКЦ детей и подростков ФМБА России»; 2023.

медицине распространен коэффициент соотношения концентрации тестостерона и кортизола, снижение которого сопровождается снижением спортивной результативности [48]. Кортизол является гормоном, содержание которого отражает выраженность катаболических реакций, таким образом, соотношение тестостерон/кортизол характеризует баланс между анаболическими и катаболическими процессами в организме. Этот гормон регулирует углеводный обмен, усиливает катаболизм белков, окисление свободных жирных кислот, стимулирует активность симпатико-адреналовой системы, оказывает влияние на когнитивные способности и эмоциональное состояние. Увеличение концентрации кортизола в крови требует продолжительности упражнений не менее 20 минут и интенсивности, равной не менее 60% от максимального потребления кислорода [49]. Стойкое и длительное увеличение уровня кортизола вследствие интенсивных физических нагрузок может иметь негативный эффект: повреждение, замедление процессов восстановления и регенерации мышечной ткани, снижение уровня гликогена, снижение иммунной защиты, ухудшение психологического статуса, что закономерно приведет к ухудшению спортивных результатов [50]. Повышенный уровень кортизола может ослаблять образование тестостерона и эстрадиола через угнетение секреции гонадотропных гормонов и/или избирательное снижение секреции надпочечниками стероидов-предшественников [51]. Поскольку увеличение уровня кортизола может снижать секрецию эстрадиола, тестостерона и влиять на сроки полового созревания, при планировании тренировочного процесса с увеличением объема физической нагрузки следует учитывать возможные антигипертрофические реакции и ингибирующее влияние повышенного уровня кортизола на допубертатное созревание и развитие в пубертатном периоде [34].

Диапазоны значений кортизола в сыворотке крови у юношей-спортсменов 14-15 лет и 16-17 лет составили 211,1-700,8 нмоль/л и 232,8-756,0 нмоль/л соответственно, у спортсменок такого же возраста - 198,9-699,3 нмоль/л и 186,5-758,2 нмоль/л соответственно. Увеличение уровня этого гормона имеет стрессорную природу и характерно для физических нагрузок [45].

Для оценки направленности биохимических процессов у спортсменов используют индекс анаболизма (ИА): $ИА = ([\text{тестостерон}] / [\text{кортизол}]) \times 100\%$. Снижение ИА может происходить как за счет снижения уровня тестостерона, так и/или за счет увеличения концентрации кортизола. Значения cut off индекса анаболизма, свидетельствующие о перенапряженности физиологических систем у разных авторов отличаются. Одни исследователи критическими считают значение индекса ниже 5% с устойчивой тенденцией к дальнейшему снижению, свидетельствующему о развитии дезадаптации², другие авторы в качестве критерия физиологической напряженности рассматривают значения ИА менее 3% [52]. Также снижение индекса более чем на

30% по сравнению с исходным уровнем рассматривается как маркер синдрома перетренированности [53].

Коэффициент ИА положительно коррелирует с показателями физической подготовленности. Так, результаты исследования Н. Nohari и соавт. [54] показали ассоциацию средней силы между соотношением тестостерон/кортизол и изометрической мышечной силой четырехглавой мышцы бедра после сезона тренировок у подростков-футболистов. Авторы считают, что подростки с повышенным по сравнению с другими ребятами уровнем тестостерона и индекса анаболизма имеют больше шансов добиться лучшей спортивной подготовленности, чем подростки с меньшим значением этих показателей.

Стоит, однако, обратить внимание на неоднозначность трактовки полученного после тренировок результата ИА, которая может быть связана с тем, что после тренировки вместо ожидаемого нормального или повышенного уровня кортизола у детей и подростков может наблюдаться гипокортизолемиа (<150 нмоль/л), которая может расцениваться как проявление дезадаптации гипофизарно-надпочечниковой системы к высоким физическим нагрузкам², обусловленное значительным ростом потребления этого гормона после высокоинтенсивной физической нагрузки и недостаточной адаптацией к стрессовому воздействию [55]. Временный дефицит кортизола в таком случае стоит рассматривать как нормальную физиологическую реакцию на стрессовый фактор. В дальнейшем организм может предотвращать этот дефицит за счет стимуляции синтеза кортизола и повышения его доступности в начале стресса, а затем - ускорения реакции снижения уровня кортизола и быстрого восстановления его прежнего уровня. Последующий избыток кортизола, который сохраняется еще некоторое время после того, как действие стрессора прошло, уменьшается, обеспечивая таким образом гомеостаз [56]. В случае как длительного стойкого повышенного уровня кортизола, так и длительного снижения его концентрации, целесообразно динамическое наблюдение с целью исключения дисфункции надпочечников.

Несмотря на возможные сложности трактовки полученного результата ИА, использование этого показателя у детей и подростков-спортсменов с уточнением его значения cut off как критерия развития дезадаптации, может оказаться полезным для контроля адекватности дозирования нагрузки во время тренировочного процесса и оценки рисков развития переутомления для того, чтобы в случае необходимости принять профилактические меры с целью повышения спортивной результативности.

Перетренированность может быть связана с дисбалансом между половыми гормонами. Показано, что соотношение тестостерон/эстрадиол было снижено почти в 2 раза у перетренированных спортсменов по сравнению с остальными спортсменами, что связано с увеличением уровня секреции эстрадиола из-за повышения активности ароматазы [57].

Научные данные свидетельствуют о том, что в результате интенсивных тренировок у детей препубертатного и пубертатного возраста происходит увеличение в крови концентрации провоспалительных цитокинов [58], являющихся мощными активаторами гипотала-

²Выходец И.Т., Дидур М.Д., Каргашина А.С., Лобов А.Н., Мирошникова Ю.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению общего и частных синдромов перенапряжения центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, иммунной системы и переутомления у спортсменов высокой квалификации. М.: ФМБА России; 2018.

мо-гипофизарно-надпочечниковой системы и вызывающими, с одной стороны, выброс кортикотропин-рилизинг-гормона, адренкортикотропного гормона и кортизола, а с другой - подавление секреции тестостерона и соматомедина [59]. Увеличение содержания провоспалительных цитокинов отражает не только негативную катаболическую сторону напряженности физиологических систем организма: IL-6 может регулировать рост мышц, оказывать влияние на фактор роста эндотелия сосудов и фактор роста фибробластов, стимулируя, таким образом ангиогенез, индуцирует липолиз, подавляет выработку фактора некроза опухоли [60]. Следовательно, увеличение содержания IL-6 может играть потенциально полезную роль в адаптации к физическим нагрузкам.

Полагаем, что при анализе эндокринных изменений у спортсменов в ответ на интенсивные тренировки целесообразно учитывать различные факторы, способные оказать влияние на результат, поэтому при взятии крови для исследований желательнее следовать следующим рекомендациям:

1) принимать во внимание циркадные ритмы гормонов,

2) у девочек должна учитываться фаза менструального цикла и возможные его нарушения,

3) для общей оценки гормонального статуса спортсмена без учета динамических изменений забор крови желательнее осуществлять после 1-3 дней отдыха,

4) для оценки гормональной реакции на высокоинтенсивную мышечную нагрузку забор крови выполнять до тренировки, после нее и далее, если требуется оценка динамических постнагрузочных изменений и уточнение длительности восстановительного периода,

5) взятие крови осуществлять в спокойном состоянии, не на фоне стресса.

Заключение. Таким образом, гормональный гомеостаз у детей и подростков-спортсменов отражает гендерные, физиологические, возрастные особенности и адаптационные возможности организма. Гормональный стероидный паспорт может быть использован при планировании тренировочного процесса и организации профилактических мероприятий с целью предупреждения негативных последствий высокоинтенсивных нагрузок.

Перспективными направлениями для дальнейших исследований эндокринного статуса у детей и подростков-спортсменов могут быть изучение адаптивных гормональных реакций в ответ на физические нагрузки различного типа и интенсивности, уточнение связи гормональных изменений в различные фазы менструального цикла и спортивной результативности, а также исследование долгосрочного влияния изменений содержания половых гормонов на эффективность тренировочного процесса.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 5-10, 12-30, 34-44, 48, 49, 51, 53, 54, 56-60 СМ. REFERENCES)

1. Правительство России: официальный сайт. URL: <http://government.ru/news/46629/> (дата обращения 03.10.2024).
2. Бикчурин Н.М., Тахавиева Ф.В. Травмы и заболевания у юных спортсменок, занимающихся художественной гимнастикой. *Наука и спорт: современные тенденции*. 2018; 21 (4): 6-10.

3. Богомолова Е.С., Максименко Е.О., Ковальчук С.Н., Котова Н.В., Олюшина Е.А. Нормы двигательной активности современных школьников: актуальность, проблемы и пути их решения (обзор). *Санитарный врач*. 2023; 11: 696-707. DOI: 10.33920/med-08-2311-02.
4. Локтев С.А., Макарова Г.А. Педагогические и медико-биологические факторы риска в детском и подростковом спорте (аналитический обзор). *Физическая культура, спорт - наука и практика*. 2013; 4: 61-4.
11. Ваулина А.В., Цыбанов А.С., Красноярцев Г.А., Козлов О.О. Анализ спортивного травматизма у детей и подростков по материалам детского травматолого-ортопедического отделения ГК БСМП им. В.В.Ангарова за 2002-2007 гг. *Acta Biomedica Scientifica*. 2008; 61 (3): 63-5.
13. Доронцев А.В., Козлятников О.А., Каширский А.В. Структура спортивного травматизма у девочек 12-14 лет, занимающихся спортивной гимнастикой. *Научно-теоретический журнал "Ученые записки университета" имени П.Ф. Лесгафта*. 2018; 4 (158): 77 - 82.
31. Аксенова Н.В., Мангушев Т.А., Окороков П.Л., Бабаева Е.В., Зябкин И.В. Влияние уровня общего тестостерона у хоккеистов-юниоров на гематологические, биохимические показатели и уровень физической работоспособности. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2023; 13(1): 80-7. DOI: 10.47529/2223-2524.2023.1.8.
32. Сайфитова А.Т., Высотин С.А. Отрицательные стороны занятий физической культурой у детей и подростков. *Международный студенческий научный вестник*. 2018; 1: 30.
33. Бадтиева В.А., Павлов В.И., Шарыкин А.С., Хохлова М.Н., Пачина А.В., Выборнов В.Д. Синдром перетренированности как функциональное расстройство сердечно-сосудистой системы, обусловленное физическими нагрузками. *Российский кардиологический журнал*. 2018; 23(6): 180-90. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-6-180-190.
45. Безуглов Э.Н., Лазарев А.М., Хайтин В.Ю., Барскова Е.М., Колода Ю.А. Влияние занятий профессиональным спортом на менструальную функцию. *Проблемы репродукции*. 2020; 26(4): 37-47. DOI: 10.17116/репро20202604137.
46. Гришина Ж.В., Ключников С.О., Яшин Т.А., Макарова Г.А., Ломазова Е.В., Бушуева И.Е. и др. Референтные интервалы биохимических показателей крови у юных спортсменов. *Вопросы практической педиатрии*. 2022; 17(1): 71-8. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-1-71-78.
47. Речкалов А.В., Пшеничникова О.Л. Спортивная эндокринология. Курган: Изд-во КГУ; 2007.
50. Самикулин П.Н., Грязных А.В. Характер изменения кортизола у юношей с различным уровнем тренированности в условиях восстановления после субмаксимальной мышечной нагрузки. *Человек. Спорт. Медицина*. 2017; 17(1): 5-13. DOI: 10.14529/hsm170101.
52. Мамиев Н.Д., Василенко В.С., Карповская Е.Б., Семёнова Ю.Б., Канавец Н.С., Зарипов В.И. и др. Обоснование использования общей воздушной криотерапии и воздействия отрицательного давления в нижней части тела для профилактики синдрома перетренированности. *Университетский терапевтический вестник*. 2023; 5(4): 137-55. DOI: 10.56871/UTJ.2023.13.58.013.
55. Васильков А.А. Влияние различных дозровок физических нагрузок на гормоны роста школьников и студентов специальных медицинских групп. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура*. 2005; 4(2): 203-5.

REFERENCES

1. Russian Government: official website. Available at: <http://government.ru/news/46629/> (accessed 3 October 2024). (in Russian)
2. Bikchurin N.M., Takhavieva F.V. Injuries and illness of young athletes practicing rhythmic gymnastics. *Nauka i sport: sovremennye tendentsii*. 2018; 21 (4): 6-10. (in Russian)
3. Bogomolova E.S., Maksimenko E.O., Kovalchuk S.N., Kotova N.V., Olyushina E.A. Norms of motor activity in modern school children: relevance, problems and ways of solution (review). *Sanitariyi vrach*. 2023; 11: 696-707. DOI 10.33920/med-08-2311-02. (in Russian)

4. Loktev S., Makarova G. Pedagogical and biomedical risk factors in children's and youth sports (analytical review). *Fizicheskaya kul'tura, sport – nauka i praktika*. 2013; 4: 61-4. (in Russian)
5. Hunter S.K., S Angadi S., Bhargava A., Harper J., Hirschberg A.L., D. Levine B. et al. The biological basis of sex differences in athletic performance: consensus statement for the American College of Sports Medicine. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2023; 55(12): 2328-60. DOI: 10.1249/MSS.0000000000003300.
6. Handelsman D.J. Sex differences in athletic performance emerge coinciding with the onset of male puberty. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2017; 87 (1). 68-72. DOI: 10.1111/cen.13350.
7. Carrard J., Rigort A.C., Appenzeller-Herzog C., Colledge F., Königstein K., Hinrichs T., Schmidt-Trucksäss A. Diagnosing overtraining syndrome: a scoping review. *Sports Health*. 2022; 4 (5): 665-73. DOI: 10.1177/19417381211044739.
8. Perroni F., Fittipaldi S., Falcioni L., Ghizzoni L., Borriore P., Vetrano M. et al. Effect of pre-season training phase on anthropometric, hormonal and fitness parameters in young soccer players. *PLoS One*. 2019; 14(11): e0225471. DOI: 10.1371/journal.pone.0225471.
9. Weel H., Joosten A.J.P., van Bergen C.J.A. Apophyseal avulsion of the rectus femoris tendon origin in adolescent soccer players. *Children (Basel)*. 2022; 9(7): 1016. DOI: 10.3390/children9071016.
10. Mersmann F., Bohm S., Schroll A., Boeth H., Duda G.N., Arampatzis A. et al. Muscle and tendon adaptation in adolescent athletes: a longitudinal study. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2017; 27(1): 75-82. DOI: 10.1111/sms.12631.
11. Vaulina A.V., Tsibanov A.S., Krasnoyarov G.A., Kozlov O.O. Analysis of sport injuries in children and teenagers by data of children traumatologic-orthopedic department of emergency hospital named after V.V. Angapov over the period of 2002-2007. *Acta Biomedica Scientifica*. 2008; 3(61): 63-5. (in Russian)
12. Hutchinson M.R., Nasser R. Common Sports injuries in children and adolescents. *Medscape General Medicine*. 2019; 2(4). URL: <https://www.medscape.com/viewarticle/408524> (accessed 12 October 2024).
13. Dorontsev A.V., Kozlyatnikov O.A., Kashirsky A.V. Structure of sports traumatism at girls of 12-14 years old doing gymnastics. *Nauchno-teoreticheskiy zhurnal «Uchyonye zapiski universitetov imeni P.F. Lesgafta»*. 2018; 158 (4): 77-82. (in Russian)
14. Albright J.A., Lou M., Rebello E., Ge J., Testa E.J., Daniels A.H. et al. Testosterone replacement therapy is associated with increased odds of achilles tendon injury and subsequent surgery: a matched retrospective analysis. *J. Foot Ankle Res.* 2023; 16: 76. DOI: 10.1186/s13047-023-00678-0.
15. Hewett T.E., Myer G.D., Ford K.R. Anterior cruciate ligament injuries in female athletes: part I, mechanisms and risk factors. *Am. J. Sports Med.* 2006; 34(2): 299-311. DOI: 10.1177/0363546505284183.
16. Hansen M., Kjaer M. Influence of sex and estrogen on musculoskeletal protein turnover at rest and after exercise. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2014; 42(4): 183-192. DOI: 10.1249/JES.0000000000000026.
17. Sewright K.A., Hubal M.J., Kearns A., Holbrook M.T., Clarkson P.M. Sex differences in response to maximal eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2008; 40: 242-251. DOI: 10.1249/mss.0b013e31815aedda.
18. Chidi-Ogbolu N., Baar K. Effect of estrogen on musculoskeletal performance and injury risk. *Front Physiol*. 2019; 9: 1834. DOI: 10.3389/fphys.2018.01834.
19. Häggglund M., Waldén M. Risk factors for acute knee injury in female youth football. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2016; 24(3): 737-46. DOI: 10.1007/s00167-015-3922-z.
20. Hewett T.E., Zazulak B.T., Myer G.D. Effects of the menstrual cycle on anterior cruciate ligament injury risk: a systematic review. *Am. J. Sports Med.* 2007; 35(4): 659-68. DOI: 10.1177/0363546506295699.
21. Lago-Fuentes C., Padrón-Cabo A., Fernández-Villarino M. Mecías-Calvo M., Muñoz-Pérez I., García-Pinillos F. et al. Follicular phase of menstrual cycle is related to higher tendency to suffer from severe injuries among elite female futsal players. *Phys. Ther. Sport*. 2021; 52: 90-6. DOI: 10.1016/j.ptsp.2021.08.008.
22. Okazaki M., Kaneko M., Ishida Y., Murase N., Katsumura T. Changes in the width of the tibiofibular syndesmosis related to lower extremity joint dynamics and neuromuscular coordination on drop landing during the menstrual cycle. *Orthopaedic journal of sports medicine*. 2017; 5(9): 2325967117724753. DOI: 10.1177/2325967117724753.
23. Abt J.P., Sell T.C., Laudner K.G. McCrory J.L., Loucks T.L., Berga S.L. Neuromuscular and biomechanical characteristics do not vary across the menstrual cycle. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2007; 15(7): 901-7. DOI: 10.1007/s00167-007-0302-3.
24. Chen D.L., Beran M.C., Duncan M., Young J.A., Napolitano J.T., MacDonald J. Achilles tendon injuries requiring surgical treatment in the pediatric and adolescent population: a case series. *Curr. Sports Med. Rep.* 2022; 21(12): 431-5. DOI: 10.1249/JSR.0000000000001015.
25. Tenforde A.S., Sayres L.C., McCurdy M.L., Collado H., Sainani K.L., Fredericson M. Overuse injuries in high school runners: lifetime prevalence and prevention strategies. *PMR*. 2011; 3(2): 125-31. DOI: 10.1016/j.pmrj.2010.09.009.
26. Ashebo L., Stevens A.C., MacAlpine E.M., Wittstein J.R., Bradley K.E., Lawrence J.T.R. Achilles tendon injuries in the pediatric population. *J. Pediatr. Orthop.* 2023; 43(7): e513-e518. DOI: 10.1097/BPO.0000000000002437.
27. Chalatzoglidis G., Arabatzi F., Christou E.A. Motor control and achilles tendon adaptation in adolescence: effects of sport participation and maturity. *J. Hum. Kinet.* 2021; 76: 101-16. DOI: 10.2478/hukin-2021-0003.
28. Bryant A.L., Clark R.A., Bartold S., Murphy A., Bennell K.L., Hohmann E. et al. Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human achilles tendon in vivo. *J. Appl. Physiol.* 2008; 105: 1035-43. DOI: 10.1152/jappphysiol.01281.2007.
29. Hagen M., Pandya N.K. Achilles tendon ruptures in young female basketball players: a case series. *J. Am. Acad. Orthop. Surg. Glob. Res. Rev.* 2019; 3(6): e016. DOI: 10.5435/JAAOSGlobal-D-19-00016.
30. De Souza M.J., Williams N.I. Physiological aspects and clinical sequelae of energy deficiency and hypoestrogenism in exercising women. *Hum. Reprod. Update*. 2004; 10(5): 433-48. DOI: 10.1093/humupd/dmh033.
31. Aksenova N.V., Mangushev T.A., Okorokov P.L., Babaeva E.V., Zybkin I.V. Effect of testosterone in young ice hockey players on hematological, biochemical parameters and the level of physical performance. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2023; 13(1): 80-7. DOI: 10.47529/22232524.2023.1.8. (in Russian)
32. Sayfitova A.T., Vy'sotin S.A. The negative sides of physical education in children and adolescents. *Mezhdunarodnyi studencheskiy nauchnyi vestnik*. 2018; 1: 30. (in Russian)
33. Badtieva V.A., Pavlov V.I., Sharykin A.S., Khokhlova M.N., Pachina A.V., Vybornov V.D. An overtraining syndrome as functional cardiovascular disorder due to physical overload. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal*. 2018; (6): 180-90. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-6-180-190. (in Russian)
34. Cselkó A., Szabó E.I., Váczai M., Kőszegi T., Tékus E. et al. Relationship between anthropometric, physical and hormonal parameters among pre-pubertal handball players. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021; 18(19): 9977. DOI: 10.3390/ijerph18199977.
35. Kapczuk K. Elite athletes and pubertal delay. *Minerva Pediatr.* 2017 Oct; 69(5):415-26. DOI: 10.23736/S0026-4946.17.05044-7.
36. Malina R.M., Rogol A.D., Cumming S.P., Coelho e Silva M.J., Figueiredo A.J. Biological maturation of youth athletes: assessment and implications. *Br. J. Sports Med.* 2015; 49(13): 852-9. DOI: 10.1136/bjsports-2015-094623.
37. Wojtyś E.M., Jannausch M.L., Kreinbrink J.L., Harlow S.D., Sowers M.R. Athletic activity and hormone concentrations in high school female athletes. *J. Athl. Train.* 2015; 50(2): 185-92. DOI: 10.4085/1062-6050-49.3.62.
38. Hirschberg A.L. Female hyperandrogenism and elite sport. *Endocr. Connect.* 2020; 9(4): R81-R92. DOI: 10.1530/EC-19-0537.
39. Ravi S., Waller B., Valtonen M., Villberg J., Vasankari T., Parkkari J. et al. Menstrual dysfunction and body weight dissatisfaction among Finnish young athletes and non-athletes. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2021; 31(2): 405-17. DOI: 10.1111/sms.13838.
40. Beals K.A. Eating behaviors, nutritional status, and menstrual function in elite female adolescent volleyball players. *J. Am. Diet. Assoc.* 2002; 102(9): 1293-6. DOI: 10.1016/s0002-8223(02)90285-3.
41. Nichols J.F., Rauh M.J., Barrack M.T., Barkai H.S., Pernick Y. Disordered eating and menstrual irregularity in high school athletes in lean-build and nonlean-build sports. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2007; 17(4): 364-77. DOI: 10.1123/ijns.17.4.364.
42. De Souza M.J., Strock N.C.A., Ricker E.A., Koltun K.J., Barrack M., Joy E. et al. The path towards progress: a critical review to advance the science of the female and male athlete triad and relative energy deficiency in sport. *Sports Med.* 2022; 52(1): 13-23. DOI: 10.1007/

- s40279-021-01568-w.
43. Warren M.P., Chua A.T. Exercise-induced amenorrhea and bone health in the adolescent athlete. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1135: 244-52. DOI: 10.1196/annals.1429.025.
 44. Maya J., Misra M. The female athlete triad: review of current literature. *Cur.r Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2022; 29(1): 44-51. DOI: 10.1097/MED.0000000000000690.
 45. Bezuglov E.N., Lazarev A.M., Khaitin V.Yu., Barskova E.M., Koloda Yu.A. The impact of professional sports on menstrual function. *Problemy reproduktiv. 2020; 26(4): 37-47.* DOI: 10.17116/repro20202604137. (in Russian)
 46. Grishina Zh.V., Klyuchnikov S.O., Yashin T.A., Makarova G.A., Lomazova E.V. et al. Reference intervals for blood parameters in young athletes. *Voprosy prakticheskoy pediatrii.* 2022; 17(1): 71-8. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-1-71-78. (in Russian)
 47. Rechkalov A.V., Pshenichnikova O.L. *Sports endocrinology.* Kurgan: KGU; 2007. (in Russian)
 48. Crewther B., Keogh J., Cronin J., Cook C. Possible stimuli for strength and power adaptation: acute hormonal responses. *Sports Med.* 2006; 36(3): 215-238. DOI: 10.2165/00007256-200636030-00004.
 49. Tsai C.-L., Wang C.-H., Pan C.-Y., Chen F.C., Huang T.H., Chou F.Y. Executive function and endocrinological responses to acute resistance exercise. *Front. Behav. Neurosci.* 2014; 8: 262. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00262.
 50. Samikulin P.N., Gryaznykh A.V. Changes of cortisol values in young men with different levels of physical fitness during recovery after sub-maximal muscular load. *Chelovek. Sport. Meditsina.* 2017; 17(1): 5-13. DOI: 10.14529/hsm170101. (in Russian)
 51. Tsai L., Pousette A., Johansson C., Carlström K. Effect of cortisol on the secretion of testosterone and estradiol-17 beta by human granulosa-luteal cell cultures. A model system for analyzing hormonal alterations in female athletes. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1992; 71(7): 502-5. DOI: 10.3109/00016349209041440.
 52. Mamiev N.D., Vasilenko V.S., Karpovskaya E.B., Semenova Yu.B., Kanavec N.S., Zaripov B.I. et al. Rationale for use of whole-body cryotherapy and low body negative pressure device for prevention of overtraining syndrome. *Universitetskiy terapevticheskiy zhurnal (St. Petersburg).* 2023; 5(4): 137-55. DOI: 10.56871/UTJ.2023.13.58.013_(in Russian)
 53. Mangine G.T., Van Dusseldorp T.A., Feito Y., Holmes A.J., Serafini P.R., Box A.G. et al. Testosterone and cortisol responses to five high-intensity functional training competition workouts in recreationally active adults. *Sports (Basel).* 2018; 6(3): 62. DOI: 10.3390/sports6030062.
 54. Nobari H., Mainer-Pardos E., Adsuar J.C., Franco-García J.M., Rojo-Ramos J., Cossio-Bolaños M.A. et al. Association between endocrine markers, accumulated workload, and fitness parameters during a season in elite young soccer players. *Front. Psychol.* 2021; 12: 702454. DOI: 10.3389/fpsyg.2021.702454.
 55. Vasil'kov A.A. The effect of different dosages of physical activity on growth hormones of schoolchildren and students of special medical groups. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Obrazovanie, zdravookhranenie, fizicheskaya kul'tura.* 2005; 4(2): 203-5. (in Russian)
 56. Latour E., Arlet J., Latour E., Latour M., Basta P., Skarpańska-Stejnborn A. Stressor-induced temporal cortisol deficiency as a primary trigger for adaptation to stress. *Int. J. Environ Res. Public Health.* 2022; 19(9): 5633. DOI: 10.3390/ijerph19095633.
 57. Cadegiani F.A., Kater C.E. Basal hormones and biochemical markers as predictors of overtraining syndrome in male athletes: the EROS-BASAL study. *J. Athl. Train.* 2019; 54(8): 906-14. DOI: 10.4085/1062-6050-148-18.
 58. Nemet D., Oh Y., Kim H.S., Hill M., Cooper D.M. Effect of intense exercise on inflammatory cytokines and growth mediators in adolescent boys. *Pediatrics.* 2002; 110(4): 681-9. DOI: 10.1542/peds.110.4.681.
 59. Smith L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000; 32(2): 317-31. DOI: 10.1097/00005768-200002000-00011.
 60. Nemet D., Rose-Gottron C.M., Mills P.J., Cooper D.M. Effect of water polo practice on cytokines, growth mediators, and leukocytes in girls. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003; 35(2): 356-63. DOI: 10.1249/01.MSS.0000048722.84182.E3.

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Альникин А.Б.¹, Максимов А.Ю.², Енгибарян М.А.², Демидова А.А.¹

ОПТИМИЗАЦИЯ ТОНКОИГОЛЬНОЙ АСПИРАЦИОННОЙ БИОПСИИ УЗЛОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ



<https://elibrary.ru/zbrtfx>

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава РФ, 344019, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы - повысить информативность тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) узловых образований щитовидной железы (ЩЖ) для дифференциальной диагностики доброкачественной и злокачественной патологии путём дополнительного исследования белков в смыве аспирата из иглы после пунктирования узлов. Клиническую группу составили 138 пациентов с неопределёнными результатами после цитологического исследования аспирата узлов ЩЖ, полученного при тонкоигольной биопсии (категория III-V по Bethesda). По итогам гистологического исследования операционных образцов рак ЩЖ идентифицирован у 63 больных, доброкачественная патология у 75 пациентов. При проведении ТАБ остаток из иглы смывали двукратно 1 мл физиологического раствора и методом ИФА определяли концентрацию белков фибронектина 1 и секретируемого белка 1, родственного Frizzled. Для доказательства связи изменения концентрации изучаемых белков в аспирате с онкогенезом, определяли экспрессию генов FN1 и SFRP1 в опухолевых клетках операционных образцов тканей, содержание одноименных белков в гомогенате опухоли. Установлена прямая статистически значимая корреляционная зависимость между концентрацией веществ в аспирате, гомогенате опухоли, экспрессией генов в опухолевых клетках. У больных раком ЩЖ по сравнению с пациентами с доброкачественной патологией концентрация фибронектина 1 в аспирате в 2,7 раза выше ($p < 0,001$), уровень SFRP1 ниже на 35,5% ($p < 0,001$). Дифференциально разделительный уровень в аспирате для диагностики злокачественных заболеваний ЩЖ для фибронектина 1 составил более 57,4 нг/мл (чувствительность 92,06% и специфичность 94,67%, $p < 0,001$), для SFRP1 ниже 92,5 нг/мл (чувствительность 90,48% и специфичность 89,33%, $p < 0,001$). Диагностическая информативность анализа концентрации фибронектина 1 и SFRP1 в аспирате, полученном при ТАБ узлов, высокая и может быть использована для разграничения доброкачественной и злокачественной патологии ЩЖ.

Ключевые слова: рак щитовидной железы; тонкоигольная аспирационная биопсия; фибронектин 1; секретируемый белок 1, родственник Frizzled

Для цитирования: Альникин А.Б., Максимов А.Ю., Енгибарян М.А., Демидова А.А. Оптимизация тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы с помощью методов лабораторной диагностики. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (2): 97-101.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-97-101>

EDN: ZBRTFX

Для корреспонденции: Демидова Александра Александровна, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой; e-mail: alald@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2024
Принята к печати 25.06.2024
Опубликовано 25.02.2025

Alnikin A.B.¹, Maksimov A.Yu.², Engibaryan M.A.², Demidova A.A.¹

OPTIMIZATION OF FINE-NEEDLE ASPIRATION BIOPSY OF THYROID NODES USING LABORATORY DIAGNOSTICS METHODS

¹Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 344002, Rostov-on-Don, Russia;

²National Medical Research Center of Oncology» of Ministry of Health of the Russian Federation, 344019, Rostov-on-Don, Russia

The purpose of the work was to increase the information content of fine-needle aspiration biopsy (FNA) of thyroid nodules for the differential diagnosis of benign and malignant pathology by additional study of proteins in the aspirate washout from the needle after puncture of the nodes. The clinical group consisted of 138 patients with indeterminate results after cytological examination of thyroid nodule aspirate obtained by fine-needle biopsy (Bethesda category III-V). Based on the results of histological examination of surgical samples, thyroid cancer was identified in 63 patients, and benign pathology in 75 patients. During FNA, the residue from the needle was washed off twice with 1 ml of saline solution and the concentration of fibronectin 1 proteins and secreted protein 1, related to Frizzled, was determined by enzyme immunoassay. To prove the connection of changes in the concentration of the studied proteins in the aspirate with oncogenesis, the expression of the FN1 and SFRP1 genes in tumor cells of surgical tissue samples, the content of the proteins of the same name in the tumor homogenate were determined. As a result, a direct statistically significant correlation was established between the concentration of substances in the aspirate, tumor homogenate, and gene expression in tumor cells. In patients with thyroid cancer, compared with patients with benign pathology, the concentration of fibronectin 1 in the aspirate is 2.7 times higher ($p < 0,001$), and the SFRP1 level is 35.5% lower ($p < 0,001$). The differential separation level in aspirate for the diagnosis of malignant thyroid diseases for fibronectin 1 was more than 57.4 ng/ml (sensitivity 92.06% and specificity 94.67%, $p < 0,001$), and for SFRP1 below 92.5 pg/ml (sensitivity 90.48% and specificity 89.33%, $p < 0,001$). Thus, the diagnostic information content of the analysis of the concentration of fibronectin 1 and SFRP1 in the aspirate obtained with TAB nodes is high and can be used to distinguish benign and malignant thyroid pathology.

Key words: thyroid cancer; fine needle aspiration biopsy; fibronectin 1; Frizzled-related secreted protein 1

For citation: Alnikin A.B., Maksimov A.Yu., Engibaryan M.A., Demidova A.A. Optimization of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodes using laboratory diagnostics methods. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 97-101 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-97-101>

EDN: ZBRTFX

For correspondence: Demidova A.A., doctor of Medical Sciences, Associate Professor, head of department; e-mail: alald@inbox.ru

Information about authors:

Alnikin A.B., <https://orcid.org/0000-0002-6853-766X>;

Maksimov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>;

Engibaryan M.A., <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>;

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

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

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

Received 29.05.2024

Accepted 25.06.2024

Published 25.01.2025

Введение. Основными способами диагностики рака щитовидной железы (ЩЖ) являются ультразвуковой метод и цитологическое исследование образцов, полученных с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии [1]. Благодаря быстрому развитию высокопроизводительных методов лабораторной диагностики в клиническую практику внедрено использование новых перспективных биомаркеров рака ЩЖ, дополняющих стандартные методы исследования [2,3]. В сложных диагностических условиях при «неопределённом» цитологическом заключении после тонкоигольной аспирационной биопсии узлов ЩЖ дополнительное лабораторное исследование маркёров в различных биологических средах может повысить информативность при проведении дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными заболеваниями железы [4]. В качестве онкомаркёра для диагностики медуллярного рака ЩЖ рассматривают кальцитонин сыворотки крови, от концентрации тиреоглобулина в крови зависит стратегия радиоiodтерапии при дифференцированных раках ЩЖ [5,6]. Появляются публикации, где предлагается проводить дифференциальную диагностику между доброкачественной и злокачественной патологией ЩЖ на основании анализа концентрации тиреоглобулина, галектина-3, раково-эмбрионального антигена, хорионического гонадотропина в смыве аспирата из иглы при пунктировании узлов [7-9]. Развитие методики тонкоигольной аспирационной биопсии видится в дальнейшем целенаправленном поиске информативных биомаркёров, которые наряду с цитологическим заключением позволят дифференцировать доброкачественную и злокачественную патологию ЩЖ.

Цель работы - повысить информативность тонкоигольной аспирационной биопсии узловых образований ЩЖ для дифференциальной диагностики доброкачественной и злокачественной патологии путём дополнительного исследования белков в смыве аспирата из иглы после пунктирования узлов.

Материал и методы. 477 больным с узловыми образованиями ЩЖ после УЗИ с категорией TI-RADS 3 ($n=81$) и 4a ($n=396$) проводили тонкоигольную аспирационную биопсию узлов и отбирали в клиническую группу пациентов с неопределёнными результатами

после цитологического исследования (категория III-V по Bethesda) [10]. Клиническая группа включала 138 пациентов: 124 человека с категорией по Bethesda III-IV и 14 больных с категорией по Bethesda V.

Критерии включения пациентов в исследование: узловые образования ЩЖ по результатам ультразвукового исследования; неопределённое цитологическое заключение после тонкоигольной аспирационной биопсии (III-V категория по классификации Bethesda); хирургическое лечение с гистологическим исследованием операционных образцов ткани ЩЖ; отсутствие локорегионарных или отдалённых метастазов.

Критерии исключения: противоопухолевое лечение до операции; онкологические заболевания иной локализации; нарушение пациентом кратности обследований в динамике.

Сложная диагностическая ситуация больных клинической группы обусловлена неопределённым заключением по итогам УЗИ и тонкоигольной аспирационной биопсии, отсутствием экстратиреоидной инвазии опухоли, поражения локорегиональных или отдалённых лимфоузлов.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие для участия в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Соблюдались этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

При проведении тонкоигольной аспирационной биопсии необходимая часть аспирата использована для цитологических мазков. Далее остаток из иглы смывали двукратно 1 мл физиологического раствора и помещали содержимое в пробирку, центрифугировали и отбирали супернатант. Для определения концентрации белков фибронектина 1 и SFRP₁ в смыве иглы для биопсии осуществляли иммуноферментный анализ. Использовали набор Fibronectin ELISA Kit (Technoclonе, США) и набор Human Secreted Frizzled-Related Protein 1 (SFRP₁) ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., США). Считывание поглощения образцов проводили при 450 нм с

использованием микропланшетного спектрофотометра Synergy H₁ (BioTek, США).

Ввиду сложной диагностической ситуации все 138 больных были прооперированы. По итогам гистологического исследования операционных образцов опухолевых образований у 63 больных верифицирован рак ЩЖ, у 75 больных доброкачественные заболевания ЩЖ. Результаты дооперационной оценки концентрации белков фибронектина I и SFRP₁ в смыве иглы ретроспективно сравнивали с гистологическим заключением опухолевых узлов как с золотым стандартом диагностики.

У больных раком ЩЖ оценку экспрессии фибронектина I и SFRP₁ раковыми клетками осуществляли путём определения концентрации мРНК соответствующих генов методом ПЦР в реальном времени в опухолевых срезах операционных образцов. Концентрацию фибронектина I и SFRP₁ измеряли непосредственно в опухолевых гомогенатах. С помощью корреляционного анализа оценивали тесноту связи между концентрацией белков в аспирате на дооперационном этапе обследования и их уровнем в опухолевой ткани.

При оценке экспрессии генов *FN₁* и *SFRP₁* в опухолевых клетках операционных образцов ЩЖ РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) для ткани. ПЦР-РВ осуществляли с использованием красителя SYBR GREEN (Qiagen, США) и термо-

циклера LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Германия). Уровни экспрессии генов *FN₁* и *SFRP₁* в опухолевой ткани сопоставляли с референсным геном *GAPDH* и выражали в относительных единицах.

