

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера»

Акционерное общество
"ЭКОлаб"

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

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 69
8 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

АВГУСТ

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. Электротгорск, 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 20.07.2024.

Подписано в печать 01.08.2024

Формат 60 × 88%

Печать офсетная

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 8,95

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

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009 г.

ЭЛ № ФС77-80929 от 21.04.2021 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Micrology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biologi-
cal Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier
BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals,
Index Medicus, Index to Dental Literature, OCLC
Article First, Reactions Weekly (Print), Thomson Re-
uters 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://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849;

<https://www.pressa-rf.ru/rucont/edition/331548/>

ISSN: 0869-2084 (Print)

ISSN: 2412-1320 (Online)

Клин. лаб. диагностика. 2024. Том 69. № 08.
365-426

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 (Электротгорск, Россия);

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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

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

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

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

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

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

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

Осман Халил Ареф, к.б.н. (Хомс, Сирия)

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

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

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

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

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

LLC Publishing Group
"Media Sphera"

Joint Stock Company
"EKOLab"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 69
8 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

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. Tartakovsky, 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

Савельева Е. И., Алюшина Т. И., Шачнева М. Д., Добронравов В. А.

Метаболическое профилирование сыворотки крови пациентов с иммуноглобулин А нефропатией методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. 369

ИММУНОЛОГИЯ

Шитикова А.М., Бельских Э.С., Атрощенко М.М., Звягина В.И., Матвеева И.В.

Оценка влияния микропластика на жизнеспособность моноядерных лейкоцитов периферической крови при помощи проточной цитометрии с визуализацией (пилотное исследование) 377

ГЕМАТОЛОГИЯ

Гаджиев Н. Дж., Эйнуллаева Н. А.

Интегральные гематологические индексы при остром калькулезном холецистите. 387

МИКРОБИОЛОГИЯ

Миронова А.В.

Опыт применения автоматического бактериологического анализатора культур крови ЮОНА® Labstar в рутинной практике микробиологической лаборатории г. Москвы. 394

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Тоголян А.А.

Прогностическая оценка развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии 402

Омельчук Е.П., Тимошкина Н.Н., Росторгуев Э.Е., Дженкова Е.А.

Циркулирующие биомаркеры глиом (обзор литературы) 411

Огарков О.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А.

Разработка ПЦР-РВ метода для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале на основе полиморфизма гена белка теплового шока 421

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

Savelieva E.I., Alyushina T.I., Shachneva M.D., Dobronravov V.A.

Metabolic profiling of blood serum of patients with immunoglobulin A nephropathy using high-performance liquid chromatography - high-resolution tandem mass spectrometry369

IMMUNOLOGY

Shitikova A.M. , Belskikh E.S. , Atroshchenko M.M. , Zyyagina V.I. , Matveeva I.V.

Evaluation of the effect of microplastic on the viability of blood mononuclear leukocytes by imaging flow cytometry (pilot study)377

HEMATOLOGY

Hajiyev N.J., Eynullayeva N.A.

Integral hematological indexes in acute calculus cholecystitis.387

MICROBIOLOGY

Mironova A. V.

Experience of using the automatic bacteriological analyzer of blood cultures YUNON® LABSTAR in the routine practice of the microbiological laboratory of Moscow394

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Davydenko V.S., Ostankova Y.V., Schemelev A.N., Totolian A.A.

Prognostic assessment of hepatotoxicity in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy.402

Omel'chuk E.P., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Dzhenkova E.A.

Circulating biomarkers of gliomas (review of literature)411

Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Zhdanova S.N., Orlova E.A. Khromova P.A.

Development of a PCR-RT method for detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in clinical samples by polymorphism of gene heat shock protein421

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Савельева Е. И.¹, Алюшина Т. И.¹, Шачнева М. Д.¹, Добронравов В. А.²

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИММУНОГЛОБУЛИН А НЕФРОПАТИЕЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ – ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

¹Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, 188663, Ленинградская область, м. р-н Всеволожский, г.п. Кузьмолоское, Россия;

²Научно-исследовательский институт нефрологии при ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, 197089 Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Альтерации кишечного микробиома могут иметь значение для прогрессирования хронических болезней почек.

Цель – выявление биомаркеров, ассоциированных с микробиомом, для последующей оценки их клинического и диагностического значения.

Материал и методы. Объект анализа – 20 перекодированных (с исключением доступа к персональным данным) образцов сыворотки крови из коллекции НИИ нефрологии: 10 от добровольцев с отсутствием патологии почек и 10 от пациентов с клинико-морфологически подтвержденным диагнозом иммуноглобулин А нефропатия (IgAN). Для целевого метаболомного анализа разработана методика определения 16 биомаркеров (9 уремических токсинов, холин, 6 аминокислот) методом жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС ВР). Разделение компонентов проводили в режиме обращённофазовой градиентной ВЭЖХ. Детектирование при целевом анализе проводили в режиме регистрации полного ионного тока (FTMS) в сочетании с регистрацией селективных реакций (SRM), при нецелевом анализе использовали режим FTMS.

Результаты. Представлены результаты целевого и нецелевого метаболомных исследований образцов сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с морфологически и клинически подтвержденным диагнозом первичной иммуноглобулин А нефропатии (IgAN). С учётом данных ранее проведённых исследований сформирован перечень потенциальных биомаркеров, ассоциированных с изменениями кишечного микробиома в условиях дисфункции почек и оценена перспективность их дальнейшего исследования и применения в клинической практике. Установлены достоверные различия в содержании фенилсульфата, индолуксусной кислоты, пролина, тирозина, триптофана в образцах сыворотки крови представителей двух обследованных групп. В рамках нецелевого подхода методом дискриминантного анализа с проекцией на латентные структуры (PLS-DA) выявлены достоверные различия в метаболомном профиле сыворотки крови пациентов с установленным диагнозом IgAN и добровольцев с отсутствием данного диагноза.

Заключение. Полученные данные указывают на перспективность исследований фенилсульфата, индолуксусной кислоты, пролина, тирозина, триптофана в сыворотке крови для разработки подходов к диагностике нарушений метаболизма у пациентов с IgAN.

Ключевые слова: болезни почек; иммуноглобулин А нефропатия; сыворотка крови; уремические токсины; высокоэффективная жидкостная хроматография тандемная масс-спектрометрия; метаболомное исследование

Для цитирования: Савельева Е. И., Алюшина Т. И., Шачнева М. Д., Добронравов В. А. Метаболическое профилирование сыворотки крови пациентов с иммуноглобулин А нефропатией методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (8): 369-376.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-369-376>

Для корреспонденции: Савельева Елена Игоревна, д-р хим. наук, зав. лабораторией аналитической токсикологии; e-mail: saveleva@rihophe.site

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00510).

Поступила	07.04.2024
Принята к печати	17.06.2024
Опубликовано	01.08.2024

Savelieva E. I.¹, Alushina T. I.¹, Shachneva M. D.¹, Dobronravov V.A.²

METABOLIC PROFILING OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH IMMUNOGLOBULIN A NEPHROPATHY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, 188663, Leningrad region, Vsevolozhsky district, Russia;

²Research Institute of Nephrology at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education First St Petersburg Medical University named after. I.P. Pavlov, 197089 St. Petersburg, Russia

Background. Alterations in the gut microbiome may be important for the progression of chronic kidney disease.

Objective - identification of biomarkers associated with the microbiome for subsequent assessment of their clinical and diagnostic significance.

Material and methods. The object of the analysis is 20 recoded (with no access to personal data) blood serum samples from the collection of the Research Institute of Nephrology: 10 from volunteers with no kidney pathology and 10 from patients with a clinical and morphologically confirmed diagnosis of immunoglobulin A nephropathy (IgAN). For targeted metabolomics analysis, a method was developed for the determination of 16 biomarkers (9 uremic toxins, choline, 6 amino acids) using liquid chromatography with high-resolution tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS HR). The separation of components was carried out in reverse-phase gradient HPLC mode. Detection for targeted analysis was carried out in the total ion current mode Fourier transform-based mass spectrometry (FTMS) in combination with selective reaction monitoring (SRM); for non-targeted analysis, the FTMS mode was used.

Results. The paper presents the results of targeted and untargeted metabolomic studies of blood serum samples from healthy volunteers and patients with a morphologically and clinically confirmed diagnosis of primary immunoglobulin A nephropathy (IgAN). Taking into account data from previous studies, a list of potential biomarkers associated with changes in the intestinal microbiome in conditions of kidney dysfunction was compiled and the prospects for their further research and use in clinical practice were assessed. Significant differences were established in the content of phenyl sulfate, indoleacetic acid, proline, tyrosine and tryptophan in blood serum samples from representatives of the two examined groups. Within the framework of a non-targeted approach, the method of discriminant analysis with projection onto latent structures (PLS-DA) revealed significant differences in the metabolomic profile of the blood serum of patients with an established diagnosis of IgAN and volunteers without this diagnosis.

Conclusion. The data obtained indicate the promise of studies of phenyl sulfate, indoleacetic acid, proline, tyrosine and tryptophan in blood serum for the development of approaches to the diagnosis of metabolome disorders in patients with IgAN.