Гомогенат операционных образцов опухоли и участка ткани из перифокальной зоны готовили с помощью гомогенизатора Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific Inc., США) при скорости 10 тыс. об/мин. Гомогенизацию проводили в фосфатно-солевом буфере PBS (EURx, Польша) в соотношении 9:1 (объём PBS/вес ткани). После центрифугирования отбирали супернатант.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Statistica 12.0 (StatSoft, США) и MedCalc (Software Ltd, США).

Результаты и обсуждение. Клиническую группу больных ($n=138$) составили 31 (22,5%) мужчина и 107 (77,5%) женщин. Возраст мужчин варьировал от 25 до 79 лет, в среднем составив $50,4 \pm 3,7$ года. Возраст женщин колебался от 21 до 76 лет, среднее значение $46,2 \pm 4,5$ года. Соотношение между злокачественными и доброкачественными образованиями ЩЖ составило 63 (45,7%) и 75 (54,3%). I стадия рака ЩЖ диагностирована у 49 (77,8%), II у 14 (22,2%) пациентов.

Распределение больных в зависимости от стадии рTNM по итогам послеоперационного обследования представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение больных раком ЩЖ клинической группы ($n=63$) в зависимости от стадии (AJCC, 8-е издание, 2017)

Стадия	Число больных	
	Абс.	%
T1aN0M0	7	11,1
T1bN0M0	13	20,6
T2N0M0	24	38,1
T3aN0M0	19	30,2
Всего	63	100,0

У больных клинической группы отсутствовали экстрапериодидная инвазия опухоли, локорегиональные и отдалённые метастазы. Папиллярная карцинома ЩЖ встречалась в 69,8% ($n=44$), включая фолликулярный вариант папиллярной карциномы ЩЖ у 12 больных, фолликулярная карцинома в 20,6% ($n=13$), медуллярный рак ЩЖ в 9,5% ($n=6$).

Всем пациентам клинической группы проводили радикальное хирургическое лечение.

Белки фибронектин I и SFRP₁ при отсутствии опухолевого процесса в организме выполняют различные функции и не являются специфическими маркерами злокачественного процесса. При существенном изменении экспрессии белков раковыми клетками, их значимость для онкогенной трансформации и прогрессирования злокачественных опухолей может измениться. Например, белок галектин-3, отвечая за широкий круг биологических функций, включая регуляцию воспаления, фиброгенеза, пролиферацию миофибробластов и ремоделирования камер сердца, длительное время использовался как маркер сердечно-сосудистой патологии. В последнее время доказанный факт его усиленной экспрессии опухолевыми клетками при фолликулярном раке ЩЖ послужил основанием для оценки

его концентрации в биоптате при диагностике данного злокачественного заболевания [6].

Фибронектин I представлен гликопротеином внеклеточного матрикса, определяющим пролиферацию, адгезию, распространение, миграцию, дифференцировку и апоптоз клеток, в том числе онкогенную трансформацию [11]. Фибронектин I участвует в развитии карцином посредством усиления сродства рецепторов $\alpha 4 \beta 1$ с интегринами. Доказано, что экспрессия фибронектина I в раковых клетках карцином желудка, молочной железы, толстой кишки, светлоклеточного рака почки повышается [12]. Адгезия клеток карциномы к фибронектину усиливает туморогенность и придаёт устойчивость к химиотерапевтическим агентам, индуцирующим апоптоз. Фибронектин I рассматривают как потенциальный биомаркер радиорезистентности, его экспрессию анализируют при формировании прогноза течения злокачественного заболевания [13]. Многие сигнальные пути вовлечены в патогенез рака ЩЖ, в том числе и передача сигналов Wnt [14]. Секретируемый белок семейства Frizzled (Secreted Frizzled-Related Protein 1, SDFRP 1) является важным представителем семейства секретируемых белков, связанных с Frizzled и выступает как антагонист сигнального пути Wnt, что

объясняет его участие в онкогенезе [15].
 Величины относительного коэффициента изменения экспрессии генов в опухолевых клетках по отношению

к перифокальной зоне железы у больных клинической группы с учётом гистотипа опухоли представлены в табл. 2.

Таблица 2

Относительный коэффициент изменения экспрессии генов в опухолевых клетках (Me [25-75]) у пациентов с раком ЩЖ различного гистотипа по отношению к перифокальной зоне железы

Ген	Относительная экспрессия $dCt_{\text{оп}}/dCt_{\text{УЗТ}}$			p
	ПК/УЗТ (n=44)	ФК/УЗТ (n=13)	МК/УЗТ (n=6)	
<i>SFRP1</i>	0,78 [0,66-0,87]*	0,67 [0,53-0,75]*	0,52 [0,41-0,65]*	0,136
<i>FN1</i>	3,01 [2,56-3,34]*	1,89 [1,62-1,97]*	2,01 [1,87-2,21]*	0,001

Примечание. УЗТ – условно здоровая ткань, ПК – папиллярная карцинома, ФК – фолликулярная карцинома, МК – медуллярная карцинома. * – статистически значимые различия по сравнению с условно здоровой тканью при $p < 0,05$, p – достоверная вероятность различия показателя в трех группах.

У больных раком ЩЖ независимо от гистологического типа опухоли экспрессия гена *FN₁* в сравнении с перифокальной тканью железы повышалась, экспрессия гена *SFRP₁* снижалась. Усиленная экспрессия гена *FN₁* и снижение экспрессии гена *SFRP₁* в раковых клетках лежали в основе изменения синтеза одноименных белков опухолевыми клетками при злокачественном заболевании ЩЖ. Концентрация фибронектина 1 в гомогенате фрагмента опухоли из операционных образцов, составила 128,9 [110,3-156,5] нг/мл, *SFRP₁* 97,4 [90,1-112,5] пг/мл.

У всех больных клинической группы в смыве аспирата, полученном при пункции узлов ЩЖ, непосредственно определяли концентрацию двух белков – фибронектина 1 и *SFRP₁*. У больных с доброкачественными

и злокачественными образованиями ЩЖ концентрация фибронектина 1 в пункционном аспирате соответствовала 33,8 [21,4-50,5] мкг/мл и 92,9 [74,1-115,4] мкг/мл, соответственно. У больных раком ЩЖ концентрация биомаркера в 2,7 раза выше по сравнению с пациентами с доброкачественной патологией ($p < 0,001$).

У больных раком ЩЖ уровень *SFRP₁* в аспирате (72,1 [45,3-93,5] пг/мл) ниже на 35,5% ($p < 0,001$) по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с доброкачественными опухолями (111,7 [91,4-133,6] пг/мл).

Уровни содержания фибронектина 1 и *SFRP₁* в аспирационном биоптате узлов у больных раком ЩЖ в зависимости от гистологического типа опухоли представлены в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация фибронектина 1 и *SFRP₁* в аспирационном биоптате узлов у больных раком ЩЖ в зависимости от гистологического типа опухоли

Гистотип опухоли	<i>SFRP1</i> аспирата, пг/мл	Фибронектин 1 аспирата, нг/мл
ПК (n=32)	67,4 [53,3-89,2]	84,9 [74,0-110,5]
ФК (n=13)	80,3 [67,4-94,9]	91,8 [77,3-114,8]
ФВ ПК (n=12)	78,4 [61,6-93,8]	93,6 [79,5-115,2]
МК (n=6)	46,8 [43,1-57,5]	115,4 [110,4-119,1]
p	0,002	0,295

Примечание. ПК – папиллярная карцинома, ФК – фолликулярная карцинома, ФВ – фолликулярный вариант, МК – медуллярная карцинома.

У пациентов с медуллярной карциномой ЩЖ концентрация *SFRP₁* в аспирате имела наименьшее значение, что обусловило статистически значимое различие ($p = 0,002$) в четырех подгруппах в зависимости от гистологического типа опухоли. Содержание фибронектина 1 в аспирате не зависело от гистологического типа опухоли.

Коэффициент корреляции между уровнями изучаемых белков в гомогенате опухоли и аспирате, полученном при биопсии, составил для фибронектина $R = 0,79$ ($p = 0,001$) и для *SFRP₁* $R = 0,72$ ($p = 0,004$). Коэффициент корреляции между экспрессией активной генов *FN₁*, *SFRP₁* и концентрацией одноименных белков в аспирате соответствовал для фибронектина $R = 0,73$ ($p = 0,003$) и для *SFRP1* $R = 0,67$ ($p = 0,009$). Между экспрессией генов *FN₁*, *SFRP₁* в опухолевых клетках, а также концентрацией соответствующих белков в гомогенате опухоли, с одной стороны, и содержанием этих же белков в аспирате, полученном при тонкоигольной биопсии, установлена статистически значимая прямая связь. Данное обстоятельство явилось обоснованием для оптимизации диагностических возможностей тонкоигольной аспирационной биопсии путём определения концентрации белков фибронектина 1 и *SFRP₁* в аспирате.

С помощью ROC анализа оценена диагностическая информативность определения содержания фибронектина 1 и *SFRP₁* в аспирате, полученном при тонкоигольной биопсии узлов ЩЖ. Большим со злокачественными образованиями ЩЖ присвоен ранг 1, с доброкачественными опухолями ранг 0. Сопоставлена чувствительность и специфичность разделения пациентов на два ранга при различных концентрациях фибронектина 1 и *SFRP₁* в пункционном аспирате.

При уровне фибронектина 57,4 нг/мл чувствительность и специфичность имели максимальные значения. Данный уровень считали дифференциально разделительным. При превышении фибронектина 1 более 57,4 нг/мл в аспирате, полученном при ТАБ, диагноз рака ЩЖ устанавливали с чувствительностью 92,06% и специфичностью 94,67% ($p < 0,001$).

Дифференциальный разделительный уровень SFRP₁ в пункционном аспирате при диагностике рака ЩЖ составил 92,5 пг/мл. При снижении концентрации SFRP₁ ниже 92,5 пг/мл, диагноз рака ЩЖ устанавливали с диагностической чувствительностью 90,48% и специфичностью 89,33% ($p < 0,001$).

Диагностическая информативность определения фибронектина 1 и SFRP₁ в аспирате, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии, высокая и может быть использована для разграничения доброкачественной и злокачественной патологии ЩЖ.

Заключение. При неопределённом цитологическом заключении после тонкоигольной биопсии узлов ЩЖ рекомендуется при повторной пункции смыв из иглы рассматривать как информативную биологическую среду для определения концентрации биомаркёров. В супернатанте аспирата, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии, необходимо определять концентрацию белков фибронектина 1 и секретируемого белка 1, родственного Frizzled. Определение концентрации белков в аспирате расширяет диагностическую информативность биопсии узлов ЩЖ. При превышении в аспирате фибронектина 1 более 57,4 нг/мл, чувствительность диагностического заключения о раке ЩЖ составляет 92,06%, специфичность 94,67% ($p < 0,001$). При снижении в аспирате концентрации SFRP₁ ниже 92,5 пг/мл, диагноз рака ЩЖ устанавливается с диагностической чувствительностью 90,48% и специфичностью 89,33% ($p < 0,001$).

Новости хирургии. 2015; 23(3): 326-31.

REFERENCES

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 3, 6, 8-15 С.М.) REFERENCES

1. Тагиль А.О., Борсуков А.В. Вакуумная тонкоигольная аспирационная биопсия как метод раннего выявления рака щитовидной железы. *Медицинский алфавит.* 2024; (7): 34-40.
2. Михайлова А.А., Шестаков А.В., Чубакова К.А., Колоколова Е.В., Елисеев В.Ю., Костяева М.Я. и др. Современные концепции молекулярного патогенеза рака щитовидной железы. *Успехи молекулярной онкологии.* 2021; 8(2): 8-22.
4. Качко В.А., Семкина Г.В., Платонова Н.М., Ванушко В.Э., Абросимов А.Ю. Диагностика новообразований щитовидной железы. *Эндокринная хирургия.* 2018; 12(3): 109-27.
5. Александров Ю.К., Яновская Е.А., Шубин Л.Б., Дякив А.Д. Эффективность стратификационных систем в диагностике узловых заболеваний щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии.* 2019; 65(4): 216-26.
7. Олифинова О.С., Кналян С.В. Роль онкомаркеров в дифференциальной диагностике узловых заболеваний щитовидной железы.

1. Tagil` A.O., Borsukov A.V. Vacuum fine-needle aspiration biopsy as a method of early detection of thyroid cancer. *Meditsinskiy alfavit.* 2024; (7): 34-40. DOI: 10.33667/2078-5631-2024-7-34-40. (in Russian)
2. Mikhaylova A.A., Shestakov A.V., Chubakova K.A., Kolokolova E.V., Eliseev V.Yu., Kostyaeva M.Ya. et al. Modern concepts of the molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2021; 8(2): 8-22. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-8-22. (in Russian)
3. Lupo M., Walts A., Sistrunk J., Giordano T.J., Sadow P.M., Massoll N. et al. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules. *Diagn. Cytopathol.* 2020; 48(12): 1254-64. DOI: 10.1002/dc.24564.
4. Kachko V.A., Semkina G.V., Abrosimov A.Y., Platonova N.M., Vanushko V.E. Diagnosis of thyroid neoplasms: state of the art on 2018. *Endokrinnaya khirurgiya.* 2018; 12(3): 109-27. DOI: 10.14341/serg9977. (in Russian)
5. Aleksandrov Yu.K., Yanovskaya E.A., Shubin L.B., Dyakiv A.D. The effectiveness of risk stratification systems in diagnosis of nodular thyroid disorders. *Problemy endokrinologii.* 2019; 65(4): 216-26. DOI: 10.14341/probl10087. (in Russian)
6. Macvanin M.T., Gluvic Z.M., Zaric B.L., Essack M., Gao X., Iseovic E.R. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2023; 14: 1218320. DOI:10.3389/fendo.2023.1218320.
7. Olifirova O.S., Knalyan S.V. The role of tumor markers in the differential diagnosis of nodular thyroid diseases. *Novosti Khirurgii.* 2015; 23 (3): 326-31. (in Russian)
8. Fanfone D., Stanicki D., Nonclercq D., Port M., Vander Elst L., Laurent S. et al. Molecular imaging of galectin-1 expression as a biomarker of papillary thyroid cancer by using peptide-functionalized imaging probes. *Biol. (Basel).* 2020; 9: 53. DOI: 10.3390/biology9030053.
9. Nangia-Makker P., Hogan V., Raz A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology.* 2018; 28: 172-81. DOI: 10.1093/glycob/cwy001.
10. Ali S.Z., Baloch Z.W., Cochand-Priollet B., Schmitt F.C., Vielh P., Vander-Laan P.A. The 2023 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid.* 2023; 33(9): 1039-44. DOI: 10.1089/thy.2023.0141.
11. Wang P., Shang J., Zhao J., Wang K., Guo L., Gu J., Wang W. SRY-related HMG box-2 role in anaplastic thyroid cancer aggressiveness is related to the fibronectin 1 and PI3K/AKT pathway. *Mol. Med. Rep.* 2020; 21(3):1201-7. DOI: 10.3892/mmr.2020.10907.
12. da Silveira Mitteldorf C.A., de Sousa-Canavez J.M., Leite K.R., Massumoto C., Camara-Lopes L.H. FN1, GALE, MET, and QPCT overexpression in papillary thyroid carcinoma. Molecular analysis using frozen tissue and routine fine-needle aspiration biopsy samples. *Diagn. Cytopathol.* 2011; 39: 556-61. DOI: 10.1002/dc.21423.
13. Sponziello M., Rosignolo F., Celano M., Maggisano V., Pecce V., De Rose R.F. et al. Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2016; 431: 123-32. DOI: 10.1016/j.mce.2016.05.007.
14. Duchartre Y., Kim Y.M., Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016; 99:141-9. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.12.005.
15. Gazdzicka J., Swietek A., Hudy D., Dabrowska N., Gofabek K., Rydel M. et al. Concentration of secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in non-small cell lung carcinoma subtypes - a preliminary study. *Curr. Oncol.* 2023; 30: 9968-80. DOI: 10.3390/curroncol30110724.

ГЕМАТОЛОГИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Вареха Н.В.¹, Стуклов Н.И.¹, Гимадиев Р.Р.^{1,2}, Варакина-Митрай К.А.²

<https://elibrary.ru/zdvkpk>

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ (обзор литературы)

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», 117198, Москва, Россия;

²ООО «ЛабХаб», 119002, Москва, Россия

Обзор посвящен искусственному интеллекту в диагностике железодефицитной анемии (ЖДА) с помощью алгоритмов машинного обучения (МО) на основе данных клинического анализа крови (КАК) и лабораторных показателей обмена железа. Приведены исследования по разработке, внедрению и оценке алгоритмов МО, которые: 1) позволяют спрогнозировать концентрацию показателей обмена железа (в частности, сывороточного ферритина) на основе минимального набора лабораторных тестов (алгоритмы регрессии); 2) автоматически оценивают риск дефицита железа (ДЖ) в организме, отражаемого низким уровнем ферритина в сыворотке крови пациентов с анемией (алгоритмы классификации); 3) позволяют лабораториям проводить диагностические тесты второй линии по результатам первоначально заказанных лабораторных услуг (алгоритмы «рефлексного» тестирования).

Ключевые слова: дефицит железа; железодефицитная анемия; искусственный интеллект; машинное обучение; сывороточное железо; ферритин

Для цитирования: Вареха Н.В., Стуклов Н.И., Гимадиев Р.Р., Варакина-Митрай К.А. Искусственный интеллект в лабораторной диагностике железодефицитной анемии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 102-107.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-102-107>

EDN: ZDVKPK

Для корреспонденции: Вареха Николай Вячеславович, аспирант кафедры госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики Медицинского института «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; e-mail: niki2187@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 18.06.2024

Принята к печати 06.11.2024

Опубликовано 25.01.2025

Varekha N.V.¹, Stuklov N.I.¹, Gimadiev R.R.^{1,2}, Varakina-Mitrail K.A.²

ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF IRON DEFICIENCY ANEMIA (review of literature)

¹Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), 117198, Moscow, Russia;

²LabHub LLC, 119002, Moscow, Russia

The review is devoted to the potential use of artificial intelligence in the diagnosis of iron deficiency anemia (IDA) using machine learning (ML) based on clinical blood count (CBC) data and laboratory indicators of iron metabolism. The paper presents studies on the development, implementation and evaluation of ML algorithms that: 1) allow predicting the concentration of iron metabolism indicators (in particular, serum ferritin) based on a minimum set of laboratory tests (regression algorithms); 2) automatically assess the risk of iron deficiency in the body, reflected by a low level of ferritin in the blood serum of patients with anemia (classification algorithms); 3) perform second line diagnostic tests on existing specimens based on the results of initially ordered tests (reflex testing algorithms).

Key words: iron deficiency; iron deficiency anemia; artificial intelligence; machine learning; serum iron; ferritin

For citation: Varekha N.V., Stuklov N.I., Gimadiev R.R., Varakina-Mitrail K.A. Artificial intelligence in laboratory diagnostics of iron deficiency anemia (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 102-107 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-102-107>

EDN: ZDVKPK

For correspondence: Varekha Nikolay Vyacheslavovich, Ph.D. student, Department of Therapy with the courses of endocrinology, hematology, and clinical laboratory diagnostic; e-mail: niki2187@mail.ru

Information about authors:

Varekha N. V., <https://orcid.org/0009-0004-0969-6144>;

Stuklov N. I., <https://orcid.org/0000-0002-4546-1578>;
Gimadiev R. R., <https://orcid.org/0000-0002-9567-3317>;
Varakina-Mitraïl K. A., <https://orcid.org/0000-0001-9321-4574>.

Conflict of interests. *The study had no sponsor support.*

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

Received 18.06.2024

Accepted 06.11.2024

Published 25.01.2025

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), железодефицитная анемия (ЖДА) является наиболее распространенным типом анемии в мире. Так, 33% небеременных женщин, 40% беременных женщин и 42% детей во всем мире страдают ЖДА [1, 2]. Несмотря на то, что течение ЖДА обычно легкое, у ряда пациентов может вызывать нарушение когнитивных и двигательных функций, внутриутробную и материнскую смертность, а также сердечную недостаточность [3, 4].

Для выявления дефицита железа (ДЖ) в клинической практике чаще всего применяется анализ содержания ферритина сыворотки (ФС), который считается наиболее объективным показателем. Однако анализ ФС плохо гармонизирован, а при установке референсных интервалов и интерпретации результатов необходимо учитывать различия между тест-системами [5]. Кроме того, диагностика ДЖ осложнена выраженным влиянием острого и хронического воспаления на показатели ФС у конкретного пациента. Диагностику ДЖ затрудняют другие микроцитарные гипохромные анемии иной этиологии: α - и β -талассемии, анемия хронических болезней (АХБ), врожденные и приобретенные сидеробластные анемии, например, свинцовая интоксикация [6].

В последние годы внимание исследователей было сосредоточено на расширении возможностей искусственного интеллекта (ИИ) и инструментов систем поддержки принятия врачебных решений (СППВР) в диагностике ЖДА. ИИ как направление, ориентирован на создание систем, которые выполняют такие зада-

чи, как рассуждение, понимание естественного языка, распознавание закономерностей и принятие решений. В рамках ИИ существует направление, известное как машинное обучение (МО), в рамках которого используются алгоритмы и статистические методы, позволяющие компьютерам «учиться» и делать прогнозы на основе имеющихся данных. По сути, МО фокусируется на методах, которые позволяют ИИ улучшать свою производительность с течением времени, в случае появления дополнительных данных.

Для прогнозирования результатов лабораторных исследований различие между ИИ и МО является критическим. ИИ может использовать различные методы, включая системы на основе правил и экспертные системы, для разработки рекомендаций на основе большого набора данных имеющихся результатов лабораторных анализов. В то же время МО использует существующие большие массивы данных для выявления закономерностей и корреляций, которые могут быть не сразу очевидны эксперту. Например, посредством МО на основе результатов проведенных лабораторных испытаний система может научиться предсказывать будущие результаты на основе новых входных данных, предлагая уровень точности и эффективности, которого традиционные методы программирования могут не достичь. МО предоставляет возможность снизить нагрузку врачей и сократить количество недиагностированных случаев ДЖ.

История развития МО для диагностики ЖДА. Поиск статей на портале PubMed показал, что первая

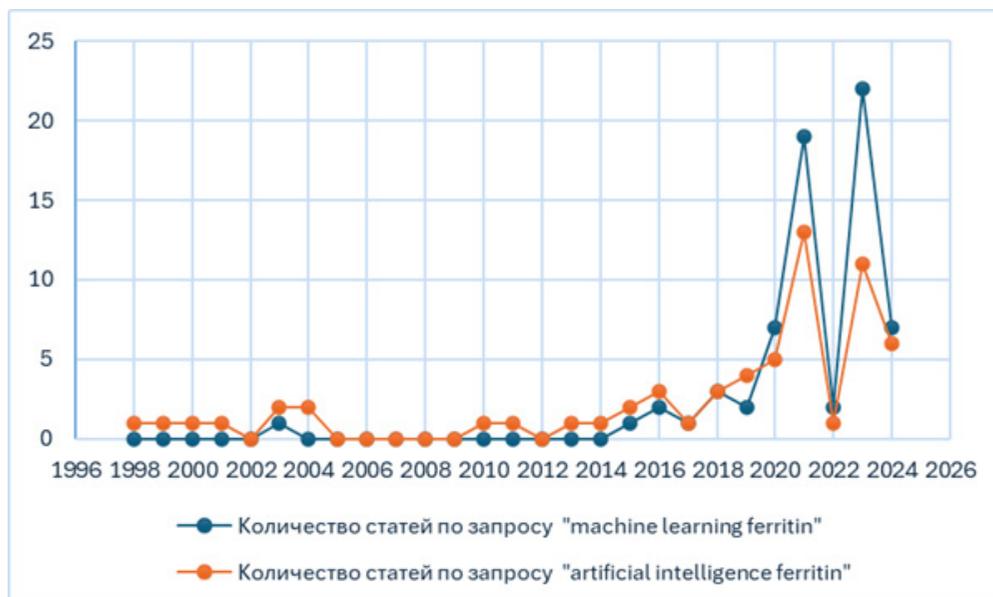


Рис. 1. Статистика публикаций на научном ресурсе PubMed по запросам “machine learning ferritin” и “artificial intelligence ferritin”.

статья по запросу “artificial intelligence ferritin” была опубликована в 1998 году, в то время как по запросу “machine learning ferritin” первая публикация появилась только в 2003 году (рис. 1). Тем не менее, до 2018 года в научных журналах появлялись лишь единичные публикации по данным запросам. После 2018 года наблюдается резкий рост исследований на указанные темы с резким провалом в 2022 году, что может объясняться снижением финансирования научных исследований, не связанным с пандемией коронавируса.

В последние годы методы МО, представляющие собой разновидность ИИ, успешно используются во многих областях: от классификации болезней до вычислительной биологии, от фармакологических исследований до биоинженерии [7]. Искусственные нейронные сети и алгоритмы глубокого обучения могут обучаться сами, организовывать, связывать нелинейные отношения и получать более конкретные результаты из связей между данными [8].

Между тем, еще в 1986 году была опубликована

первая статья, в которой упоминается математический алгоритм для дифференциальной диагностики анемий «ANEMIA», разработанный в университете Рутгерса в США. Для создания системы использовалось всего 320 клинических случаев, однако создатели предполагали, что доработка данного алгоритма позволит проводить дифференциальную диагностику 64 различных патологий, включая ЖДА, талассемии, АХБ и другие патологические состояния со схожими симптомами [9].

В 1989 году вышло сразу 3 статьи о разработке компьютерных экспертных систем (ЭС), способствующих дифференциальной диагностике различных типов анемий (рис. 2). В одной из них ученые из США описали опыт создания ЭС для интерпретации микроцитарной анемии VP-Expert, работающей на персональном компьютере IBM. Система обрабатывала массив данных (результаты КАК, возраст и пол) в соответствии с набором логических правил, запрограммированных учеными, и делала выводы о возможных вариантах микроцитарной анемии: α -, β -талассемия, ЖДА или АХБ [10].

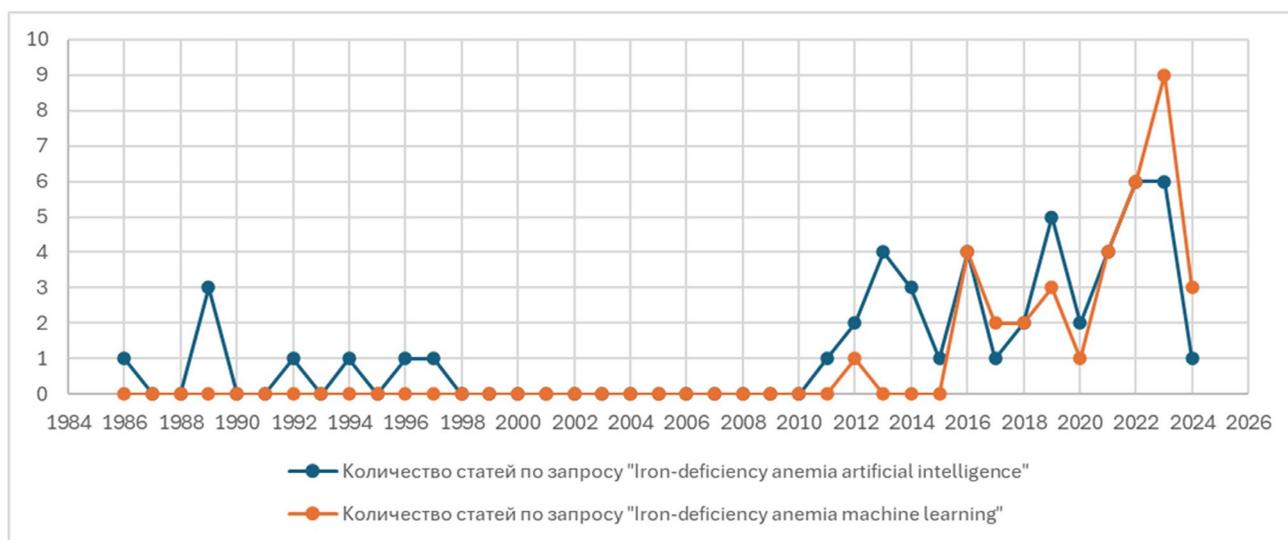


Рис. 2. Статистика публикаций на научном ресурсе PubMed по запросам “Iron-deficiency anemia machine learning” и “Iron-deficiency anemia artificial intelligence”.

Другая ЭС, разработанная на персональном компьютере Macintosh с использованием коммерчески доступной оболочки ИИ, сравнивала четыре различные дискриминантные функции для дифференциации микроцитарной анемии по этиологическим категориям [11]. Было использовано несколько баз данных, которые содержали, по крайней мере, несколько образцов от лиц с талассемией и от пациентов с ЖДА. Ни одна из существующих баз данных не показала удовлетворительных результатов при использовании по отдельности, наоборот, одна из них получила очень высокий уровень ложноположительных результатов. При этом эффективность диагностики несколько повысилась за счет объединения нескольких баз, что и послужило основанием для создания ЭС, использующей кластерный анализ и набор обучающих примеров. Входными данными, необходимыми для указанной ЭС с целью получения заключения, явились: средний объем эритроцитов (MCV), число эритроцитов в литре крови (RBC)

и ширина распределения эритроцитов (RDW), а также бинарное заключение о том, есть ли у пациента анемия. На основании значений этих параметров ЭС могла дать «совет» относительно вероятности талассемии, ДЖ и/или других состояний, таких как предыдущие переливания крови, АХБ, лабораторная ошибка и т. д. Удивительно, но, несмотря на небольшую выборку используемых для программирования результатов анализов, в проспективном исследовании система работала с точностью выше 85%.

Разработка третьей ЭС проводилась на основе данных, полученных на гематологическом анализаторе Coulter S-Plus II [12]. Дискриминантные правила алгоритма были определены ретроспективно на основе многомерного анализа существующей базы данных. Используемыми параметрами были MCV, RDW, концентрация гемоглобина в цельной крови (HGB), RBC, средний объем тромбоцитов (MPV) и число тромбоцитов (PLT). Впоследствии была оценена способность

системы выявлять талассемию и другие гемоглобинопатии в выборке из 1671 женщины и 1490 мужчин в реальных лабораторных условиях. 845 случаев микроцитоза были использованы для оценки реальной частоты диагностических групп, определенных с помощью ЭС «Micro Nema Screen». Точность экспертного заключения авторами не указана.

Подобный “бум” интереса к теме в конце 1980-х годов мог быть связан с повышением распространенности персональных компьютеров, способных совершать вычисления со скоростью на порядок выше человеческой. Тем не менее, интерес к теме на протяжении длительного времени угас, и новый рост количества опубликованных статей по теме в базе PubMed начался только в 2011 году.

Алгоритмы МО для прогнозирования уровня показателей обмена железа (алгоритмы регрессии). Задача прогнозирования количественных переменных на основе данных (регрессия) была реализована в Тегеранской больнице Шариати в 2010 году. Разработана искусственная нейронная сеть (ANN) для прогнозирования концентрации сывороточного железа (СЖ) по показателям КАК: отношения количества эритроцитов к концентрации гемоглобина, MCV, среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах (МСН), средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) [13]. Когорта пациентов составила 203 человека (92 мужчины и 111 женщин, средний возраст составил $55,8 \pm 17,8$ лет). Участники исследования были случайным образом распределены на группы: для обучения модели и ее последующего тестирования. Среднее значение и стандартное отклонение прогнозируемого и измеренного уровня СЖ составили $9,11 \pm 6,46$ и $9,10 \pm 6,46$ мкмоль/л

соответственно. Кроме того, модель ANN показала высокую прогностическую ценность по сравнению с моделью линейной регрессии (средняя абсолютная ошибка 0,022 против 7,042; коэффициент детерминации R^2 0,93 против 0,092 соответственно).

Прогнозирование уровня ФС по другим лабораторным параметрам было выполнено в концептуальном исследовании Гарвардской медицинской школы [14]. Для обучения регрессионных моделей (на платформе Scikit-learn) использовались данные 3590 пациентов, для тестирования — 1358 пациентов. В перечень МО было включено до 40 входных параметров: развернутый КАК, альбумин, общий белок, глюкоза, билирубин общий, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), соотношения анионов и катионов плазмы (анионный разрыв), бикарбонаты, витамин B_{12} , мочевины, креатинин, кальций, калий, натрий, хлориды, СЖ, ФС, железосвязывающая способность сыворотки (ОЖСС), сывороточные белковые фракции, включая пол и возраст. Корреляция между концентрацией измеренного и смоделированного ФС достигала 0,732. Была выявлена умеренная корреляция с уровнем ФС ($r=-0,62, 0,39$ и $0,43$) показателей ОЖСС, MCV и МСН. Также важно отметить размышления авторов о причинах значительного расхождения содержания ФС у четырех пациентов. Они полагали, что в этих случаях прогнозируемый уровень ФС был более репрезентативен для определения статуса железа у пациента, чем полученный в реальном измерении показатель (см. таблицу).

Клинические случаи с расхождением измеренного и прогнозируемого уровня ФС, представленные в работе Y. Luo и соавт. [14]

Случай	Измеренный ФС, мкг/л	Прогнозируемый ФС, мкг/л	Предположение	Комментарий
1	230	21	Не диагностированная ЖДА	Измеренный ФС повышен вследствие воспаления
2	197	19	Восстановление запасов железа в организме при лечении ЖДА	Недавно завершён курс внутривенных инфузий железа
3	1768	9	Ограниченная база данных	Только два предикторных теста были включены в расчёты
4	364	20	Сложная гематологическая картина	Рекомендуется консультация гематолога

Алгоритмы МО для предиктивной диагностики ЖДА (алгоритмы классификации). Задача прогнозирования категориальных переменных на основе данных (классификация) позволяет оперативно и точно проводить диагностику ЖДА. Например, в одной из работ I. Azarkhish и соавторов [13] была разработана модель с использованием программного обеспечения MATLAB 7 для диагностики ЖДА (при уровне СЖ $<7,13$ мкмоль/л) на основе лабораторных данных: RBC, HGB, MCV, МСН, МСНС и СЖ. Из исследования были исключены пациенты с кровотечением и гемодиализом. Для обучения модели использовались данные 149 пациентов. Остальные данные (54 случая) использовались для тестирования модели. Модель классификации ANN обладала высокой диагностической ценностью: AUC ROC составила 0,982 ($p < 0,00001$), точность, чув-

ствительность и специфичность – 96,3, 96,8 и 95,6% соответственно. Таким образом, используя рутинные лабораторные данные, разработанная модель представляет собой новый высокоточный, неинвазивный, недорогой и быстрый метод, который можно использовать в клинической практике при диагностике ЖДА.

Y. Luo и соавторы [14] в 2016 году разработали классификационную модель на основе МО, которая позволяла с высокой точностью диагностировать ЖДА, используя демографические и лабораторные данные. По предлагаемым в работе критериям нижняя граница нормы ФС составила 10,0 мкг/л у лиц женского пола и 30,0 мкг/л - у мужчин. В наборе данных для МО было включено в среднем 23 лабораторных показателя. Как в случае регрессии, так и при классификации, наиболее информативными признаками были показатели ОЖСС,

MCV и МСН. Демографические данные и результаты лабораторных анализов позволили с высокой точностью классифицировать ЖДА по уровню предсказанного ФС, отклоняющегося от нормы (площадь под ROC-кривой составила 0,97).

В недавнем исследовании были проанализированы данные 19 000 пациентов: пол, возраст, КАК и ФС [15]. AUC ROC классификационной модели ЖДА составила 0,99, точность, чувствительность и специфичность – 87, 89 и 98% соответственно. Одним из ограничений исследования было отсутствие в наборе данных уровня С-реактивного белка (СРБ) – показателя воспалительного процесса. Однако такими биомаркерами, по мнению авторов, может выступить количество лейкоцитов (лимфоциты и моноциты).

В Турции с целью предиктивной диагностики ЖДА у пациенток женского пола было разработано приложение с использованием нейросетей FFN, CFN, DDN, TDN, PNN, LVQ [16]. Для построения прогностической модели использовались 4600 результатов КАК. В алгоритм включали следующие показатели: RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC. Также исследователи впоследствии включили еще 600 результатов анализов крови для оценки эффективности полученной модели, из которых 478 пациенток были здоровы, а у 122 диагностировали ЖДА. Чувствительность полученной модели составила 97,6%, точность — 99,2%. Таким образом, исследователи выяснили, что с помощью алгоритмов на основе МО можно диагностировать ЖДА с очень высокой точностью.

Алгоритмы рефлексного тестирования на основе инструментов МО. В 2022 году в Нидерландах был разработан алгоритм МО, который оценивает ДЖ с использованием минимального набора лабораторных тестов - КАК и СРБ [17]. В исследование были включены результаты анализов 12 009 пациентов из трех лабораторий. Около 80% результатов использовались для разработки и тестирования алгоритма МО, остальные – для проверки работы полученной модели. В результате были выявлены два наиболее важных морфологических параметра, указывающих на снижение уровня ФС ниже порогового значения — МСН и МCV (AUC ROC = 0,92). Кроме того, провели сравнение точности прогнозирования уровня ФС разработанной моделью и сотрудниками лаборатории, которые интерпретировали результаты лабораторных анализов (возраст, пол, КАК и СРБ) у 60 пациентов с анемией. Специалистам было предложено сделать прогноз содержания ФС на основе указанных данных или выбрать вариант «не уверен». Чувствительность созданного алгоритма МО оказалась выше и составила 93%, в то время как у специалистов лаборатории — 83%. По результатам проведенного исследования в нескольких регионах Нидерландов введена услуга рефлексного тестирования, которая включает поясняющие комментарии и тесты для завершения диагностического обследования, что экономит время врачей и предотвращает взятие крови у пациента без необходимости. Машинный алгоритм, разработанный в описанном исследовании, может использоваться в качестве инструмента СППВР и выявления случаев ДЖ.

В работе М. McDermott и соавторов [18] ретроспективно проанализированы данные КАК 288 427 пациентов с целью определения необходимости рефлексного

тестирования ФС в день сдачи анализов или в течение 30 дней при подозрении на ЖДА. Моделирование выполнялось на языке Python с использованием фреймворка Scikit-learn. Модель обладала лучшей диагностической ценностью по сравнению с другими правилами. Например, чувствительность и специфичность алгоритма доназначения анализа ФС (например, при низких уровнях MCV и гематокрита) составила 51 и 63% против 69 и 80% у данной модели, соответственно. Таким образом, полученная модель превосходила многие простые правила, которые лежат в основе традиционных протоколов рефлексного тестирования (например, назначение ФС при низком уровне ФС в динамике, при высоком уровне RDW и других комбинациях).

Заключение. Применение алгоритмов МО позволяет определять ЖДА с точностью более 87% и уровень ФС с точностью более 83%. Развитие и современное применение ИИ в оценке большого количества лабораторных и демографических параметров уже позволило достигнуть высокой точности прогнозных моделей. Исследования показали, что использование даже только стандартных показателей RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC может быть эффективно для построения высокоточных прогностических моделей наличия железодефицитных состояний. Разработанные модели могут быть использованы в качестве вспомогательного инструмента для помощи врачу в выявлении случаев ДЖ и СППВР.

Одним из направлений практической работы для реализации описанной стратегии является использование технологии МО для разработки моделей с использованием больших массивов данных с уровнями гемоглобина, СЖ, ФС, коэффициента насыщения трансферрина железом, ОЖСС и другие. Выявляя закономерности в этих данных, можно разработать алгоритмы для дифференциальной диагностики ЖДА и АХБ.

Еще одна возможность для внедрения ИИ — разработка автоматизированных диагностических систем, которые напрямую интегрируются с лабораторными информационными системами. Эти системы могут в режиме реального времени отслеживать входящие результаты лабораторных исследований и отмечать потенциальные случаи ДЖ на основе разработанных алгоритмов. Кроме того, методы кластеризации могут применяться на неразмеченных данных для поиска ранее не выявленных факторов риска, что позволит внедрить подходы персонализированной медицины в клинику. Кроме того, алгоритмы МО могут стать основой для новых типов рефлексного тестирования с лучшими диагностическими характеристиками.

Вместе с тем существует и ряд серьезных ограничений для их применения:

- алгоритмы МО можно применять только для групп людей, на которых проводилось обучение математической модели (например, для взрослых пациентов с анемией, ДЖ и т.д.);
- следует учитывать новый Европейский «Регламент диагностики *in vitro*» (IVDR), ограничивающий определенные программные инструменты;
- определение ФС не стандартизовано, и в лабораториях используют разные тест-системы и референсные интервалы.

Предиктивная диагностика ЖДА в силу полиэти-

логичности заболевания требует системного подхода, реализуемого в рамках омиксных технологий (метабономики). Для дальнейшего прогресса ИИ необходимы более масштабные клинические исследования и интеграция различных типов данных, включая генетические, клинические и характеристику образа жизни пациентов. Внешний контроль качества исследований может существенно повысить точность моделей ИИ. Разработка стандартизированных протоколов моделей ИИ на основе международного сотрудничества имеет важное значение, равно как и решение таких этических проблем, как конфиденциальность данных и последствия принятия решения ИИ, что позволит использовать указанный потенциал в эффективной диагностике заболеваний, связанных с дефицитом железа в организме.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-5, 7-20 СМ. REFERENCES)

6. Сахин В.Т., Крюков Е.В., Рукавицын О.А. Анемия хронических заболеваний - особенности патогенеза и попытка классификации. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019; 1: 33-7.

REFERENCES

1. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. Miller J.L. Iron deficiency anemia: A common and curable disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013; 3(7): a011866.
3. Thachil J. Iron deficiency: still under-diagnosed? *British Journal of Hospital Medicine*. 2015; 76(9): 528-32.
4. Daru J. Sustainable Development Goals for anaemia: 20 years later, where are we now? *Lancet Glob. Health*. 2022; 10(5): e586.
5. Hoofnagle A.N. Harmonization of blood-based indicators of iron status: making the hard work matter. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017; 106: 1615S-1619S.
6. Sakhin V.T., Kryukov E.V., Rukavitsyn O.A. Anemia of chronic diseases - the key mechanisms of pathogenesis and the attempt of the classification. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; (1): 33-7. (in Russian)
7. Obermeyer Z., Emanuel E.J. Predicting the future - bigdata, machine learning, and clinical medicine. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(13): 1216-9.
8. Prieto A., Prieto B., Ortigosa E. M., Ros E., Pelayo F., Ortega J. et al. Neural networks: An overview of early research, current frameworks and new challenges *Neurocomputing*. 2016; 214: 242-68.
9. Quaglini S., Stefanelli M., Barosi G., Berzuini A. ANEMIA: an expert consultation system. *Comput. Biomed Res.* 1986; 19(1): 13-27.
10. O'Connor M.L., McKinney T. The diagnosis of microcytic anemia by a rule-based expert system using VP-Expert. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989; 113(9): 985-8.
11. Houwen B. The use of inference strategies in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Blood cells*. 1989; 15(3): 509-27.
12. Paterakis G.S., Terzoglou G., Vasilioy E. The performance characteristics of an expert system for the "on-line" assessment of thalassemia trait and iron deficiency - Micro Hema Screen. *Blood cells*. 1989; 15(3): 541-60.
13. Azarkhish I., Raoufy M.R., Gharibzadeh S. Artificial intelligence models for predicting iron deficiency anemia and iron serum level based on accessible laboratory data. *J. Med. Syst.* 2012; 36(3): 2057-61.
14. Luo Y., Szolovits P., Dighe A.S., Baron J.M. Using machine learning to predict laboratory test results. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016; 145(6): 778-88.
15. Pullakhandam S., McRoy S. Classification and explanation of iron deficiency anemia from complete blood count data using machine learning. *BioMedInformatics*. 2024; 4(1): 661-72.
16. Yilmaz Z., Bozkurt M.R. Determination of women iron deficiency anemia using neural networks. *J. Med. Syst.* 2012; 36(5): 2941-5.
17. Kurstjens S., de Bel T., van der Horst A., Kusters R., Krabbe J., van Balveren J. Automated prediction of low ferritin concentrations using a machine learning algorithm. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2022; 60(12): 1921-8.
18. McDermott M., Dighe A.S., Szolovits P., Luo Y., Baron J.M. Using machine learning to develop smart reflex testing protocols. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2023; 31(2): 416-25.

КОАГУЛОЛОГИЯ



https://elibrary.ru/zsaahd

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Берковский А.Л.¹, Бабкеева Э.Р.², Сергеева Е.В.¹, Суворов А.В.¹,
Сапунова И.Д.², Каримова И.Н.²

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ЛАБОРАТОРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА

¹ МБООИ «Общество больных гемофилией», НПО Ренам, 125212, Москва, Россия;

² АСНП Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований, 129090, Москва, Россия

Цель работы заключается в выявлении частоты и характера типичных ошибок лабораторного определения волчаночного антикоагулянта (ВА). Проведено межлабораторное сравнительное исследование по программе Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК) клинических лабораторных исследований. Определяли правильность тестирования контрольных плазм с различным содержанием ВА. Проанализированы возможные погрешности выявления ВА. Определена частота допущенных ошибок при детекции ВА. Показано, что основной ошибкой является нарушение алгоритма исследования. На основании данных литературы проведена оценка характера зарегистрированных ошибок определения ВА и представлены соответствующие рекомендации.

Ключевые слова: волчаночный антикоагулянт; лабораторная детекция; характерные ошибки; внешний контроль качества; гемостаз

Для цитирования: Берковский А.Л., Бабкеева Э.Р., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Сапунова И.Д., Каримова И.Н. Предотвращение возможных ошибок лабораторной детекции волчаночного антикоагулянта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 108-111.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-108-111>

EDN: ZSAAHD

Для корреспонденции: Берковский Арон Леонидович, канд. биол. наук, директор НПО Ренам; e-mail: aron_56@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.07.2024

Принята к печати 18.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Berkovsky A.L.¹, Babkeeva E.R.², Sergeeva E.V.¹, Suvorov A.V.¹, Sapunova I.D.², Karimova I.N.²

PREVENTION OF POSSIBLE ERRORS IN LABORATORY DETECTION OF LUPUS ANTICOAGULANT

¹ SPA Renam, Society of Haemophilia Patients, 125212, Moscow, Russia;

² ASNP Centre for External Quality Control of Clinical Laboratory Research, 129090, Moscow, Russia

The aim of the work is to identify the frequency and nature of typical errors in laboratory determination of lupus anticoagulant (LA). An interlaboratory comparative study was carried out according to the programme of the Federal System of External Quality Assessment of Clinical Laboratory Studies. The correctness of testing of control plasmas with different VA content was determined. Possible errors of VA detection were analysed. The frequency of errors in VA detection was determined. It is shown that the main error is the violation of the algorithm of the study. On the basis of the literature data the character of registered VA detection error was assessed and corresponding recommendations were presented.

Key words: lupus anticoagulant; laboratory detection; characteristic errors; external quality control; haemostasis

For citation: Berkovsky A.L., Babkeeva E.R., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Sapunova I.D., Karimova I.N. Prevention of possible errors in laboratory detection of lupus anticoagulant. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 108-111 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-108-111>

EDN: ZSAAHD

For correspondence: Berkovskiy A.L, PhD, director of SPA «Renam»; e-mail: aron_56@mail.ru

Information about authors:

Berkovskiy A.L., <https://orcid.org/0000-0001-8213-1810>;

Babkeeva E.R., <https://orcid.org/0000-0001-5261-1821>;

Sergeeva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-9137-343X>;

Suvorov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2314-8353>;

Sapunova I.D., <https://orcid.org/0000-0002-1105-9804>;

Karinova I.N., <https://orcid.org/0000-0002-7428-0012>.

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

Funding. The study had no sponsor support.

Received 21.07.2024

Accepted 18.10.2024

Published 25.01.2025

Введение. Волчаночный антикоагулянт (ВА) - это группа иммуноглобулинов классов IgG и IgM, *in vitro* ингибирующих зависимость от фосфолипидов коагуляционные реакции, а *in vivo* способных вызывать развитие тромбозов. Выявление наличия ВА является значимым в различных областях медицины и сложной методической задачей [1 - 3]. Гетерогенная природа ВА обуславливает отсутствие «золотого стандарта» диагностического теста. О присутствии ВА свидетельствует пролонгация клоттингового теста, зависимость от фосфолипидов, демонстрация присутствия ингибитора свертывания в методе со смешением плазм и зависимости ингибитора от фосфолипидов [1, 4]. Алгоритм определения ВА основан на последовательном проведении скрининговых и подтверждающих тестов [1, 4, 5]. Для выявления ВА используют реагенты, содержащие разбавленные фосфолипиды (для усиления различия между нормальной и патологической плазмами), и реагенты с высокой концентрацией фосфолипидов (для ослабления антикоагулянтного действия ВА). Основными тестами для выявления ВА являются активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ), метод с применением активатора фактора X, выделенного из яда гадюки Рассела (dilute Russell viper venom time, dRVVT), протромбиновое и каолиновое время [1, 3]. Возможные ошибки лабораторной детекции наличия ВА могут быть связаны с несоблюдением строгих правил проведения клинических лабораторных исследований на различных этапах [1, 3 - 6]. Для всех ВА-тестов правильность результатов обеспечивается внутренним и внешним контролем качества. При внутреннем контроле обязательным является определение ВА в каждой серии ВА-положительных и ВА-отрицательных плазм. Валидация методов определения ВА на уровне внешней оценки качества (ВОК) достигается сравнением собственных данных с консенсусными результатами ВОК, что обеспечивает возможность оценки правильности получаемых в каждой лаборатории результатов. В Российской Федерации межлабораторные сравнительные испытания по ВА проводит Центр внешнего контроля качества Федеральной системы внешней оценки качества (ЦВКК ФСВОК).

Цель работы - определение частоты и характера лабораторных ошибок детекции ВА с помощью лабораторного тестирования контрольных плазм (КП) и анализа соответствующих данных литературы.

Материал и методы. В Центре внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований (ЦВКК) по аттестату аккредитации № RA.RU 430094 было проведено межлабораторное сличительное испытание (МСИ) «Волчаночный антикоагулянт» с использованием разработанной аналитической системы и с учетом требований к образцам контрольных плазм (КП). КП представляли собой лиофилизированную плазму человека с различным содержанием ВА или

без ВА, но с дефицитом факторов свертывания или с их ингибиторами. В 51 лабораторию Российской Федерации и стран СНГ были направлены 12 образцов КП для проведения трех циклов оценки качества (по 4 КП двух уровней: высокий титр ВА (нормализованное отношение >2,0), низкий титр ВА (нормализованное отношение ~ 1,2-1,6), и отсутствие ВА (в одном цикле). В программе МСИ были использованы реагенты различных производителей и КП производства НПО «Ренам» (Москва). Титры ВА в контрольных плазмах были установлены путем сравнения с плазмами, аттестованными против 1-й международной панели референсных плазм, содержащих ВА. Правильность результатов измерений оценивали путем сличения полученных участниками результатов с приписанными значениями, установленными производителем КП. Анализ неудовлетворительных результатов и распределения основных ошибок проводился с использованием программы Microsoft® Excel®. Также проведена оценка аналитических обзорных данных литературы, полученных с помощью программы «Google Академия».

Результаты. Доля результатов, не соответствующих критериям качества МСИ ФСВОК, составила 22,3%. Доли неудовлетворительных результатов выявления ВА в положительных, слабopоложительных и отрицательных КП составили 16,4%, 48,1% и 13,5% соответственно. К основным ошибкам, допущенным участниками при анализе КП, относились: аналитические ошибки, связанные с нарушением алгоритма исследования, неправильное измерение времени свертывания анализируемых плазм, неверные расчеты нормализованного отношения - 65,5% от общего числа выявленных ошибок; ошибки интерпретации результатов исследования - 10,9%; преаналитические ошибки (ошибки идентификации) - 7,3%; постаналитические ошибки, связанные с неверным заполнением формы для результатов - 16,3%. Подавляющее большинство лабораторий, давших ошибочные результаты (94,4%), нарушили алгоритм тестирования ВА. Согласно рекомендациям Международного общества по тромбозам и гемостазу, исследование на наличие/отсутствие ВА в образце следует проводить минимум двумя различными методами [1, 3]. Однако в большинстве случаев это положение лаборатории не выполняли. По данным за 2023 год, наибольшее количество неудовлетворительных результатов было получено при определении ВА в слабopоложительных образцах.

Обсуждение. В настоящее время данные международных систем ВОК свидетельствуют о значительном количестве ложноположительных и ложноотрицательных результатов лабораторного выявления ВА [4, 7, 8]. Для выяснения причин возможных ошибок нами был проведен анализ литературных данных и последних руководств [4, 7] по выявлению ВА. Правильность детекции ВА регламентирована следующими критериями:

удлинение одного или двух клоттинговых методов, зависящих от фосфолипидов; отсутствие коррекции пролонгированного времени свертывания в тесте со смешением испытуемой и нормальной плазм, коррекция удлинения времени свертывания в присутствии высоких концентраций фосфолипидов, а также отсутствие специфических ингибиторов факторов свертывания крови [1, 3, 4, 6]. К наиболее частым ошибкам выявления ВА относятся: неправильное определение времени свертывания нормальной и контрольной плазм, нарушение алгоритма исследований, неправильный расчет нормализованного отношения. Ложные результаты могут быть вызваны анализом плазмы больных, получающих антикоагулянтную терапию [1, 3, 5, 9]. На преаналитическом этапе для обеспечения правильности определения необходимо приготовление бестромбоцитарной плазмы. Заморозка/оттаивание проб вызывает значимое увеличение числа ложноотрицательных результатов и поэтому нежелательна. Наличие гемолиза, липемии и белков острой фазы в испытуемых образцах также искажает результаты коагуляционных методов выявления ВА. В тесте АЧТВ правильная интерпретация полученных результатов может быть искажена вследствие дефицита факторов свертывания, что рекомендуется определять, используя чувствительные и нечувствительные к ВА АЧТВ-реагенты. Увеличенная активность факторов VIII или IX может замаскировать наличие ВА и привести к ложноотрицательному результату [1, 5, 8, 10]. У больных, получающих антикоагулянтную терапию, по существующим рекомендациям детекция ВА должна проводиться через 1-2 недели после прерывания приема антагонистов витамина К и не ранее, чем через 12 часов после последнего введения низкомолекулярного гепарина. Интерпретация полученных результатов должна учитывать прием антикоагулянтных препаратов пациентом. Также с осторожностью следует рассматривать данные лабораторного определения ВА при беременности (рекомендуется повторное тестирование после родов) [3, 4, 7].

На аналитическом этапе обязательным требованием является использование внутреннего контроля качества лабораторного исследования, позволяющего вовремя выявить нарушения работы аналитической системы [1, 5, 8].

Существенное влияние на результаты определения ВА имеет выбор методов тестирования. По рекомендациям ISTH-SSC за 2009 год [11], преимущественно следует применять комбинацию тестов dRVVT и АЧТВ. Выбор dRVVT обусловлен повышенной специфичностью метода, а АЧТВ - чувствительностью. При использовании теста АЧТВ необходимо помнить о большой вариабельности реагентов по чувствительности. В Руководстве К.М.Д. Devreese и соавторов [4] панель рекомендуемых тестов расширена за счет метода протромбинового времени со сниженной активностью тромбопластина. Считают, что ограничение числа используемых тестов уменьшает межлабораторную вариабельность и количество ложноположительных результатов. Необходим также правильный выбор пограничных значений результатов исследования ложноположительных по ВА проб (отрезки отсечения), которые могут быть рекомендованы производителем или установлены в лаборатории с учетом специфич-

ности используемых аналитических систем (реагенты + коагулометр) [1, 4, 5, 10, 11]. В Руководстве от 2020 года [4] изменен срок подтверждения положительного результата на ВА с 6-ти недель (критерий Саппоро) на 12 недель (критерий Сиднея), гарантирующий исключение транзитного положительного результата теста на ВА после инфекции или приема лекарственных средств [4, 6]. Значимым требованием к алгоритму лабораторного выявления ВА является использование «нормализованного отношения», применение которого снижает межлабораторную вариабельность результатов за счет уменьшения различий в применяемых реагентах, инструментах и снижения роли «человеческого фактора» [1, 4, 6].

Заключение. Таким образом, проведенное МСИ и анализ соответствующих рекомендаций позволяет считать необходимыми условиями правильного лабораторного определения ВА жесткое соблюдение алгоритма исследования и обязательный внутрिलाбораторный контроль качества с аттестованными контрольными материалами. К основным требованиям корректного определения ВА относятся: правильный выбор методов выявления ВА; тщательное соблюдение правил преаналитического и аналитического этапа; обязательное участие в ВОК; контроль используемых реагентов и нормальных плазм; учет возможного влияния аналитической системы реагент + коагулометр; установление в каждой лаборатории собственных референсных пограничных значений (может потребовать значительных затрат рабочего времени и реагентов); подтверждение наличия ВА у пациента не менее чем через 12 недель после первого тестирования; проведение дополнительных тестов при получении сомнительных результатов; учет особенностей определения ВА у больных, получающих антикоагулянтную терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keeling D., Mackie I., Moore G., Greer I., Greaves M. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br. J. Haematology*. 2012; 157: 47-58.
2. Galli M., Luciani D., Bertolini G. Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003; 101: 1827-32.
3. Берковский А.Л., Калашникова Л.А., Сергеева Е.И., Суворов А.В., Качалова Н.Д., Васильев С.А. и др. Диагностика волчаночного антикоагулянта. Методическое руководство. М.: Изд-во «Принт»: 2011.
4. Devreese K.M.J., de Groot P.G., de Laat B., Erkan D., Favaloro F.J., Mackie I. et al. Guidance from the scientific and standardization committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International society on thrombosis and haemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18: 2828-39. DOI: 10.1111/jth.15047.
5. Ledford-Kraemer M.R., Moore G.W., Bottenus R., Daniele C., de Groot P.G., Exner T. et al. Laboratory testing for the lupus anticoagulant. Approved guideline. 1st ed. CLSI document H60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
6. Pengo V., Tripodi A., Reber G., Rand J., Ortel T., Galli M. et al. Subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibody of the scientific and standardisation committee of the international society on thrombosis and haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7(10):1737-47.
7. Tripodi A., Cohen H., Devreese K.M.J. Lupus anticoagulant detection in anticoagulated patients. Guidance from the scientific and standardization committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International society on thrombosis and haemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(7): 1569-75.

8. Favaloro E.J., Bonar R., Marsden K. Internal quality control and external quality assurance in testing for antiphospholipid antibodies: part II—lupus anticoagulant. *Semin Thromb. Hemost.* 2012; 38(4): 404-11.
 9. Liestol S., Jacobsen E.M., Wisloff F. Dilute prothrombin time-based lupus ratio test. Integrated LA testing with recombinant tissue thromboplastin. *Thrombosis Research.* 2002; 105: 177–82.
 10. Moore G.W., Savidge G.F. Heterogeneity of Russell's viper venom affects the sensitivity of the dilute Russell's viper venom time to lupus anticoagulants. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 2004; 15: 279–82.
 11. Horowitz G., Altaie S., Boyd J., Ceriotti F., Garg U., Horn P. et al. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: Approved Guideline. 3rd ed. CLSI document C28-A3c. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
-
- REFERENCES
1. Keeling D., Mackie I., Moore G., Greer I., Greaves M. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br. J. haematology*, 2012; 157: 47-58.
 2. Galli M., Luciani D., Bertolini G. Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 2003; 101: 1827–32.
 3. Berkovskij A.L., Kalashnikova L.A., Sergeeva E.I., Suvorov A.V., Kachalova N.D., Vasil'ev S.A. et al. Lupus anticoagulant diagnosis [Diagnostika volchanochnogo antikoagulyanta. Metodicheskoe rukovodstvo]. Moscow: Print; 2011. (in Russian)
 4. Devreese K.M.J., de Groot P.G., de Laat B., Erkan D., Favaloro F.J., Mackie I. et al. Guidance from the scientific and standardization committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International society on thrombosis and haemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18: 2828–39. DOI: 10.1111/jth.15047.
 5. Ledford-Kraemer M.R., Moore G.W., Bottenus R., Daniele C., de Groot P.G., Exner T. et al. Laboratory testing for the lupus anticoagulant. Approved guideline, 1st ed. CLSI document H60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
 6. Pengo V., Tripodi A., Reber G., Rand J., Ortel T., Galli M. et al. Subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibody of the scientific and standardisation committee of the International society on thrombosis and haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7(10):1737-47.
 7. Tripodi A., Cohen H., Devreese K.M.J. Lupus anticoagulant detection in anticoagulated patients. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(7): 1569-75.
 8. Favaloro E.J., Bonar R., Marsden K. Internal quality control and external quality assurance in testing for antiphospholipid antibodies: part II—lupus anticoagulant. *Semin Thromb. Hemost.* 2012; 38(4): 404-11.
 9. Liestol S., Jacobsen E.M., Wisloff F. Dilute prothrombin time-based lupus ratio test. Integrated LA testing with recombinant tissue thromboplastin. *Thrombosis Research.* 2002; 105: 177–82.
 10. Moore G.W., Savidge G.F. Heterogeneity of Russell's viper venom affects the sensitivity of the dilute Russell's viper venom time to lupus anticoagulants. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 2004; 15: 279–82.
 11. Horowitz G., Altaie S., Boyd J., Ceriotti F., Garg U., Horn P. et al. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline. 3rd ed. CLSI document C28-A3c. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Александрова Е. Н., Новиков А. А., Кулакова П. И., Кольцова Е. Н., Савенкова Н. А.,
Волнухин Е. В., Ковшик А. Н., Лукина Г. В.

<https://elibrary.ru/aqusfg>

АНТИТЕЛА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА, ПРИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕМ СПОНДИЛИТЕ

ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», 111123, Москва, Россия

Анкилозирующий спондилит (АС) - хроническое иммуновоспалительное заболевание из группы спондилоартритов, при котором часто наблюдаются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). Аутоантитела и антимикробные антитела применяют в качестве дополнительных неинвазивных диагностических маркеров ВЗК.

Цель исследования – определить уровни и частоту выявления антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС. **Материал и методы.** Исследованы сыворотки 44 здоровых доноров (ЗД) и 51 больных АС: 40 мужчин, 11 женщин в возрасте 44,0 (34,0–49,0) лет с длительностью заболевания 12,0 (5,0–20,0) лет. У 22% больных АС диагностированы ВЗК. Атипичные перинуклеарные антинеитрофильные цитоплазматические антитела (пАНЦА) определяли методом ИРИФ, IgG/IgA антитела к *S. cerevisiae* (ASCA), IgG/IgA антитела (АТ) к гликопротеину 2 (GP2), IgG АТ к катепсину G, лактоферрину, эластазе и бактерицидному белку, повышающему проницаемость (BPI) - с помощью ИФА.

Результаты. Больные АС с ВЗК отличались более высокой сывороточной концентрацией АТ к катепсину G и частотой обнаружения атипичных пАНЦА (36,0%) и АТ к BPI (36,0%), чем пациенты с АС без ВЗК (4,8% и 8,0%) ($p < 0,05$). Относительно здоровых лиц, увеличение концентрации IgG АТ к GP2 наблюдалось при АС без ВЗК ($p < 0,05$), частота выявления атипичных пАНЦА и IgA АТ к GP2 – при АС с ВЗК (36,0% и 27,0% vs 0%, $p < 0,05$). Больные АС без и с ВЗК имели более высокие уровни IgA ASCA, IgA АТ к GP2, АТ к эластазе по сравнению с группой ЗД ($p < 0,05$). АТ к эластазе при АС без ВЗК и АС с ВЗК встречались чаще, чем у ЗД (23,0% и 33,0% vs 0%, $p < 0,05$).

Заключение. Выявление при АС без ВЗК антител, ассоциированных с ВЗК, указывает на сходные механизмы патологической активации иммунного ответа у больных АС и ВЗК и возможность использования данных биомаркеров для прогнозирования развития субклинического воспаления кишечника.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилит; воспалительные заболевания кишечника; антитела к *S. cerevisiae* (ASCA); атипичные перинуклеарные антинеитрофильные цитоплазматические антитела (пАНЦА); антитела к гликопротеину 2 (GP2); антитела к катепсину G, лактоферрину, эластазе, бактерицидному белку, повышающему проницаемость (BPI)

Для цитирования: Александрова Е.Н., Новиков А.А., Кулакова П.И., Кольцова Е.Н., Савенкова Н.А., Волнухин Е.В., Ковшик А.Н., Лукина Г.В. Антитела, ассоциированные с воспалительными заболеваниями кишечника, при анкилозирующем спондилите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 112-118.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-112-118>

EDN: AQU5FG

Для корреспонденции: Александрова Елена Николаевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией клинической иммунологии; e-mail: aleksandrovaen2015@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 07.10.2024

Принята к печати 14.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Kulakova P.I., Koltsova E.N., Savenkova N.A., Volnukhin E.V., Kovschik A.N., Lukina G.V.

ANTIBODIES ASSOCIATED WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES IN ANKYLOSING SPONDYLITIS

A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic immune-inflammatory disease from the group of spondyloarthritis, which is often accompanied by inflammatory bowel disease (IBD). Autoantibodies and antimicrobial antibodies are used as additional non-invasive diagnostic markers of IBD.

Objectives. The aim of the study was to determine the levels and frequency of detection of IBD-associated antibodies in the sera of patients with AS.

Material and methods. The sera of 44 healthy donors (HD) and 51 patients with AS were studied: 40 men, 11 women aged 44.0 (34.0–49.0) years with a disease duration of 12.0 (5.0–20.0) years. IBD was diagnosed in 22% of patients with AS. Atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) were determined by IIF, IgG/IgA antibodies to *S. cerevisiae* (ASCA), IgG/IgA antibodies (AB) to glycoprotein 2 (GP2), IgG AB to cathepsin G, lactoferrin, elastase and bactericidal permeability-increasing protein (BPI) - by ELISA.

Results. Patients with AS with IBD had a higher serum concentration of AB to cathepsin G and the frequency of detection of atypical pANCA (36.0%) and AB to BPI (36.0%) than patients with AS without IBD (4.8% and 8.0%) ($p < 0.05$). In comparison with HD, an increase in the concentration of IgG AT to GP2 was observed in AS without IBD ($p < 0.05$), the frequency of detection of atypical pANCA and IgA AB to GP2 - in AS with IBD (36.0% and 27.0% vs 0%, $p < 0.05$). Patients with AS without and with IBD had higher levels of IgA ASCA, IgA AT to GP2, AT to elastase compared to HD ($p < 0.05$). In AS without IBD and AS with IBD, the occurrence of AB to elastase was higher than for HD (23.0% and 33.0% vs 0%, $p < 0.05$).

Conclusion. The detection of IBD-associated antibodies in AS without IBD indicates similar mechanisms of pathological activation of the immune response in patients with AS and IBD and the possibility of using these biomarkers to predict the development of subclinical intestinal inflammation.

Key words: ankylosing spondylitis; inflammatory bowel diseases; antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA); atypical perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA); antibodies to glycoprotein 2 (GP2); antibodies to cathepsin G, lactoferrin, elastase, bactericidal permeability-increasing protein (BPI)

For citation: Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Kulakova P.I., Koltsova E.N., Savenkova N.A., Volnukhin E.V., Kovschik A.N., Lukina G.V. Antibodies associated with inflammatory bowel diseases in ankylosing spondylitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 112-118 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-112-118>

EDN: AQUFG

For correspondence: Aleksandrova Elena Nikolaevna; Dr. Sci. Med., head of the laboratory of clinical immunology; e-mail: aleksandrovaen2015@yandex.ru

Information about authors:

Aleksandrova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-4074-5907>;

Novikov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2738-2956>;

Kulakova P.I., <https://orcid.org/0000-0003-3747-9644>;

Koltsova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-5202-4878>;

Savenkova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-9677-6334>;

Volnukhin E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6360-4264>;

Kovschik A.N., <https://orcid.org/0000-0002-6608-5460>;

Lukina G.V., <https://orcid.org/0000-0001-7958-5926>.

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 07.10.2024

Accepted 14.10.2024

Published 25.01.2025

Анкилозирующий спондилит (АС) - хроническое иммуновоспалительное заболевание из группы спондилоартритов (СПА), характеризующееся поражением крестцово-подвздошных суставов и/или позвоночника с частым вовлечением в патологический процесс энтезов и периферических суставов. Прогрессирование АС связано с пролиферацией костной ткани, что проявляется ростом синдесмофитов (и/или энтезофитов) и процессом анкилозирования позвоночника и суставов [1]. Распространённость АС составляет 0,2-1,1%. Наряду с поражением опорно-двигательного аппарата, при АС нередко наблюдается патология других органов и систем (воспалительные заболевания кишечника - ВЗК, увеиты, нарушения проводимости сердца, аортит). Наиболее частыми внесуставными проявлениями АС служат ВЗК (болезнь Крона - БК, язвенный колит - ЯК) - иммуноопосредованные болезни пищеварительного тракта неизвестной этиологии, отличающиеся воспалительно-деструктивным поражением стенки кишки и хроническим рецидивирующим течением с развитием системных и внекишечных осложнений [2]. При АС встречаемость ВЗК составляет 6-14%, однако у 50-65% пациентов с АС имеет место субклиническое (гистологически подтверждённое) воспаление кишечника [3, 4]. СПА, включая АС, относятся к наиболее частым внекишечным проявлениям ВЗК и могут предшествовать, сопутствовать или развиваться уже после диагностики ВЗК. По данным мета-анализа, при ВЗК

частота обнаружения АС составляет 3%, но рентгенологические признаки сакроилеита, как симптоматического, так и субклинического, регистрируются у 50% пациентов [4,5]. Общие механизмы иммунопатогенеза АС и ВЗК включают генетические факторы риска (гены *DRB1 0103*, *HLA-B27*, *HLA-B35*, *HLA-B44*, *CARD15/NOD2*, *IL-23R*, *IL-12B*, *STAT3*, *CARD9*); дисрегуляцию микробиома кишечника с миграцией активированных Т-клеток и макрофагов из кишечного эпителия в синовиальную ткань; повышение продукции молекул адгезии (Е-кадгерин, $\alpha E\beta 7$ интегрин), провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α - TNF- α , интерлейкинов - IL-17, IL-23), макрофагального протеина CD₁₆₃, сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 [4, 6-8]. Выделены кандидатные диагностические и прогностические биомаркеры АС, ассоциированного с ВЗК, в том числе, генетические полиморфизмы (HLA-B27, ген аминопептидазы эндоплазматического ретикулума 1 - *ERAP1/rs26653*, гены рецептора IL-23 - *IL-23R*, бета рецептора лимфотоксина - LTBR, рецептора TNF - TNFRSF1A, *CARD15/NOD2*), маркеры воспаления (сывороточный и фекальный кальпротектин), маркеры метаболизма костной и хрящевой ткани (хрящевой гликопротеин-39 - YKL-40), антитела (перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические антитела - пАНЦА, антитела к *Saccharomyces cerevisiae* - ASCA, порообразующему белку OmpC наружной мембраны *Escherichia coli*, бактериальному

флагеллину CBir1, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду - АЦЦП, антитела к модифицированному цитруллинированному виментину - АМЦВ [4]. Значительное внимание исследователей привлекает изучение при АС антител, ассоциированных с ВЗК.

Цель исследования - определить уровни и частоту выявления антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС.

Материал и методы. Исследованы сыворотки 51 пациента с достоверным диагнозом АС (в соответствии с модифицированными Нью-Йоркскими критериями 1984 года) [9]: 40 мужчин, 11 женщин в возрасте 44,0 (34,0-49,0) лет с длительностью заболевания 12,0 (5,0-20,0) лет; высокой активностью болезни (Батский индекс активности АС - BASDAI - 5,3; 4,5-6,4; индекс активности АС с использованием СОЭ - ASDAS СОЭ - 3,6; 3,0-4,4; индекс активности АС с использованием С-реактивного белка - СРБ - ASDAS СРБ - 3,7; 2,8-4,5). Позитивность по HLA-B27 составляла 40%. У 22% больных АС диагностированы ВЗК (БК и ЯК). Больные наблюдались в ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ с 2018 по 2022 год. В контрольную группу вошли 44 здоровых донора (ЗД), сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на исследование.

Атипичные пАНЦА класса IgG определяли методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) на нейтрофилах человека, фиксированных этанолом и формальдегидом с помощью набора реагентов «ImmuGlo COMVI anti-neutrophil cytoplasmic antibody (c+pANCA) IFA Kit» («Immco Diagnostics», США) и визуальной оценки образцов флюоресценции при использовании микроскопа «AXIOSKOP 40» («Zeiss», Германия). Позитивные результаты измерения пАНЦА соответствовали титрам $\geq 1/20$. IgG/IgA ASCA, IgG/IgA антитела (АТ) к гликопротеину 2 (АТ к GP2), антитела к таргетным антигенам атипичных пАНЦА - гранулярным цитоплазматическим белкам нейтрофилов (IgG АТ

к катепсину G, лактоферрину, эластазе, бактерицидно-му белку, повышающему проницаемость - ВР1) исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов реагентов «ASCA IgG/IgA», «Anti-Cathepsin G», «Anti-Lactoferrin», «Anti-Elastase», «Anti-BPI» («ORGENTEC», ФРГ), «Anti-GP2 IgG/IgA» («MEDIPAN», ФРГ) согласно инструкциям фирм-изготовителей на микропланшетном ридере «Sunrise» («Tecan», Австрия). Верхние пределы референсных интервалов (ВПРИ) при определении IgG/IgA ASCA, IgA АТ к GP2, IgG АТ к катепсину G, лактоферрину, эластазе и ВР1 составляли 10,0 ЕД/мл, IgG АТ к GP2 - 15 ЕД/мл.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica 12.0, включая методы параметрического и непараметрического анализа. Результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (ИР) 25-75 перцентилей. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Уровни антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС без ВЗК, АС с ВЗК и у ЗД представлены в табл.1. Как следует из таблицы, больные АС без ВЗК и АС с ВЗК имели более высокие уровни IgA ASCA, IgA aGP2 и IgG антител к эластазе, чем ЗД ($p < 0,05$). Увеличение концентрации IgG АТ к GP2 относительно ЗД наблюдалось только у больных АС без ВЗК ($p < 0,05$). Концентрация IgG АТ к катепсину G выше при АС с ВЗК по сравнению с АС без ВЗК ($p < 0,05$). Достоверных различий в сывороточных уровнях IgG ASCA, IgG АТ к лактоферрину и IgG АТ к ВР1 между больными АС и ЗД не обнаружено ($p > 0,05$).

Частота обнаружения антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС без ВЗК, АС с ВЗК и ЗД представлена в табл. 2, из которой следует, что при АС без ВЗК и АС с ВЗК АТ к эластазе (23,0% и 33,0%) встречались чаще, чем у ЗД (0%) ($p < 0,05$). IgA АТ к GP2 наиболее часто выявлялись среди больных

Таблица 1

Уровни антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС без ВЗК, АС с ВЗК и ЗД (Me, ИР 25-75 перцентилей)

Антитела (ЕД/мл)	Группы обследованных		
	АС без ВЗК	АС с ВЗК	ЗД
IgG ASCA	6,6(4,9-10,8) n=38	8,1(4,3-11,7) n=11	4,4(2,1-8,0) n=14
IgA ASCA	4,5(2,6-6,4)* n=39	4,9(3,7-7,3)** n=11	1,9(0,6-2,6)*** n=16
IgG АТ к GP2	2,1(1,4-6,0)' n=39	2,3(1,4-7,0) n=11	1,3(0,9-3,6)' n=17
IgA АТ к GP2	1,2(0,8-5,5)# n=39	1,2(0,9-11,8)## n=11	0,7(0,6-1,3)#,## n=17
IgG АТ к катепсину G	0,4(0,3-0,6)§,§§ n=38	0,8(0,5-1,0)§§ n=10	0,6(0,6-0,9)§ n=17
IgG АТ к лактоферрину	1,4(1,1-1,7) n=39	2,0(1,1-2,5) n=11	1,8(1,5-2,1) n=17
IgG АТ к эластазе	8,2(5,9-9,9)° n=39	9,1(8,5-10,5)°°° n=9	5,6(4,7-8,3)°°,°°° n=17
IgG АТ к ВР1	4,3(3,2-5,3) n=38	5,7(3,5-23,4) n=11	3,6(3,9-5,3) n=17

Примечание. Достоверность различий в уровнях антител: IgA ASCA (* - $p=0,0008$ между больными АС без ВЗК и ЗД, ** - $p=0,001$ между больными АС с ВЗК и ЗД); IgG АТ к GP2 (' - $p=0,03$ между больными АС без ВЗК и ЗД); IgA АТ к GP2 (# - $p=0,007$ между больными АС без ВЗК и ЗД, ## - $p=0,02$ между больными АС с ВЗК и ЗД); IgG АТ к катепсину G (§ - $p=0,02$ между больными АС без ВЗК и ЗД, §§ - $p=0,02$ между больными АС без ВЗК и АС с ВЗК); IgG АТ к эластазе (° - $p=0,01$ между больными АС без ВЗК и ЗД, °°° - $p=0,003$ между больными АС с ВЗК и ЗД). n – число обследованных больных АС и ЗД.