Key words: kidney diseases; immunoglobulin A nephropathy; blood serum; uremic toxins; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; metabolomics study

For citation: Savelieva E.I., Alyushina T.I., Shachneva M.D., Dobronravov V.A. Metabolic profiling of blood serum of patients with immunoglobulin A nephropathy using high-performance liquid chromatography - high-resolution tandem mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 369-376 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-369-376>

For correspondence: Savelieva E.I., Dr. Sci. Chem., head of the laboratory of analytical toxicology; e-mail: savelieva@rihophe.site

Information about authors:

Savelieva E.I., <https://orcid.org/0000-0002-3115-9626>;
Alushina T.I., <https://orcid.org/0009-0003-4804-5574>;
Shachneva M.D., <https://orcid.org/0000-0003-1173-4870>;
Dobronravov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-7179-5520>.

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

Financing. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-15-00510).

Received 07.04.2024

Accepted 17.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. В настоящее время не вызывает сомнений то, что патологические изменения микробиома кишечника могут влиять на развитие и прогрессирование различных болезней, включая патологию почек. Механизмы системных эффектов, вероятно, опосредованы альтерациями интестинального метаболома, изменениями концентраций отдельных метаболитов в циркуляции и их эффектами в отношении почечных и экстрапочечных клеточных популяций [1,2].

Связи между микробиотой кишечника и составом метаболитов циркулирующей крови остаются в значительной степени неопределёнными. Иммуноглобулин А нефропатия (IgAN) - наиболее распространённая форма гломерулонефрита и одна из основных причин терминальной почечной недостаточности в мире [3]. Особенностью патогенеза болезни является зависимость поражения почек от активации мукозального иммунитета, который в значительной степени опосредован особенностями их микробиома [4,5]. В этом контексте критичным является определение биомаркёров, которые могут отражать изменения состава кишечной микрофлоры и метаболизма, ассоциированные с тяжестью почечного патологического процесса. Сведения

о биомаркёрах хронических заболеваний почек, ассоциированных с альтерацией кишечного микробиома, остаются противоречивыми, несмотря на ежегодно возрастающее количество проводимых в этой области исследований. Поиски биомаркёров продолжают преимущественно в трёх биоматрицах: в фекалиях, крови, моче [6, 7]. Эффективное применение метаболомики в диагностических целях может быть основано на анализе больших наборов данных с использованием расширяющихся возможностей различных метаболомических платформ [8], нуждающихся в дополнительных валидирующих исследованиях [9,10]. Ненаправленные (или нецелевые) методы метаболомных исследований позволяют одновременно обнаруживать сотни известных соединений, вовлеченных в различные метаболические пути, связанные с патологией почек вообще и с IgAN, в частности [11-14].

Цель исследования - определение потенциальных биомаркёров состояния интестинального метаболома у пациентов с IgAN. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие частные задачи:

- разработка методики определения в сыворотке крови 16-ти потенциальных биомаркёров почечной

дисфункции;

- проведение пилотного эксперимента для предварительной оценки перспективности этих биомаркёров для диагностики альтераций кишечного метаболома при IgAN;

- оценка эффективности выбранного протокола анализа сыворотки крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС ВР) при проведении диагностики.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использованы образцы сыворотки крови из коллекции НИИ Нефрологии. Всего для анализа использованы 20 образцов сыворотки крови: 10 из них от добровольцев с отсутствием патологии почек, подтверждённым исследованиями мочи и сонографией почек, с нормальными значениями скорости клубочковой фильтрации (группа НС - healthy control) и 10 образцов от пациентов с клинико-морфологически подтверждённым диагнозом IgAN (группа IgAN). Кровь отбирали утром натощак после 12 часов голодания. При анализе в группе IgAN учитывали проводимую фармакотерапию, которая могла включать: лозартан, амлодипин, периндоприл, преднизолон, эналаприл, эзомепразол, омакор, рамиприл, аторвастатин; симвастатин, метоклопрамид, этамзилат, транексамовую кислоту. Лица в группе сравнения лекарственные препараты не принимали. Образцы сыворотки крови взяты из банка длительного хранения и перекодированы, что исключало доступ к персональным данным пациентов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием лиц, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Выбор анализов для целевого метаболомного анализа сыворотки крови производили с учётом результатов предыдущих исследований [15-18]. Отобрано 16 потенциальных биомаркёров альтерации кишечного микробиома и оценена перспективность их дальнейшего исследования применительно к IgAN.

Исследовано 16 соединений: 9 из них относились к группе так называемых «уремических токсинов», включая: индолуксусную кислоту, индоксилглюкуронид, индоксилсульфат, триметиламиноксид (ТМАО), биопредшественник ТМАО - холин, фенилацетилглутамин, 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (СМРФ), фенилсульфат, фенилглюкуронид, гиппуровую кислоту.

В сыворотке крови определяли содержание холина и 6 аминокислот - тирозина, фенилаланина, валина, пролина, метионина, триптофана, являющихся биопредшественниками известных биомаркёров альтераций микробиома при дисфункции почек. Все исследованные кандидатные биомаркёры так или иначе ассоциированы с альтерацией кишечного микробиома [8-14].

Не существует единого мнения о диагностической ценности свободных и связанных с белком индольных токсинов. Обычно связывание с белком снижает опасность эндогенных токсинов. Установлено, что факторами риска являются свободные (не связанные с белком) индольные токсины [19], в других работах в качестве информативного показателя рассматривается их общее

содержание в сыворотке или плазме крови [20]. В настоящей работе с использованием метода ультрамикрофильтрации проведено раздельное определение свободных и связанных с белком индолуксусной кислоты и индоксилсульфата.

В работе использованы следующие реактивы и материалы: метанол (J.T.Baker, Нидерланды); ацетонитрил (Panreac, Испания); муравьиная кислота, ЧДА (Экос-1, Россия); аналитические стандарты уремических токсинов - индолуксусная кислота, индолглюкуронид, индоксил сульфат, триметиламиноксид (ТМАО), фенилацетил глутамин, 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (СМРФ), фенил сульфат, фенил глюкоронид, гиппуровая кислота (Sigma Aldrich, США); холин (Sigma Aldrich, США); аналитические стандарты аминокислот - тирозин, фенилаланин, валин, пролин, метионин, триптофан (Sigma Aldrich, США); центробежный фильтр Amicon Ultra-0.5 с мембраной Ultracel-3k (Sigma Aldrich, США).

Для подготовки проб к анализу использованы: центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf, Германия), микроцентрифуга с охлаждением Microfuge 22R (Beckman Coulter, США), шейкер для пробирок Multi Reax (Heidolph, Германия).

Определение уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови проводили на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 с масс-селективным детектором Q-Exactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (Thermo Scientific, США) и программным обеспечением для управления и обработки данных «Xcalibur». Хроматографическое разделение компонентов осуществляли на колонке Zorbax SB-C8 длиной 15 см, внутренним диаметром 4.6 мм, с размером частиц 1.8 мкм (Agilent Technologies, США).

Условия хроматографического разделения: скорость потока элюента - 0.4 мл/мин; температура термостата колонки - 35 °С; температура термостата для проб - 5 °С; объем вводимой пробы - 5 мкл; время анализа при определении уремических токсинов, холина и аминокислот - 14 минут; время анализа при нецелевом метаболомном исследовании - 20 минут.

Подвижная фаза:

- компонент А - 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде для ВЭЖХ;

- компонент В - ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ.

Режим элюирования – градиентный (табл. 1).

Условия масс-спектрометрического детектирования: режим источника ионизации - электростатическое распыление при атмосферном давлении; температура капилляра электроспрея - 380 °С; температура проводящего капилляра - 300 °С; скорость потока защитного газа - 50 psi; скорость потока вспомогательного газа - 17 у.ед.; напряжение на капилляре - 3500 В; масс-спектральное разрешение - 30 000; режим сканирования в диапазоне масс от 70 до 1000 *m/z*. Режим детектирования при целевом анализе: регистрация полного ионного тока в режиме высокого разрешения (FTMS) в сочетании с регистрацией селективных реакций (SRM). Полярность детектируемых ионов: детектирование положительных и отрицательных ионов. Параметры идентификации уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР представлены в табл. 2.

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы в режиме ВЭЖХ анализа

Целевой анализ			Нецелевой анализ		
Время, мин	A, %	B, %	Время, мин	A, %	B, %
0,0	90	10	0,0	90	10
0,5	90	10	0,5	90	10
8	10	90	10	10	90
10	10	90	15	10	90
10,1	90	10	15,1	90	10
14	90	10	20	90	10

Режим детектирования при нецелевом анализе: регистрация полного ионного тока в режиме высокого разрешения. Остальные условия те же, что и в протоколе целевого анализа.

Определение свободных и связанных с белками сыворотки крови соединений проводили согласно процедуре [21] с незначительными модификациями. Для определения свободных аналитов 100 мкл сыворотки переносили в устройство для ультрафильтра-

ции (центробежный фильтр Amicon Ultra-0.5 с мембраной Ultracel-3k) и центрифугировали 15 минут со скоростью 14 тыс об/мин. Для определения общего количества соединений (свободных и связанных с белками крови) к 100 мкл сыворотки крови добавляли 300 мкл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 минут со скоростью 14 тыс. об/мин и анализировали экстракт методом ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Таблица 2

Параметры идентификации уремических токсинов, холина и аминокислот

Аналит	Условия детектирования	Полярность	RT, мин
Индолуксусная кислота	176,0706→130,0649 (SRM)	(+)	6,5
Индолглюкоронид	308,0770→113,0230 (SRM)	(-)	7,8
Индоксил сульфат	212,0023→79,9558 (SRM)	(-)	7,2
ТМАО	76,0757→58,0652 (SRM)	(+)	3,9
Фенилацетил глутамин	265,1180→130,0496 (SRM)	(+)	8,0
СМРФ	239,0925→195,1016 (SRM)	(-)	10,4
Фенил сульфат	172,9914 (FTMS)	(-)	7,8
Фенил глюкоронид	269,0668 (FTMS)	(-)	7,8
Гиппуровая кислота	178,0510 (FTMS)	(-)	8,3
Холин	162,1125 (FTMS)	(-)	3,7
Тирозин	182,0812 (FTMS)	(+)	4,9
Фенилаланин	166,0862 (FTMS)	(+)	7,1
Валин	118,0863 (FTMS)	(+)	4,0
Пролин	116,0706 (FTMS)	(+)	4,0
Метионин	150,05833 (FTMS)	(+)	4,6
Триптофан	205,0971 (FTMS)	(+)	7,6

Примечание. (+) - регистрация положительных ионов; (-) - регистрация отрицательных ионов.