АС с ВЗК (27,0% vs 0% у ЗД, $p < 0,05$). Больные АС с ВЗК имели более высокую частоту обнаружения атипичных пАНЦА (36,0%) и АТ к ВРІ (36,0%) по сравнению с группой больных АС без ВЗК (4,8% и 8,0%)

и ЗД (0% и 0%), соответственно ($p < 0,05$). Встречаемость IgA/IgG ASCA, IgG АТ к GP2, АТ к катепсину G и лактоферрину при АС с и без ВЗК не отличалась от таковой у ЗД.

Таблица 2

Частота обнаружения антител, ассоциированных с ВЗК, в сыворотках больных АС без ВЗК, АС с ВЗК и ЗД

Антитела	АС без ВЗК; n (%)	АС с ВЗК; n (%)	ЗД; n (%)
Атипичные пАНЦА	2/40 (4,8) [#]	4/11 (36,0) ^{#,##}	0/44 (0) ^{##}
IgG ASCA	11/38 (28,9)	4/11 (36,0)	2/14 (14,0)
IgA ASCA	3/39 (7,7)	2/11 (18,0)	1/16 (6,0)
IgG АТ к GP2	3/39 (7,7)	1/11 (9,0)	0/17 (0)
IgA АТ к GP2	6/39 (16,4)	3/11 (27,0) [*]	0/17 (0) [*]
IgG АТ к катепсину G	0/38 (0)	0/10 (0)	0/17 (0)
IgG АТ к лактоферрину	0/39 (0)	0/11 (0)	0/17 (0)
IgG АТ к эластазе	9/39 (23,0) [*]	3/9 (33,0) ^{**}	0/17 (0) ^{***}
IgG АТ к ВРІ	3/38 (8,0) [§]	4/11 (36,0) ^{§,§§}	0/17 (0) ^{§§}

Примечание. Достоверность различий в частоте обнаружения антител: атипичные пАНЦА ([#] - $p = 0,005$ между больными АС без ВЗК и АС с ВЗК, ^{##} - $p = 0,0001$ между больными АС с ВЗК и ЗД); IgA АТ к GP2 (^{*} - $p = 0,025$ между больными АС с ВЗК и ЗД; IgG АТ к эластазе (^{*} - $p = 0,03$ между больными АС без ВЗК и ЗД, ^{**} - $p = 0,01$ между больными АС с ВЗК и ЗД); IgG АТ к ВРІ ([§] - $p = 0,02$ между больными АС без ВЗК и АС с ВЗК, ^{§§} - $p = 0,008$ между больными АС с ВЗК и ЗД). n – число лиц с положительными результатами определения антител относительно общего количества обследованных больных и ЗД.

Обсуждение. Развитие патологического процесса при ВЗК сопровождается образованием широкого спектра антител к собственным и микробным антигенам [10-14]. Аутоантитела, ассоциированные с ВЗК, включают атипичные пАНЦА, антитела к мембранному GP2 секреторных панкреатических ацинарных клеток (АТ к GP2), бокаловидным клеткам эпителия слизистой оболочки кишечника («goblet cells») (GAB) и гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору. Среди антимикробных антител, специфичных для ВЗК, различают антитела к гликанам - олигосахаридам клеточной стенки патогенных микроорганизмов - (ASCA и др.), порообразующему белку OmpC наружной мембраны *Escherichia coli*, бактериальному флагеллину Cbir1, компоненту I2 *Pseudomonas fluorescens*, антигенам *Mycobacterium avium paratuberculosis* и нематоды *Caenorhabditis elegans*. Антитела не входят в число диагностических критериев БК и ЯК, диагноз которых традиционно ставится на основании комплекса клинических, рентгенологических, эндоскопических, гистологических признаков, однако могут использоваться в качестве полезных дополнительных неинвазивных маркёров для ранней диагностики, оценки клинических фенотипов, активности, прогноза и эффективности терапии данных заболеваний [10,11, 15,16]. Наибольшей информативностью для дифференциальной диагностики ВЗК (БК+ЯК) с другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, имеющими сходные клинические проявления, обладают ASCA (диагностическая чувствительность - ДЧ - 41-45%; диагностическая специфичность - ДС - 91-98%; предсказательная ценность положительных результатов - ПЦПР - 95-100%; предсказательная ценность отрицательных результатов - ПЦПР - 14-29%) [10]. При БК самыми полезными диагностическими маркёрами являются ASCA (ДЧ - 33-72%; ДС - 82-100%; отношение правдоподобия положительных и отрицательных результатов теста - ОППР и ОПОР - 3,3-7,9 и 0,3-0,7) и АТ к GP2 (ДЧ - 30%, ДС - 96%, ОППР - 3,4, ОПОР - 0,8), при ЯК

- атипичные пАНЦА (ДЧ - 50-71%, ДС - 75-98%, ОППР - 2,5-8,3, ОПОР - 0,4-0,5) [10-11, 16].

Результаты изучения антител, ассоциированных с ВЗК при АС немногочисленны и имеют противоречивый характер [4]. По нашим данным, больные АС с ВЗК отличались более высокими показателями концентрации АТ к катепсину G и частоты обнаружения атипичных пАНЦА и АТ к ВРІ в сыворотке крови, чем пациенты с АС без ВЗК. По сравнению с группой ЗД, увеличение концентрации IgG АТ к GP2 наблюдалось у больных АС без ВЗК, а количество положительных результатов определения атипичных пАНЦА и IgA АТ к GP2 - у больных АС с ВЗК. Повышенные сывороточные уровни IgA ASCA, IgA АТ к GP2, АТ к эластазе, встречаемость АТ к эластазе при АС без ВЗК сравнимы с этими показателями при АС с ВЗК. Уровни IgG ASCA, АТ к лактоферрину, АТ к ВРІ, частота обнаружения IgA/IgG ASCA, IgG АТ к GP2, АТ к катепсину G и лактоферрину при АС с и без ВЗК находились в пределах нормальных значений. Сходные с нашими, результаты опубликованы I.E. Hoffman и соавт. [17], не обнаружено достоверных различий в сывороточных уровнях IgA ASCA между двумя группами из 11 больных SpA (6 - АС и 5 - недифференцированным SpA) с ВЗК и 17 больных SpA (12 - АС и 5 - недифференцированным SpA) без ВЗК, у которых концентрация IgA ASCA выше, чем у ЗД и больных ревматоидным артритом. Рядом авторов продемонстрировано увеличение концентрации и частоты выявления IgA ASCA в сыворотках больных АС по сравнению с ЗД [18,19]. Установлено отсутствие статистически значимого повышения уровней и встречаемости IgA/IgG ASCA среди больных АС [20]; идентифицировано увеличение концентрации IgG ASCA [21], но не IgA ASCA при АС относительно больных ВЗК и ЗД. Не обнаружено существенных различий в показателях серопозитивности и медианных значениях концентрации IgA/IgG ASCA, АТ к I2, АТ к OmpC, АТ к Cbir1 и атипичных пАНЦА у 80 больных АС и 80 ЗД, однако при АС достоверно чаще определя-

лись соответствовавшие четвёртому квартилю высокие уровни IgG ASCA (26% vs 13%), IgG+IgA ASCA (27% vs 12%) и АТ к I2 (25% vs 14%) ($p < 0,05$) [22]. Сообщается о нормальных уровнях IgA/IgG ASCA, АТ к I2, АТ к OmpC, АТ к CBir1 в сыворотках больных АС и увеличении концентрации АНЦА, выявляемых методом ИФА [23]. При определении антител, специфичных для ВЗК, в группах больных АС без ВЗК ($n=52$) и АС с ВЗК ($n=26$), пАНЦА, IgA/IgG ASCA и АТ к OmpC выявлялись у 21%, 30% и 19% пациентов с АС без ВЗК, но лишь пАНЦА отличались более высокой частотой обнаружения при АС с БК ($n=11$) (64,0%) по сравнению с АС без ВЗК ($p < 0,05$) [24]. Методом ИФА тестировали IgA/IgG ASCA, АТ к OmpC, АТ к CBir1 и пАНЦА в сыворотках 76 больных АС без ВЗК, 77 больных АС с ВЗК и 48 пациентов с механической болью в спине [25]. IgG ASCA, АТ к OmpC и АТ к CBir1 чаще встречались среди больных АС с ВЗК, чем у больных АС без ВЗК (14% vs 0%, 27% vs 12%, 42% vs 20%, соответственно, $p < 0,05$), в то время как частота выявления пАНЦА достоверно не различалась в обеих группах. По сравнению с контрольной группой, при АС без ВЗК чаще регистрировались АТ к CBir1 и пАНЦА, а при АС с ВЗК - IgA ASCA, АТ к OmpC, АТ к CBir1 и пАНЦА. Медиана концентрации АТ к OmpC в сыворотках больных АС с ВЗК превышала таковую у больных АС без ВЗК и пациентов с механической болью в спине, а при АС без ВЗК не отличалась от контрольной группы. Уровни АТ к CBir1 и пАНЦА у больных АС с ВЗК и без ВЗК не различались между собой и повышены по сравнению с контрольной группой.

АНЦА - гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с ферментами цитоплазмы нейтрофилов. В зависимости от типа свечения в НРИФ на фиксированных этанолом нейтрофилах человека различают две основные разновидности АНЦА - цитоплазматические (ц) АНЦА и перинуклеарные (п) АНЦА. Обнаружение цАНЦА и пАНЦА в сыворотках крови наиболее характерно для системных некротизирующих васкулитов сосудов среднего и мелкого калибра (АНЦА-ассоциированных системных васкулитов) [26]. цАНЦА дают диффузный цитоплазматический гранулярный тип свечения с большей интенсивностью по направлению к ядру нейтрофилов, чем к периферии, взаимодействуют с протеиназой 3 и являются высокоспецифичным диагностическим маркёром гранулематоза с полиангиитом. пАНЦА характеризуются гомогенным свечением цитоплазмы по периферии ядра нейтрофилов, реагируют с миелопероксидазой и служат полезным диагностическим маркёром микроскопического полиангиита и эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (синдрома Черджа-Стросс). При ВЗК и аутоиммунных заболеваниях печени выявляют преимущественно атипичные пАНЦА, которые идентифицируются с помощью НРИФ на фиксированных этанолом нейтрофилах в виде линейного свечения по периферии ядра или диффузного неоднородного свечения перинуклеарной цитоплазмы нейтрофилов или гомогенного диффузного цитоплазматического свечения. В НРИФ на нейтрофилах, фиксированных формальдегидом, атипичные пАНЦА характеризуются перинуклеарным свечением или отсутствием свечения [11, 26-28]. Специфичными антигенами для атипичных пАНЦА служат различные

ядерные и цитоплазматические белки нейтрофилов (нуклеопорин β -тубулин 5, гистоновый белок H1, негистоновые белки хроматина HMG-1,2, катепсин G, эластаза, ВР1, лактоферрин, лизоцим, β -глюкуронидаза, α -энолаза, каталаза). Наиболее высокая частота обнаружения атипичных пАНЦА регистрируется при ЯК (24-85%), первичном склерозирующем холангите (ПСХ) (26-94%), аутоиммунном гепатите (АИГ) (20-96%); у пациентов с БК данные антитела встречаются значительно реже (в 2-38% случаев) [11-13, 29-31]. С помощью НРИФ атипичные пАНЦА чаще выявлялись нами в сыворотках больных АС с ВЗК (36,0%), чем у больных АС без ВЗК (4,8%) и ЗД (0%) ($p < 0,05$), при этом в группе больных АС без ВЗК частота определения данных антител не отличалась от таковой среди ЗД ($p > 0,05$), что подтверждается результатами других авторов [22, 24]. При использовании ИФА, значения концентрации и частоты обнаружения совокупности антител, реагирующих с целевыми антигенами пАНЦА, не различались между группами больных АС с ВЗК и АС без ВЗК и повышены относительно ЗД и пациентов с механической болью в спине [23, 25]. Среди аутоантител, направленных к антигенам атипичных пАНЦА, наибольшее клиническое значение для диагностики, оценки активности и таргетной терапии ВЗК имеют антитела к катепсину G, лактоферрину, эластазе и ВР1 [31]. АТ к катепсину G выявляются у больных ЯК (0-41%), БК (40%), ПСХ (37%), первичным билиарным холангитом (ПБХ) (4%), реактивным артритом (РеА) (2%), ревматоидным артритом (РА) (13%) [31-36]. Встречаемость АТ к лактоферрину при БК составляет 13-15%, ЯК - 5-8%, ПСХ - 22-50%, АИГ - 20%, ПБХ - 7-23%, АС - 7%, РеА - 20-42%, РА - 7% [31-33, 37-39]. Повышенные уровни АТ к эластазе у больных ЯК определяются с частотой 0-26%, ПСХ - 18%, ПБХ - 15%, РеА - 2% РА - 0% [31-33]. АТ к ВР1 присутствуют в сыворотках больных ЯК (20-37%), БК (14-23%), ПСХ (26-36%), ПБХ (20%), РеА (8%), РА (3%) [31-33, 40]. В доступной литературе отсутствуют результаты подробного изучения антител к катепсину G, лактоферрину, эластазе и ВР1 при АС с и без ВЗК. По нашим данным, большие АС с ВЗК, наряду с увеличением частоты обнаружения атипичных пАНЦА, имеют более высокую концентрацию АТ к катепсину G и встречаемость АТ к ВР1 в сыворотке крови, чем пациенты с АС без ВЗК. Повышение уровней и частоты выявления АТ к эластазе при АС с ВЗК сравнимы с таковыми при АС без ВЗК. Уровни АТ к лактоферрину, АТ к ВР1, частота обнаружения АТ к катепсину G и лактоферрину при АС с ВЗК и АС без ВЗК не отличались от данных показателей у ЗД.

Помимо IgG/IgA ASCA, к специфическим маркёрам БК относятся IgG/IgA АТ к GP2. Частота обнаружения IgG/IgA АТ к GP2 в сыворотках больных БК варьирует от 21 до 45%, ЯК - от 2 до 19% [11]. Нами показано увеличение сывороточной концентрации IgA АТ к GP2 при АС с ВЗК и АС без ВЗК по сравнению с ЗД, однако повышение частоты положительных результатов определения IgA АТ к GP2 наблюдалось только у больных АС с ВЗК. Частота обнаружения IgG АТ к GP2 в группах больных АС с ВЗК и АС без ВЗК сравнима с данным показателем среди ЗД, вместе с тем, при АС без ВЗК отмечался более высокий уровень IgG АТ к GP2, чем у ЗД. В работах других авторов исследование IgG/

IgA AT к GP2 при AC не проводилось.

Противоречивость результатов изучения антител, специфичных для ВЗК, в группах больных AC без ВЗК и AC с ВЗК, обусловленная различиями в подборе групп пациентов, уровнях серопозитивности антител и методов их определения, не позволяет применять указанные биомаркеры для дифференциальной диагностики данных патологических состояний. Согласно нашим и зарубежным исследованиям, выявление при AC без признаков ВЗК широкого спектра антител, ассоциированных с ВЗК (IgA/IgG ASCA, атипичных пАНЦА, AT к эластазе, AT к лактоферрину, IgA/IgG AT к GP2, AT к CBir1, AT к I2, AT к OmpC), свидетельствует о сходных механизмах aberrантной активации иммунной системы у больных AC и ВЗК и возможности использования данных биомаркеров в качестве потенциальных предикторов воспалительной патологии кишечника на доклинической стадии.

Заключение. Больные AC с ВЗК отличаются более высокой концентрацией AT к катепсину G и частотой обнаружения атипичных пАНЦА (36,0%) и AT к VP1 (36,0%) в сыворотке крови, чем пациенты с AC без ВЗК (4,8% и 8,0%) ($p < 0,05$). Относительно ЗД, увеличение концентрации IgG AT к GP2 наблюдается при AC без ВЗК ($p < 0,05$), частоты выявления атипичных пАНЦА и IgA AT к GP2 - при AC с ВЗК (36,0% и 27,0% vs 0%, $p < 0,05$). Больные AC без ВЗК и AC с ВЗК имеют более высокие уровни IgA ASCA, IgA AT к GP2, AT к эластазе по сравнению с ЗД ($p < 0,05$). AT к эластазе при AC без ВЗК и AC с ВЗК встречаются чаще, чем у ЗД (23,0% и 33,0% vs 0%, $p < 0,05$). Выявление при AC без ВЗК антител, ассоциированных с ВЗК (IgA ASCA, IgA/IgG AT к GP2, AT к эластазе), указывает на сходные механизмы патологической активации иммунного ответа у больных AC и ВЗК, а также возможность использования данных биомаркеров для прогнозирования развития субклинического воспаления кишечника.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 2–10, 12–25, 27–40 СМ. REFERENCES)

1. Эрдес Ш.Ф. Анкилозирующий спондилит. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Российские клинические рекомендации. Ревматология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019: 58-86.
11. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Лукина Г.В., Парфенов А.И. Клиническое значение антител при воспалительных заболеваниях кишечника. *Терапевтический архив*. 2021; 93 (2): 103–10. DOI: 10.26442/00403660.2021.02.200610.
26. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Российские клинические рекомендации. Ревматология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019: 302-20.
1. Erdes Sh.F. Ankylosing spondylitis. In: Nasonov E.L., ed. *Russian Clinical Guidelines. Rheumatology*. [Rossiyskie Klinicheskie Rekomendatsii. Revmatologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2019: 58-86. (in Russian)
2. Harbord M., Annesse V., Vavricka S.R., Allez M., Barreiro-de Acosta M., Boberg K.M. et al.; European Crohn's and Colitis Organisation. The first European evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *J. Crohns. Colitis*. 2016; 10(3):239-54. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjv213.
3. Stolwijk C., van Tubergen A., Castillo-Ortiz J.D., Boonen A. Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis*. 2015; 74(1):65-73. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203582.
4. Benfaremo D., Luchetti M.M., Gabrielli A. Biomarkers in inflammatory bowel disease-associated spondyloarthritis: state of the art and unmet needs. *J. Immunol. Res*. 2019; 2019:8630871. DOI: 10.1155/2019/8630871.
5. Karreman M.C., Luime J.J., Hazes J.M.W., Weel A.E.A.M. The prevalence and incidence of axial and peripheral spondyloarthritis in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Crohns. Colitis*. 2017; 11(5):631-42. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw199.
6. Fragoulis G.E., Liava C., Daoussis D., Akriviadis E., Garyfallos A., Dimitroulas T. Inflammatory bowel diseases and spondyloarthropathies: from pathogenesis to treatment. *World J. Gastroenterol*. 2019; 25(18):2162-76. DOI: 10.3748/wjg.v25.i18.2162.
7. Luchetti M.M., Ciccio F., Avellini C., Benfaremo D., Rizzo A., Spadoni T. et al. Gut epithelial impairment, microbial translocation and immune system activation in inflammatory bowel disease-associated spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2021; 60(1):92-102. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa164.
8. Alizadeh M., Wong U., Siaton B.C., Patil S.A., George L., Raufman J.P. et al. ExpLORing the role of the intestinal Microbiome in Inflammatory bowel disease-Associated Spondyloarthritis (LOCATION-IBD). *Heliyon*. 2024; 10(4):e26571. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e26571.
9. van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984; 27(4):361-8. DOI: 10.1002/art.1780270401.
10. Prideaux L., De Cruz P., Ng S.C., Kamm M.A. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm. Bowel Dis*. 2012; 18(7):1340-55. DOI: 10.1002/ibd.21903.
11. Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Lukina G.V., Parfenov A.I. Clinical value of antibodies in inflammatory bowel diseases. *Terapevticheskiy Arkhiv*. 2021; 93 (2): 103–10. DOI: 10.26442/00403660.2021.02.200610. (in Russian)
12. Mitsuyama K., Niwa M., Takedatsu H., Yamasaki H., Kuwaki K., Yoshioka S. et al. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*. 2016; 22(3):1304-10. DOI: 10.3748/wjg.v22.i3.1304.
13. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin. Chem*. 2006; 52(2):171-81. DOI:10.1373/clinchem.2005.058560.
14. Kuna A.T. Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2013; 23(1):28-42. DOI: 10.11613/bm.2013.006.
15. Arai R. Serologic markers: impact on early diagnosis and disease stratification in inflammatory bowel disease. *Postgrad Med*. 2010; 122(4):177-85. DOI: 10.3810/pgm.2010.07.2184.
16. Bonneau J., Dumestre-Perard C., Rinaudo-Gaujous M., Genin C., Sparrow M., Roblin X., Paul S. Systematic review: new serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes. *Autoimmun. Rev*. 2015; 14(3):231-45. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.11.004.
17. Hoffman I.E., Demetter P., Peeters M., De Vos M., Mielants H., Veys E.M., De Keyser F. Anti-saccharomyces cerevisiae IgA antibodies are raised in ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthropathy. *Ann. Rheum. Dis*. 2003; 62(5):455-9. DOI: 10.1136/ard.62.5.455.
18. Török H.P., Glas J., Gruber R., Brumberger V., Strasser C., Kellner H. et al. Inflammatory bowel disease-specific autoantibodies in HLA-B27-associated spondyloarthropathies: increased prevalence of ASCA and pANCA. *Digestion*. 2004; 70(1):49-54. DOI: 10.1159/000080081.
19. Aydin S.Z., Atagunduz P., Temel M., Bicakcigil M., Tasan D., Dir-eskeneli H. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in spondyloarthropathies: a reassessment. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47(2):142-4. DOI: 10.1093/rheumatology/kem324.
20. Riente L., Chimenti D., Pratesi F., Delle Sedie A., Tommasi S., Tommasi C. et al. Antibodies to tissue transglutaminase and Saccharomyces cerevisiae in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *J. Rheumatol*. 2004; 31(5):920-4.
21. Romero-Sánchez C., Bautista-Molano W., Parra V., De Avila J., Rueda J.C., Bello-Gualtero J.M. et al. Gastrointestinal symptoms and elevated levels of anti-saccharomyces cerevisiae antibodies are associated with higher disease activity in Colombian patients with spondyloarthritis. *Int. J. Rheumatol*. 2017; 2017:4029584. DOI: 10.1155/2017/4029584.
22. Mundwiler M.L., Mei L., Landers C.J., Reveille J.D., Targan S., Weisman M.H. Inflammatory bowel disease serologies in ankylosing spon-

- dylitis patients: a pilot study. *Arthritis Res. Ther.* 2009; 11(6):R177. DOI: 10.1186/ar2866.
23. Matzkies F.G., Targan S.R., Berel D., Landers C.J., Reveille J.D., McGovern D.P., Weisman M.H. Markers of intestinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *Arthritis Res. Ther.* 2012; 14(6):R261. DOI: 10.1186/ar4106.
24. De Vries M., van der Horst-Bruinsma I., van Hoogstraten I., van Bodegraven A., von Blomberg B.M., Ratnawati H., Dijkmans B. pANCA, ASCA, and OmpC antibodies in patients with ankylosing spondylitis without inflammatory bowel disease. *J. Rheumatol.* 2010; 37(11):2340-4. DOI: 10.3899/jrheum.100269.
25. Wallis D., Asaduzzaman A., Weisman M., Haroon N., Anton A., McGovern D. et al. Elevated serum anti-flagellin antibodies implicate sub-clinical bowel inflammation in ankylosing spondylitis: an observational study. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15(5):R166. DOI: 10.1186/ar4350.
26. Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases. In: Nasonov E.L., ed. *Russian Clinical Guidelines. Rheumatology*. [Rossiyskie Klinicheskie Rekomendatsii. Revmatologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2019: 302-20. (in Russian)
27. Mukhtyar C., Flossmann O., Hellmich B., Bacon P., Cid M., Cohen-Tervaert J.W. et al. European Vasculitis Study Group (EUVAS). Outcomes from studies of antineutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis: a systematic review by the European League Against Rheumatism systemic vasculitis task force. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67:1004-10. DOI: 10.1136/ard.2007.071936.
28. Savige J., Gillis D., Benson E., Davies D., Esnault V., Falk R.J. et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 1999; 111(4):507-13. DOI: 10.1093/ajcp/111.4.507.
29. Terziroli Beretta-Piccoli B., Mieli-Vergani G., Vergani D. Autoimmune hepatitis: serum autoantibodies in clinical practice. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2022; 63(2):124-37. DOI: 10.1007/s12016-021-08888-9.
30. Tornai D., Ven P.L., Lakatos P.L., Papp M. Serological biomarkers for management of primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol.* 2022; 28(21):2291-2301. DOI: 10.3748/wjg.v28.i21.2291.
31. Kyriakidi K.S., Tsianos V.E., Karvounis E., Christodoulou D.K., Katsanos K.H., Tsianos E.V. Neutrophil anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody proteins: bactericidal increasing protein, lactoferrin, cathepsin, and elastase as serological markers of inflammatory bowel and other diseases. *Ann. Gastroenterol.* 2016; 29(3):258-67. DOI: 10.20524/aog.2016.0028.
32. Locht H., Skogh T., Wiik A. Characterisation of autoantibodies to neutrophil granule constituents among patients with reactive arthritis, rheumatoid arthritis, and ulcerative colitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2000; 59(11):898-903. DOI: 10.1136/ard.59.11.898.
33. Lindgren S., Nilsson S., Nässberger L., Verbaan H., Wieslander J. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. Swedish Internal Medicine Liver Club (SILK). *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15(4):437-42. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.02078.x. PMID: 10824890.
34. Bahari A., Aarabi M., Hedayati M., Jarollahi A., Firouzi F., Aghazadeh R. et al. Target antigens for perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in Iranian patients with ulcerative colitis. *Middle East J. Dig. Dis.* 2014; 6(4):203-7.
35. Mayet W.J., Hermann E., Finsterwalder J., Rieder H., Poralla T., Meyer Zum Büschenfelde K.H. Antibodies to cathepsin G in Crohn's disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992; 22(6):427-33. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1992.tb01485.x.
36. Kuwana T., Sato Y., Saka M., Kondo Y., Miyata M., Obara K. et al. Anti-cathepsin G antibodies in the sera of patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* 2000; 35(9):682-9. DOI: 10.1007/s005350070047.
37. Locht H., Skogh T., Kihlström E. Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 117(3):568-73. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.01008.x.
38. Peen E., Almer S., Bodemar G., Rydén B.O., Sjölin C., Tejle K., Skogh T. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 1993; 34(1):56-62. DOI: 10.1136/gut.34.1.56.
39. Roozendaal C., de Jong M.A., van den Berg A.P., van Wijk R.T., Limburg P.C., Kallenberg C.G. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J. Hepatol.* 2000; 32(5):734-41. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)80241-x.
40. Walmsley R.S., Zhao M.H., Hamilton M.I., Brownlee A., Chapman P., Pounder R.E. et al. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1997; 40(1):105-9. DOI: 10.1136/gut.40.1.105.

L-карнитин

*популярный спортивный жиросжигатель,
для похудения*

- Усиливает сжигание жиров;
- Улучшает жировой обмен и транспорт жирных кислот;
- Улучшает обмен веществ, нормализует деятельность сердечно-сосудистой системы;
- Повышает физическую выносливость и сокращает период восстановления у спортсменов.



Покупайте на маркетплейсах

АО «ЭКОлаб»

142530, Московская обл., г.о. Павлово-Посадский, г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
ИНН 5035025076, ОГРН 1035007106958



БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

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

ЭКОЛАБ
красота и здоровье

РЕКЛАМА

ИНТИМ ЭКО

СПРЕЙ
ДЛЯ ИНТИМНОГО
УХОДА



покупайте
на маркетплейсах

Гигиена
интимных
зон в любом
возрасте

АО "ЭКОЛАБ"
142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1
ИНН 5035025076 ОГРН 1035007106958

ЭКОЛАБ
красота и здоровье

КАШЕЛОТИК

**СИРОП
ДЛЯ ДЕТЕЙ С 3-Х ЛЕТ И ВЗРОСЛЫХ**



Покупайте
на маркетплейсах

**СНИЖАЕТ ВЯЗКОСТЬ
МОКРОТЫ**

**ОБЛАДАЕТ
ОБВОЛАКИВАЮЩИМ
ЭФФЕКТОМ**

**СПОСОБСТВУЕТ
УМЕНЬШЕНИЮ
РАЗДРАЖЕНИЯ КАШЛЕВЫХ
РЕЦЕПТОРОВ**



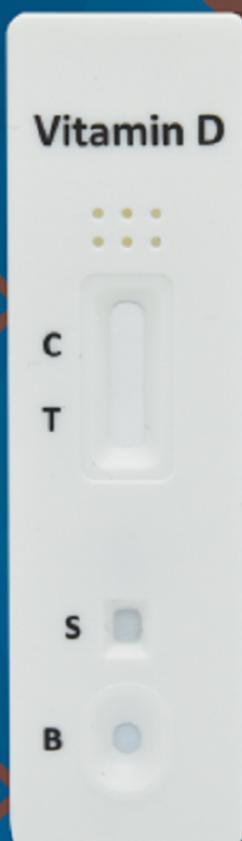
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ.



ЭКОлаб

НОВИНКА

**ПРОВЕРЬ
СКОЛЬКО СОЛНЦА
У ТЕБЯ ВНУТРИ?**



УЗНАЙ
СВОЙ
УРОВЕНЬ
ВИТАМИНА Д,
НЕ ВЫХОДЯ
ИЗ ДОМА



БЫСТРО



ЭКОНОМИЧНО



УДОБНО

www.ekolab.ru

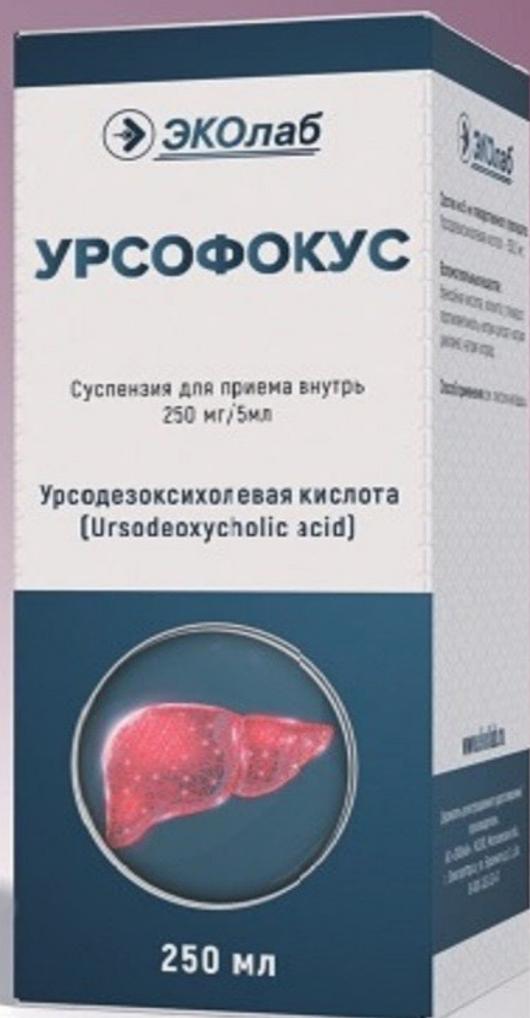


РЕКЛАМА

Для профилактики и лечения заболеваний печени и желчного пузыря

УРСОФОКУС от ЭКОлаб

для детей и взрослых в удобной питьевой форме



*Гепатопротекторное
средство*



Урсодезоксихолевая кислота в суспензии



Уменьшает синтез холестерина в печени



Способствует растворению холестериновых камней в желчном пузыре



Стимулирует образование и выделение желчи

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ
ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОКОНСУЛЬТИРУЙТЕСЬ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Черепович Б.С.¹, Кудряшова А.М.¹, Мануйлов В.А.², Свитич О.А.¹, Борисова О.В.¹

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ, БЛОКИРУЮЩИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ RBD SARS-COV-2 И ACE₂



https://elibrary.ru/fsetbk

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия

Цель: изучение функциональных характеристик иммуноферментного анализа (ИФА) определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ (суррогатный вируснейтрализующий анализ, sVNT).

Материал и методы. Исследовали 374 образца сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 гг., 97 образцов, полученных в 2021 году от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Образцы сывороток крови анализировали: 1) ИФА определения антител класса IgG к RBD SARS-CoV-2; 2) в реакции биологической нейтрализации вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток; 3) в суррогатном вируснейтрализующем тесте.

Результаты Параметры sVNT анализа оптимизированы на двух выборках из 397 (2017-2020 гг.) и 97 (2021 г.) образцов добровольцев. При валидации метода оценка порогового значения, позволяющая дифференцировать образцы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, от не содержащих антител, определялась двумя статистическими методами. ROC-методом раздельно проанализированы образцы сывороток крови добровольцев с постинфекционным и гибридным иммунитетом. Во всех случаях получены близкие (31,45-31,65%) пороговые значения и высокие диагностические характеристики. Аналитическая чувствительность, определённая путём титрования международного стандартного образца First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) в sVNT, составила 20-22 ВАУ/мл. При изучении корреляционной связи между результатами sVNT и количеством IgG антител к RBD SARS-CoV-2 коэффициент Спирмена составил 0,8979 (ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p < 0,001$). При определении процентной согласованности результатов, полученных в sVNT с титром нейтрализующих антител, полученным в вирусологической реакции нейтрализации, коэффициент Спирмена составил 0,8187 (ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p < 0,001$).

Заключение. Ключевую роль во взаимодействии вируса с клеткой человека в процессе инфицирования последней играет образование распознающего комплекса между рецептор-связывающим доменом, расположенным на субъединице S1 белка Spike SARS-CoV-2 и трансмембранным белком человека, ангиотензин-превращающим ферментом 2 типа. Поэтому иммунологические средства определения антител, специфически блокирующие взаимодействие между RBD и ACE₂, могут служить адекватной альтернативой РБН для определения протективности приобретённого гуморального иммунитета. Был разработан sVNT метод, позволяющий выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, простым, безопасным и быстрым способом с высокой специфичностью и чувствительностью.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; суррогатный вируснейтрализующий анализ; RBD; SARS-CoV-2; ACE₂; реакция биологической нейтрализации; вируснейтрализующие антитела

Для цитирования: Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Мануйлов В.А., Свитич О.А., Борисова О.В. Разработка и оценка диагностических характеристик иммуноферментного метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 и ACE₂. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (2): 119-125.

DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-119-125

EDN: FSETBK

Для корреспонденции: Черепович Богдан Сергеевич, мл. науч. сотр. лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов; e-mail: bogdancherpevovich@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.10.2024

Принята к печати 22.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Cherpevich B.S.¹, Kudryashova A.M.¹, Manuilov V.A.², Svitich O.A.¹, Borisova O.V.¹

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF ANTIBODIES BLOCKING THE INTERACTION OF RBD SARS-COV-2 AND ACE₂

¹I. Mechnikov research institute of vaccines and sera, 115088, Moscow, Russia;

²N. Gamaleya research center of epidemiology and microbiology, 123098, Moscow, Russia

The purpose of this work was to study the functional characteristics of an enzyme immunoassay for the determination of antibodies blocking the interaction of RBD and ACE₂ (surrogate virus neutralizing analysis, sVNT).

Material and methods. 374 blood serum samples obtained from volunteers with a known medical history in 2017-2020, 97 samples obtained in 2021 from patients who had been ill and immunized with the vaccine drug «Gam-COVID-Vac». Blood serum samples were analyzed: 1) enzyme immunoassay for the determination of antibodies of class G to RBD SARS-CoV-2, 2) in the neutralization reaction of the SARS-CoV-2 virus in cell culture 3) in a surrogate virus neutralizing test.

Results. The sVNT analysis parameters were optimized on 2 samples from 397 (2017-2020) and 97 (2021) samples of volunteers. During the validation of the method, the threshold value estimation, which makes it possible to differentiate samples containing antibodies blocking the interaction of RBD and ACE2 from those not containing them, was determined by two statistical methods. Blood serum samples from volunteers with postinfectious and hybrid immunity were analyzed separately using the ROC method. In all cases, close (31.45-31.65%) threshold values and high diagnostic characteristics were obtained. The analytical sensitivity determined by titration of the international standard sample First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) in sVNT was 20-22 BAU/ml. When studying the correlation between sVNT results and the amount of IgG antibodies to RBD SARS-CoV-2, the Spearman coefficient was 0.8979 (95% CI: 0.8425-0.9345, $p < 0.001$). When determining the percentage consistency of the results obtained in sVNT with the titer of neutralizing antibodies obtained in the virological neutralization reaction, the Spearman coefficient was 0.8187 (95% CI: 0.7641-0.8616, $p < 0.001$).

Conclusion. A critical aspect in the interaction between the virus and human cells during infection is the formation of a recognition complex between the receptor-binding domain located on the S1 subunit of the SARS-CoV-2 Spike protein and the human angiotensin-converting enzyme 2 transmembrane protein. Therefore, immunological tools for antibody detection that specifically block the interaction between RBD and ACE2 could serve as an adequate substitute for virus neutralization reaction in determining the protective capacity of acquired humoral immunity.

The sVNT method has been developed, which allows the detection of antibodies blocking the interaction of RBD and ACE2 in a simple, safe and fast way with high specificity and sensitivity.

Key words: enzyme immunoassay; surrogate virus neutralizing analysis; RBD; SARS-CoV-2; ACE 2; virus neutralization reaction; neutralizing antibodies

For citation: Cherepovich B.S., Kudryashova A.M., Manuilov V.A., Svitich O.A., Borisova O.V. Development and evaluation of diagnostic characteristics of an enzyme immunoassay for the determination of antibodies blocking the interaction of RBD SARS-CoV-2 and ACE₂. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 119-125 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-119-125>
EDN: FSETBK

For correspondence: Cherepovich Bogdan Sergeevich, junior researcher at the laboratory of genetics of RNA-containing viruses; e-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Information about authors:

Cherepovich B.S., <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>;
Kudryashova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-0637-9184>;
Manuilov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-2296-6151>;
Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;
Borisova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.10.2024

Accepted 22.10.2024

Published 25.01.2025

Введение. Титр вируснейтрализующих антител (nAbs), определённый в реакции биологической нейтрализации (РБН), является основным серологическим параметром, используемым для оценки эффективности иммунизации. РБН проводится на культуре клеток, является трудоёмкой и требует специальных условий биобезопасности [1].

Ключевую роль во взаимодействии вируса с клеткой человека в процессе инфицирования последней играет образование распознающего комплекса между рецептор-связывающим доменом (RBD, receptor-binding domain), расположенным на субъединице S₁ белка Spike SARS-CoV-2 и трансмембранным белком человека, ангиотензин-превращающим ферментом 2 типа (ACE₂, angiotensin-converting enzyme 2) [2,3]. Если такой комплекс не сформировался, клетка не будет инфицирована [4,5]. Поэтому лишь те иммунологические средства определения антител, специфически блокирующие взаимодействие между RBD и ACE₂, служат адекватной альтернативой РБН для определения протективности приобретённого гуморального иммунитета [6,7].

Не все антитела к RBD обладают вируснейтрализующей способностью. Не все сыворотки, содержащие IgG антитела к RBD, обладают вируснейтрализующим действием [8-10]. Показано, что из 109 моноклональных антител, сконструированных к уникальным эпитопам субъ-

единицы S₁ белка Spike (включает RBD), только три обладали вируснейтрализующим воздействием *in vitro* [11]. Это совершенно закономерный результат, если учесть, что область RBD, ответственная за связывание с ACE₂, невелика относительно всего домена, поэтому антитело к эпитопу вне этой области неспособно препятствовать образованию распознающего инфекционного комплекса.

Имуноферментный анализ (ИФА), определяющий только антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, может служить альтернативной РБН при оценке эффективности вакцинации.

Цель работы: изучение функциональных характеристик метода ИФА определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ (суррогатный вируснейтрализующий тест, sVNT).

Материал и методы. В работе применялись реактивы: ТМБ, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Для приготовления растворов использована деионизованная вода (Milli-Q System, Millipore, США). Для ИФА использовали 96-луночные планшеты (Costar, США). Для валидации результатов, полученных с использованием разработанного sVNT метода, использовали РБН в культуре клеток, и коммерческие наборы реагентов:

Набор реагентов для качественного ИФА определения антител класса IgG к коронавирусу «SARS-CoV-

2-ИФА-IgG» по ТУ 21.20.23-004-28597318-2020, РЗН 2020/12585. («МедипалТех», Россия).

Набор реагентов для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 иммунохемилюминесцентным методом в сыворотке и плазме крови человека на иммунохимических анализаторах ARCHITECT «SARS-CoV-2 IgG II Количественный Реагенты для ARCHITECT (SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit)», РУ РЗН 2021/13866, («Abbott», Ирландия).

В работе использовали следующие иммунореагенты: рекомбинантные антигены Spike Protein(mFc Tag) HPR, («Vazyme», Китай), рекомбинантный ангиотензин-превращающий фермент 2 («Cusabio», США), в качестве стандартного образца, охарактеризованного по титру nAbs, использован международный стандарт ВОЗ – First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) (NIBSC code: 20/136, Dated 17/12/2020) [12].

Исследовали выборки сывороток крови пациентов: 374 образцов сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 годах и 97 образцов, полученных в 2021 году от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак».

Методика постановки РБН и оценка результатов производилась аналогичным способом, описанным в работе Б.С. Череповича и соавторов [7].

ИФА метод определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂. При проведении ИФА в лунки планшета вносили по 50 мкл образцов исследуемой сыворотки в разведении 1:10 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, и 50 мкл рекомбинантного Spike, конъюгированного с пероксидазой хрена в том же буферном растворе в разведении 1:150. После инкубирования в течение 30 мин при 37 °С смесь переносили в лунки планшета с иммобилизованным рекомбинантным ACE₂ и инкубировали 30 мин при 37 °С. После инкубирования и отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Для каждого образца рассчитывали коэффициент подавления (КП, %) по формуле:

$$КП = \frac{(ОП_{ср.(К-)} - ОП_{обр.})}{(ОП_{ср.(К-)})} \cdot 100\%$$

где: ОП_{ср.(К-)} – среднее арифметическое значение ОП для группы неиммунных лиц;

ОП_{обр.} – значение ОП для тестируемого образца.

Образец считается содержащим антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, если КП ≥ 30%.

Для более точной интерпретации образцов с одинаково высокими показателями КП, введён количественный параметр – титр sVNT, соответствующий последнему разведению исследуемого образца при КП > 30%.

Статистическая обработка. Образцы анализировали в двух повторях, и для расчётов использованы средние арифметические значения. Оценка граничного значения КП, позволяющая дифференцировать образ-

цы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂ от не содержащих, определена двумя методами.

В первом методе пороговое значение определялось как КП_{порог}, рассчитываемое для ОП = ОП_{срКП} - 3σ, где:

ОП_{срКП} – среднее значение оптической плотности «отрицательных» образцов;

σ – среднее квадратическое отклонение.

Оценку доверительных интервалов для частот осуществляли методом Уилсона (Wilson E.B.) [13].

Пороговое значение и диагностические характеристики метода определены с помощью ROC-анализа путём построения ROC-зависимости (Receiver Operator Characteristic) для результатов анализа крови выборки, иммунных и неиммунных в отношении SARS-CoV-2 пациентов и выбора значения КП%, для которого сумма чувствительности и специфичности была максимальной.

Все данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты. Оптимизация и оценка диагностических характеристик метода выявления антител, блокирующих взаимодействие между RBD и ACE₂ (sVNT) проведены на 374 образцах сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 годах, 97 образцах, полученных в 2021 г. от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Все образцы охарактеризованы на наличие антител к RBD Spike SARS-CoV-2. В качестве критерия наличия антител, в sVNT, блокирующих взаимодействие RBD коронавируса SARS-CoV-2 и ACE₂ человека, в сыворотке или плазме крови использован коэффициент подавления (КП%). В соответствии с полученными результатами, образцы с КП ≥ 30% рассматривались как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂.

Рассчитаны показатели чувствительности (Se) и специфичности (Sp) разработанного sVNT метода по отношению к коммерческому тесту («SARS-CoV-2-ИФА-IgG», «МедипалТех») [14,15].

Чувствительность и специфичность рассчитаны по формулам и составили:

$$Se = TP / (TP + FN) = 96\% (ДИ \pm 3,35\%, p < 0,05);$$

$$Sp = TN / (TN + FP) = 100\% (ДИ \pm 0,65\%, p < 0,05),$$
 где:

TP - образцы, определённые как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, и к RBD Spike SARS-CoV-2;

FP - образцы, определённые как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, в разрабатываемом тесте, но не содержащие антител к RBD Spike SARS-CoV-2;

TN - образцы, определённые как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, и к RBD Spike SARS-CoV-2;

FN - образцы, определённые как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, но содержащие антитела к RBD Spike SARS-CoV-2

Пороговое значение и диагностические характеристики метода определены с помощью ROC-анализа. Результаты ROC-анализа для выборки образцов, полученных в 2017-2021 гг., и отдельно для двух выборок, полученных на разных этапах пандемии, представлены на рис. 1, А, Б, В и в таблице.

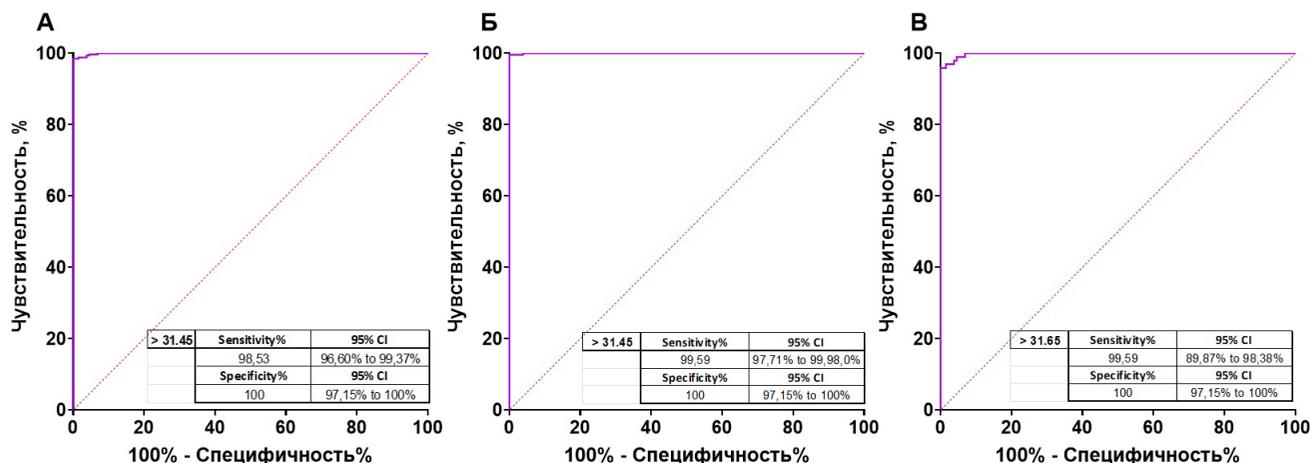


Рис. 1. ROC-кривые результатов sVNT. А - для 340 положительных образцов, полученных в 2020-2021 гг. в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 год; Б - для 243 положительных образцов, полученных в 2020 г. в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 г.; В - для 97 положительных образцов, полученных в 2021 году в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 год.

Определение порогового значения и диагностических характеристик двумя методами

Метод	Год, тип иммунитета	КП _{порог.} %	Чувствительность, %	Специфичность, %
Уилсона (Wilson)	2020-2021 (n=340), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	30	96 (ДИ: ±3,35%, p<0,05)	100(ДИ±0,65%, p<0,05)
ROC (рис. 1, А)	2020-2021 (n=340), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	31,45	98,53 (ДИ: 96,60-99,37%)	100 (ДИ:97, 15-100,0%)
ROC (рис. 1, Б)	2020 (n=243), инфекция	31,45	99,59 (ДИ: 97,71-98,0%)	100 (ДИ 97, 15-100%)
ROC (рис. 1, В)	2021 (n=97), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	31,65	95,88 (ДИ: 89,87-98,38%)	100 (ДИ: 97, 15-100%)

Коэффициент вариации (CV%), определённый для 30 образцов, не содержащих и содержащих антитела, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂, находился в диапазоне 5,5-17,1%.

Аналитическая чувствительность sVNT. Оценка аналитической чувствительности sVNT осуществлена по международному стандартному образцу First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human (NIBSC code: 20/136). Опре-

делена концентрация антител к коронавирусу SARS-CoV-2, блокирующая взаимодействие RBD и ACE₂, соответствующая КП=30%. На основании трёх независимых экспериментов диапазон чувствительности находился в пределах 20-22 ВАУ/мл (рис. 2, А).

Аналитическая чувствительность, определённая по стандартному образцу ВОЗ, не противоречила экспериментальным данным, полученных при исследовании образцов сывороток крови в наборах двух производи-

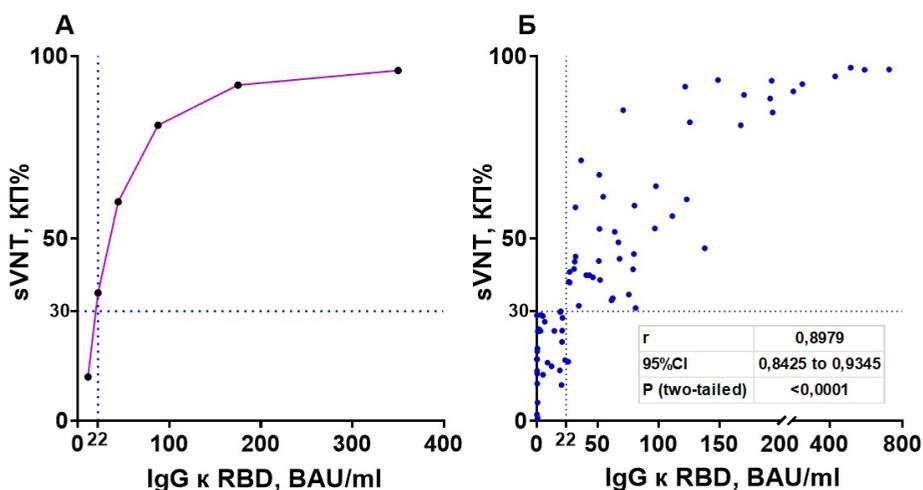


Рис. 2. Аналитическая и диагностическая чувствительность sVNT. А - кривая титрования стандарта ВОЗ в sVNT; Б - результаты зависимости %КП (sVNT) от количества антител, полученные в наборах «МедипалТех» и «Abbot». По оси абсцисс - граница чувствительности (BAU/ml= 22), по оси ординат - граница уровня отсеечения (КП=30).

телей (рис. 2, Б). Все образцы с содержанием IgG антител к RBD SARS-CoV-2 <22 BAU/ml по результатам анализа в наборах «МедипалТех» и «Abbot», определены как не содержащие антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ в методе sVNT. Все образцы с содержанием IgG антител к RBD SARS-CoV-2 >22 BAU/ml определены как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂ в методе sVNT.

Коэффициент корреляции Спирмена 0,8979 (ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p<0,001$) свидетельствует о выраженной, статистически значимой корреляции между

КП% sVNT и количеством антител, выявленных в наборах сравнения (см. рис. 2, Б).

Определение процентной согласованности результатов, полученных в разработанном методе с титром вируснейтрализующих антител, полученном в РБН. 182 образца, охарактеризованные на наличие антител, блокирующие образование комплекса между RBD и ACE₂, и антител к RBD Spike SARS-CoV-2, исследованы в РБН в культуре клеток для определения титров nAbs. Полученные значения КП сопоставлены с титрами nAbs в РБН (рис. 3).

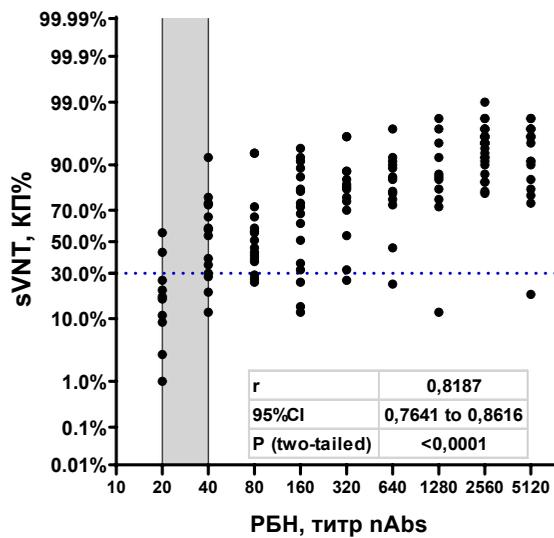


Рис. 3. Зависимость коэффициента подавления КП% от титра nAbs. Выделен интервал значений титра nAbs (1:20-1:40) при котором антитела начинают обнаруживаться в sVNT.

Коэффициент корреляции Спирмена для этих данных составил 0,8187 (ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p<0,001$). Полученные данные свидетельствуют о выраженной, статистически значимой корреляции КП% sVNT с титрами nAbs, определенными в РБН.

В процессе анализа данных дополнительно использо-

ван уточнённый параметр, характеризующий содержание антител – $sVNT_{титр}$, соответствующий последнему разведению исследуемого образца при КП>30%. $sVNT_{титр}$ определён по кривым титрования образцов, анализируемых в ряде последовательных разведений. Пример таких кривых титрования представлен на рис. 4, А.

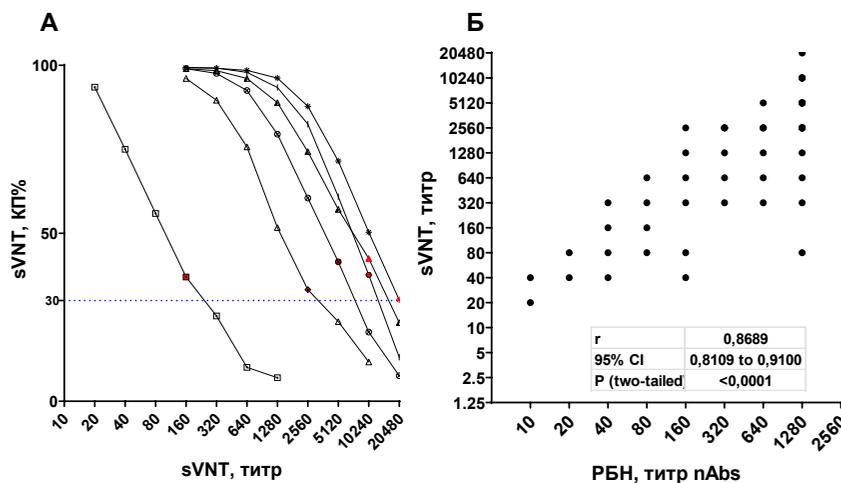


Рис. 4. Определение параметра $sVNT_{титр}$ и его корреляция с результатами РБН. А - кривые титрования образцов; Б – зависимость титра sVNT от титра nAbs в РБН.

При сравнении титров pAbs РБН с титрами sVNT (рис. 4, Б), установлена корреляция высокой степени, коэффициент Спирмена составил 0,8689 (ДИ 95%: 0,8109-0,9100, $p < 0,001$).

Обсуждение. Эталонном для определения вируснейтрализующих антител pAbs является РБН в культуре клеток. Для проведения РБН требуется лаборатория 3 уровня биологической безопасности (BSL 3) из-за обращения с живым вирусом SARS-CoV-2, помимо этого, анализ трудоёмок, на его выполнение уходит 2-4 дня.

Альтернативной РБН является реакция нейтрализации на основе псевдовирусов (pVNT), подразумевающая использование генно-модифицированного вируса, на поверхности которого экспонирован S-белок SARS-CoV-2, позволяющего проводить анализ в лаборатории уровня BSL 2. Тот факт, что pVNT по-прежнему требует использования живых вирусов и клеток делает его малоприменимым для масштабирования. [3,16] Другая альтернатива РБН – ИФА, определяющий только антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, sVNT [1,6,7,17].

При валидации метода ИФА оценка порогового значения КП, позволяющая дифференцировать образцы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, от не содержащих, определялась двумя статистическими методами (см. таблицу). ROC-анализом различно проанализированы образцы с постинфекционным и гибридным иммунитетом. Во всех случаях получены близкие (31,45- 1,65%) пороговые значения КП и высокие диагностические характеристики.

При сравнении данных, полученных в разработанном sVNT методе с данными, полученными в РБН в культуре клеток, установлена статистически значимая корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0,8187; ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p < 0,001$), что согласуется с результатами других авторов [1,6,17].

Разработанный метод определения антител, блокирующих взаимодействие RBD-ACE₂, апробирован на образцах доноров с поствакцинальным и с постинфекционным иммунитетом.

Аналитическая чувствительность наборов «МедипалТех» и «Abbott» для определения антител к RBD SARS-CoV-2 имеет более высокую чувствительность, 10 BAU/ml и 7 BAU/ml, соответственно, анализируемые образцы, содержащие антитела к SARS-CoV-2 в количестве, ниже предела чувствительности sVNT, имеют КП < 30%. Чувствительность РБН в культуре клеток, определённая путём титрования международного стандартного образца First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human, составила 25 IU/мл (разведение стандартного образца 1:40). Схожесть результатов, полученных для чувствительности двух методов, позволяет утверждать, что разработанный метод является адекватной альтернативой РБН в культуре клеток.

Заключение. Разработан метод, позволяющий выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD-ACE₂, простым, безопасным и быстрым способом с высокой специфичностью и чувствительностью. Преимуществом разработанного метода является универсальность, исключая необходимость использования антивидовых конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных, при про-

ведении доклинического тестирования вакцин против SARS-CoV-2. В работе по изучению иммуногенности кандидатной вакцины при оценке нейтрализующих антител у трёх видов животных, установлена корреляция высокой степени между титрами РБН и sVNT [7].

Разработанный метод может найти применение в клинической лабораторной диагностике для мониторинга титров антител у вакцинированных и реконвалесцентов при подборе донорской плазмы, для оценки эффективности вакцин-кандидатов во время доклинических и клинических испытаний, при разработке лекарственных средств [18], в том числе моноклональных антител, с соответствующим механизмом действия.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1 - 6, 8 - 13, 16 - 19 С. М. REFERENCES)

7. Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П., Грачева А.В., Мануйлов В.А., Ленева И.А. и др. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2. *Медицинская иммунология*. 2024; 26(3):569-76. DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905.
14. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. М.: Медиа-Сфера; 1998.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998.

REFERENCES

1. Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S. et al. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging microbes & infections*. 2020; 9:2394-2403. DOI:10.1080/22221751.2020.1835448.
2. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veerle D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike. *Cell*. 2020; 181:281-92.e6. DOI:10.1016/J.CELL.2020.02.058.
3. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2):271-80.e8. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.02.052.
4. Xiaojie S., Yu L., lei Y., Guang Y., Min Q. Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein. *Stem. cell research*. 2021; 50:102125. DOI:10.1016/J.SCR.2020.102125.
5. Yang Y., Du L., Carver R.J., Yang D. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021; 6(1):95. DOI: 10.1038/s41392-021-00523-5.
6. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE₂-spike protein-protein interaction. *Nature Biotechnology*. 2020; 38(9):1073-8. DOI: 10.1038/s41587-020-0631-z.
7. Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П., Грачева А.В., Мануйлов В.А., Ленева И.А. et al. Pseudoneutralizing test for preclinical studies of vaccines against SARS-CoV-2. *Meditsinskaya immunologiya*. 2024; 26(3):569-76. DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905. (in Russian)
8. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., Astudillo M.G., Yang D., Miller T.E., Feldman J. et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*. 2021; 184(2):476-88.e11. DOI:10.1016/2020.10.15.20213512.
9. Bauer G. The variability of the serological response to SARS-coronavirus-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). *Journal of medical virology*. 2021; 93(1):311-22. DOI:10.1002/JMV.26262.
10. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020; 370(6521):1227-30. DOI:10.1126/SCIENCE.ABD7728.
11. Bertoglio F., Meier D., Langreder N., Steinke S., Rand U., Simonelli L. et al. SARS-CoV-2 neutralizing human recombinant antibodies selected from pre-pandemic healthy donors binding at RBD-ACE2 interface. *Nature com-*

- munications*. 2021; 12(1):1577. DOI: 10.1038/s41467-021-21609-2.
12. Mattiuzzo G., Bentley E.M., Hassall M., Routley S., Richardson S., Bernasconi V. et al. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. 2020. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/biologicals/ecbs/bs-2020-2403-sars-cov-2-ab-ik-17-nov-2020.pdf?sfvrsn=662b46ae_2.
 13. Wilson E.B. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association*. 1927; 22(158): 209-12. DOI:10.1080/01621459.1927.10502953.
 14. Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. Clinical epidemiology. Fundamentals of evidence-based medicine [Klinicheskaya epidemiologiya]. Moscow: Media-Sfera; 1998. (in Russian)
 15. Glantz S. Biomedical Statistics [Biomeditsinskaya statistika]. Trans. from Engl. Moscow: Praktika; 1998. (in Russian)
 16. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections*. 2020; 9(1):680-6. DOI:10.1080/22221751.2020.1743767.
 17. Mariën J., Michiels J., Heyndrickx L., Nkuba-Ndaye A., Ceulemans A., Bartholomeeusen K. et al. Evaluation of a surrogate virus neutralization test for high-throughput serosurveillance of SARS-CoV-2. *Journal of virological methods*. 2021; 297:114228. DOI:10.1016/J.JVIROMET.2021.114228.
 18. Wang G., Yang M.L., Duan Z.L., Liu F.L., Jin L., Long C.B. et al. Dalbavancin binds ACE2 to block its interaction with SARS-CoV-2 spike protein and is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in animal models. *Cell Research*. 2021; 31(1):17-24. DOI: 10.1038/s41422-020-00450-0.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Шпилевая М.В. Чикин В.В., Носов Н.Ю. Арбузова Н.В.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АУТОИММУННЫХ БУЛЛЕЗНЫХ ДЕРМАТОЗОВ: ВОЗМОЖНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (обзор литературы)



https://elibrary.ru/panmjk

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава РФ, Москва, 119991, Россия

Аутоиммунные буллезные дерматозы представляют собой гетерогенную группу редких заболеваний кожи и слизистых оболочек, характеризующихся продукцией аутоантител, нацеленных на структурные белки эпителиальной ткани и подлежащей базальной мембраны. Появившиеся на рынке за последние два десятилетия высокочувствительные и специфичные тест-системы для иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных форм целевых антигенов предоставили новый эффективный инструмент для диагностики ряда аутоиммунных буллезных дерматозов. Цель данной статьи – обобщить информацию о современных наборах для ИФА диагностики буллезных дерматозов. В обзоре описаны диагностические возможности, шкала оценки результата и особенности постановки иммуноферментного анализа для представленных тест-систем. Кроме того, приведена информация о разработке аналогичных диагностических инструментов в Российской Федерации.

Ключевые слова: обзор; рекомбинантные белки; аутоиммунные буллезные дерматозы; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Шпилевая М.В. Чикин В.В., Носов Н.Ю. Арбузова Н.В. Лабораторная диагностика аутоиммунных буллезных дерматозов: возможности тест-систем для иммуноферментного анализа (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 126-134.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-126-134>

EDN: PANMJK

Для корреспонденции: Шпилевая Марина Валентиновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путём, и дерматозов; e-mail: aniram1970@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России № 056-00003-24-02.

Поступила 23.04.2024

Принята к печати 14.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Shpilevaya M.V., Chikin V.V., Nocos N.Yu., Arbuzova N.V.

LABORATORY DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE BULLOUS DERMATOSES: CAPABILITIES OF TEST SYSTEMS FOR ENZYME IMMUNOASSAY (review of literature)

State Research «Center of Dermatovenereology and Cosmetology», Russian Ministry of Health, Moscow 119991, Russia

Autoimmune bullous dermatoses are a heterogeneous group of rare diseases of the skin and mucous membranes characterized by the production of autoantibodies targeting structural proteins of epithelial tissue and the underlying basal membrane. Highly sensitive and specific immunoassay test systems based on recombinant forms of target antigens that have appeared on the market in the last two decades have provided a new effective tool for the diagnosis of a number of autoimmune bullous dermatoses. The purpose of this article is to summarize information on current ELISA kits for the diagnosis of bullous dermatoses. The review describes the diagnostic capabilities, the result evaluation scale and the specifics of immunoassay staging for the test systems. In addition, information on the development of similar diagnostic tools in the Russian Federation is given.

Key words: review; recombinant proteins; autoimmune bullous dermatoses; enzyme immunoassay

For citation: Shpilevaya M.V., Chikin V.V., Nocos N.Yu., Arbuzova N.V. Laboratory diagnosis of autoimmune bullous dermatoses: capabilities of test systems for enzyme immunoassay (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 126-134 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-126-134>

EDN: PANMJK

For correspondence: Shpilevaya M.V., Ph.D., senior researcher State Research «Center of Dermatovenereology and Cosmetology»; e-mail: aniram1970@list.ru

Information about authors:

Shpilevaya M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9957-4009>;

Chikin V. V., <https://orcid.org/0000-0002-9688-2727>;

Nocos N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3967-8359>;

Arbuzova N. V., <https://orcid.org/0009-0009-9343-7191>.

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

Funding. The study was carried out within the framework of the state task of the State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology of the Ministry of Health of Russia № 056-00003-24-02.

Received 23.04.2024
Accepted 14.10.2024
Published 00.02.2025

Аутоиммунные буллезные дерматозы (АИБД) – представляют собой гетерогенную группу редких заболеваний кожи и слизистых оболочек, развитие которых обусловлено продукцией аутоантител, связывающихся со структурными белками эпителиальной ткани и подлежащей базальной мембраны [1]. Клинические проявления этих заболеваний могут существенно совпадать, а именно: общим клиническим признаком буллезных дерматозов являются пузыри (буллы) и образующиеся на их месте эрозии. Аналогичные клинические проявления в виде пузырей и эрозий могут также наблюдаться при токсидермиях, синдроме Лайелла, синдроме Стивенса-Джонсона, многоформной эритеме, патогенез которых не связан с продукцией аутоантител. Схожесть клинической картины этих заболеваний делает необходимым использование в их диагностике методов, позволяющих обнаруживать соответствующие аутоантитела. В настоящее время окончательный диагноз буллезного дерматоза устанавливается на основании сочетания клинической картины с выявлением аутоантител к отдельным целевым антигенам. Особенно важна диагностика пузырчатки, которая является дерматозом с потенциально летальным исходом. До появления кортикостероидов от пузырчатки погибали 75% заболевших, обычно в течение 1 года после начала болезни [2].

Выявление аутоантител при буллезных дерматозах возможно с помощью патолого-анатомического исследования биопсийного материала кожи с применением иммунофлюоресцентных методов, а также может быть использована серологическая диагностика. Иммунофлюоресцентное исследование биоптата кожи позволяет выявить отложение и локализацию аутоантител в коже, которая различна при разных заболеваниях. Однако получение биоптата кожи представляет собой инвазивную и сложную процедуру по сравнению с получением образца крови. Поэтому ведущее место в идентификации АИБД занимает серодиагностика, которая является минимально инвазивной, что особенно важно в случаях, когда невозможно получить биоптаты.

Для серологической диагностики буллезных дерматозов может быть использована непрямая иммунофлюоресцентная микроскопия с использованием сыворотки пациента или иммуноферментный анализ (ИФА). В настоящее время в серологической диагностике АИБД все чаще применяются системы ИФА на основе рекомбинантных форм целевых антигенов. Помимо идентификации специфичных аутоантител, ИФА позволяет количественно оценить их уровень, обеспечивая мониторинг течения заболевания и эффективность проводимой терапии. Исследование проводят с использованием коммерческих наборов для определения аутоантител, наблюдаемых при АИБД, а именно: антител к десмоглеину первого типа (Dsg1) и третьего типа (Dsg3) при вульгарной или листовидной пузырчатке; к энвоплакину при паранеопластической пузырчатке; к белкам BP180 и BP230 при пемфигоидных заболеваниях; к коллагену VII типа при приобретённом буллезном эпидермолизе. Поскольку

не существует международных эталонных сывороток для определения уровня аутоантител, ассоциированных с АИБД, в большинстве тест-систем результаты представляются в условных единицах, которые являются относительной мерой концентрации антител в образце крови пациента.

Цель данной статьи – обобщить информацию об имеющихся на российском рынке коммерческих лабораторных системах для иммуноферментной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов с описанием их диагностических возможностей, шкалы оценки результата и особенностей постановки ИФА для каждой тест-системы. В обзоре также приведена информация о разработке аналогичных диагностических инструментов в Российской Федерации. Изучение вопроса о возможности создания российских аналогов с целью импортозамещения актуально в ситуации нарастающего дефицита и увеличения стоимости зарубежных диагностических систем.

Обзор основан на публикациях, посвящённых разработке тест-систем для иммуноферментной диагностики буллезных дерматозов, включающих исследования последних 10 лет. Поисковая работа выполнена с использованием международных научных баз данных PubMed, Scopus, Elsevier.

Обобщённая информация о доступных на российском рынке тест-системах для иммуноферментной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов – как имеющих регистрационное удостоверение, так и предназначенных только для лабораторного использования, а также их диагностические характеристики представлены в таблице.

ИФА тест-системы для обнаружения аутоантител к десмоглеинам 1 и 3 типов. Десмоглеины 1-го и 3-го (Dsg1 и Dsg3) типов являются гликопротеинами семейства десмосомных кадгеринов - молекул клеточной адгезии [3, 5].

Это трансмембранные белки с С-концевым цитоплазматическим доменом, трансмембранным участком и внеклеточным фрагментом, состоящим из пяти экстрацеллюлярных субдоменов [3, 4, 6]. Тест-системы для ИФА на основе рекомбинантных белков – аналогов экстрацеллюлярных доменов десмоглеинов 1-го и 3-го типов позволяют эффективно дифференцировать вульгарную (определение аутоантител к Dsg3) и листовидную (определение аутоантител к Dsg1) пузырчатку [7, 8].

Первыми коммерчески доступными тестами стали «Mesacup-2 test Desmoglein 1» и «Mesacup-2 test Desmoglein 3», производимые компанией MBL (Medical and Biological Laboratories Co.Ltd., Япония). Тест-системы основаны на непрямом ИФА. Для поиска аутоантител используются рекомбинантные белки-аналоги внеклеточных доменов Dsg1 и Dsg3, продуцируемые клетками CHO (Chinese hamster ovary) [9]. Уровень антител в сыворотке крови оценивается введёнными авторами индексом «условные единицы» - U/ml (Unit value/ml). Для количественной оценки данного

индекса тест-системы включают калибраторы 0 и 100 U/ml. Значение индекса ≥ 20 свидетельствует о наличии антител к соответствующему десмоглеину. Диапазон

измерений тест-систем составляет 5-150 U/ml, а чувствительность и специфичность - 100% для определения Dsg1 и 95,8% для определения Dsg3 [10].

Тест-системы для иммуноферментной диагностики аутоиммунных буллёзных дерматозов, представленные на российском рынке

Диагностические маркеры	Заболевание	Диагностическая тест-система (производитель)	Чувствительность	Специфичность (%)	Литература	Регистрационное удостоверение (при наличии)
Анти-Dsg1	Листовидная пузырчатка	Mesacup-2 test Desmoglein 1 (MBL, Япония)	100%	95,8	[9, 10]	For in vitro diagnostic use
		Euroimmun (Германия)	100%	97,9	[4, 11]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
		Fine Test (Южная Корея)	0,469 МЕ/мл		[12]	For research use only
Анти-Dsg3	Вульгарная пузырчатка	Mesacup-2 test Desmoglein 3 (MBL, Япония)	100%	95,8	[9, 10]	For in vitro diagnostic use
		Euroimmun (Германия)	100%	97,9	[4, 11, 12]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
		Fine Test (Южная Корея)	0,469 МЕ/мл		[12]	For research use only
		Cloud-Clone Corp (США)	0,71 нг/мл		[14]	For research use only
		AssayGenie (Дублин-Лондон)	0,469 IU/ml		[15]	For research use only
Анти-энвоплакин	Паранеопластическая пузырчатка	Euroimmun (Германия)	91,3%	95,7	[16]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
Анти-BP180	Буллёзный пемфигоид	(MBL, Япония)	59 - 60%	98 - 99	[18]	
		Euroimmun (Германия)	75,5 - 94,3%	86 - 98,8	[19, 21]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
Анти-BP230	Буллёзный пемфигоид	(MBL, Япония)	59 - 60%	98 - 99	[19, 20]	For research use only
		Euroimmun (Германия)	36,7 - 61,6	86,0 - 98,8	[21]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
Анти - Col 7	Приобретённый буллёзный эпидермолиз	Euroimmun (Германия)	82,2%	98,6	[27-28]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
Анти- tTG	Целиакия Герпетиформный дерматит Дюринга	Euroimmun (Германия)	95,7%	98	[31-33]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
		Orgentec Diagnostika (Германия)	100%	96,7	[34]	ФСЗ 2012/11754 от 20.03.2012
Анти -Gliadin	Целиакия Герпетиформный дерматит Дюринга	Euroimmun (Германия)	82,3%	95,9	[31]	ФСЗ 2010/07326 от 05.07.2010
		Orgentec Diagnostika (Германия)	70%	100	[34]	ФСЗ 2012/11754 от 20.03.2012
Анти- Dsg1, Анти- Dsg3, Анти-BP230, Анти-BP180, Анти - Col 7	Мультивариантная тест-система (определение 5 диагностических маркеров)	Mesacup anti-skin profile test (MBL, Япония)	Соответствует чувствительности каждого моноантигенного ИФА	Соответствует специфичности каждого моноантигенного ИФА	[23]	For research use only
Анти- Dsg1, Анти- Dsg3, Анти-BP230, Анти-BP180, Анти - Col 7, Анти-энвоплакин	Мультивариантная тест-система (определение 6 диагностических маркеров)	Dermatology Profile Elise Euroimmun (Германия)	Соответствует чувствительности каждого моноантигенного ИФА	Соответствует специфичности каждого моноантигенного ИФА	[35]	For research use only

Компания Euroimmun (Medizinische Labordiagnostika AG, Germany) при создании аналогичных систем для ИФА использовала в качестве целевых антигенов экстрацеллюлярные фрагменты Dsg1 и Dsg3, экспрессированные в клеточной линии человека НЕК293 [4, 11]. Чувствительность созданных тест-систем - 100% - была аналогична таковым фирмы MBL, а специфичность оказалась несколько выше - 97,9% [12]. Уровень активности антител в исследуемом образце оценивается в

сравнительных единицах – relative units в мл (RU/ml). Для количественной характеристики активности антител тест-система включает набор калибраторов, на основе значений оптической плотности которых строится калибровочный график. Как и в тест-системах фирмы MBL, значение активности ≥ 20 RU/ml свидетельствует о наличии антител к определяемому десмоглеину. Диапазон измерений наборов составлял 2-200 RU/ml. Считается, что установленные в тест-системах MBL и

Euroimmun уровни активности аутоантител к Dsg1 или Dsg3 коррелируют с активностью заболевания и могут служить прогностическим средством для оценки его тяжести, а также быть индикатором перехода между двумя формами пузырчатки [7, 8].

В настоящее время тест-системы ИФА для количественного определения уровня антител к десмоглеинам 1-го и 3-го типа предлагаются также фирмами Fine Test (Южная Корея) [13] и Cloud-Clone Corp (США) [14], которые позиционируют себя как производители данных тест-систем, а для определения уровня антител только к десмоглеину 3-го типа - AssayGenie (Дублин-Лондон) [15].