Для приготовления градуировочных растворов уре-мических токсинов и холина использована модельная смесь раствора альбумина в фосфатном буфере, имитирующая сыворотку крови. Для этого приготовлен рас-твор альбумина в фосфатном буфере с концентрацией 45 мг/мл, в который введена стандартная добавка смеси анализируемых компонентов в соответствующих кон-центрациях. Пробы проводили по процедуре пробо-подготовки и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС ВР. При определении аминокислот для приготовления градуировочных растворов использована деионизи-рованная вода, в которую вносили стандартные рас-творы различной концентрации. Пробы проводили по процедуре пробоподготовки и анализировали методом

ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Нецелевое метаболомное исследование проведено по протоколу [22] с небольшими модификациями. Для этого к аликвоте каждого образца сыворотки объемом 50 мкл добавляли 200 мкл метанола, встряхивали на устройстве Вортекс в течение 10 мин, центрифугировали образцы в течение 10 мин при 14 тыс. об/мин (при 4 °С) и анализи-ровали экстракт методом ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Статистическая обработка результатов анализа прове-дена с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 9 и Excel, электронного ресурса MetaboAnalyst 5.0. Нормальность распределения определена по методу Колмогорова-Смирнова, статистически значимые разли-чия между двумя группами определены по методу Манна-

Уитни и методом дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (Partial Least Squares Discriminant

Analysis, PLS-DA). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Таблица 3

Характеристики разработанной методики определения уремических токсинов, холина и аминокислот в сыворотке крови

Аналит	ЛД, мкг/мл	R ² (n=5)	ПО, мкг/мл	КВ, % (n=5)
Холин	0,10-10	0,9998	0,005	3
Триметиаминоксид (ТМАО)	0,10-10	0,9994	0,005	12
Индоксилсульфат	0,01-10	0,9993	0,005	4
Фенилацетилглутамин	0,01-10	0,9975	0,005	8
Гиппуровая кислота	0,10-10	0,9995	0,005	8
Индолюксусная кислота	0,10-10	0,9994	0,005	3
3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионат (CMPF)	0,10-10	0,9981	0,005	2
Индоглукоронид	0,01-10	0,9999	0,001	8
Фенилглукоронид	0,01-10	0,9967	0,001	10
Фенил сульфат	0,01-10	0,9999	0,005	9
Тирозин	0,10-10	0,9998	0,01	4
Фенилаланин	0,10-20	0,9999	0,01	4
Валин	0,10-30	0,9999	0,01	8
Пролин	0,10-20	0,9991	0,01	3
Метионин	0,10-10	0,9999	0,01	4
Триптофан	0,10-20	0,9999	0,01	5

Таблица 4

Уремические токсины, холин, аминокислоты в образцах сыворотки крови в экспериментальной (IgAN) и контрольной (НС) группах

Аналит	Концентрация, мкг/мл Me [Q ₁ ; Q ₃]		p
	Группа НС	Группа IgAN	
CMPF	2,21 [0,89; 2,80]	1,19 [0,74; 2,46]	0,24
ТМАО	0,73 [0,44; 1,07]	0,72 [0,43; 1,91]	0,46
Валин	23,53 [19,08; 27,23]	20,59 [17,67; 22,98]	0,10
Гиппуровая кислота	1,08 [0,60; 1,64]	1,32 [0,66; 2,62]	0,28
Индоксил сульфат (общее количество)	3,63 [2,15; 4,90]	3,13 [1,74; 4,98]	0,45
Индоксил сульфат (свободный)	0,40 [0,25; 0,63]	0,59 [0,33; 1,07]	0,11
Индолюксусная кислота (общее количество)	0,47 [0,35; 0,56]	0,30 [0,24; 0,39]	0,02
Индолюксусная кислота (свободная)	0,12 [0,10; 0,20]	0,15 [0,12; 0,19]	0,31
Карнитин	4,81 [3,88; 5,25]	4,61 [3,95; 5,48]	0,46
Метионин	1,88 [1,39; 2,23]	2,06 [1,87; 2,39]	0,11
Пролин	16,20 [13,65; 17,62]	13,04 [10,80; 15,43]	0,04
Тирозин	6,24 [5,77; 6,96]	5,17 [4,48; 6,61]	0,01
Триптофан	7,88 [7,16; 8,24]	5,90 [5,10; 6,89]	<0,01
Фенилаланин	10,69 [8,69; 12,53]	9,26 [8,08; 10,82]	0,09
Фенилацетил глутамин	0,64 [0,34; 1,06]	1,02 [0,46; 1,55]	0,14
Фенилсульфат	0,26 [0,22; 0,61]	0,66 [0,38; 1,50]	0,01
Холин	2,09 [1,60; 2,49]	1,69 [1,54; 2,10]	0,19

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе исследования оценены воспроизводимость и правильность результатов измерений, получаемых при использовании разработанной методики. Оценку воспроизводимости количественного определения целевых компонентов осуществляли с помощью образца сыворотки для контроля (QC), который разделяли на 5 аликвот и определяли фоновые концентрации целевых компонентов. Затем в объединённый образец сыворотки крови добавляли аналитические стандарты с известной концентрацией и анализировали. Линейные диапазоны концентраций (ЛД), пределы обнаружения (ПО), и коэффициенты вариации (КВ) представлены в табл. 3. Пределы количественного определения соответствуют нижним границам линейных диапазонов.

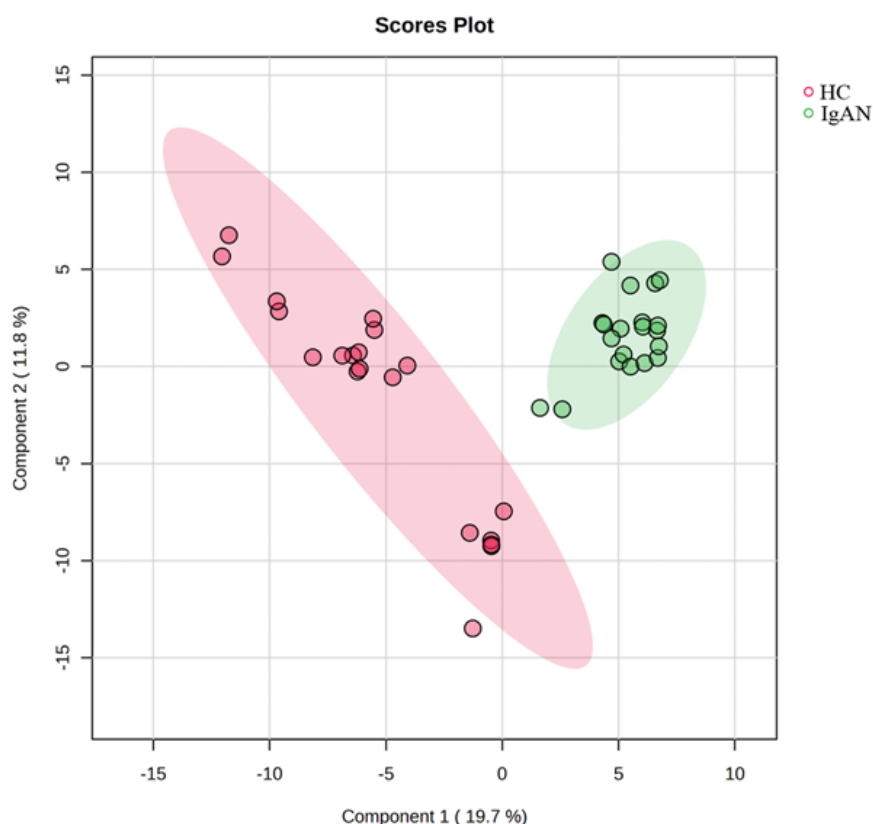
Как следует из табл. 3, разработанная методика обладает удовлетворительными метрологическими характеристиками и может быть применена для выполнения измерений концентраций выбранной группы аналитов в целевом метаболомном исследовании.

Результаты определения уремических токсинов, хо-

лина и аминокислот в образцах сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным диагнозом IgAN представлены в табл. 4. Результаты представлены как медианное значение (Me) и интерквартильный размах в 25 и 75 перцентилей.

По сравнению с группой контроля в образцах сыворотки крови пациентов с диагнозом IgAN (группа IgAN) наблюдали статистически значимое увеличение концентрации фенилсульфата на 60% ($p=0,01$), снижение концентраций пролина на 20% ($p=0,04$), тирозина на 17% ($p=0,01$), триптофана на 25% ($p=0,01$), общего количества индолуксусной кислоты на 36% ($p=0,02$).