Cloud-Clone Corp предлагает набор для непрямого качественного и количественного ИФА, аналогичный системам MBL и Euroimmun. Набор включает лиофилизированный стандарт для построения калибровочного графика. Единицей измерения концентрации аутоантител являются нг/мл. Диапазон определения: 1,56-100 нг/мл. Чувствительность: 0,71 нг/мл. Длительность анализа 2,5 часа.

Тест-системы Fine Test и AssayGenie идентичны и предназначены для количественного определения концентрации антидесмоглеиновых антител методом сэндвич ИФА. В качестве антигена для сорбции и меченая биотином использованы рекомбинантные Dsg 1 или Dsg 3 человека. Уровень аутоантител определяется по калибровочным графикам в условных единицах. Интервал обнаружения 0,781 – 50 UE/мл, чувствительность метода 0,781 UE/мл. Время выполнения исследования 4 часа.

В тест-системах Fine Test, Cloud-Clone Corp и AssayGenie рассматривается проведение количественного анализа, так как критерии для качественного анализа отсутствуют. Для определения диагностически значимого количества аутоантител необходимо построение калибровочного графика как минимум из 4 точек и дополнительно – постановка отрицательного контроля. Это значительно сокращает количество лунок для тестируемых образцов. Возникают также вопросы сопоставления количественных результатов определения, выраженных в нг/мл в одних тест-системах и условных единицах (Relative Units, RU, или International Units, IU) - в других.

ИФА тест-системы для обнаружения аутоантител при паранеопластической пузырчатке. Тест-система ИФА для диагностики паранеопластической пузырчатки производства компании Euroimmun [16] создана на основе рекомбинантного N-концевого фрагмента энвоплакина, экспрессированного в клетках *E. coli*. Как во всех наборах Euroimmun, имеются калибратор, положительный и отрицательный контроли. Показатель оптической плотности (ОП) калибратора определяет верхний предел референсного диапазона (пороговое значение) для здоровых людей, рекомендованный Euroimmun. Значения выше порогового считаются положительными, ниже — отрицательными. Помимо качественной интерпретации, возможна полуколичественная оценка результатов путем расчета коэффициента (R) как отношения значения ОП исследуемого образца к значению ОП калибратора. Результаты интерпретируются следующим образом: $R < 1,0$ - результат отрицательный, $R \geq 1,0$ - результат положи-

тельный. Нижний предел обнаружения антител к энвоплакину предложенным методом $R = 0,07$. При специфичности 95,7% чувствительность метода составляет 91,3% [16]. Концентрация антител коррелирует с активностью заболевания и может использоваться для мониторинга эффективности лечения. ИФА для обнаружения антител к энвоплакину на основе N-концевого фрагмента энвоплакина не только идентифицирует циркулирующие аутоантитела против энвоплакина при паранеопластической пузырчатке, но и способствует её дифференциальной диагностике от буллезного пемфигоида, вульгарной и листовидной пузырчаток.

ИФА тест-системы для обнаружения аутоантител к VP180 и VP230 при буллезном пемфигоиде. При буллезном пемфигоиде аутоантитела специфичны к двум полудесмосомальным белкам, VP180 и VP230 [17]. VP180 представляет собой трансмембранную молекулу, аутоантитела к которой реагируют с её внеклеточным неколлагеновым доменом NC16A. VP230 является внутриклеточным компонентом гемидесмосомы, и основная иммуногенная мишень аутоантител - глобулярный C-концевой домен данной молекулы.

Для обнаружения аутоантител против VP180 было разработано несколько методов ИФА с использованием рекомбинантных форм VP180, чаще всего его внеклеточного домена NC16A [18-20], полученного путем бактериальной экспрессии в клетках *E. coli*.

Широкое распространение получили коммерческие тест-системы для качественного определения концентрации аутоантител при буллезном пемфигоиде методом непрямого ИФА двух производителей – MBL и Euroimmun. Тест-система MBL основана на рекомбинантном антигене NC16A в виде белка, слитого с глутатион-S-трансферазой - (GST)-NC16A [18]. В тест-системе Euroimmun используемый рекомбинантный белок включает четыре копии домена (NC16A-4X), слитые с полигистидиновой меткой для усиления экспрессии [21]. Получившийся белок имеет такой же размер, как белок, слитый с GST.

Тест-системы MBL содержат положительный и отрицательный контроли. Для определения уровня аутоантител к BP180 сравниваются значения оптических плотностей (ОП) в лунках с исследуемым образцом и отрицательным контролем. Если ОП образца $< 2,1 \times$ ОП отр. контроля - результат исследования отрицательный; если ОП образца $\geq 2,1 \times$ ОП отр. контроля - результат положительный. Чувствительность и специфичность тест-систем составляют 59-60% и 98-99% соответственно [19,20]. Единицей обнаружения аутоантител являются Международные Единицы - МЕ (International Units, IU). Пороговое значение обнаружения аутоантител 9 МЕ/мл.

Тест-система компании Euroimmun основана на использовании тетрамерного белка NC16A-4X. Уровень активности антител в исследуемом образце оценивается в сравнительных единицах (RU/ml). Состав тест-системы и метод регистрации результатов аналогичны таковым для определения антител к десмоглеинам. ИФА с VP180 - NC16A-4X имеет чувствительность 75,5-94,3% и специфичность 86-98,8% [21,22]. Уровни антител к VP180, определяемые с помощью тетрамерной тест-системы, коррелируют с активностью заболевания, что важно для принятия решений о лечении у

пациентов без видимых поражений кожи [22].

Тест-наборы ИФА для определения антител против ВР230 разработаны теми же компаниями и имеют сходный дизайн. Планшеты компании MBL сорбированы N-концевыми и C-концевыми рекомбинантными белками человека [21], клонированными и экспрессированными в клетках *E. coli*. Чувствительность такой иммуноферментной системы составляет 59-60%, специфичность варьируется в интервале 98-99% [23].

Планшеты компании Euroimmun сорбированы фрагментом C-концевого глобулярного домена ВР230, экспрессированного также в системе *E. coli* [24]. Чувствительность и специфичность метода варьируются в интервалах 36,7–61,6% и 86,0–98,8% соответственно [21-22].

Достаточно широкие диапазоны чувствительности и специфичности ИФА, о которых сообщается в исследованиях, объясняют следующими причинами: разные методы определения порогового значения тест-систем; различие в количестве исследуемых сывороток; выборка пациентов буллезным пемфигоидом (длительность и тяжесть заболевания, оказываемое лечение); разная длина и источники получения рекомбинантных белков [25].

Многие исследователи отмечают, что при одновременном исследовании сывороток с использованием двух тест-систем – на определение антител к ВР230 и ВР180 чувствительность и специфичность ELISA возрастают до 84,6-97% и 88-100% соответственно [21,22].

Известна также очень редкая форма буллезного пемфигоида – анти-ламинин- γ 1/анти-p200-пемфигоид. У этих пациентов аутоантитела вырабатываются к белку p200, который представляет собой γ 1-ламинин.

ИФА тест-системы для обнаружения аутоантител к коллагену VII типа при приобретенном буллезном эпидермолизе. Высокочувствительную и специфичную диагностику приобретенного буллезного эпидермолиза позволяет проводить доступная коммерческая система ИФА Col7-NC1 (Euroimmun). Диагностика основана на качественном определении аутоантител IgG к коллагену VII типа (Col7). Молекула Col7 представляет собой тример, каждая цепь которого состоит из коллагенового домена, фланкированного неколлаженовыми доменами NC1 на аминоконце и NC2 - на карбокси-конце. Мажорные иммуногенные эпитопы находятся в домене NC1, а минорные - в домене NC2 [26].

В тест-системе Euroimmun Col7-NC1 планшеты сорбированы рекомбинантным NC1-Col7, экспрессированным на поверхности клеток НЕК293 [27]. Пороговое значение тест-системы 20 RU/ml; чувствительность и специфичность 82,2% и 98,6% соответственно [28].

ИФА для обнаружения аутоантител к коллагену VII типа полезен для подтверждения диагноза ПБЭ, дифференциации его от случаев анти-ламинин- γ 1/анти-p200-пемфигоида и для помощи в принятии решений о лечении. Уровень циркулирующих антител коррелируют с активностью заболевания [29].

ИФА тест-системы для обнаружения ауто-

антител к герпетиформному дерматиту (болезни Дюринга). Герпетиформный дерматит (болезнь Дюринга) — кожное проявление целиакии, поражающее около 10% пациентов с этим заболеванием. Для него характерно образование пузырей в зоне базальной мембраны кожи. Мишенью циркулирующих аутоантител IgA при этом являются тканевая трансглутаминаза (tTG) [30] и деамидированный глиадин [30]. Поскольку основная глютенчувствительная энтеропатия часто связана с селективным дефицитом IgA, для диагностики показано дополнительное определение антител класса IgG. Компания Euroimmun производит тест-системы ИФА для диагностики анти-tTG и анти-глиадиновых аутоантител - «Anti-tissue Transglutaminase ELISA (IgA)» [31] и «Europlus Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)» [32,33].

Эпидермальная трансглутаминаза [30] - фермент, экспрессируемый в шиповатом слое эпидермиса. Соответствующий рекомбинантный белок, сорбируемый в лунки планшетов, экспрессируется в клеточной линии насекомых *Spodoptera frugiperda* Sf9. Тест-система позволяет проводить качественное и количественное определения аутоантител класса IgA, а при необходимости – IgG.

Глиадин - белок, входящий в состав глютена, вызывает воспалительные, иммунологические и аутоиммунные реакции у людей с глютеносенситивностью. В диагностике используются тесты, содержащие в качестве антигенов линейные дезамидированные пептиды глиадина, что делает метод чувствительнее и специфичнее. Рекомбинантный полипептид, к которому определяются антитела, представляет собой «дизайнерский антиген» - тример слитого пептида [31], который вызывает положительную реакцию почти исключительно у пациентов с целиакией и герпетиформным дерматитом Дюринга. Одна пептидная последовательность - основной эпитоп дезамидированного глиадина, тогда как вторая патофизиологически значима для целиакии [32]. ДНК, кодирующая слитые пептиды, экспрессирована в клетках *E. coli*.

Состав обеих тест-систем и метод регистрации результатов аналогичны таковым для определения антител к десмоглеинам. Активность антител в исследуемом образце оценивается в сравнительных единицах в мл (RU/ml). Значение активности ≥ 20 RU/ml (в случае глиадина ≥ 25 RU/ml) свидетельствует о наличии антител к соответствующему белку. Чувствительность и специфичность тест-системы «Anti-tissue Transglutaminase ELISA (IgA)» составляют 95,7% и 98% соответственно [32]. В случае дефицита в исследуемом образце антител IgA, можно определять IgG [33]. Чувствительность тест-системы для определения IgG выше – 99,7%. Чувствительность и специфичность тест-системы «Europlus Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)» составляют 82,3% и 95,9% соответственно [31].

Для диагностики анти-tTG и анти-глиадиновых аутоантител на российском рынке также зарегистрированы тест-системы для непрямого ИФА компании Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). [34] Антигенами для сорбции являются высокоочищенные рекомбинантные белки человеческого происхождения:

тканевая трансглутаминаза и деамидированные пептиды глиадина (DGP). В связи с отсутствием международного стандарта определения анти-tTG и анти-DGP антител, метод прокалиброван в арбитражных единицах (U/ml). Диапазон измерения в обоих случаях составляет 0-200 U/ml, чувствительность - 1 U/ml. Для определения анти-tTG диапазон измерения 0-200 U/ml, чувствительность 100%, специфичность 96,7%. Для определения анти-DGP диапазон измерения 0-1000 U/ml, чувствительность 70%, специфичность 100%.

Мультивариантные тест-системы ИФА.

В 2016 году компания MBL создала новую тест-систему ИФА для более быстрого обнаружения антител IgG к десмоглеину 1, десмоглеину 3, антигенам буллезного пемфигоида BP180, BP230 и коллагену XVII типа «Mesacup anti-skin profile test» (ASPT) [12, 23]. Аутоантитела к перечисленным антигенам можно обнаружить одновременно в одном анализе, поскольку каждое определяется в отдельной лунке с сорбированным соответствующим рекомбинантным антигеном. Согласно инструкции производителя, время анализа до момента снятия результатов 1 час 45 минут и один образец сыворотки может быть протестирован на одном стрипе, содержащем восемь лунок: пять для аутоантигенов и три для положительного и отрицательного контролей. Диагностическая чувствительность метода варьировалась от 59,6% (к BP180 при буллезном пемфигоиде) до 92,5% (для обыкновенной пузырчатки), а специфичность от 97,5% (к BP180) до 100% (при всех остальных исследуемых дерматозах). В 2016 году были опубликованы аналогичные исследования по использованию системы многовариантного иммуноферментного анализа для диагностики аутоиммунных буллезных заболеваний, созданной под руководством департамента дерматологии г. Любек (Германия) [35]. Мультивариантный ИФА – Dermatology Profile ELISA - включает 6 различных рекомбинантных иммунодоминантных антигенов – мишеней

ней аутоиммунных буллезных дерматозов: BP180, BP230, коллаген VII типа, десмоглеин 1, десмоглеин 3 и энвоплакин, каждый из которых вносится в отдельную лунку (см. рисунок). Время анализа до момента снятия результатов 1 час 45 мин. Полуколичественная оценка проводится на основе общего калибратора и антигенспецифического фактора.

Метод разрабатывался на основе индивидуальных ИФА систем для определения антител против десмоглеина 1, десмоглеина 3, энвоплакина, BP180, BP230 и col17. Для валидации многовариантного ИФА использовали панель сывороток пациентов с хорошо охарактеризованными аутоиммунными буллезными дерматозами и панель контрольных сывороток, полученных от здоровых доноров и от пациентов с невоспалительными заболеваниями кожи. Диагностическая чувствительность метода варьировалась от 85,7% (для паранеопластической пузырчатки) до 100% (для обыкновенной пузырчатки), а специфичность от 97,3% (для буллезного пемфигоида) до 100% (при приобретенном буллезном эпидермолизе). При сравнении многовариантного ИФА и прямой иммунофлуоресцентной микроскопии (золотой стандарт диагностики АИБД), согласованные результаты наблюдались для 94% больных пузырчаткой и 71% больных пемфигоидом. При традиционном многоэтапном диагностическом подходе совпадение результатов отмечено для 91% больных пузырчаткой, 88% больных буллезным пемфигоидом и 93% здоровых доноров.

По мнению авторов, отсутствие реактивности в многовариантном ИФА может быть связано с охватом неполного спектра целевых антигенов АИБД и игнорированием реактивности аутоантител класса IgA.

Несмотря на отмеченную информативность и скорость выполнения анализа, мультивариантные тест-системы ИФА в настоящее время отсутствуют на коммерческом рынке. Заявленный разработчиками оптимизм не был поддержан клиническими дерматологами [36], основное замечание которых заклю-

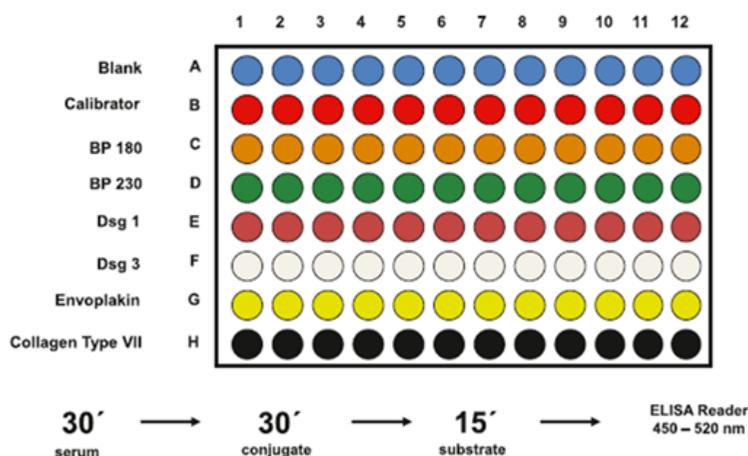


Схема расположения антигенов на планшете для мультивариантного ИФА.

В горизонтальных рядах сорбированы рекомбинантные формы иммунодоминантных антигенов – мишеней шести аутоиммунных буллезных дерматозов. Сыворотка каждого пациента вносится в вертикальный ряд. На планшете возможен анализ двенадцати образцов сыворотки. Под схемой панели показана длительность каждого этапа ИФА.

BP – буллезный пемфигоид; Dsg – десмоглеин (цит. по V. van Beek и соавт. [35]).

чается в том, что анализ крови методом ИФА полезен для подтверждения заболевания, но не для его диагностики при отсутствии клинических данных.

Помимо описанных диагностических систем, в специализированных лабораториях доступны нестандартизированные тест-системы ИФА, содержащие набор рекомбинантных антигенов для определения таких редких параметров, как: наличие IgE-антител против BP180 NC16A [37-38], реактивность сыворотки крови против десмоколлина [39], ламинина $\gamma 1$ [40], реактивность IgA-антител против эктодомена BP180 [41], диагностика полноразмерного BP180 [42] и различных других форм BP180 [43], а также ламинина 332 [44]. Использование данных наборов обеспечивает предварительное скрининговое исследование редких АИБД и сокращает время для постановки диагноза.

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует, что появившиеся на рынке за последние два десятилетия высокочувствительные и специфичные системы ИФА на основе рекомбинантных антигенов все чаще применяются в серологической диагностике АИБД. Отличаясь простотой исполнения, быстротой получения и объективностью оценки результата, метод позволяет идентифицировать и количественно измерять уровень аутоантител, который в ряде случаев коррелирует с активностью заболевания и может служить прогностическим средством для оценки его тяжести. Каждая представленная в обзоре тест-система отличается высокими значениями диагностических характеристик и содержит все необходимые для постановки анализа реагенты. Одновременно следует отметить уникальность каждой тест-системы по видам и источникам получения рекомбинантных целевых антигенов и определяемому ими диапазону чувствительности; качественной и/или количественной оценке предоставляемого результата; единицам измерения активности аутоантител. Представленный обзор может помочь определиться с выбором тест-системы, максимально соответствующей требованиям потребителя. Отмеченное в обзоре отсутствие единого стандарта единиц измерения связано с невозможностью создания банка стандартных сывороток в связи с редкой встречаемостью описанных аутоиммунных заболеваний. К недостаткам описанных тест-систем в настоящее время можно отнести сложность поставки и высокую стоимость. Последние два качества зарубежных тест-систем делают актуальной задачу по их импортозамещению.

С этой целью в Российской Федерации проводились работы по созданию иммуноферментных тест-систем для диагностики вульгарной пузырчатки как потенциально летального дерматоза. Для изучения аутоиммунного ответа к десмоглеину 3 типа были созданы две лабораторные тест-системы [45 - 47]. В первой тест-системе в качестве антигена использовали рекомбинантный белок, воспроизводящий два начальных домена EC1-EC2 экстрацеллюлярного фрагмента Dsg3, который был синтезирован в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Экспериментальная тест-система показала специфичность 85% при определении уровня аутоантител в сыворотке крови пациентов с вульгарной пузырчаткой [45, 46]. Вторая

тест-система [47] основывалась на рекомбинантных антигенах, воспроизводящих полноразмерный фрагмент Dsg3 или его отдельные домены EC1, EC2 и EC4, которые были получены экспрессией в клетках млекопитающих (линия CHO). Данная система позволила установить дифференцированный аутоиммунный ответ на отдельные домены Dsg3 у пациентов с вульгарной пузырчаткой.

Таким образом, анализ современной научной и научно-технической литературы, посвященной ИФА-диагностике АИБД, свидетельствует о совершенствовании и активном внедрении данного метода серологической диагностики, а также о возможности разработки российских аналогов подобных тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1 - 44, 47 С. М. REFERENCES)

45. Свирщевская, Е.В., Матушевская Е.В., Дзугцева И.Р., Лысенко А.А. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе дрожжевого рекомбинантного десмоглеина 3 для серодиагностики вульгарной пузырчатки. *Вестник дерматологии и венерологии*, 2005; (3): 4-10.
46. Матушевская Е.В., Свирщевская Е.В., Дзугцева И.Р., Тогоева Л.Т., Лапшина Т.П. Изменение уровня антител к десмоглеину-3 в сыворотках крови больных пузырчаткой до и после лечения. *Вестник дерматологии и венерологии*, 2005; (6): 12-6.

REFERENCES

1. Egami S., Yamagami J., Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020; 145: 1031-47. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.02.013.
2. Bystry J.C., Steinman N.M. The adjuvant therapy of pemphigus. An update. *Arch. Dermatol.* 1996; 132 (2): 203-12. DOI: 10.1001/archderm.1996.03890260105016.
3. Hegazy M., Perl A.L., Svoboda S.A., Green K.J. Desmosomal cadherins in health and disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2022; 17: 47-72. DOI: 10.1146/annurev-pathol-042320-092912.
4. Saschenbrecker S., Karl I., Komorowski L., Probst C., Dähnrich C., Fechner K. et al. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1-18. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01974.
5. Schmidt E., Kasperkiewicz M., Joly P. Pemphigus. *Lancet.* 2019; 394: 882-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31778-7.
6. Harrison O.J., Brasch J., Lasso G., Katsamba P.S., Ahlsen G., Honig B. et al. Structural basis of adhesive binding by desmocolins and desmogleins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016; 113: 7160-5. DOI: 10.1073/pnas.1606272113.
7. van Beek N., Zillikens D., Schmidt E. Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2018; 16(9): 1077-91. DOI: 10.1111/ddg.13637.
8. Kasperkiewicz M., Ellebrecht C.T., Takahashi H., Yamagami J., Zillikens D., Payne A.S. et al. Pemphigus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2017; (3): 17026. DOI: 10.1038/nrdp.2017.26.
9. Fujioa Y., Kojimab K., Hashiguchib M., Wakui M., Murata M., Amagai M. et al. Validation of chemiluminescent enzyme immunoassay in detection of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid. *Journal of Dermatological Science.* 2017; 85 (3): 208-15. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.12.007.
10. Futei Y., Amagai M., Sekiguchi M., Nishifuji K., Fujii Y., Nishikawa T. Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115 (5): 829-834. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00137.x.
11. Schmidt E., Dähnrich C., Rosemann A., Probst C., Komorowski L., Saschenbrecker S. et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody

- levels in individual pemphigus patients. *Exp. Dermatol.* 2010; 9 (5): 458–63. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01069.x.
12. Yang A., Xuan R., Melbourne W., Tran K., Murrell D.F. Validation of the BIOCHIP test for the diagnosis of bullous pemphigoid, pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 2020; 34 (1): 153–60. DOI: 10.1684/ejd.2015.2692.
 13. Human anti-DSG3 antibody (anti-desmoglein-3 antibody) ELISA kit. Available at: <https://www.fn-test.com/product/eh4171/> (accessed April 2024).
 14. Enzyme-linked immunosorbent assay kit for anti-desmoglein 3 antibody (Anti-DSG3). Available at: <https://www.cloud-clone.com/products/SEA444Hu.html> (accessed April 2024).
 15. Assay Genie. Human Anti-DSG3 antibody (anti-Desmoglein-3 antibody) ELISA Kit. Available at: <https://www.assaygenie.com/human-anti-dsg3-antibody-anti-desmoglein-3-antibody-elisa-kit/> (accessed April 2024).
 16. Probst C., Schlumberger W., Stöcker W., Recke A., Schmidt E., Hashimoto T. et al. Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 410 (1-2): 13-8. DOI: 10.1016/j.cca.2009.08.022.
 17. Keller J.J., Kittridge A.L., Debanne S.M., Korman N.J. Evaluation of ELISA testing for BP180 and BP230 as a diagnostic modality for bullous pemphigoid: a clinical experience. *Arch. Dermatol. Res.* 2016; 308 (4): 269–72.
 18. Kobayashi M., Amagai M., Kuroda-Kinoshita K., Hashimoto T., Shirakata Y., Hashimoto Koji. et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.* 2002; 30 (3): 224-32. DOI: 10.1016/s0923-1811(02)00109-3.
 19. Sitaru C., Dähnrich C., Probst C., Komorowski L., Blöcker I., Schmidt E. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp. Dermatol.* 2007; 16 (9): 770-7. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2007.00592.x.
 20. Tampoia M., Lattanzi V., Zucano A., Villalta D., Filotico R., Fontana A. et al. Evaluation of a new ELISA assay for detection of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1173: 15- 20. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04630.x.
 21. Esmaili N., Mortazavi H., Kamyab-Hesari K., Aghazadeh N., Daneshpazhoo M., Khani S. et al. Diagnostic accuracy of BP180 NC16a and BP230-C3 ELISA in serum and saliva of patients with bullous pemphigoid. *Clin. Exp. Dermatol.* 2015; 40 (3): 324–30.
 22. Chanprapaph K., Thadanipon K. Anti-BP180 and anti-BP230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and disease activity tracking of bullous pemphigoid: A prospective cohort study. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 2021; 39 (4): 272-8. DOI: 10.12932/AP-231118-0446.
 23. Horváth O., Rita Varga R., Kaneda M., Schmidt E., Thomas Ruzicka T., Sárdy M. Diagnostic performance of the "MESACUP anti-skin profile test" *Eur. J. Dermatol.* 2016; 26 (1): 56-63. DOI: 10.1684/ejd.2015.2692.
 24. Damoiseaux J., van Rijsingen M., Warnemünde N., Dähnrich C., Fechner K., Tervaert J.W. Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the Europlus dermatology mosaic. *J. Immunol. Methods.* 2012; 382 (1-2): 76-80. DOI: 10.1016/j.jim.2012.05.007.
 25. Charneux J., Lorin J., Vitry F., Antonicelli F., Reguiaz Z., Barbe C. et al. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch. Dermatol.* 2011; 47 (3): 286-91. DOI: 10.1001/archdermatol.2011.23.
 26. Koga H., Prost-Squarcioni C., Iwata H., Jonkman M.F., Ludwig R.J., Bieber K. Epidermolysis bullosa acquisita: The 2019 Update. *Front Med. (Lausanne)* 2018; 5: 362. DOI: 10.3389/fmed.2018.00362.
 27. Chen M., Chan L.S., Cai X., O'Toole E. A., Sample J. C., Woodley D. T. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of Investigative Dermatology.* 1997; 108 (1): 68-72. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12285634.
 28. Holsche M.M., van Beek N., Hashimoto T., Zenzo G.D., Zillikens D., Prost-Squarcioni C. et al. Diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita: multicentre comparison of different assays for serum anti-type vii collagen reactivity. *Acta Derm. Venereol.* 2021; 101 (3): 971. DOI: 10.2340/00015555-3774.
 29. Seta V., Aucouturier F., Bonnefoy J., Roux-Villet L. C., Pendaries V., Alexandre M. et al. Comparison of 3 type VII collagen (C7) assays for serologic diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita (EBA). *J. Am Acad. Dermatol.* 2016; 74 (6): 1166-72. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.01.005.
 30. Hietikko M., Hervonen K., Tuire I., Salmi T., Huhtala H., Laurila K. et al. Ex vivo culture of duodenal biopsies from patients with dermatitis herpetiformis indicates that transglutaminase 3 antibody production occurs in the gut. *Acta Derm. Venereol.* 2018; 98 (3): 366-72. DOI: 10.2340/00015555-2849.
 31. Prause C., Probst C., Komorowski L., Dähnrich C., Schlumberger W., Richter T. et al. The new anti-GAF(3X) ELISA for highly reliable serologic diagnosis of childhood coeliac disease. Wissenschaftliche Präsentation auf dem 10th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA), Mexiko, 2008.
 32. Rose C., Dähnrich C., Probst C., Stöcker W., Schlumberger W., Zillikens D. Anti-GAF(3X) ELISA (IgG) in combination with anti-tTG-ELISA (IgA) identifies 100% of celiac disease patients with dermatitis herpetiformis Dühring and positive intestinal biopsy (March III). Abstract zum 6. International Congress on Autoimmunity in Porto, Portugal, 2008.
 33. Euroimmun Anti-tissue Transglutaminase ELISA (IgA) Test instruction. Available at: <https://www.intimakmur.co.id/uploads/files/produk/ifu/20210712164420-ifu-anti-tissue-transglutaminase-elisa-iga.pdf> (accessed April 2024).
 34. Test instruction Anti-Tissue-Transglutaminase Orgentec Diagnostika GmbH (Germany). Available at: <https://www.orgentec.com/en/products/alegria/autoimmune+disease+diagnostics/gastroenterology+diagnostics/Anti-Tissue-Transglutaminase.html> (accessed April 2024).
 35. van Beek N., Dähnrich C., Johannsen N., Lemcke S., Goletz S., Hübner F. et al. Prospective studies on the routine use of a novel multivalent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of autoimmune bullous diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2016; 76 (5): 889–894.e5. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.11.002.
 36. Mutasim M.D. Practice Update. Novel multivalent ELISA effective for the diagnosis of autoimmune blistering diseases. Accessible via Google: <https://www.practiceupdate.com/content/novel-multivalent-elisa-effective-for-the-diagnosis-of-autoimmune-blistering-diseases/48603> (accessed April 2024).
 37. van Beek N., Luttmann N., Huebner F., Recke A., Karl I., Schulze F.S. et al. Correlation of serum levels of IgE autoantibodies against BP180 with bullous pemphigoid disease activity. *JAMA Dermatol.* 2017; (5391): 30–8. DOI: 10.1001/jamadermatol.2016.3357.
 38. Hashimoto T., Ohzono A., Teye K., Numata S., Hiroyasu S., Tsuruta D. et al. Detection of IgE autoantibodies to BP180 and BP230 and their relationship to clinical features in bullous pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 2017; 77 (1): 141–51. DOI: 10.1111/bjd.15114.
 39. Ishii N., Teye K., Fukuda S., Uehara R., Hachiya T., Koga H. et al. Anti-desmoglein autoantibodies in nonclassical pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173 (1): 59–68. DOI: 10.1111/bjd.13711.
 40. Groth S., Recke A., Vafia K., Ludwig R. J., Hashimoto T., Zillikens D. et al. Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 2011; 164 (1): 76–82. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.10056.x.
 41. Csorba K., Schmidt S., Florea F., Ishii N., Hashimoto T., Hertl M. et al. Development of an ELISA for sensitive and specific detection of IgA autoantibodies against BP180 in pemphigoid diseases. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2011; 6: 31. DOI: 10.1186/1750-1172-6-31.
 42. Izumi K., Nishie W., Mai Y., Wada M., Natsuga K., Ujii H. et al. Autoantibody profile differentiates between inflammatory and non-inflammatory bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* 2016; 136 (11): 2201–10. DOI: 10.1016/j.jid.2016.06.622.
 43. Yasukochi A., Teye K., Ishii N., Hashimoto T. Clinical and immunological studies of 332 Japanese patients tentatively diagnosed as anti-BP180-type mucous membrane pemphigoid: a novel BP180 C-terminal domain enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Derm. Venereol.* 2016; 96: 762–7. DOI: 10.2340/00015555-2407.
 44. Bernard P., Antonicelli F., Bedane C., Joly P., Le Roux-Villet C., Duvert-Lehembre S. et al. Prevalence and clinical significance of anti-laminin 332 autoantibodies detected by a novel enzyme-linked immunosorbent assay in mucous membrane pemphigoid. *JAMA Dermatol.* 2013; 149 (5): 533–40. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.1434.

45. Svirshcevskaia E.V., Matushevskaya E.V., Dzutseva I.R., Lysenko A.A. Development of an immunoenzyme test system based on yeast recombinant desmoglein 3 for serodiagnosis of vesicular vesicular vulgar disease. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2005; (3): 4-10. (in Russian)
46. Matushevskaya E.V., Svirshcevskaia E.V., Dzutseva I.R., Togoeva L.T., Lapshina T.P. Serum antidesmoglein-3 antibodies in patients with pemphigus before and after therapy. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2005; (6): 12-6. (in Russian)
47. Kubanov A.A., Deryabin D.G., Shpilevay M.V., A.E. Karamova A.E., Nikonorov A.A., Larina E. N. et al. Analysis of the specificity of auto-reactive antibodies to individual fragments of the extracellular domain of desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021; 171 (4): 475-9. DOI: 10.1007/s10517-021-05254-9.

МИКРОБИОЛОГИЯ



<https://elibrary.ru/sqdaJV>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Ильин И.И.^{1,2}, Беляков И.С.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МАЗКАХ МЕТОДОМ ПРЯМОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

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

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

Введение. Применение прямой ПЦР, без экстракции нуклеиновых кислот, для выявления инфекционных агентов - хорошая альтернатива рутинному ПЦР: снижает риск контаминации, вдвое ускоряется время получения результата, снижает себестоимость исследования. Разработана методика прямой ПЦР для генотипирования 18 типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в мультиплексном формате. Первичное и повторное выявление ВПЧ высокого онкогенного риска является фактором риска развития дисплазий шейки матки.

Материал и методы. Исследовано 60 гинекологических мазков методом прямой ПЦР разработки АО ЭКОлаб и 60 ДНК из них референсным непрямым набором производства НекстБио (Москва). Все выявленные генотипы ВПЧ подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Результаты. Данные, полученные с помощью двух наборов и секвенирования по Сэнгеру, совпали. Наибольшая относительная частота выявлена у ВПЧ 16 и 39 типов (13,3%), частота выявления увеличена для ВПЧ 6, 33, 58 до 11,7%, в случае ВПЧ 56, 59 до 10%. В десяти образцах из 60 (16,7%) выявлена коинфекция ВПЧ, и повышенная частота коинфекции ВПЧ 66.

Обсуждение. Полученные данные генотипирования ВПЧ согласуются с более ранними данными по высокой относительной частоте выявления генотипов ВПЧ 16 и 31 типов. Отмечена более низкая относительная частота выявления образцов с коинфекцией ВПЧ высокого риска. В нашей выборке выявлена высокая частота коинфекции ВПЧ 66, как и в данных, полученных в Китае и Парагвае. Прямая ПЦР и генотипирование ВПЧ, наряду с наборами для самостоятельного забора биоматериала позволяют сделать скрининг ВПЧ-инфекции более доступным, что важно, как для профилактики ВПЧ-инфекции, так и скрининга дисплазий и рака шейки матки.

Заключение. Генотипирование ВПЧ успешно проведено при помощи технологии прямой ПЦР.

Ключевые слова: прямая ПЦР; генотипирование ВПЧ; вакцинация против ВПЧ; дисплазии шейки матки; рак шейки матки

Для цитирования: Ильин И.И., Беляков И.С., Марданлы С.Г. Генотипирование вирусов папилломы человека в урогенитальных мазках методом прямой ПЦР в реальном времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 135-140. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-135-140> EDN: SQDAJV

Для корреспонденции: Ильин Илья Игоревич, микробиолог научно-производственного отделения ПЦР АО «ЭКОлаб», аспирант кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; e-mail: ekolab-ilin@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование финансировало АО «ЭКОлаб».

Благодарность. Выражаем благодарность сотрудникам медицинского центра ЭКОлаб (г. Электрогорск) за помощь в работе с коллекцией биоматериала.

Поступила 11.11.2024
Принята к печати 13.11.2024
Опубликовано 25.01.2025

Ilyin I.I.^{1,2}, Belyakov I.S.¹, Mardanly S.G.^{1,2}

GENOTYPING OF HPV IN UROGENITAL SMEARS BY REAL-TIME DIRECT PCR

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region «State University of Humanities and Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Introduction. The use of direct PCR, without nucleic acid extraction, for detection of infectious agents is a good alternative to routine PCR: it reduces the risk of contamination, doubles the time to obtain a result, and lowers the cost of the study. Direct PCR methodology for genotyping of 18 HPV types in multiplex format has been developed. Primary and repeated detection of HPV of high oncogenic risk is a risk factor for the development of cervical dysplasia.

Material and methods. 60 gynecologic smears were examined by direct PCR developed by JSC EKOLab and 60 DNA from them by a reference non-direct kit produced by NextBio (Moscow). All detected HPV genotypes were confirmed by Sanger sequencing.

Results. The data obtained with the two kits and Sanger sequencing matched. The highest relative frequency was found for HPV16 and 39 types (13.3%), the frequency of detection was increased for HPV6, 33 and 58 to 11.7%, and in the case of HPV56, 59 to 10%. In ten samples out of 60 (16.7%), HPV coinfection was detected and the frequency of HPV66 coinfection was increased.

Discussion. The HPV genotyping data obtained are consistent with earlier findings of a high relative frequency of detection of HPV16 and 31 type genotypes. A lower relative frequency of detection of samples with high-risk HPV coinfection was noted. Our sample showed a high frequency of HPV66 coinfection as in the data from China and Paraguay. Direct PCR and HPV genotyping, along with self-sampling kits, make HPV screening more accessible, which is important for both HPV prevention and screening of cervical dysplasia and cancer.

Conclusion. HPV genotyping was successfully performed using direct PCR technology.

Key words: direct PCR; HPV genotyping; HPV vaccination; cervical dysplasia; cervical cancer

For citation: Ilyin I.I., Beliakov I.S., Mardanly S.G. Genotyping of HPV in urogenital smears by real-time direct PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 135-140 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-135-140 EDN: SQDAJV

For correspondence: Ilyin Ilya Igorevich, microbiologist of the scientific and production department of PCR of JSC «EKOlab», postgraduate student of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines GGTU; e-mail: ekolab-ilin@mail.ru
Information about authors:

Ilyin I.I., <https://orcid.org/0009-0003-0316-7260>;

Beliakov I.S., <https://orcid.org/0000-0002-1313-2729>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding. The study was funded by JSC «EKOlab».

Acknowledgment. We thank the staff of the EKOlab Medical Center (Elektrogorsk) for their assistance with the biomaterial collection.