Оценка информативности ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа сыворотки крови для диагностики IgAN. Для оценки потенциальной информативности выбранного протокола анализа масс-хроматограммы, полученные после анализа образцов сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР, обработаны методом дробных наименьших квадратов (PLS-DA) (см. рисунок).



Различия в метаболомном профиле сыворотки крови добровольцев контрольной (HC) и основной (IgAN) групп.

Как видно из рисунка, методом PLS-DA выявлены достоверные (модель прошла перекрёстную проверку (cross validation) со значениями $Q^2=0.66$ и $R^2=0.79$) различия в метаболомном профиле сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с подтверждённым диагнозом IgAN. Можно сделать вывод, что сыворотка крови является информативной биоматрицей для проведения метаболомных исследований в целях диагностики

IgAN. Как следует из рисунка, группа IgAN является более однородной в сравнении с группой контроля.

Обсуждение. У пациентов с почечной недостаточностью логично было бы ожидать повышения концентраций всех уремических токсинов в крови. То, что концентрации уремических токсинов в циркулирующей крови напрямую связаны с нарушением функции почек, является консенсусным мнением [23]. В ряду

исследованных в работе уремических токсинов концентрация фенилсульфата значимо (на 60%) повышена у пациентов с диагнозом IgAN. Установлено, что уровни фенилсульфата в циркулирующей крови крыс значительно коррелируют с прогрессированием альбуминурии [24]. В нашем исследовании это подтверждено применительно к пациентам с IgAN. Фенилсульфат может быть не только биомаркером для ранней диагностики, но и модифицируемой причиной и, следовательно, мишенью для лечения патологии почек.

Концентрации триптофана и продуцируемого микробиомом его метаболита индолуксусной кислоты в сыворотке крови пациентов с диагнозом IgAN практически синхронно (на 25-30%) понижены. Концентрации свободной индолуксусной кислоты в сыворотке крови представителей обеих групп практически одинаковы, в то время как общее содержание за счёт связанной с белком формы в группе IgAN понижено. Такой результат представляется неожиданным. Тем не менее, он подтверждается данными масштабного исследования [12], нацеленного на поиск биомаркеров плазмы крови для диагностики IgAN. Наиболее высокие концентрации индолуксусной кислоты зафиксированы не только при IgAN в терминальных стадиях, но и, как это ни парадоксально, у здоровых добровольцев. В стадиях I-II содержание индолуксусной кислоты в крови понижено. Индолуксусная кислота должна быть повышена в сыворотке крови при наличии воспалительных процессов, кардиоваскулярных рисков, при неблагоприятном прогнозе хронических болезней почек [25]. Если эти неблагоприятные эффекты скомпенсированы, уровень индолуксусной кислоты в крови падает [26]. Возможно, более низкий уровень индолуксусной кислоты в сыворотке крови группы IgAN обусловлен приемом фармацевтических препаратов, понижающих содержание липополисахаридов в крови [27]. Определение диагностических биомаркеров IgAN в большинстве случаев будет происходить на фоне сопутствующих заболеваний и фармакотерапии, поэтому биомаркеры, сохраняющие диагностический потенциал независимо от этих обстоятельств, будут иметь особую ценность.

Термин «уремические токсины» является исторически сложившимся, но с учётом современных представлений далеко не все соединения, охватываемые этой группой, следует оценивать именно как токсины. Индолуксусная кислота в последние годы рассматривается с позиций её терапевтического потенциала в отношении различных проявлений дисбиоза кишечника [28]. В этой связи можно предполагать защитные функции индолуксусной кислоты при развитии IgAN, чем может быть обусловлено её пониженное содержание в сыворотке крови группы IgAN в сравнении с контрольной группой. Полученный результат интересен с позиций оценки не только диагностического, но и терапевтического потенциала индолуксусной кислоты. В этой связи важен результат, установивший безусловную связь между индолуксусной кислотой и фактором роста стволовых клеток (SCF), необходимым для выживания, пролиферации и дифференцировки кроветворных стволовых клеток [29].

В ряду исследованных биомаркеров для трёх аминокислот - пролина, тирозина, триптофана, установлено значимое снижение их концентраций в сыворотке крови пациентов с IgAN в сравнении с контролем, что

полностью совпадает с результатами исследования, в котором показано снижение концентраций этих трёх аминокислот при почечной дисфункции [30]. Эти три аминокислоты обнаруживали отрицательную корреляцию с креатинином и мочевиной сыворотки крови. Снижение уровня пролина в сыворотке крови пациентов с почечной дисфункцией установлено впервые, что может быть объяснено снижением реабсорбции пролина в почках. Снижение уровня тирозина в крови при почечной дисфункции отмечалось и ранее, и объяснялось нарушением синтеза тирозина из фенилаланина в почках [31]. Снижение концентрации триптофана в циркулирующей крови пациентов с почечной дисфункцией описано ранее [32], при этом выявлена отрицательная корреляция ($r=-0,6$) между концентрацией триптофана и тяжестью заболевания.

Хотя перечисленные различия между исследуемыми в работе группами являются статистически значимыми, они, все же с учётом малого объёма выборки, остаются сугубо ориентировочными. При переходе от пилотного эксперимента к когортному исследованию такие различия могут и не подтвердиться. В свете полученной информации важно задаться вопросом, насколько выбранный протокол ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа сыворотки крови перспективен для диагностики и, возможно, стратегии терапевтического лечения IgAN. Как следует из рисунка, при анализе сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС ВР метаболом сыворотки пациентов с IgAN значительно отличается от контроля. Молекулярная верификация этих различий является сложной задачей.

Идентификация и поиск наиболее значимых и характеристичных биомаркеров данного заболевания, определённых по полученным методом PLS-DA данным, будет проводиться на следующем этапе исследования. В рамках пилотного эксперимента задача дифференциальной диагностики этиологии нефропатии не ставилась. Различия в этиологии заболеваний почек основываются на происхождении и точной анатомической позиции процесса заболевания. Ввиду того, что в исследовании использована сыворотка крови пациентов с клинически установленным диагнозом IgAN, мы не сочли возможным распространить полученные результаты на другие формы болезней почек.

Закключение. Разработанная в рамках проведённого исследования методика определения 16 потенциальных биомаркеров IgAN в циркулирующей крови успешна валидирована и применена для целевого метаболомного анализа. Результаты ВЭЖХ-МС/МС ВР анализа подтвердили данные литературы о снижении концентраций трёх аминокислот: фенилаланина, тирозина, триптофана у пациентов с IgAN. Из исследованных уремических токсинов индолуксусная кислота и фенилсульфат установлены в качестве биомаркеров-кандидатов, показавших значимые различия в концентрациях в сыворотке крови пациентов с IgAN и контрольной группы. Нецелевой метаболомный ВЭЖХ-МС/МС ВР анализ показал, что сыворотка крови является перспективной биоматрицей для диагностики заболевания и, возможно, оценки тяжести его течения. Первоочередной задачей в этом направлении является подтверждение установленных и поиск новых биомаркеров-кандидатов, их валидация в дальнейших экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2-9, 11-16, 18-32 СМ.
 REFERENCES)

1. Данилова Е.Ю., Васалатий И.М., Носырев А.Е., Мальцева Л.Д., Морозова О.Л. Метаболом мочи в диагностике хронической болезни почек (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 253-60. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260.
10. Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 52-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59.
17. Гецина М.Л., Черневская Е.А., Белобородова Н.В. Роль обиха для человека и микробиоты метаболитов триптофана при тяжелых заболеваниях и критических состояниях (обзор). *Клиническая практика*. 2020; 11(1): 92-102. DOI: 10.17816/clinpract19068.
14. Davies R. The metabolomic quest for a biomarker in chronic kidney disease. *Clin. Kidney J.* 2018; 11 (5): 694-703. DOI: 10.1093/ckj/sfy037.
15. Toft P.B., Vanslette A.M., Trošt K., Moritz T., Gillum MP, Bäckhed F, Arora T. Microbial metabolite p-cresol inhibits gut hormone expression and regulates small intestinal transit in mice. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2023; 14: 1200391. DOI: 10.3389/fendo.2023.1200391.
16. Zhang D., Jian Y.P., Zhang Y.N. et al. Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun. Signal.* 2023; 21: 212. DOI: 10.1186/s12964-023-01219-9.
17. Getsina M.L., Chernevskaya E.A., Beloborodova N.V. The role of tryptophan metabolites common to humans and microbiota in severe diseases and critical conditions (review). *Klinicheskaya praktika*. 2020; 11(1): 92-102. DOI: 10.17816/clinpract19068. (in Russian)
18. Mair R.D., Sirich T.L., Plummer N.S., Meyer T.W. Characteristics of colon-derived uremic solutes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13(9): 1398-1404. DOI: 10.2215/CJN.03150318.
19. Liabeuf S., Barreto D.V., Barreto F.C., Meert N., Glorieux G., Schepers E., Temmar M., Choukroun G., Vanholder R., Massy Z.A. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010; 25: 1183-91. DOI: 10.1093/ndt/gfp592.
20. Machado T.S., Poitevin S., Paul P., McKay N., Jourde-Chiche N., Legris T. et al. Indoxyl sulfate upregulates liver P-glycoprotein expression and activity through aryl hydrocarbon receptor signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 29: 906-18. DOI: 10.1681/ASN.2017030361.
21. Fabresse N., Uteem L., Lamy E., Massy Z., Larabi I.A., Alvarez J.C. Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 507: 228-35. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.032.
22. Souza A.L., Patti G.J. A Protocol for untargeted m Analysis: From Sample Preparation to Data Processing. *Methods Mol. Biol.* 2021; 2276: 357-82. DOI: 10.1007/978-1-0716-1266-8_27.
23. Teo S.H., Endre Z.H. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2017; 31: 331-44. DOI: 10.1016/j.bpa.2017.10.003.
24. Kikuchi K., Saigusa D., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Thanai P., Suzuki N. Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):1835. DOI: 10.1038/s41467-019-09735-4.
25. Dou L., Sallée M., Cerini C., Poitevin S., Gondouin B., Jourde-Chiche N. et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 26(4): 876-87. DOI: 10.1681/ASN.2013121283.
26. Liabeuf S., Laville S.M., Glorieux G., Cheddani L., Brazier F., Titeca Beauport D. et al. Difference in profiles of the gut-derived tryptophan metabolite indole acetic acid between transplanted and non-transplanted patients with chronic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(6): 2031. DOI: 10.3390/ijms21062031.
27. Ji Y., Yin W., Liang Y., Sun L., Yin Y., Zhang W. Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of indole-3-acetic acid involves induction of HO-1 and neutralization of free radicals in RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(5): 1579. DOI: 10.3390/ijms21051579.
28. Chen Y., Pan R., Mei L., Tian P., Wang L., Zhao J., Chen W., Wang G. Colon-Targeted Delivery of Indole Acetic Acid Helps Regulate Gut Motility by Activating the AHR Signaling Pathway. *Nutrients*. 2023; 15: 4282. DOI: 10.3390/nu15194282.
29. Wu P.-H., Lin Y.-T., Wu P.-Y., Lee H.-H., Lee S.-C., Hung S.-C. et al. Association between circulation indole-3-acetic acid levels and stem cell factor in maintenance hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(1): 124. DOI: 10.3390/jcm9010124.
30. Andrianova N.V., Popkov V.A., Klimenko N.S., Tyakht A.V., Baydakova G.V., Frolova O.Yu. Microbiome-metabolome signature of acute kidney injury. *Metabolites*. 2020; 10(4): 142. DOI: 10.3390/metabo10040142.
31. Kopple J. D. Phenylalanine and Tyrosine Metabolism in Chronic Kidney Failure. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137(6): 1586S-1590S. DOI: 10.1093/jn/137.6.1586s.
32. Saito A., Niwa T., Maeda K., Kobayashi K., Yamamoto Y., Ohta K. Tryptophan and indolic tryptophan metabolites in chronic renal failure. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980; 33: 1402 DOI: 10.1093/ajcn/33.7.1402.
1. Danilova E.Yu., Vasalati I.M., Nosyrev A.E., Maltseva L.D., Morozova O.L. Urine metabolome in the diagnosis of chronic kidney disease (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (5): 253-60. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-253-260. (in Russian)
2. Mishima E., Fukuda S., Mukawa C., Yuri A., Kanemitsu Y., Matsumoto Y. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.* 2017; 92(3): 634-45. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.011
3. Jha V., Garcia-Garcia G., Iseki K., Li Z., Naicker S., Plattner B., Yang C.W. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013; 382: 260-72. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
4. Mucha K., Pac M., Pączek L. Omics are Getting Us Closer to Understanding IgA Nephropathy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2023; 71(1): DOI: 10.1007/s00005-023-00677-w.
5. Radhakrishnan A., Elango A., Ilanchoorian D. Aging gut microbiota and chronic kidney disease. *Gut Microbiota in Aging and Chronic Diseases*. 2023. 153-73. DOI: 10.1007/978-3-031-14023-5_8.
6. Lun H., Yang W., Zhao S., Jiang M., Xu M., Liu F., Wang Y. Altered gut microbiota and microbial biomarkers associated with chronic kidney disease. *Microbiology Open*. 2018; 8(4): 00678. DOI: 10.1002/mbo3.678.
7. Mc Carthy D.D., Kujawa J., Wilson C., Papandile A., Poreci U. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 3991-4002. DOI: 10.1172/JCI45563.
8. Huang Y., Xin W., Xiong J. The intestinal microbiota and metabolites in the gut-kidney-heart axis of chronic kidney disease. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 837500. DOI: 10.3389/fphar.2022.837500.
9. Chasapi S. A., Karagkouni E., Kalavrizioti D., Vamvakas S., Zompra A., Takis P. G., Goumenos D. S., Spyroulias G. A. NMR-based metabolomics in differential diagnosis of chronic kidney disease (CKD) subtypes. *Metabolites*. 2022; 12(6): 490. DOI: 10.3390/metabo12060490 S.A.
10. Don E.S., Tarasov A.V., Epstein O.I., Tarasov S.A. Biomarkers in medicine: search, selection, study and validation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(1): 52-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59. (in Russian)
11. Hirakawa Y., Yoshioka K., Kojima K., Yamashita Y., Shibahara T., Wada T., Nangaku M., Inagi R. Potential progression biomarkers of diabetic kidney disease determined using comprehensive machine learning analysis of non-targeted metabolomics. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 16287. DOI: 10.1038/s41598-022-20638-1.
12. Fu X., Luo Z.X., Yin H.H., Liu Y.N., Du X.G., Cheng W., Liu J.Y. Metabolomics study reveals blood biomarkers for early diagnosis of chronic kidney disease and IgA nephropathy: A retrospective cross-sectional study. *Clin. Chim. Acta.* 2024; 555: 117815. DOI: 10.1016/j.cca.2024.117815.
13. Dong L., Tan J., Zhong Z., Tang Y., Qin W. Altered serum metabolic profile in patients with IgA nephropathy. *Clin. Chim. Acta.* 2023; 549: 117561. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117561.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Шитикова А.М.^{1,2}, Бельских Э.С.¹, Атрощенко М.М.², Звягина В.И.¹, Матвеева И.В.¹

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МИКРОПЛАСТИКА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МОНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 390026, г. Рязань, Россия;

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» (ФГБНУ «ВНИИ коневодства»), 391105, Дивово, Рязанская обл., Россия

Введение. Известно, что микропластик способен вызывать воспалительные реакции, однако имеющиеся данные о воздействии частиц микропластика на иммунные клетки человека и о поглощении клетками частиц микропластика довольно ограничены, что обусловлено рядом недостатков существующих методов оценки эффектов микропластика.

Цель - исследовать влияние частиц полистирольного микропластика на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека с использованием технологии проточной цитометрии с визуализацией Amnis Flowsight.

Материал и методы. Исследование носило пилотный характер. Мононуклеары периферической крови здоровых доноров (n=6) подвергались *in vitro* воздействию полистирольного флуоресцентного микропластика диаметром 1,7-2,2 мкм в концентрации 25 мкг/мл в течение 1, 2 и 4 часов, параллельно проводилась серия контроля. Далее оценивалась жизнеспособность клеток и степень их контакта с микропластиком при помощи проточного цитометра с визуализацией Amnis Flowsight и программного обеспечения INSPIRE.

Результаты. Удалось установить, что микропластик снижает общую жизнеспособность мононуклеаров после 2 часов *in vitro* инкубации, при этом снижается жизнеспособность моноядерных лейкоцитов крови, имевших прямой контакт с частицами микропластика на протяжении всего периода *in vitro* инкубации. На 4-ом часу инкубации наблюдается падение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови при контакте с двумя и более частицами микропластика, что указывает на зависимость его неблагоприятного эффекта от числа частиц, контактирующих с клеткой.

Выводы. Воздействие полистирольного микропластика в концентрации 25 мкг/мл приводит к значимому снижению общей жизнеспособности моноядерных лейкоцитов крови человека уже после 2 часов *in vitro* инкубации. Наиболее выраженное снижение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови наблюдается при контакте с двумя и более частицами микропластика. Проточная цитометрия с визуализацией является современным методом для оценки негативного влияния микропластика на клеточном уровне.

Ключевые слова: микропластик, мононуклеарные лейкоциты, проточная цитометрия с визуализацией

Для цитирования: Шитикова А.М., Бельских Э.С., Атрощенко М.М., Звягина В.И., Матвеева И.В. Оценка влияния микропластика на жизнеспособность моноядерных лейкоцитов периферической крови при помощи проточной цитометрии с визуализацией (пилотное исследование). Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (8): 377-386.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-69-8-377-386>

Для корреспонденции: Шитикова Анна Михайловна, канд. биол. наук, доц., доцент кафедры биологической химии РязГМУ; ст. науч. сотр. лаб. криобиологии «ВНИИ коневодства»; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства» и Марченко Г.А., руководителя направления проточной цитометрии, Сутек, за оказанное содействие в выполнении исследования.

Поступила 29.03.2024
Принята к печати 01.06.2024
Опубликовано 01.08.2024

Shitikova A.M.^{1,2}, Belskikh E.S.¹, Atroshchenko M.M.², Zvyagina V.I.¹, Matveeva I.V.¹

EVALUATION OF THE EFFECT OF MICROPLASTIC ON THE VIABILITY OF BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES BY IMAGING FLOW CYTOMETRY (PILOT STUDY)

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026, Ryazan, Russia;

²All-Russian Research Institute of Horse Breeding Russia, 391105, Ryazan region, Divovo, Russia

Introduction. It is known that microplastic can induce inflammatory reactions, but the available data on the effects of microplastic particles on human immune cells and on cellular uptake of microplastic particles are rather limited due to a number of shortcomings of existing methods for assessing microplastic effects.