Received 11.11.2024

Accepted 13.11.2024

Published 25.01.2025

Введение. Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) позволяет быстро определить возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) в клиническом материале [1]. Чувствительность рутинного ПЦР достаточна для определения от нескольких сотен копий генома инфекционного агента [2]. Известны ингибиторы ПЦР, присутствующие в биоматериале (гемы белков-гемопротеинов, полисахариды и др.). Необходимость постановки ПЦР, минуя выделение нуклеиновых кислот (НК), снижает риск контаминации, ошибок при проведении исследования, ускоряет как ручной вариант методики, так и экстракцию с применением автоматических станций [7]. Прямая ПЦР, минуя выделение НК, подходит для ускорения диагностики образцов с низким содержанием интерферентов и высокой копийностью инфекционного агента. Благодаря данной технологии возможно качественное выявление целевой НК, в данном случае – ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты)

вируса папилломы человека. Генотипирование вирусов папилломы человека (ВПЧ) – главной причины рака шейки матки и других ВПЧ-ассоциированных опухолей – важный критерий для правильного ведения ВПЧ-положительных пациентов в ходе скрининга и лечения ВПЧ-инфекций [1]. Для принятия решения о вакцинации взрослого пациента квадριвалентной (6, 11, 16, 18) или нонавалентной (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) вакцинами, необходимо предварительное генотипирование ВПЧ для исключения инфекции.

В компании ЭКОлаб накоплен значительный опыт применения прямой ПЦР и создания наборов с применением (табл. 1) данной технологии. Новый набор по генотипированию ВПЧ в прямом формате сравнивался с референсным набором с обязательной предварительной экстракцией образца (непрямой метод ПЦР) компании НекстБио (Россия) на коллекции ВПЧ-положительных образцов.

Таблица 1

Наборы реализации технологии прямой ПЦР

Наборы	Производитель	Номер регистрационного удостоверения	Определяемые возбудители инфекции
КовидЭк Директ	АО ЭКОлаб	РЗН 2022/17966 от 12.08.2022	SARS-CoV-2
УроЭК Директ	АО ЭКОлаб	РЗН 2023/21534 от 16.11.2023	<i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>
ВПЧ-Эк Директ	АО ЭКОлаб	Подготовка к регистрации	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82

Материал и методы. Урогенитальные мазки в транспортной среде КовидЭк Директ (АО «ЭКОлаб») получены в медицинском центре ЭКОлаб (г. Электрогорск) квалифицированным гинекологом по рутинным показаниям. Для сравнительного исследования, в обезличенной форме, отобрано 60 ВПЧ-положительных

образцов. Все образцы мазков и ДНК хранились при температуре –20 С.

ВПЧ-генотипирование проведено с использованием набора ВПЧ-Эк Директ (16 типов ВПЧ высокого риска и 2 низкого риска) и референсного набора – Ампли-Прайм ВПЧ ВКР 14 генотип (14 генотипов ВПЧ высо-

кого риска) (РЗН 2020/11951, НекстБио).

В 20 мкл мастермикса прямой ПЦР ВПЧ-Эк Директ, содержащего смесь олигонуклеотидов и компонентов ПЦР, добавляли 5 мкл мазка в транспортной среде (КовидЭк Директ, ЭКОлаб).

Для референсного набора АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14 генотип ДНК выделяли с помощью набора Магно-Прайм ВПЧ (РЗН 2020/12397, НекстБио) в соответствии с рекомендациями производителя.

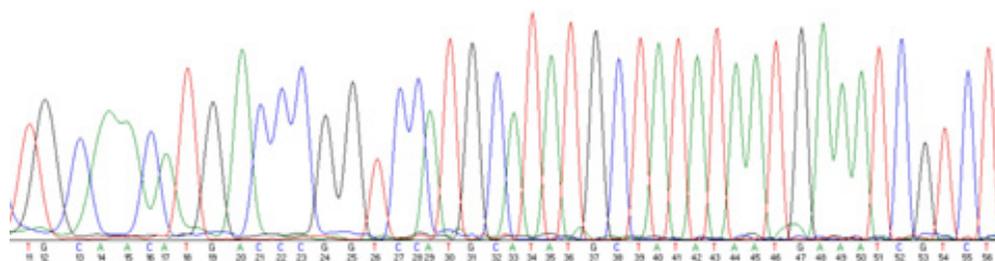
Исследовано 60 гинекологических мазков и 60 образцов ДНК из них. Концентрация ДНК определена с помо-

щью прибора NanoDrop One (США). В работе использованы образцы с концентрацией ДНК более 20 нг/мкл.

Результаты ПЦР анализировали вручную на приборах ДТ-прайм (ДНК-технология) и СFX96 (BioRad) в соответствии с инструкциями к наборам.

Результаты ПЦР подтверждены прямым секвенированием по Сэнгеру продуктов ПЦР (размером от 80 п.н.) (Евроген, Москва) для всех выявленных ВПЧ-генотипов с помощью праймеров набора ЭКОлаб.

Верификация генотипов ВПЧ выполнена с помощью сравнения полученных при секвенировании



Фрагмент результата секвенирования по Сэнгеру образец № 14 (ВПЧ 66).

Таблица 2

Результаты генотипирования ВПЧ прямым ПЦР и референсным набором

№ образца	Генотипирование ВПЧ		Секвенирование по Сэнгеру	№ образца	Генотипирование ВПЧ		Секвенирование по Сэнгеру
	ВПЧ-Эк Директ	ВПЧ ВКР 14 генотип			ВПЧ-Эк Директ	ВПЧ ВКР 14 генотип	
1	+	+	6	31	+	+	52
2	+	+	58	32	+	+	(66,6,16,45)*
3	+	-+++	(11,31,39,51)*	33	+	+	18
4	+	+	(6,66)*	34	+	+	33
5	+	+	33	35	+	+	33
6	+	+	45	36	+	-+	56
7	+	+	31	37	+	+	(68,66,51,33)*
8	+	+	6	38	+	+	56
9	+	+	33	39	+	+---	16
10	+	+	18	40	+	+	68
11	+	+	33	41	+	+	16
12	+	+	39	42	+	+	56
13	+	+	59	43	+	+	39
14	+	+	(66,33,31)*	44	+	+	56
15	+	+	59	45	+	+	16
16	+	+	(16,51)*	46	+	+	16
17	+	+	(35,52)*	47	+	+	16
18	+	+	52	48	+	+	68
19	+	+	58	49	+	+	39
20	+	+	6	50	+	+	58
21	+	+	11	51	+	+	(6,35,52)*
22	+	+	18	52	+	+	16
23	+	+	39	53	+	+	58
24	+	+	59	54	+	+	6
25	+	+	59	55	+	+	56
26	+	-	39	56	+	+	16
27	+	+	52	57	+	+	58
28	+	+	58	58	+	+	82, 59
29	+	+	(11,39)*	59	+	+	56
30	+	+	18	60	+	+	58

Примечание. * - Каждый генотип ВПЧ подтверждался секвенированием независимо.

нуклеотидных последовательностей и базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank (NCBI, США) с помощью программы BLAST (NCBI, США).

Результаты. При генотипировании 60 образцов выявлены следующие типы ВПЧ (табл. 2). С помощью набора ВПЧ-Эк Директ при помощи технологии прямой ПЦР выявлено 10 генотипов низкого онкогенного риска, 67 генотипов высокого риска. С помощью набора АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14 генотип (НекстБио) с предварительным этапом экстракции выявлено 66 генотипов высокого риска. Генотип ВПЧ 82, выявленный набором ЭКОлаб в образце 58, как и генотипы низкого риска ВПЧ 6 и 11, не входят в состав референсного набора.

Все результаты подтверждены секвенированием по Сенгеру (Евроген, Москва) с помощью праймеров набора, разрабатываемого ЭКОлаб.

Подтверждение результата генотипирования осуществлено прямым секвенированием продукта ПЦР независимо для каждого генотипа ВПЧ. Результат секвенирования в программе Chromas 2.6.6 преобразуется из хроматограммы в последовательность нуклеотидов (см. рисунок). Генотип ВПЧ определен сравнением результатов секвенирования с базой данных GenBank (NCBI, США) с помощью программы BLAST (NCBI, США).

Результаты, полученные технологией прямой ПЦР от АО ЭКОлаб, подтверждены секвенированием по

Таблица 3

Частота выявленных генотипов ВПЧ в Москве и Московской области

Генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска [цит. по 13,14]	Относительная частота, %		
	ЭКОлаб	О.Ю.Шипулина, 2013 [цит. по 15]	Е. Shipitsyna, 2010*[цит.по 16]
	n=60	n=440	n=84
16	13,3	6	23,8
18	6,7	-	4,8
31	5,0	2,9	17,9
33	11,7	-	9,5
35	3,3	-	3,6
39	13,3	-	2,4
45	1,7	-	4,8
51	5,0	-	2,4
52	8,3	-	9,5
56	10,0	-	7,1
58	11,7	-	3,6
59	10,0	-	2,4
66	5,0	-	2,4
68	5,0	-	6,0
73	0,0	-	Н.а.
82	0,0	-	Н.а.

Примечание. * - Данные по г. Санкт-Петербург (РФ).

Остается высокой относительная частота встречаемости ВПЧ высокого онкогенного риска 16, несмотря на значительный период времени с начала вакцинации (табл. 3).

В десяти образцах из 60 (16,7%) выявлена коинфекция ВПЧ с одним и более генотипами высокого онко-

генного риска, в половине случаев с коинфекцией выявлены генотипы низкого риска (табл. 4). Чаще всего в образцах с коинфекцией выявлен генотип ВПЧ 66 в 40% (4/10), генотипы 11, 16, 31, 33, 35, 39, 51, 52 в 20% (2/10), реже генотипы 45, 59, 68, 82 в 10% (1/10).

Таблица 4

Образцы с коинфекцией ВПЧ

Образец	Генотипы ВПЧ	
	Низкого риска	Высокого риска
3	11	31, 39, 51
4	6	66
14	-	31, 33, 66
16	-	16, 51
17	-	35, 52
29	11	39
32	6	16, 45, 66
37	-	33, 51, 66, 68
51	6	35, 52
58	-	59, 82

Сенгеру, и полностью согласуются с референсным набором НекстБио.

По результатам подсчитана частота встречаемости исследованных генотипов. Наибольшая относительная частота выявлена у ВПЧ 16 и 39 типов (13,3%), ВПЧ 6, 33, 58 (11,7%), ВПЧ 56, 59 (10%). Результаты представлены в табл. 3.

Обсуждение. Полученные данные генотипирования ВПЧ согласуются с ранее полученными данными О.Ю. Шипулиной [15] для образцов из Москвы и Московской области и дополняют их данными генотипирования 4-х генотипов ВПЧ высокого риска (см. табл. 3). Относительная частота ВПЧ 31 вдвое выше по сравнению с данными этого автора [15]. Сравнение с данными Е.В. Шипицыной и соавторов [16] указывает на различие в частоте распространенности генотипов ВПЧ на территории Российской Федерации, и возрастание частоты образцов с коинфекцией ВПЧ высокого канцерогенного риска [16]. Аналогично нашим данным, в работе С.Л. Murall и соавт. [20] в образцах с коинфекцией выявлена наибольшая частота генотипов ВПЧ 51, 66, 53, 52. Высокая частота коинфекции ВПЧ 66 выявлена в регионе внутренняя Монголия [23]. По данным М.Л. Bobadilla и соавторов [19], выявлено 42% образцов с коинфекцией, в которых доминировал ВПЧ 56. Эти авторы исследовали 35 генотипов ПВЧ, что вероятно и увеличило частоту выявления коинфекции ВПЧ по сравнению с нашими данными – 16,7%.

Коинфекция - фактор риска сниженного клиренса ВПЧ и повышенного риска развития дисплазий и рака шейки матки. Коинфекция ВПЧ высокого риска выявляется в 25% остроконечных кондилом и является фактором риска малигнизации кондилом [17]. Аналогично для пациентов с коинфекцией генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска выявлен повышенный риск развития дисплазий шейки матки тяжелой степени [11, 12].

Интересно оценить изменение относительной частоты ВПЧ-генотипов за период вакцинации от ВПЧ [20, 22]. После регистрации в Российской Федерации Гардасила (Мерк, США) квадريفалентной вакцины (генотипы 6, 11, 16, 18) в 2006 году прошло 18 лет. Поскольку ни одна из двух вакцин от ВПЧ не включена в Национальный календарь прививок, сложно оценивать индивидуальную эффективность вакцинации от ВПЧ даже при полном соблюдении схемы вакцинации. Возможно, с появлением отечественной вакцины компании «Нанолек» вакцинация против ВПЧ станет доступнее для населения или будет включена в Национальный календарь прививок.

Заключение. Успешно проведено генотипирование ВПЧ ($n=60$) при помощи технологии прямой ПЦР. Наблюдается совпадение полученных результатов исследования (реализация прямой ПЦР на примере разрабатываемого набора ВПЧ-Эк Директ) с референсным набором для сравнения (коммерческий набор для амплификации АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14 генотип, экстракция для которого проводилась при помощи набора для выделения нуклеиновых кислот МагноПрайм ВПЧ). В десяти образцах из шестидесяти (16,7%) выявлена коинфекция ВПЧ, отмечается повышенная частота коинфекции ВПЧ 66.

Прямая ПЦР, при которой минует этап экстракции нуклеиновых кислот, может использоваться при geno-

типировании вируса папилломы человека без искажения итогового результата, поскольку данные в сравнении с зарегистрированным набором (ДНК прошло этап выделения) одинаковы. Экстракция ДНК, к примеру, методом очистки при помощи магнитных частиц [24], на данном этапе развития технологии ПЦР и предшествующих ей этапов, всё ещё считается необходимой для количественной оценки инфекционного агента, но качественное выявление нуклеиновых кислот инфекционных агентов, в частности ДНК ИППП [25], генотипирование ВПЧ, возможно и при помощи прямой ПЦР.

Технология прямой ПЦР позволяет серьёзно ускорить качественное выявление ДНК ВПЧ в клинических образцах, что делает быстрее и доступнее скрининг ВПЧ-инфекции. Это является важным как для этапа профилактики, так и для скрининга дисплазий и рака шейки матки у женщин.

ЛИТЕРАТУРА (П П . 1 - 9 , 1 1 - 1 4 , 1 6 - 2 3 С М . REFERENCES)

10. Кравцова Е.А., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Ибрагимова М.К. ВПЧ-ассоциированный рак шейки матки: современное состояние и перспективы. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(3): 42-54.
15. Шипулина О.Ю. Эпидемиологические особенности и меры профилактики онкогинекологической патологии папилломавирусной этиологии. Дисс.... М.; 2013.
24. Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы С.С. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (10): 650-7. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657>.
25. Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г. Молекулярно-генетическая диагностика ИППП. Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24 ноября 2023 г. С.Г. Марданлы, В.А. Киселева, В.В. Помазанов, ред. Электрогорск: АО «ЭКОлаб»; Орехово-Зуево: ГГТУ; Оболенск: Национальное научно-практическое общество бактериологов ассоциация бактериологов; Ростов-на-Дону: ФГБОУ ВО «Государственный медицинский университет Минздрава России»; 2023.

REFERENCES

1. H zur Hausen H. Papillomaviruses - to vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)*. 2008 May; 73 (5) : 498-503.
2. Biassoni R., Raso A. Quantitative real-time PCR. *Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Springer New York. 2020; 2065.
3. Pandori MW., Lei J., Wong EH., Klausner J., Liska S. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction. *BMC Infect. Dis*. 2006 Jun 24; 6: 104.
4. Park S.J., Kim J.Y., Yang Y.G., Lee S.H. Direct STR amplification from whole blood and blood or saliva-spotted FTA without DNA purification. *J. Forensic. Sci*. 2008 Mar; 53(2): 335-41.
5. Pastorino B., Bessaud M., Grandadam M., Murri S., Tolou H.J., Peyrefitte C.N. Development of a TaqMan(R) RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *Journal of Virological Methods*. 2005; 124: 65-71.
6. Sakai K., Wakasugi S., Muchemwa FC., Ihn H. Quick detection of herpesviruses from skin vesicles and exudates without nucleic acid extraction using multiplex PCR. *BioScience Trends*. 2008; 2 (4): 164-8.
7. Yang Y.G., Kim J.Y., Song Y.H., Kim D.S. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Clin. Chim. Acta*. 2007 May 1; 380 (1-2): 112-7.
8. Nishimura N., Nakayama T., Tonoike H., Kojima K., Kato S. Direct

- polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *AnnClin. Biochem.* 2000; 37 (Pt 5): 674–80.
9. Wang R., Guo X.L., Wisman G.B., Schuurin E., Wang W.F., Zeng Z.Y., Zhu H., Wu S.W. Nationwide prevalence of human papillomavirus infection and viral genotype distribution in 37 cities in China. *BMC Infect. Dis.* 2015 Jul 4; 15: 257.
 10. Kravtsova E.A., Tsyganov M.M., Litvyakov N.V., Ibragimova M.K.. HPV-associated cervical cancer: current status and perspectives. *Acta biomedica scientifica.* 2023; 8(3): 42-54. (in Russian)
 11. Bonde J., Bottari F., Parvu V., Pedersen H., Yanson K., Iacobone A.D., et al. Bayesian analysis of baseline risk of CIN2 and CIN3 by HPV genotype in a European referral cohort. *Int. J. Cancer.* 2019; 145(4): 1033-41.
 12. Sand F.L., Munk C., Frederiksen K., Junge J., Iftner T., Dehlendorff C., et al. Risk of CIN3 or worse with persistence of 13 individual oncogenic HPV types. *Int. J. Cancer.* 2019; 144(80): 1975-82.
 13. Schmitt M., Depuydt C., Benoy I., Bogers J., Antoine J., Arbyn M., Pawlita M. (May 2013). Prevalence and viral load of 51 genital human papillomavirus types and three subtypes. *International Journal of Cancer.* 132 (10): 2395–2403.
 14. Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., et al. (International Agency for Research on Cancer Multi-center Cervical Cancer Study Group) (February 2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". *The New England Journal of Medicine.* 348 (6): 518–27.
 15. Shipulina O.Yu. Epidemiologic features and measures of prevention of onco-gynecologic pathology of papillomavirus etiology. Diss.... Moscow; 2013. (in Russian)
 16. Shipitsyna E., Zolotoverkhaya E., Kuevda D., Nasonova V., Romanyuk T., Khachatryan A. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus types and cervical squamous intraepithelial lesions in women over 30 years of age in St. Petersburg, Russia. *Cancer Epidemiol.* 2011 Apr; 35(2):160-4.
 17. Cong X., Sun R., Zhang X., Wang Y., Wang L., Yu Y. Correlation of human papillomavirus types with clinical features of patients with condyloma acuminatum in China. *Int. J. Dermatol.* 2016 Jul; 55(7):775-80.
 18. Lan J., Walboomers J.M., Roosendaal R., van Doornum G.J., MacLaren D.M., Meijer C.J., van den Brule A.J. Direct detection and genotyping of Chlamydia trachomatis in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993 May; 31(5):1060-5.
 19. Bobadilla M.L., Villagra V., Ortiz V., Deluca G., de Paula V.S. High prevalence and co-infection of high-risk Human Papillomavirus genotypes among unvaccinated young women from Paraguay. *PLoS One.* 2023 Apr 6; 18(4):e0283542.
 20. Murall C.L., Reyné B., Selinger C., Bernat C., Boué V., Grasset S. et al. HPV cervical infections and serological status in vaccinated and unvaccinated women. *Vaccine.* 2020 Dec 3; 38(51):8167-74.
 21. Cohen P.A., Jhingran A., Oaknin A., Denny L. Cervical cancer. *Lancet.* 2019 Jan 12; 393(10167):169-82.
 22. Drolet M., Bénard É., Pérez N., Brisson M. HPV Vaccination Impact Study Group. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2019 Aug 10; 394(10197): 497-509.
 23. Ji Y., Ma X.X., Li Z., Peppelenbosch M.P., Ma Z., Pan Q. The Burden of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis Coinfection in Women: A Large Cohort Study in Inner Mongolia, China. *J. Infect. Dis.* 2019 Jan 7; 219(2): 206-14.
 24. Zhigaleva O.N., Ilyin I.I., Mardanly S.G., Mardanly S.S. Development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids from clinical material based on magnetic adsorption. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2023; 68(10): 650-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657. (in Russian)
 25. Zhigaleva O.N., Ilyin I.I., Mardanly S.G. Molecular genetic diagnosis of STIs. [Perspektivy vnedreniya innovatsionnykh tekhnologiy v meditsine i farmatsii]. Proceedings of the X All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation, November 24, 2023. S.G. Mardanly, V.A. Kiseleva, V.V. Pomazanov, eds. Elektrogorsk: JSC «EKOlab»; Orekhovo-Zuevo: State University of Humanities and Technology; Obolensk: National Scientific and Practical Society of Bacteriologists Association of Bacteriologists; Rostov-on-Don: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "State Medical University of the Ministry of Health of Russia"; 2023. (in Russian)

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Ивойлов О.О.^{1,3}, Кочетов А.Г.^{1,2}, Сальникова Ю.П.³, Велицкая О.А.³

ТРУДОЗАТРАТЫ ПЕРСОНАЛА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НА ПРОВЕДЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

¹ АНО ДПО «Институт лабораторной медицины», 117042, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

³ ООО «НПФ «Хеликс», 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Автоматизация и информатизация современной медицинской лаборатории существенно изменила трудовой процесс выполнения наиболее распространенных гематологических исследований: общего клинического анализа крови (ОАК) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ). В настоящее время отсутствует понимание фактической трудоемкости этих исследований, что препятствует эффективному расчету себестоимости, обоснованному формированию штатного расписания и нормированию труда.

Цель исследования - определение трудоемкости выполнения ОАК и СОЭ из венозной и капиллярной крови на современном автоматизированном оборудовании на основе анализа структуры и величины трудозатрат персонала.

Материал и методы. Изучение трудозатрат персонала было проведено методом фотохронометража. Оснащение рабочих мест было представлено автоматизированными гематологическими анализаторами технологии 5-дифф, модулями окраски мазков и анализаторами СОЭ. Информатизация обеспечивалась двунаправленной связью всех анализаторов с лабораторной информационной системой и применением программного обеспечения – «менеджера результатов». Подсчет лейкоцитарной формулы в венозной крови выполнялся с использованием цифрового анализатора изображения клеток крови, в капиллярной – светового микроскопа. Применена авторская методика исследования трудозатрат.

Результаты. Определены классифицированные перечни стандартных манипуляций, формирующих трудовой процесс рабочих мест медицинских лабораторных техников и врачей клинической лабораторной диагностики и биологов, замерена их продолжительность. Выполнен расчет компонентов постоянных и переменных трудозатрат. Установлено, что для среднего персонала полная трудоемкость выполнения ОАК (в комплексе с автоматизированным определением СОЭ) из венозной крови составляет 25,7 – 37,1 с, а из капиллярной – 75,2 – 125,1 с, в зависимости от аналитической процедуры исследования. Трудоемкость ОАК для врачей/биологов определяется прежде всего вероятностью проведения подсчета лейкоцитарной формулы и составляет 26,6 с для венозной крови и 33,3 с для капиллярной при пересмотре 12 % от общего числа образцов. В случае выполнения подсчета лейкоцитарных формул в 100 % образцов указанные значения достигают 170,5 с и 226,7 секунд, соответственно. Переменные трудозатраты среднего медицинского персонала на проведение исследований с использованием капиллярной крови в 4,6 раза превышают затраты при использовании венозной крови.

Заключение. Примененный в работе метод позволил определить структуру трудового процесса по выполнению автоматизированных гематологических исследований, объективно охарактеризовать их трудоемкость и получить стратифицированные данные о величине переменных трудозатрат, пригодные к использованию при нормировании труда персонала современной лаборатории в условиях изменяющейся нагрузки. Высокие трудозатраты на выполнение исследований из капиллярной крови связаны с сохранением в их аналитических процедурах существенной доли ручного труда, что ставит вопрос о выделении ОАК из капиллярной крови в отдельную номенклатуру медицинских услуг.

Ключевые слова: лаборатория; автоматизация; хронометраж; нормирование труда; трудозатраты; общий анализ крови (ОАК); скорость оседания эритроцитов (СОЭ)

Для цитирования: Ивойлов О.О., Кочетов А.Г., Сальникова Ю.П., Велицкая О.А. Трудозатраты персонала автоматизированной медицинской лаборатории на проведение гематологических исследований. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 141-151.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-141-151>

EDN: TERGGE

Для корреспонденции: Ивойлов Олег Олегович, канд. мед. наук, преподаватель АНО ДПО «Институт лабораторной медицины», ведущий аналитик по развитию процессов лабораторного производства ООО «НПФ «Хеликс»; e-mail: kbld@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность за организационное содействие в выполнении работы руководителям и сотрудникам лабораторных комплексов ООО «НПФ «Хеликс»: Болотиной Л.В., Вильгельми А.А., Поповцевой А.В., Прохоровой Ю.Ю.

Поступила 21.12.2024

Принята к печати 24.12.2024

Опубликовано 25.01.2025

Ivoylov O.O.^{1,3}, Kochetov A.G.^{1,2}, Salnikova Yu.P.³, Velitskaya O.A.³

LABOR COSTS OF AUTOMATED MEDICAL LABORATORY STAFF FOR PERFORMING HEMATOLOGICAL TESTS

¹ Institute of Laboratory Medicine, 117042, Moscow, Russia;

² Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russia;

³ LLC «Research and Production Firm «HELIX», Saint-Petersburg, Russia

Relevance. Automation and informatization of a modern medical laboratory have significantly changed the work process of performing the most common hematological tests: general clinical blood test (CBC) and erythrocyte sedimentation rate (ESR). Currently, there is no understanding of the actual labor intensity of these tests, which hinders the effective calculation of costs, the reasonable formation of staffing schedules and labor standardization.

Objective. The aim of the study was to determine the labor intensity of performing CBC and ESR from venous and capillary blood on modern automated equipment based on an analysis of the structure and amount of personnel labor costs.

Materials and methods. The study of staff labor costs was conducted using the work sampling method. The equipment of workplaces was represented by automated hematological analyzers of 5-diff technology, smear staining modules and ESR analyzers. Informatization was ensured by bidirectional communication of all analyzers with the laboratory information system and the use of software - "results manager". The white blood cell count in venous blood was performed using a digital blood cell image analyzer, and in capillary blood, a light microscope. An original method for studying labor costs was applied.

Results. Classified lists of standard manipulations that form the labor process of the workplaces of medical laboratory technicians and clinical laboratory diagnostic doctors and biologists have been determined, and the duration of standard manipulations has been measured. The components of fixed and variable labor costs were calculated. It has been established that for mid-level personnel, the total labor intensity per test of performing a CBC (in combination with automated determination of ESR) from venous blood is 25.7 - 37.1 seconds, and from capillary blood - 75.2 - 125.1 seconds, depending on the analytical procedure of the test. The labor intensity of the CBC for doctors/biologists is determined mainly by the probability of performing the calculation of the leukocyte formula and is 26.6 seconds for venous blood and 33.3 seconds for capillary blood when reviewing 12% of the total number of samples. In the case of performing the calculation of leukocyte formula in 100% of samples, these values reach 170.5 and 226.7 seconds, respectively. The variable labor costs of mid-level medical personnel for conducting studies using capillary blood are 4.6 times higher than the costs when using venous blood.

Conclusions. The method used in the work made it possible to determine the structure of the labor process for performing automated hematological tests, objectively characterize their labor intensity and obtain stratified data on the value of variable labor costs, suitable for use in rationing the labor of modern laboratory personnel under changing workload conditions. High labor costs for performing tests from capillary blood are associated with the preservation of a significant share of manual labor in their analytical procedures, which raises the question of isolating a CBC from capillary blood into a separate nomenclature of medical services.

Key words: laboratory; automation; time-and-motion study; labor rationing; labor costs; complete blood count; ESR

For citation: Ivoylov O.O., Kochetov A.G., Salnikova Yu.P., Velitskaya O.A. Labor costs of automated medical laboratory staff for performing hematological tests. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 141-151 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-141-151>

EDN: TERGGE

For correspondence: Ivoylov O.O., PhD, Lecturer of The Institute of Laboratory Medicine; Lead Analyst for the development of laboratory production processes at Helix Laboratories; e-mail: kblid@mail.ru

Information about authors:

Ivoylov O.O., <https://orcid.org/0000-0002-4684-8440>;

Kochetov A.G., <https://orcid.org/0000-0003-3632-291X>;

Salnikova Yu.P., <https://orcid.org/0009-0000-0186-3535>;

Velitskaya O.A., <https://orcid.org/0009-0004-6975-1643>.

Funding. The study had no sponsor support.

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

Acknowledgment. The authors express their sincere gratitude for organizational assistance in carrying out the study to the heads and employees of the laboratory complexes of LLC «Research and Production Firm «HELIX»: L.V. Bolotina, A.A. Vilgelmi, A.V. Popovtseva, Yu.Yu. Prokhorova.

Received 21.12.2024

Accepted 24.12.2024

Published 25.01.2025

Введение. Общий (клинический) анализ крови (ОАК) является самым востребованным лабораторным исследованием [1] и традиционно считается отправной точкой диагностического поиска. В связи с большим количеством назначений во многих медицинских лабораториях для его выполнения выделены полноценные подразделения или отдельные участки. Использование автоматизированных гематологических анализаторов и информатизация в значительной степени преобразили методологию и организационные аспекты проведения ОАК и сопутствующих ему тестов, в первую очередь исследования скорости оседания эритроцитов (СОЭ). В то же время нормативно-правовая база, регламенти-

рующая работу диагностических подразделений, по-прежнему не учитывает современные технологические особенности медицинского оборудования, а штатная численность персонала не регулируется в зависимости от оснащения [2]. Существующие типовые нормы времени¹, на которые иной раз пытаются опираться как организаторы, так и сотрудники здравоохранения, были разработаны еще в прошлом веке и ориентированы на использование ручных методов и устаревших гематологических анализаторов, ныне практически уже не ¹Приказ Минздрава РФ от 25.12.1997 г. № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». <https://base.garant.ru/4173965/>.

используемых.

Степень автоматизации выполнения одних и тех же гематологических тестов может отличаться в зависимости от биологического материала. Технологии работы с образцами венозной крови в крупных лабораториях в настоящее время стремятся к реализации концепции «total laboratory automation» (TLA) [3]. Исследование капиллярной крови сохраняет больше элементов ручного труда в силу неадаптированности автоматических анализаторов и линий к работе с микропробирками, а также в связи с небольшим количеством и вариативным качеством самого биоматериала [4]. Однако количество таких образцов остаётся значительным, в немалой степени в силу того, что многие пациенты предпочитают взятие капиллярной крови, отказываясь от венопункции [5].

Следует отметить неполное соответствие федеральных кодификаторов реальным технологиям лечения и оказания услуг [6]. Протоколы проведения гематологических исследований варьируют в зависимости от оснащения и профиля деятельности лабораторий. Номенклатура медицинских услуг, определенная приказом Минздрава РФ от 13.10.2017 г. № 804н², содержит лишь две формулировки для анализа крови (обычный и расширенный) и не конкретизирует измеряемые аналиты, что допускает вольное их толкование. В различных вариантах коммерческих медицинских услуг это может быть ОАК без исследования лейкоцитарной формулы³, либо с автоматизированной дифференцировкой лейкоцитов по популяциям⁴, либо с микроскопией мазка после исследования на анализаторе⁵. Последняя может выполняться как выборочно, на основе разработанных лабораторией правил валидации результата, так и обязательно. Часто вместе с ОАК комплексно выполняют и СОЭ⁶. Таким образом, упоминая ОАК, мы в реальности говорим о целой группе технологически взаимосвязанных, но вариативных с точки зрения трудового процесса исследований.

Адекватная оценка трудозатрат на выполнение ОАК и СОЭ в их современном виде важна как для понимания потребности в персонале ключевых подразделений лабораторий, так и для расчета себестоимости самых распространённых диагностических услуг. В то же время в профессиональной литературе нет публикаций, представляющих систематизированные данные по анализу трудового процесса и нормированию труда при выполнении гематологических исследований, а также описывающих методологические подходы к их получению. Современные нормативные документы, регламентирующие выполнение лабораторных исследований, в частности приказ Минздрава РФ от 18.05.2021 г.

№ 464⁷, эти аспекты не затрагивают.

Целью настоящей работы являлось определение трудоёмкости выполнения ОАК и СОЭ из венозной и капиллярной крови на современном автоматизированном оборудовании на основе анализа структуры и величины трудозатрат персонала.

Материал и методы. Исследование прямых трудозатрат сотрудников отделов общей клиники и гематологии было проведено в 2023 году методом фотохронометража на базе лабораторных комплексов г. Санкт-Петербурга и г. Москвы ООО «НПФ «Хеликс». Замеры времени проводились на рабочих местах среднего медицинского персонала (медицинские лабораторные техники) и персонала лаборатории с высшим образованием (врач клинической лабораторной диагностики, биолог), выполняющих гематологические исследования. Трудовой процесс был оценен от момента поступления первично отсортированных образцов венозной и капиллярной крови из преаналитического подразделения в отдел общей клиники и гематологии до моментов валидации результатов и архивации проб. Автоматизация процесса на момент проведения исследования была обеспечена использованием следующего оборудования: анализаторы гематологические «Mindray» моделей BC 6200, BC 6800 (с дифференцировкой лейкоцитов по 5 популяциям), анализаторы СОЭ «Alifax» моделей TEST1, Roller (выполнение СОЭ методом капиллярной фотометрии), автоматизированные модули окраски мазков крови. Подсчет лейкоцитарной формулы венозной крови выполнялся на цифровом анализаторе изображения клеток крови (автоматизированном сканере мазков крови) «CellaVision» DM96, а капиллярной – с использованием светового микроскопа. Информатизация была обеспечена двунаправленной связью всех анализаторов с лабораторной информационной системой (ЛИС) и применением специального программного обеспечения (ПО) – менеджера результатов гематологических исследований «Extended IPU».

В работе применена авторская «Методика исследования трудозатрат персонала медицинской лаборатории» [7] в связи с отсутствием в литературе и нормативных актах каких-либо иных общепринятых методологических подходов. Она основана на изложенных нами взглядах в ранее опубликованной статье о стратификации компонентов затрат лаборатории [8]. Методика включала следующие этапы: определение границ хронометрируемого рабочего места, анализ трудового процесса методом фотографии рабочего места⁸, выделение перечня стандартных манипуляций трудового процесса с их классификацией по видам и компонентам затрат, подготовка карты фотохронометража, прямые замеры времени выполнения стандартных манипуляций.

Статистическая обработка, расчет компонентов трудозатрат и их моделирование были выполнены по отдельным аналитическим процедурам (АП) с помощью табличного инструмента, созданного в MS Excel. Описательная статистика количественных переменных, основанных на времени, в связи с особенностями хро-

²Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13.10.2017 г. N 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг». <https://base.garant.ru/71805302/>.

³Каталог медицинских услуг Лабораторной службы Хеликс: Общий анализ крови (без лейкоцитарной формулы и СОЭ). <https://helix.ru/catalog/item/02-014>.

⁴Каталог медицинских услуг Лабораторной службы Хеликс: Лейкоцитарная формула (с микроскопией мазка крови при выявлении патологических изменений). <https://helix.ru/catalog/item/02-025>.

⁵Каталог медицинских услуг Лабораторной службы Хеликс: Клинический анализ крови: микроскопией лейкоцитарной формулы. <https://helix.ru/catalog/item/02-041>.

⁶Каталог медицинских услуг Лабораторной службы Хеликс: Клинический анализ крови: общий анализ, лейкоцитарная формула, СОЭ (с микроскопией мазка крови при выявлении патологических изменений). <https://helix.ru/catalog/item/02-029>.

⁷Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» (с изменениями и дополнениями). <https://base.garant.ru/400839855/>.

⁸Приказ Минтруда России от 31.05.2013 г. № 235 «Об утверждении методических рекомендаций для федеральных органов исполнительной власти по разработке типовых отраслевых норм труда». <https://mintrud.gov.ru/docs/mintrud/orders/76>.

нометража лабораторных исследований представлена в виде диапазона границ минимального и максимального значений и центрального значения диапазона, а также в виде средневзвешенного значения. Средневзвешенные значения более эффективны для оценки времени обработки 1 образца при хронометражных замерах разных по количеству образцов поступлений биоматериала. Расчёт данного показателя проводился по суммарным замерам времени для всех поступлений и сумме образцов во всех партиях, вес отдельных замеров был принят за единицу. Средневзвешенные значения использовались в дальнейших расчетах формул. Доверительные интервалы (95% ДИ) частот/долей рассчитывались методом Уилсона с учетом объема выборки и поправки на непрерывность.

Термин «аналитическая процедура» (АП) был введен и используется нами в качестве обозначения номенклатурной единицы типового трудового процесса, характеризующегося определённой трудоемкостью. АП можно определить как документально установленную процедуру лабораторного исследования отдельного аналита (совокупности аналитов, в случае ОАК), основанную на физико-химических принципах определенного лабораторного метода, выполняемую на оборудовании опреде-

ленного рабочего места с использованием уникального набора реактивов (расходных материалов) и алгоритма действий [7]. При анализе трудового процесса были установлены несколько АП, характеризующих разные протоколы гематологических исследований (лабораторных услуг), имеющих в своей основе ОАК (табл. 1). В рамках базового ОАК определяли следующие аналиты и индексы: количество лейкоцитов, эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, распределение эритроцитов по объему, количество тромбоцитов, распределение тромбоцитов по объему, средний объем тромбоцита, коэффициент больших тромбоцитов. Основным методом определения СОЭ была капиллярная фотометрия. Манипуляции, связанные с данным методом, включены в соответствующие АП. Исследование СОЭ по Панченкову, ограниченно используемое лишь в целях профосмотров и выполняемое из венозной крови, было учтено как отдельная АП вне протоколов ОАК. Определение содержания ретикулоцитов, с точки зрения организации трудового процесса и состава манипуляций, производилось по АП «ОАК + СОЭ» в венозной крови.