Aim. To investigate the effect of polystyrene microplastic particles on the viability of human peripheral blood mononuclear leukocytes using Amnis Flowsight imaging flow cytometry technology.

Material and methods. This was a pilot study. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors ($n=6$) were exposed in vitro to polystyrene fluorescent microplastic 1.7-2.2 μm in diameter at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1, 2 and 4 hours; a series of controls were performed in parallel. Cell viability and the extent of cell contact with the microplastic were then assessed using an Amnis Flow-sight imaging flow cytometer and INSPIRE software. It was found that microplastic reduces the total viability of mononuclear cells after 2 hours of in vitro incubation and reduces the viability of mononuclear blood leukocytes that had direct contact with microplastic particles throughout the whole in vitro incubation period. At the 4th hour of incubation, a drop in the viability of peripheral blood mononuclear leukocytes in contact with two or more particles of microplastic is observed, which shows the dependence of its adverse effect on the number of particles in contact with the cell.

Conclusion. Exposure to polystyrene microplastic at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leads to a significant decrease in the total viability of human blood mononuclear leukocytes after 2 hours of in vitro incubation. The most pronounced decrease in the viability of peripheral blood mononuclear leukocytes is observed in contact with two or more microplastic particles. Flow cytometry with visualization is a modern method to assess the negative effect of microplastic at the cellular level.

Key words: microplastic, mononuclear leukocytes, imaging flow cytometry

For citation: Shitikova A.M., Belskikh E.S., Atroshchenko M.M., Zvyagina V.I., Matveeva I.V. Evaluation of the effect of microplastic on the viability of blood mononuclear leukocytes by imaging flow cytometry (pilot study). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 377-386 (in Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-377-386>

For correspondence: Shitikova A.M., Candidate. Sci. Biol., associate professor, associate professor of the department of biological chemistry of Ryazan State Medical University; Senior Researcher at the Cryobiology Laboratory of All-Russian Research Institute of Horse Breeding; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

Information about authors:

Shitikova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-4004-9058>;

Belskikh E.S., <https://orcid.org/0000-0003-1803-0542>;

Atroshchenko M.M., <https://orcid.org/0000-0001-6023-0332>;

Zvyagina V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2800-5789>;

Matveeva I.V., <https://orcid.org/0000-0001-9475-8127>.

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

Funding. The study had no sponsor support.

Acknowledgement. The authors would like to thank the staff of the Cryobiology Laboratory of All-Russian Research Institute of Horse Breeding and G.A. Marchenko, Head of Flow Cytometry, Cytek, for their assistance in the study.

Received 29.03.2024

Accepted 01.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. На сегодняшний день проблема загрязнения микропластиком является одной из самых обсуждаемых экологических угроз. Согласно данным ООН, в мире было произведено более 9 млрд тонн пластика [1, 2], а в пандемию COVID-19 человечество ежемесячно выбрасывало миллиарды производимых из полимеров перчаток и масок для лица [3]. В ходе биodeградации, термоокислительной деструкции, механической фрагментации пластика образуются частицы, которые принято классифицировать в зависимости от их размера: нанопластик $\leq 0,1$ мкм (НП), $0,1$ мкм $<$ микропластик < 5 мкм (МП), $0,5$ мкм $<$ мезопластик < 5 см, 5 см $<$ макропластик < 50 см и мегапластик > 50 см [4,5]. Наиболее часто встречаются частицы МП из полиэтилена, полипропилена, поливинилхлорида и полистирола, при этом около 4 % от веса пластмасс приходится на добавки органического и неорганического происхождения, обладающие токсическими свойствами [6].

Установлено, что микропластик может попадать в организм человека через желудочно-кишечный тракт, кожу и дыхательные пути [7,8]. Ежегодно человек употребляет с пищей от 39 000 до 52 000 частиц МП [9]. В 2022 году впервые опубликованы результаты работы, продемонстрировавшие наличие микропластика в крови человека [4].

Судьба частиц микропластика в организме человека и последствия их действия все еще остаются спорными и малоизученными. Эффекты частиц МП могут быть обусловлены их физическими свойствами (размером, формой, длиной), химическими свойствами (наличием добавок и типом полимера), концентрацией или слоем микробной биопленки [10,11]. Считается, что эпителий ЖКТ млекопитающих способны пересекать частицы размером менее 150 мкм [10], а в дыхательные пути человека могут проникать частицы размером менее 135 мкм, раздражая альвеолы [8]. Установлено, что частицы МП размером около 10 мкм пересекают гематоэнцефалический барьер, клеточные мембраны и плаценту [10]. Считается, что накопление и распределение МП в органах обратно пропорционально размеру частиц, а депонирование частиц МП размером менее 20 мкм происходит в кишечнике, печени, почках [12]. Несмотря на отсутствие в мире единой (унифицированной) утвержденной методики обнаружения и количественного подсчета частиц МП в образцах [13], ряд исследований указывает на присутствие пластика в человеческом кале [14], плаценте [15], легких [16], печени [17], кишечнике [18]. В крови человека среднее значение суммарной концентрации частиц МП размером ≥ 700 нм составило 1,6 мкг/мл, при этом обнаруженный пластик был

представлен в большинстве полиэтилентерефталатом, полиэтиленом и полистиролом [19].

В ряде исследований подчеркивалась способность частиц МП и НП оказывать токсическое действие, вызывать хроническое воспаление и повышать риск развития новообразований [20 - 22]. Среди негативных эффектов МП выделяют также влияние на энергетический и липидный обмен, окислительный стресс и нейротоксические реакции [11]. Способность полистирольных частиц индуцировать продукцию АФК была обнаружена на клеточной линии Hs27 [23] и BEAS-2B [24]. У. Не и соавторы [25] показали цитотоксическое действие НП полистирола на клеточной линии HepG2, а на мононуклеарах периферической крови человека было показано, что микропластик индуцирует выработку цитокинов и хемокинов [11, 26 - 28].

Для изучения биологических эффектов МП на иммунные клетки крови в настоящее время используются различные методы и подходы. Известен подход в изучении эффектов МП на лимфоциты крови с использованием показателей, характеризующих нарушение стабильности клеточного ядра и коэффициента клеточного цитостаза, характеризующего процент снижения жизнеспособности клеток по результатам микроскопии окрашенных и фиксированных клеток [26]. J. Hwang и соавт. [27] оценивали биологические эффекты микропластика на клеточных линиях тучных клеток и фибробластов, а также мононуклеарах крови с использованием конфокальной микроскопии. Данные подходы имеют значимые ограничения, обусловленные особенностями подготовки к исследованию: необходимость фиксации клеток параформальдегидом, а также обработка тритоном X-100 непосредственно перед конфокальной визуализацией, что способно значительно искажать показатели жизнеспособности клеток. Также ограничением микроскопических методов анализа является невозможность исследовать популяции с большими выборками, содержащими тысячи событий, и использование не более 3-4 флуоресцентных меток [29].

Более точным представляется метод проточной цитометрии, основным преимуществом которого являются: 1) способность за короткий срок обрабатывать миллионы событий; 2) возможность одновременно использовать несколько флуоресцентных маркеров [29]. Так, Kinga Kik и соавт. [30] продемонстрировали, что полистериновые наночастицы различного диаметра способны оказывать токсическое влияние на мононуклеары человеческой крови, а S. Ballesteros и соавторы [28] выявили генотоксические эффекты МП по отношению к мононуклеарам и полиморфноядерным лейкоцитам. Ограничением конвенциональной проточной цитометрии является невозможность проследить биологические эффекты частиц МП при их прямом контакте в отдельных клетках, а для выявления интернализации частиц необходимо дополнительно использовать микроскопические методы исследования.

Проточная цитометрия с визуализацией (ПЦВ) — это гибридная технология, объединяющая преимущества цитометрии и микроскопии. ПЦВ позволяет значительно расширить объем выборки без привязки значений флуоресцентных параметров к их пространственным распределениям и морфологическим особенностям клетки [29]. Метод ПЦВ позволяет получать

качественные изображения анализируемых единичных клеток, что активно используется для исследования иммунопатогенеза ряда заболеваний [31]. Впервые метод ПЦВ для оценки влияния частиц МП на фагоцитоз и жизнеспособность был проведен на иммунных клетках атлантического лосося (*Salmo salar*) [32].

Мы предлагаем впервые использовать технологию Amnis Flowsight для оценки биологических эффектов МП на моноядерные лейкоциты (МЯЛ) периферической крови человека, которые наиболее доступны в рутинной клинической практике [33,34]. Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение влияния частиц полистирольного микропластика диаметром 1,7-2,2 мкм на жизнеспособность МЯЛ периферической крови при помощи проточной цитофлуориметрии с визуализацией.

Материал и методы. Проведённое исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 10.10.2022 г.) и соответствует требованиям Надлежащей Клинической Практики (GCP) и Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования». В пилотное исследование были включены 6 здоровых доноров (3 мужчины, 3 женщины), давшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании, возраст участников составил 34,5 [31,75;35,5] года, 95% CI (31,00-37). Критериями исключения явились злоупотребление алкоголем и наркотическими веществами, острые воспалительные и хронические заболевания в фазе обострения и неполной ремиссии, сахарный диабет 1-го и 2-го типа, онкологические заболевания и болезни крови, беременность и период лактации. Взятие крови осуществляли однократно натощак путём венепункции с помощью вакуумных систем для забора крови из кубитального доступа с использованием пробирок Vacutainer® CPT™ - BD с разделительным гелем, гепарином и фиколлом, от каждого донора исследовался один образец крови. Центрифугировали пробирки Vacutainer® CPT™ - BD при 3000 об/мин в течение 30 минут. Аккуратно забирали слой с мононуклеарами автоматической пипеткой и дважды отмывали в среде теплого PBS путем центрифугирования при 1600 об/мин в течение 10 минут. После выделения мононуклеарных лейкоцитов полученную суспензию ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей L-глутамин и 10% эмбриональную бычью сыворотку. Далее измеряли концентрацию мононуклеарных лейкоцитов, доводили её до 500 тысяч клеток в 1 мл. Полученную суспензию делили на контрольный (без добавления частиц микропластика) и опытный образцы (с добавлением частиц полистирольного микропластика Polystyrene Fluorescent Particles 1,7-2,2 мкм, Light Yellow, High Intensity (Spherotech, USA) в конечной концентрации 25 мкг/мл), которые инкубировали в термостате при 37 °C. Взятие биоматериала на анализ жизнеспособности происходил через 1, 2 и 4 часа инкубации. За 15 минут до конца инкубации добавляли CD-45 PE (Cloud-Clone Corp.), за 5 минут до конца инкубации добавляли 7-AAD (Biolegend) в количестве, соответствующем рекомендациям производителя. Инкубация происходила в темноте. Цитометрические ис-

следования проводились на проточном цитометре с визуализацией AmnisFlowsight (Cytek Biosciences, USA) при помощи голубого лазера (488 нм, 60 мВт), на средней скорости потока с использованием программного обеспечения INSPIRE®. Анализировали 10000 собы-

тий при помощи программного обеспечения IDEAS®.

На рис. 1 представлена стратегия гейтирования при анализе жизнеспособности CD-45 положительных клеток, контактирующих с частицами микропластика.

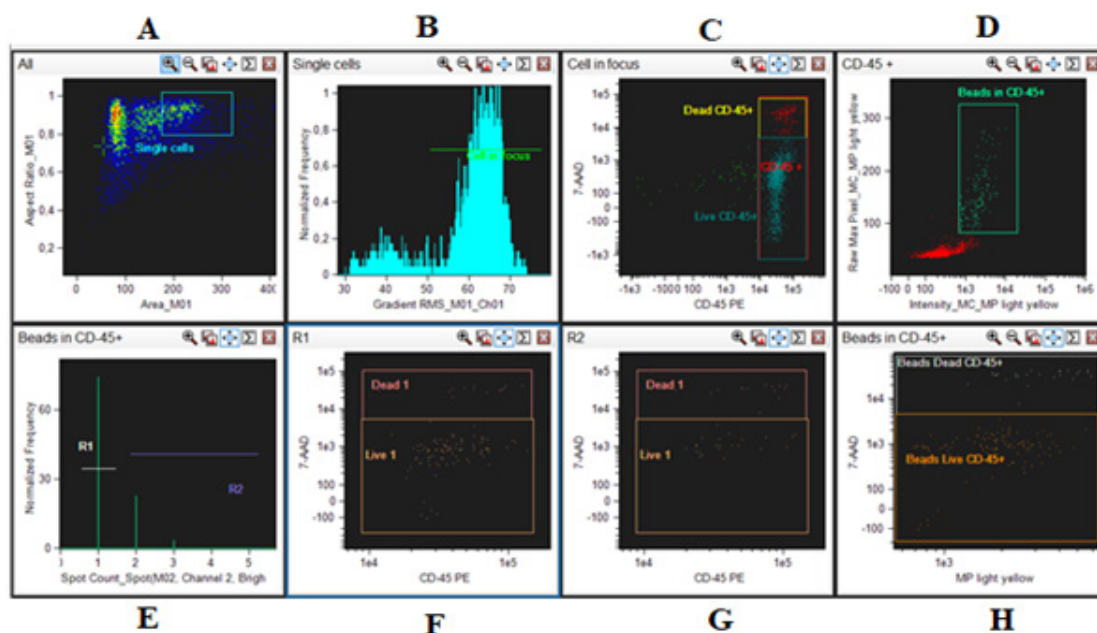


Рис. 1. Жизнеспособность МЯЛ крови при контакте с частицами микропластика.

А - выделение области единичных клеток (Single cells) по таким признакам как Area (площадь) и Aspect Ratio (сферичность), соответствующим морфологии МЯЛ;

В - выделение клеток в фокусе с использованием функции IDEAS® gradient RMS, которая помогает выбирать высококачественные изображения со среднеквадратичными значениями выше 50;

С - выделение CD-45- положительных клеток, их разделение на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Д - выделение CD-45-положительных клеток, контактирующих с частицами микропластика с использованием функции IDEAS® Internalization Wizard;

Е - гистограмма, показывающая количество CD-45- положительных клеток, контактирующих с 1-ой частицей МП (R1) и 2-мя и более частицами МП (R2), полученная при помощи IDEAS® Spot Wizard;

Ф - разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с 1 частицей МП (R1) на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Г - разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с 2-мя и более частицами (R2) на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Н - Разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с частицами МП на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD.

Для контрольных образцов стратегия гейтирования включает только графики А, В, С (см. рис.1).

Статистическую обработку проводили с использованием программы GraphPad Software, США. При помощи критерия Шапиро-Уилка проверяли соответствие выборок нормальному распределению. Поскольку распределение было отличным от нормального, для оценки статистической значимости использовали непараметрический критерий Краскелла-Уоллиса, для поправки на множественное сравнение использовали двухэтапный метод Бенджамини-Кригера-Иекутелли, отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Жизнеспособность CD45+ МЯЛ, выделенных с помощью BD CPT, за периоды инкубации 1, 2 и 4 часа отражена в табл. 1. Результаты представлены в виде Ме (95% CI)

Период от 1 до 4-х часов инкубации сопровождался

сопоставимым уровнем жизнеспособности исследуемых клеток с незначительным снижением показателя на 4-ом часу инкубации. Таким образом, относительно небольшое снижение жизнеспособности клеток позволило предположить возможность оценки воздействия микропластика на показатель жизнеспособности при четырехчасовом воздействии.

Жизнеспособность клеток, подвергшихся экспозиции микропластиком также статистически значимо снижалась спустя 4 часа инкубации по сравнению с 1-м и 2-м часом.

Сравнение показателей жизнеспособности в общем пуле клеток контрольной и опытных образцов выявило статистически значимое падение жизнеспособности только на 2-м часу инкубации, однако наблюдалось достоверное снижение доли жизнеспособных МЯЛ, имевших контакт с микропластиком на всех временных промежутках *in vitro* инкубации (рис. 2).

Таблица 1

Уровень жизнеспособных CD45⁺ МЯЛ в течение 1, 2 и 4 часов (ч) в контрольных образцах (контроль, А) и в образцах с микропластиком 25 мкг/мл (МП, в)

Показатель	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
Доля жизнеспособных CD45 ⁺ МЯЛ в контрольных образцах, %	94,55[94,0;95,6] 95% CI (93,7-95,6)	95,65 [94,90;96,53] 95% CI (94,3-96,6)	88,55 [88,25;89,95] 95% CI (87,8-91,6) $p_{1-4}=0,0455$ $p_{2-4}=0,0031$
Доля жизнеспособных CD45 ⁺ МЯЛ в образцах с МП 25 мкг/мл, %	93,75[92,98;94,85] 95% CI (92,9-95,6)	93,0 [91,43;93,78] 95% CI (91,2-94,3) [#]	88,6 [85,7;89,18] 95% CI (85,4-90,0) $p_{1-4}=0,0041$ $p_{2-4}=0,0110$

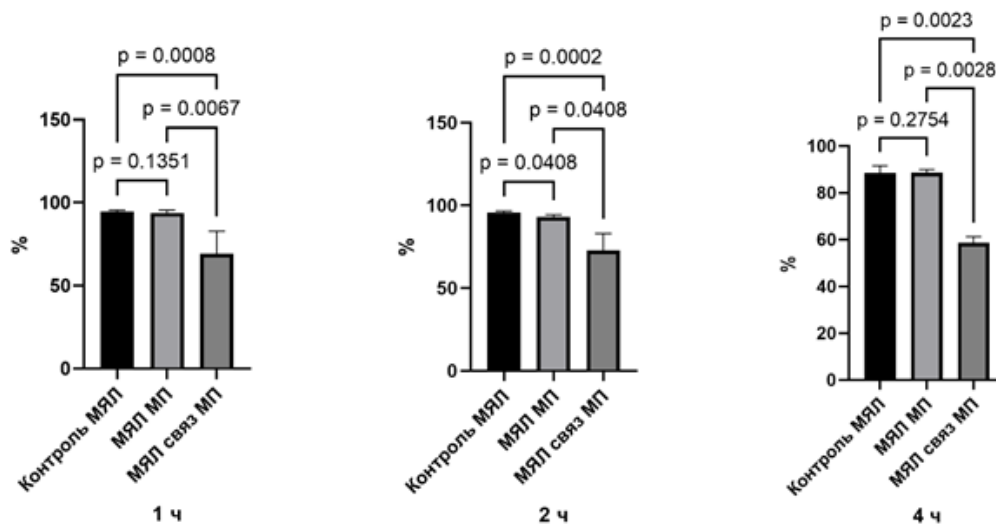


Рис. 2. Процент жизнеспособных CD45⁺ лейкоцитов в течение 1, 2 и 4-х часов инкубации с микропластиком.