Таблица 1

Протоколы проведения аналитических процедур гематологических исследований на основе ОАК

Аналитическая процедура	Протокол проведения
ОАК + СОЭ, - в капиллярной крови - в венозной крови	1. Выполнение общего анализа крови на гематологическом анализаторе без оценки лейкоцитарной формулы 2. Исследование СОЭ методом капиллярной фотометрии на анализаторе
ОАК + ДИФФ + СОЭ + % микрокопии, - в капиллярной крови - в венозной крови	1. Выполнение общего анализа крови на гематологическом анализаторе с оценкой лейкоцитарной формулы по 5 популяциям 2. Исследование СОЭ методом капиллярной фотометрии на анализаторе 3. Микроскопия мазка с подсчетом лейкоцитарной формулы в случаях, определенных правилами (по назначению программным обеспечением-менеджером результатов)
ОАК + ДИФФ + СОЭ + микрокопия, - в капиллярной крови - в венозной крови	1. Выполнение общего анализа крови на гематологическом анализаторе с оценкой лейкоцитарной формулы по 5 популяциям 2. Исследование СОЭ методом капиллярной фотометрии на анализаторе 3. Микроскопия мазка с подсчетом лейкоцитарной формулы
ОАК, - в венозной крови*	1. Выполнение общего анализа крови на гематологическом анализаторе без оценки лейкоцитарной формулы
ОАК + ДИФФ, - в венозной крови*	1. Выполнение общего анализа крови на гематологическом анализаторе с оценкой лейкоцитарной формулы по 5 популяциям

Примечание. * - Выполняются отдельно, как исследования в целях профосмотров.

Элементы нормирования труда, приведенные в работе, основывались на величине годового бюджета рабочего времени специалистов лаборатории, рассчитанного с учетом результатов специальной оценки условий труда. Он был определен исходя из расчета нормы рабочего времени для 39-часовой рабочей недели¹, за вычетом 5 недель отпуска, и составил 6 243 840 секунд.

Результаты. Структура и продолжительность стандартных манипуляций трудового процесса рабочих мест, задействованных в выполнении гематологических исследований, представлена в табл. 2, 3. Ма-

нипуляции были классифицированы по компонентам, определена их кратность или периодичность выполнения (для постоянных трудозатрат), или их пропорциональность единице предмета труда (для переменных трудозатрат). Поскольку состав манипуляций в исследованиях венозной и капиллярной крови отличался, в отношении работы с образцами даны пояснения, к какому виду биоматериала они относятся. Отдельно обозначены пункты, касающиеся выполнения выделенной АП – определения СОЭ методом Панченкова.

В лабораторных подразделениях, где проводились исследования, были развернуты 2 типа рабочих мест среднего персонала, отличающихся по зонам ответственности и, как следствие, по составу стандартных манипуляций (табл. 2). Рабочее место № 2 медицинского лабораторного техника характеризуется, в большей степени, разнородными ручными действиями и обязан-

¹Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 13.08.2009 г. № 588н «Об утверждении порядка исчисления нормы рабочего времени на определенные календарные периоды времени (месяц, квартал, год) в зависимости от установленной продолжительности рабочего времени в неделю». <https://www.garant.ru/hotlaw/federal/205744/>.

ностями по общему контролю рабочего процесса. В то же время, рабочее место № 1 предусматривает более

простой функционал, определяемый, как операторская работа на автоматических анализаторах.

Таблица 2

Структура и продолжительность стандартных манипуляций трудового процесса рабочих мест среднего персонала лаборатории (медицинского лабораторного техника)

Стандартные манипуляции трудового процесса		Средне-взвешенное значение, с	Центральное значение, с	Диапазон, с	Периодичность	Рабочее место № 1	Рабочее место № 2
1. Постоянные трудозатраты на обслуживание рабочего места (FTw)							
1.1	Подготовка рабочего места к работе: дезинфекция, пополнение расходного материала		353	266-440	2 раза в сутки	+	+
1.2	Мытье и обработка рук		68	60-75	10 раз в сутки	+	+
1.3	Надевание / смена перчаток		24	16-32	10 раз в сутки	+	+
1.4	Заполнение листов регистрации температуры		60	50-70	2 раза в сутки	+	-
1.5	Списание расходных материалов и реагентов для работы		300	210-390	2 раза в сутки	+	+
1.6	Подготовка, проверка реагентов и запуск гематологических анализаторов		245	233-258	4 раза в сутки	-	+
1.7	Подготовка и запуск модуля автоматизированной окраски мазков		82	79-85	1 раз в сутки	-	+
1.8	Подготовка и запуск анализаторов СОЭ «TEST1»		284	256-312	1 раз в сутки	-	+
1.9	Подготовка и запуск анализатора СОЭ «Roller»		125	117-138	1 раз в сутки	-	+
1.10	Выгрузка биоматериала из лифта		81	59-103	24 раза в сутки	+	-
1.11	Выполнение промывки гематологических анализаторов		39	31-46	8 раз в сутки	+	-
1.12	Подготовка пробирок с дистиллятом и промывка анализатора СОЭ «TEST1» (после каждой партии)		67	55-78	44 раза в сутки	+	-
1.13	Опустошение резервуаров для жидких отходов анализаторов СОЭ «TEST1», «Roller»		120	115-125	2 раза в сутки	+	-
1.14	Промывка и рестарт анализатора СОЭ «Roller» (после каждой партии)		167	126-213	14 раз в сутки	+	-
1.15	Архивирование протокола с анализатора СОЭ «TEST1», «Roller» (после каждой партии)		23	21-24	58 раз в сутки	+	-
1.16	Замена красителя и фиксатора для окраски мазков по Романовскому		185	146-224	5 раз в сутки	-	+
1.17	Приготовление буфера по Романовскому		440	420-460	1 раз в неделю	-	+
1.18	Окраска партии капиллярной крови по Романовскому вручную (до 20 стекол в штативе)		47	44-50	10 раз в сутки	-	+
1.19	Пополнение дистиллята		390	360-420	1 раз в неделю	-	+
1.20	Мониторинг проб «Cito»		18	14-22	24 раза в сутки	-	+
1.21	Работа с архивом: поиск проб при поступлении запросов		900	600-1200	Суммарно за сутки	-	+
1.22	Работа с проблемными образцами (с нарушением преаналитики, с нечитаемым штрих-кодом, выполнение назначенных повторов)		6600	5400-7800	Суммарно за сутки	-	+
1.23	Работа с ошибками в анализаторах		2600	1800-3600	Суммарно за сутки	-	+
1.24	Уборка и дезинфекция рабочего места текущая		109	68-150	6 раз в сутки	+	+
1.25	Уборка и дезинфекция рабочего места заключительная		330	300-360	1 раз в сутки	+	+
1.26	Транспортировка штативов с отработанными образцами в архив		600	540-660	2 раза в сутки	+	-
1.27	Подготовка отчета о смене		96	72-120	1 раз в сутки	-	+
1.28	Еженедельная генеральная уборка		2200	1800-2400	1 раз в неделю	+	-
2. Постоянные трудозатраты на подготовку АП к работе (FTa)							
2.1	СОЭ по Панченкову: приготовление 5% цитрата натрия		384		Периодически*	-	+
2.2	СОЭ по Панченкову: формирование журнала		51	22-79	Ежесерийно**	-	+
2.3	СОЭ по Панченкову: подготовка к постановке (принести штатив, дозировать цитрат, распечатать журнал)		69	60-78	Ежесерийно	-	+
2.4	СОЭ по Панченкову: уборка штативов СОЭ, контейнеров с капиллярами в дезинфекционную		32	28-35	Ежесерийно	+	-

Стандартные манипуляции трудового процесса	Средне-взвешенное значение, с	Центральное значение, с	Диапазон, с	Периодичность	Рабочее место № 1	Рабочее место № 2	
3. Переменные трудозатраты на подготовку АП к работе (АВТа)							
3.1	Замена флакона лизирующего раствора / дилуэнта в гематологическом анализаторе		45	40-50	На 1 флакон	+	-
3.2	Замена канистры дилуэнта в гематологическом анализаторе		125	97-152	На 1 канистру	+	-
3.3	Замена тубы флюоресцентного красителя в гематологическом анализаторе		41	38-44	На 1 тубу	+	-
3.4	Загрузка упаковки предметных стекол в модуль окраски мазков		77	69-85	На 1 упаковку	+	-
3.5	Замена флакона фиксатора / красителя в модуле окраски мазков		141	125-157	На 1 флакон	+	-
3.6	Считывание смарт-карты анализаторов СОЭ «TEST1», «Roller»		44	39-49	На 1 карту	-	+
4. Переменные трудозатраты на отдельное исследование (АВТt)							
4.1	Вен. кровь: визуальная проверка качества образца, перемешивание, размещение в штативе гематологического анализатора, загрузка в анализатор	2,7	2,3	1,4-3,2	На 1 образец	+	-
4.2	Вен. кровь: перестановка образца из штатива гематологического анализатора в штатив анализатора СОЭ «TEST1», загрузка в анализатор	2,5	2,5	2,3-2,7	На 1 образец	+	-
4.3	Венозная кровь: выгрузка из анализатора СОЭ «TEST1» и перестановка образца в рабочий штатив	1,4	1,4	1,3-3,5	На 1 образец	+	-
4.4	Капиллярная кровь: визуальная проверка качества образца, установка в шейкер	3,3	3,4	3,2-3,5	На 1 образец	+	-
4.5	Капиллярная кровь: проверка образца при подозрении на сгустки	21,0	21,0	18,1-23,9	На 1 образец (до 10% образцов)	+	-
4.6	Капиллярная кровь: последовательное исследование образца на гематологическом анализаторе и на анализаторе СОЭ «Roller», через ручные пробоборники	50,6	50,8	50,5-51,5	На 1 образец	+	-
4.7	Венозная кровь / Капиллярная кровь: сканирование штрих-кода образца на необходимость выполнения мазка / архивация образца (в ПО –менеджере результатов)	2,3	2,2	1,9-2,5	На 1 образец	-	+
4.8	Венозная кровь: загрузка/выгрузка образца в штатив модуля окраски мазков	1,6	2,0	1,1-3,2	На 1 образец	-	+
4.9	Венозная кровь: извлечение окрашенных стекол из штатива модуля окраски мазков	5,2	5,2	4,8-5,6	На 1 образец	+	-
4.10	Капиллярная кровь: печать штрих-кода для маркировки мазка	9,2	9,2	9,0-9,3	На 1 образец	-	+
4.11	Капиллярная кровь: нанесение мазка вручную	27,3	26,8	25,0-28,5	На 1 образец	-	+
4.12	Капиллярная кровь: маркировка стекла штрих-кодом	6,8	6,4	5,0-7,8	На 1 образец	-	+
4.13	Венозная кровь / Капиллярная кровь: архивация образца в ЛИС	2,0	2,2	1,8-2,6	На 1 образец	+	-
4.14	СОЭ по Панченкову: вторичная сортировка проб для выполнения исследования	5,5	5,5	3,0-8,0	На 1 образец	-	+
4.15	СОЭ по Панченкову: расстановка образцов и выполнение методики	24,1	19,5	10,2-26,8	На 1 образец	-	+
4.16	СОЭ по Панченкову: снятие результата, внесение в протокол	10,2	6,4	2,8-13,0	На 1 образец	-	+

Примечание. * – Периодичность определяется для данной АП; ** – в каждую аналитическую серию: определяется для данной АП, в соответствии с количеством проводимых аналитических серий в год.

Рабочее место специалиста с высшим образованием в основном ассоциировано с действиями по микроскопии и валидации результатов (табл. 3). Микроскопия мазков крови выполняется по результатам автоматизированной оценки лейкоцитарной формулы и имеет вероятность 12 % для первичных образцов в составе аналитической процедуры «ОАК + ДИФФ + СОЭ +

% микроскопии». Она также проводится обязательно в том случае, если была исходно заказана (соответствует АП «ОАК + ДИФФ + СОЭ + микроскопия»).

Продолжительность стандартных манипуляций суммировалась с учетом кратности (или вероятности) их выполнения в той или иной АП по соответствующим компонентам. Те, в свою очередь, учитывались

стратифицировано, по принадлежности к виду затрат времени: FT (fixed labor time) – постоянные трудозатраты, в расчете на 1 год работы, и AVT (unit average variable labor time) – переменные трудозатраты, представленные в виде удельных трудозатрат на 1 (одно) лабораторное исследование (ЛИ) каждой из выполняемых на рабочем месте АП. При этом постоянные тру-

дозатраты оценивались в виде двух отдельных компонентов: на обслуживание рабочего места (FT_w) и на подготовку АП к работе (FT_a). Это связано с особенностями их использования в расчете трудоемкости: первые распределяются на общее число выполняемых на рабочем месте ЛИ, а вторые – на количество ЛИ только этой АП.

Таблица 3

Структура и продолжительность стандартных манипуляций трудового процесса рабочего места специалиста с высшим образованием (врач клинической лабораторной диагностики / биолог)

	Стандартные манипуляции трудового процесса	Средне-взвешенное значение, с	Центральное значение, с	Диапазон, с	Периодичность
1. Постоянные трудозатраты на обслуживание рабочего места (FT_w)					
1.1	Подготовка рабочего места к работе: дезинфекция, пополнение расходного материала		180	120-240	2 раза в сутки
1.2	Мытье и обработка рук		68	60-75	8 раз в сутки
1.3	Надевание / смена перчаток		24	16-32	8 раз в сутки
1.4	Списание расходных материалов и реагентов для работы		140	120-180	1 раз в сутки
1.5	Подготовка к работе сканера мазков		240	180-300	1 раз в сутки
1.6	Контроль обработки проб «Cito» в течение рабочей смены		60	45-75	5 раз в сутки
1.7	Отмена заказов для образцов, выполнение исследований в которых невозможно		129	67-190	5 раз в сутки
1.8	Работа в ЛИС: внесение комментариев, работа с критическими значениями		700	600-900	Суммарно за сутки
1.9	Работа с почтой, IC, ответы на запросы		1380	720-2280	Суммарно за сутки
1.10	Консультации с коллегами		620	360-900	Суммарно за сутки
1.11	Поиск образцов / препаратов для срочного выполнения		400	300-600	Суммарно за сутки
1.12	Исследование виртуальных препаратов по программам внешней оценки качества, (общее нормативное время на отработку заданий 1 цикла всеми врачами в штате)		50400	-	Суммарно, каждые 4 месяца
1.13	Уборка и дезинфекция рабочего места по мере загрязнения / заключительная		100	60-120	3 раза в сутки
1.14	Подготовка отчета о смене		220	180-240	1 раз в сутки
1.15	Еженедельная генеральная уборка		1400	1200-1800	1 раз в неделю
2. Постоянные трудозатраты на подготовку АП к работе (FT_a) - не выделено					
3. Переменные трудозатраты на подготовку АП к работе (AVT_a) - не выделено					
4. Переменные трудозатраты на отдельное исследование (AVT_t)					
4.1	Венозная кровь: просмотр и сортировка изображений клеток в ПО сканера мазков	82,6	81,6	66,9-99,2	На 1 образец
4.2	Венозная кровь: извлечение стекла из штатива сканера мазков, считывание штрих-кода и валидация результата в ПО – менеджере результатов	15,1	15,5	10,4-19,3	На 1 образец
4.3	Венозная кровь / Капиллярная кровь: сканирование штрих-кода стекла, ручная микроскопия мазка с подсчетом лейкоцитарной формулы, внесение и валидация результата в ПО – менеджер результатов, экспорт в ЛИС (либо отмена заказа)	209,6	209,6	88,0-503,0	На 1 образец
4.4	Венозная кровь / Капиллярная кровь: постановка задачи медлабтехнику на повторное исследование образца крови	68,0	68,0	53,0-83,0	На 1 образец (до 8% образцов, подлежащих микроскопии)
4.5	Венозная кровь / Капиллярная кровь: финальная валидация и авторизация результата в ЛИС	4,4	4,9	3,5-6,3	На 1 образец

Постоянные трудозатраты на обслуживание рабочих мест в расчете на год работы составили: 5,1 млн. с. и 6,1 млн. с для рабочих мест среднего персонала №1 и №2, соответственно, и 2,4 млн. с. для рабочего места врача/ биолога. Постоянные трудозатраты на подготов-

ку АП к работе были определены только для исследования СОЭ по Панченкову и составили 220 тыс. с в год.

Итоговое значение AVT складывалось из компонентов переменных трудозатрат: AVT_a , и AVT_t , характеризовавших, соответственно, подготовительные действия

с реагентами (расходными материалами) в расчете на 1 ЛИ и непосредственную работу по выполнению ЛИ из образца.

Полная трудоемкость 1 ЛИ ($t_{\text{ЛИ}}$) любой АП оценивалась по формуле (1):

$$t_{\text{ЛИ}} = AVT + \frac{FT_w}{Q_w} + \frac{FT_a}{Q_a} \quad (1),$$

где: AVT – величина удельных переменных затрат на 1 ЛИ для данной АП;

FT_w – постоянные трудозатраты на обслуживание рабочего места, за год;

Q_w – количество всех выполняемых в течение года

ЛИ на данном рабочем месте;

FT_a – постоянные трудозатраты на подготовку данной АП к работе, за год;

Q_a – количество выполняемых в течение года ЛИ данной АП.

С целью представления данных в удобном для их обсуждения и моделирования виде трудозатраты обоих рабочих мест среднего персонала, исходно рассчитанные отдельно, были суммированы. Полученные величины ОАК приведены в табл. 4. Переменные трудозатраты исследования СОЭ по Панченкову, выполняемого в виде отдельной АП, составили 42,2 с на 1 ЛИ, а полная трудоемкость – 58,0 секунд.

Таблица 4

Удельные значения переменных трудозатрат (AVT) и полная трудоемкость ($t_{\text{ЛИ}}$) аналитических процедур в соответствии с долей выполняемых гематологических исследований на основе ОАК

Аналитическая процедура (АП)	Доля исследований по виду биоматериала, % (95%ДИ)	Доля исследований относительно всех видов биоматериала, % (95%ДИ)	Средний персонал		Специалисты с высшим образованием	
			AVT , с	$t_{\text{ЛИ}}$, с	AVT , с	$t_{\text{ЛИ}}$, с
Биоматериал: венозная кровь						
ОАК + СОЭ*	6,3% (6,24-6,36%)	5,7% (5,65-5,75%)	13,4	25,7	4,4	7,0
ОАК + ДИФФ + СОЭ + % микроскопии	75,5% (75,4-75,6%)	68,4% (68,3-68,5%)	15,1	27,4	24,0	26,6
ОАК + ДИФФ + СОЭ + микроскопия	4,0% (3,95-4,05%)	3,6% (3,56-3,64%)	24,8	37,1	167,9	170,5
ОАК	2,2% (2,17-2,23%)	2,0% (1,97-2,03%)	9,5	21,8	4,4	7,0
ОАК + ДИФФ	12,0% (11,9-12,1%)	10,9% (10,8-11,0%)	11,1	23,4	24,0	26,6
Итого, из венозной крови, %	100,0%	90,5% (90,4-90,6%)				
Средневзвешенное значение для АП венозной крови, с			14,8	27,1	28,1	30,7
Биоматериал: капиллярная кровь						
ОАК + СОЭ	3,5% (3,37-3,63%)	0,3% (0,29-0,31%)	62,9	75,2	4,4	7,0
ОАК + ДИФФ + СОЭ + % микроскопии	78,6% (78,3-78,9%)	7,4% (7,34-7,46%)	69,3	81,6	30,7	33,3
ОАК + ДИФФ + СОЭ + микроскопия	17,9% (17,6-18,2%)	1,7% (1,67-1,73%)	112,8	125,1	224,1	226,7
Итого, из капиллярной крови, %	100,0%	9,5% (9,43-9,57%)				
Средневзвешенное значение для АП капиллярной крови, с			76,8	89,1	64,3	66,9
Итого, все виды биоматериалов, %		100 %				

Примечание. * – АП идентична для определения содержания ретикулоцитов.

Обсуждение. Трудовой процесс выполнения гематологических исследований из венозной крови имеет высокую степень автоматизации. Образцы, первично отсортированные в преаналитическом подразделении, после поступления в отдел лаборатории немедленно переставляются в штативы гематологических анализаторов и отправляются на линию, где выполняется автоматизированный ОАК без или с лейкоцитарной формулой, либо исследование количества ретикулоцитов, в зависимости от заказа. Затем происходит загрузка всех проб в анализатор СОЭ. Выполнение необходимых исследований на этих этапах обеспечивается штрихкодированием и двунаправленной связью с ЛИС. При этом вторичная сортировка между автоматизированным выполнением ОАК и СОЭ является избыточным дей-

ствием. В тех относительно редких случаях, когда последнее исследование не заказано, образец просто проходит через анализатор без каких-либо материальных затрат. Такая практика работы принята в лабораторном комплексе Санкт-Петербурга. В Москве же в процессе изучения трудового процесса был выявлен сохранившийся этап сортировки образцов между ОАК и СОЭ. Моделирование данных показало, что отказ от него при текущих количествах исследований, может сэкономить труд, эквивалентный 1,9 ставкам среднего персонала в год. После выполнения автоматизированного анализа гематологические образцы поступают на вторичную сортировку с помощью специального ПО – менеджера результатов, определяющего возможность их архивации или необходимость окраски и микроскопии мазка

крови. На этом базовая АП «ОАК + СОЭ» завершается, а дальнейшие действия других АП в отношении микроскопического исследования выполняются либо вероятностно, на основе разработанных критериев, применяемых к полученным результатам, либо обязательно, согласно требованию лабораторного заказа.

Вероятность подготовки и просмотра мазка крови оказалась фактором, влияющим на трудозатраты АП (см. табл. 4). Несмотря на попытки экспертных групп разработать единые правила принятия решений для выполнения микроскопии [9], в разных лабораториях критерии устанавливаются самостоятельно и могут от-

личаться. На вероятность выполнения микроскопического исследования может повлиять и контингент обследуемых пациентов: амбулаторный или стационарный, преобладающий профиль нозологии. Это сказывается на количестве образцов крови, подлежащих микроскопическому исследованию. С целью сравнительной оценки масштабов влияния данного фактора на трудозатраты ОАК в сопоставлении с нагрузкой на персонал, было выполнено моделирование значений удельных переменных трудозатрат (AVT) для различных сценариев, связанных с изменением количества поступающих проб и процентной доли их микроскопии.

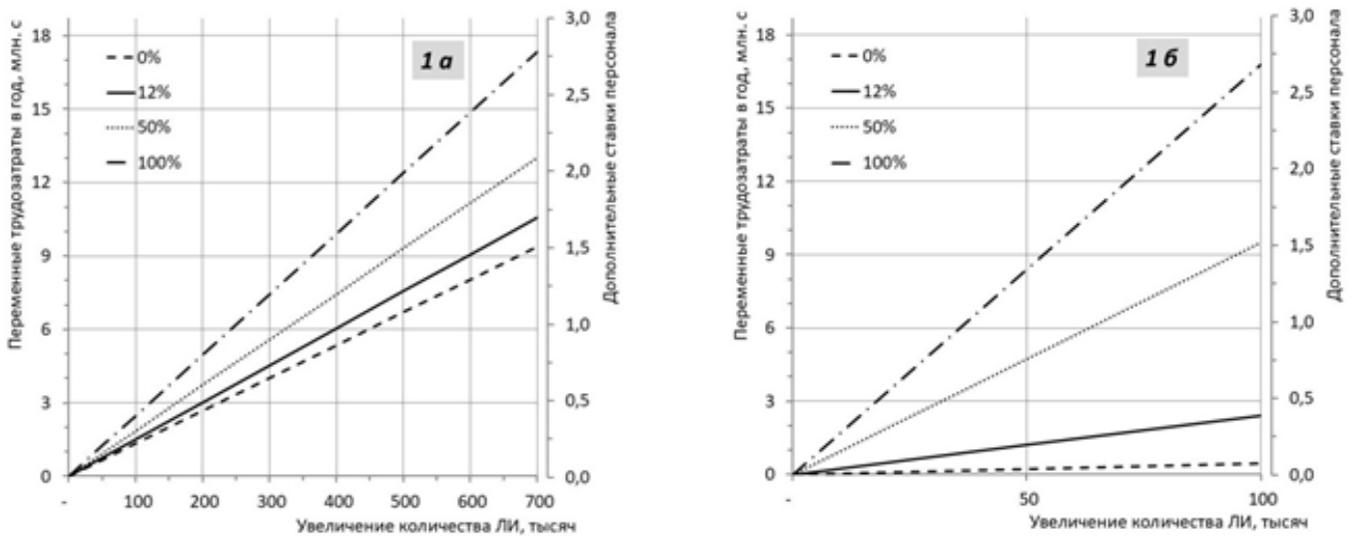


Рис. 1. Динамика роста годовых трудозатрат (в миллионах секунд) с увеличением количества ЛИ (в тысячах в год), выполняемых из образцов венозной крови по аналитической процедуре «ОАК + ДИФФ + СОЭ + % микроскопии». Графики моделируют ситуации для различной вероятности окраски и микроскопии мазка крови (0 %, 12 %, 50 %, 100 %). Сплошная линия соответствует текущей вероятности (для 12 % образцов). Дополнительная ось справа интерпретирует трудозатраты в ставках специалистов. а – трудозатраты среднего персонала лаборатории; б – трудозатраты специалистов с высшим образованием.

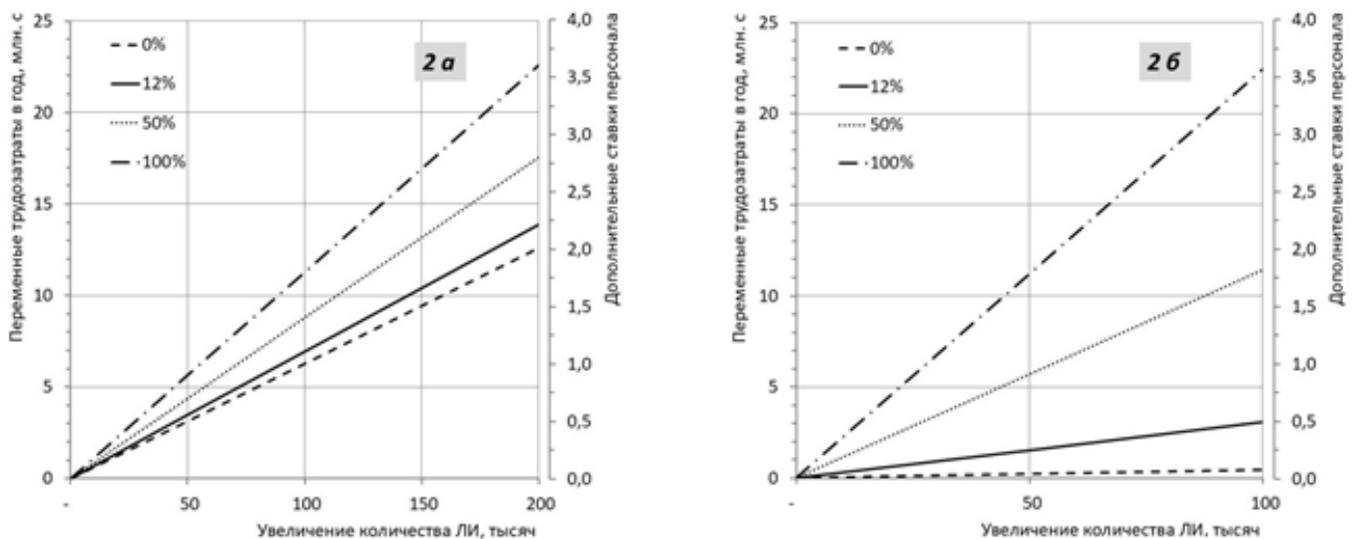


Рис. 2. Динамика роста годовых трудозатрат (в миллионах секунд) с увеличением количества ЛИ (в тысячах в год), выполняемых из образцов капиллярной крови по аналитической процедуре «ОАК + ДИФФ + СОЭ + % микроскопии». Графики моделируют ситуации для различной вероятности окраски и микроскопии мазка крови (0 %, 12 %, 50 %, 100 %). Сплошная линия соответствует текущей вероятности (для 12 % образцов). Дополнительная ось справа интерпретирует трудозатраты в ставках специалистов. а – трудозатраты среднего персонала лаборатории; б – трудозатраты специалистов с высшим образованием.

Влияние такого фактора, как приготовление мазка из венозной крови для медицинского лабораторного техника (рис. 1, а) не столь велико, что связано со значительной автоматизацией этого процесса в рассматриваемых лабораториях. Но в отношении врачебного персонала, основная деятельность которого связана именно с подсчетом лейкоцитарной формулы, вероятность этого фактора является определяющим в нормировании труда (рис. 1, б). Так увеличение количества венозных образцов, подлежащих микроскопии с 12 до 50 % на каждые 100 тыс. проб приведет к трехкратному росту потребности в штате, с 0,5 дополнительных ставок до 1,5 ставок.

Одноименные АП для капиллярной крови отличаются от венозной как существенно более трудозатратные (см. табл. 4). Это связано с относительно низкой степенью автоматизации трудового процесса. Работа с капиллярной кровью выполняется на анализаторах с ручными пробоотборниками, мазок крови наносится на предметное стекло и окрашивается также вручную. Результаты моделирования трудозатрат свидетельствуют о том, что при увеличении количества поступающих образцов капиллярной крови на 100 тыс. в год дополнительная потребность в среднем персонале (рис. 2, а) будет эквивалентна ситуации с ростом обрабатываемого количества проб венозной крови на 450 – 500 тыс. (см. рис. 1, а).

Опосредованным следствием применения средним персоналом ручных техник работы с капиллярной кровью являются и увеличенные трудозатраты врача (рис. 2, б). В отличие от венозной крови, в данном случае не используется автоматизированный сканер мазков, а микроскопия выполняется традиционно, с помощью светового микроскопа. Это обусловлено тем, что одним из ограничений для цифрового анализа изображений клеток крови считается именно неоптимальное качество мазков, обусловленное их ручным нанесением или окрашиванием. Сканер в этом случае может неверно выбирать области: слишком плотные или разреженные для корректного выполнения исследования [10]. Другое ограничение потенциально связано с качеством самого биоматериала. Взятие капиллярной крови сопровождается повышенным риском преаналитических ошибок, наиболее распространенным проявлением которых является активация процессов свертывания и образование сгустков в образце [11]. Это создает дополнительные риски применения автоматизированных сканеров типа «CellaVision», поскольку они не определяют агрегаты тромбоцитов, за исключением случаев, когда те присутствуют в мазке в большом количестве [10].

Высокая трудоемкость исследования капиллярной крови потенциально ставит вопрос отделения его от венозной в независимую номенклатуру медицинских услуг, что позволит применять дифференцированные тарифы и таким образом опосредовано управлять количествами таких образцов. Приверженность и пациентов, и врачей этому виду биоматериала носит, в немалой степени, традиционный, субъективный характер и не подтверждается объективными оценками. Например, исследование, проведенное в больнице для новорожденных в Канаде, показало, что медсестры, в отличие от пациентов и врачей, считали процесс вене-

пункции менее трудоемким, менее болезненным для младенца и более простым методом получения образца, чем взятие капиллярной крови [12]. Напротив, в стационарах РФ приходится наблюдать ситуацию, когда явно отдаваемое предпочтение этому виду материала в некоторых клинических отделениях носит преднамеренный характер перераспределения обязанностей от их дежурного персонала в сторону лаборатории. Это связано с тем, что традиционно за венопункцию отвечает медицинская сестра процедурного кабинета, а за взятие крови из пальца – фельдшер-лаборант, хотя до принятия профессионального стандарта специалиста в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием¹ не было нормативных актов, предоставляющих среднему персоналу лаборатории право на взятие крови [13]. Указанный профессиональный стандарт принят лишь в 2020 году, носит больше рекомендательный характер и не подкреплён в части трудовых действий обязательными законодательными нормами [14].

Представленные в работе значения трудозатрат не следует считать абсолютными для всех современных автоматизированных методов гематологических исследований. Трудоемкость их может изменяться в зависимости от организации трудового процесса, состава стандартных манипуляций, распределения обязанностей и, естественно, оборудования рабочих мест лаборатории. Дальнейший сдвиг гематологического оснащения лабораторных комплексов «Хеликс» в сторону ТЛА, связанный с объединением в одной линии гематологических анализаторов со встроенными СОЭ-метрами, модуля окраски мазков и их автоматизированного сканера безусловно потребует корректировки списка стандартных манипуляций и итоговых значений трудозатрат персонала в отношении АП венозной крови.

Заключение. Примененный в работе метод оценки трудозатрат позволил определить структуру трудового процесса по выполнению автоматизированных гематологических исследований, объективно охарактеризовать их трудоемкость и получить стратифицированные данные о величине переменных трудозатрат, пригодные к использованию при нормировании труда персонала современной лаборатории в условиях изменяющейся нагрузки. Фактором, определяющим финальную трудоемкость, особенно для врачей и биологов, является вероятность подготовки и подсчёта лейкоцитарной формулы мазка крови, в связи с чем наиболее трудозатратной аналитической процедурой в рамках каждого биоматериала является «ОАК + ДИФФ + СОЭ + микроскопия». Переменные трудозатраты среднего персонала на выполнение исследований из капиллярной крови выше в 4,6 раза по сравнению с венозной, что связано с сохранением в их аналитических процедурах существенной доли ручного труда. В связи с этим представляется актуальным вопрос о выделении ОАК из капиллярной крови в отдельную номенклатуру медицинских услуг.

¹Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 31.07.2020 г. № 473н "Об утверждении профессионального стандарта "Специалист в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием". <https://cdnstatic.rg.ru/uploads/attachments/193/91/31/59303.pdf>.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 3-5, 9-12 С.М. REFERENCES)

1. Свешчинский М.Л., Кокарева Т.С., Плюснина С.В., Черных С.В. Оценки использования лабораторных исследований в учреждениях первичной медико-санитарной помощи. *Лабораторная служба*. 2017; 6(3): 206-13. DOI: 10.17116/labs201763206-213.
2. Билалов Ф.С., Сквирская Г.П., Сон И.М. Организация работы диагностических подразделений медицинских организаций, оказывающих помощь в амбулаторных условиях. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2017; 25(3): 155-60. DOI: 10.18821/0869-866X-2017-25-3-155-160.
3. Николаева М.Ю., Зотов В.А. Особенности ценообразования лабораторных анализов при оказании платных услуг в государственном лечебном учреждении в современных рыночных условиях. *Лабораторная служба*. 2016; 5(3): 19.
4. Ивойлов О.О. Методика исследования трудозатрат персонала медицинской лаборатории. *www.researchgate.net*. 2021; Доступно по адресу: https://www.researchgate.net/publication/355031944_Metodika_issledovaniya_trudozatrat_personala_meditsinskoj_laboratorii. Последнее обращение декабрь 2024. DOI: 10.13140/RG.2.2.12058.57288.
5. Ивойлов О.О., Кочетов А.Г. Метод анализа типовой структуры прямых затрат в себестоимости лабораторного теста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(3): 187-92. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192.
6. Соловьёв А.Г., Лянг О.В., Кочетов А.Г. Правомочность взятия капиллярной крови специалистами лабораторной службы. *Лабораторная служба*. 2015; 4(4): 57-60. DOI: 10.17116/labs20154457-60.
7. Рекомендации по применению профессиональных стандартов в организации (утв. Министерством труда и социальной защиты РФ). ГАРАНТ.ру. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72817320/> (дата обращения: 17.12.2024).
8. Nassar B. Evaluation of the impact of a total automation system in a large core laboratory on turnaround time. *Clinical Biochemistry*. 2016; 49(16-17): 1254-8. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.018.
9. Krleza J.L., Dorotic A., Grzunov A., Maradin M. Capillary blood sampling: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochemia Medica*. 2015; 25(3): 335-58. DOI: 10.11613/BM.2015.034.
10. Doeleman M.J.H., 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*. 2023; 45(5): 659-67. DOI: 10.1111/ijlh.14080.
11. Николаева М.Ю., Зотов В.А. Features of laboratory tests price formation in modern medical market. *Laboratornaya sluzhba*. 2016; 5(3): 19. (in Russian)
12. Ivoylov O.O. The method for researching the labor costs of staff of medical laboratory. *www.researchgate.net*. 2021; Available at: https://www.researchgate.net/publication/355031944_Metodika_issledovaniya_trudozatrat_personala_meditsinskoj_laboratorii. Accessed December 2024. DOI: 10.13140/RG.2.2.12058.57288. (in Russian)
13. Ivoylov O.O., Kochetov A.G. A method for analyzing the typical structure of direct costs in the cost of a laboratory test. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(3): 187-92. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192. (in Russian)
14. Barnes P.W., McFadden S.L., Machin S.J., Simson E.; international consensus group for hematology. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Laboratory Hematology*. 2005; 11(2): 83-90. DOI: 10.1532/LH96.05019.
15. Da Costa L. Digital image analysis of blood cells. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2015; 35(1): 105-22. DOI: 10.1016/j.cll.2014.10.005.
16. Hjelmgren H., Nilsson A., Myrberg I.H., Andersson N., Ygge B.M., Nordlund B. Capillary blood sampling increases the risk of preanalytical errors in pediatric hospital care: Observational clinical study. *Journal for Specialists in Pediatric Nursing*. 2021; 26(4):e12337. DOI: 10.1111/jspn.12337.
17. Jewell S., Medves J., Duhn L., Boomhower K., Barrett J.A., Rivoire E. Implementation and evaluation of a best practice initiative: Venipuncture in the well baby. *Advances in Neonatal Care*. 2007; 7(5): 222-9. DOI: 10.1097/01.ANC.0000296629.03798.6c.
18. Solov'ev A.G., Lyang O.V., Kochetov A.G. The competence of capillary blood drawing by specialists of laboratory service. *Laboratornaya sluzhba*. 2015; 4(4): 57-60. DOI: 10.17116/labs20154457-60. (in Russian)
19. Recommendations for the Application of Professional Standards in the Organization (approved by the Ministry of Labor and Social Protection of the Russian Federation). ГАРАНТ.ру. Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72817320/> (accessed: 17 December 2024). (in Russian)

REFERENCES

1. Sveshchinskiy M.L., Kokareva T.S., Plyusnina S.V., Chernykh S.V. Analysis of the use of laboratory tests in primary care in the Russian region. *Laboratornaya sluzhba*. 2017; 6(3): 206-13. DOI: 10.17116/labs201763206-213. (in Russian)
2. Bilalov F.S., Skvirskaya G.P., Son I.M. The organization of functioning of diagnostic departments of medical organizations providing care in out-patient conditions. *Problemy sotsial'noy gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny*. 2017; 25 (3): 155-60. DOI: 10.18821/0869-866X-2017-25-3-155-160. (in Russian)
3. Lou A.H., Elnenaei M.O., Sadek I., Thompson S., Crocker B.D.,