Результаты на графиках представлены в виде Ме (95% CI). Точное значение p отражено над столбцами в графиках. Контроль МЯЛ - доля жизнеспособных CD45⁺ МЯЛ в контрольных образцах, МЯЛ МП - доля жизнеспособных CD45⁺ МЯЛ в образцах с МП 25 мкг/мл, МЯЛ связ МП - доля жизнеспособных клеток, проконтактировавших с частицами МП от общего числа CD45⁺ МЯЛ.

Далее была проведена оценка количества клеток, проконтактировавших с частицами МП. Мы выявили тенденцию к снижению процентного содержания CD45⁺ клеток, связанных с частицами МП после 1-го часа инкубации, что отражено в табл. 2. Вместе с тем наблюдалась тенденция к падению жизнеспособности клеток, имеющих контакт с МП, на 4-м часу инкубации.

Таблица 2

Доля от общего числа CD45⁺ МЯЛ проконтактировавших с частицами микропластика и относительное количество жизнеспособных клеток среди МЯЛ, проконтактировавших с частицами микропластика

Показатель	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
Доля клеток от общего числа CD45 ⁺ МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП, %	5,8 [3,55;7,1] 95% CI (3,4-8,9)	4,15 [3,33;4,73] 95% CI (2,8-5,7)	4,4 [3,88;5,88] 95% CI (3,2-7,6)
Доля жизнеспособных клеток, проконтактировавших с частицами МП от общего числа CD45 ⁺ МЯЛ, %	64,30 [69,30;74,78] 95% CI (56,2-82,8)	63,60 [72,75;78,98] 95% CI (62,1-83,1)	58,60 [52,10;60,93] 95% CI (45,8-61,3)

В этой связи было сделано предположение, что наличие тенденции могло быть обусловлено различным количеством частиц, которое может быть связано с клеткой. Неоспоримым преимуществом проточной цитометрии с

визуализацией является получение графических изображений, позволяющих отличить клетки без контакта с микропластиком (рис.3, А), контактирующие с 1 частицей (рис.3, В), с 2-мя (рис.3, С), 3-мя и более частицами (рис.3, D).

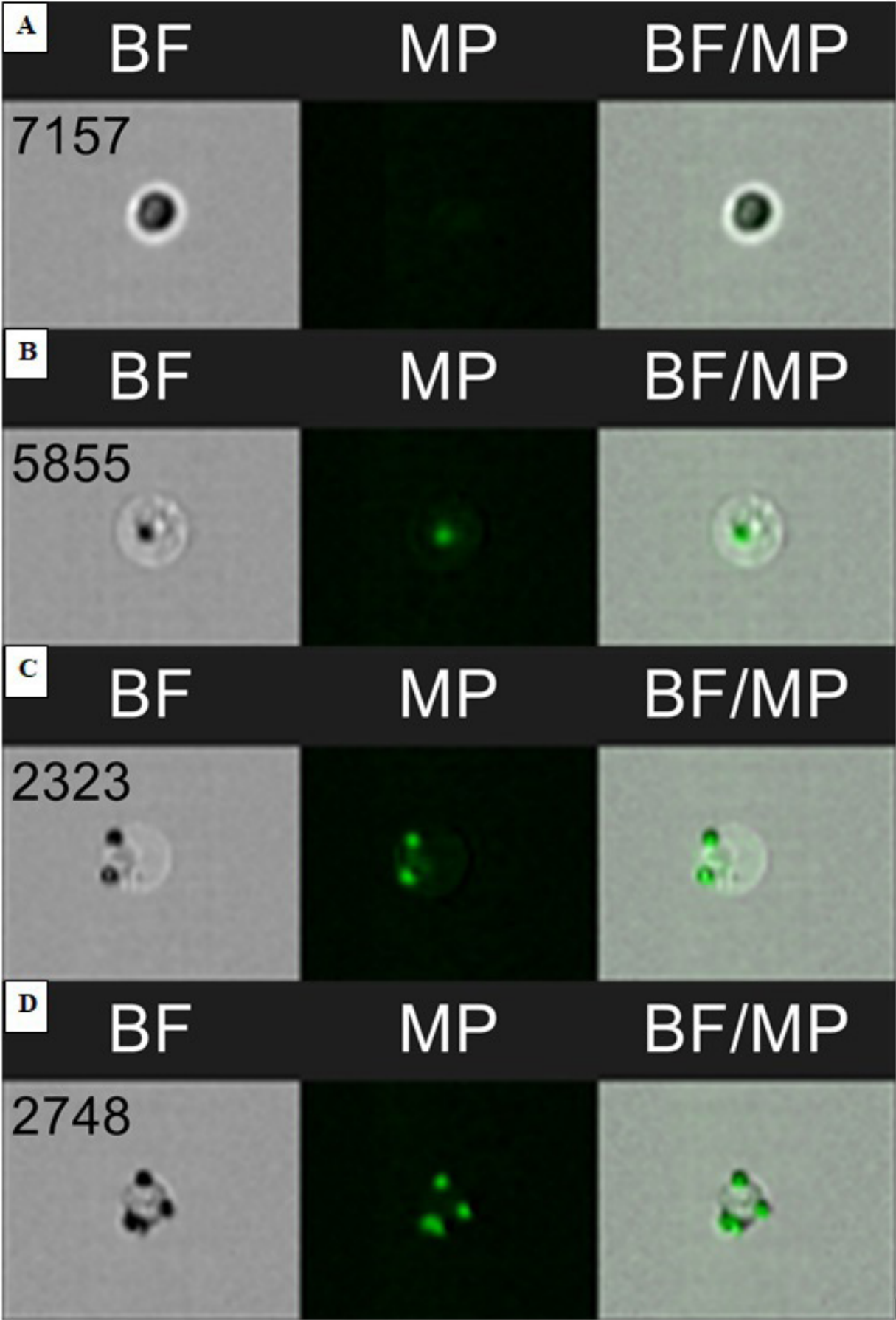


Рис. 3. Мононуклеарные лейкоциты без контакта с микропластиком (А), контактирующие с 1 частицей (В), с 2-мя частицами (С), с 3-мя частицами (D).

Мы проанализировали, менялось ли количество клеток, связанных с 1 частицей и 2-мя и более частицами в течение 1,2 и 4-х часов инкубации, что отражено в табл. 3. Оказалось, что относительное содержание кле-

ток, связанных с 1-й частицей статистически значимо выше на протяжении всего времени инкубации, чем связанных с 2-мя и более частицами. Результаты представлены в виде Me (95% CI).

Таблица 3

Относительное количество CD45⁺ МЯЛ, проконтактировавших с частицами микропластика в зависимости от количества частиц и времени инкубации и динамика их жизнеспособности

Число проконтактировавших частиц	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
Относительное количество CD45⁺ МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП			
1 частица	4,72 [2,89;5,96] 95% CI (2,52-6,51)	3,66 [2,85;3,99] 95% CI (2,58-4,87)	3,50 [3,33;4,23] 95% CI (2,93-5,77)
2+ частицы	0,89 [0,78;1,79] 95% CI (0,64-2,71) $p_{1-2+}=0,0043$	0,53 [0,36;0,79] 95% CI (0,19-0,89) $p_{1-2+}=0,0022$	0,96 [0,56;1,733] 95% CI (0,3-2,0) $p_{1-2+}=0,0022$
Относительное количество живых CD45⁺ МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП			
1 частица	67,55 [58,35;77,08] 95% CI (56,7-87,2)	66,15 [51,13;75,73] 95% CI (38,90-77,90)	58,0 [52,53;62,05] 95% CI (40,6-67,0)
2+ частицы	45,24 [28,01;70,0] 95% CI (26,32-72,31)	40,63 [26,98;72,76] 95% CI (22,22-83,33)	27,88 [22,6; 36,76] 95% CI (22,22-37,93) $p_{1-2+}=0,0022$

При сравнении показателей жизнеспособности в зависимости от количества связанных частиц было установлено, что на 4-м часу инкубации достоверно снижалась жизнеспособность клеток, имеющих контакт с 2-мя и более частицами по сравнению с клетками, проконтактировавшими с 1-й частицей.

Обсуждение. Мононуклеарные лейкоциты крови представляют собой смешанную популяцию миелоидных и лимфоидных клеток. Миелоидные клетки включают моноциты, дендритные клетки и макрофаги. Лимфоидные клетки включают В-клетки, Т-клетки и НК-киллеры. Большинство МЯЛ (70-90%) - это лимфоциты, не обладающие способностью к фагоцитозу. В исследовании S. Ballesteros и соавторов [28] при действии полистирольных частиц нано- и микропластика повреждение ДНК наблюдалось в моноцитах и полиморфноядерных клетках, но в лимфоцитах повреждений обнаружено не было. В то время как моноциты демонстрировали самое высокое поглощение полистирольных частиц, лимфоциты демонстрировали незначительную интернализацию [28]. В связи с этим в данном пилотном исследовании мы не ставили цель оценить фагоцитирующую активность МЯЛ крови по отношению к частицам микропластика. Наряду с этим, предложенный нами метод может использоваться в дальнейших исследованиях для выявления негативного действия частиц МП в отдельных субпопуляциях клеток крови, в том числе для оценки фагоцитоза и влияния МП на субклеточные структуры. Установленное нами значимое снижение жизнеспособности МЯЛ, имевших контакт с МП (см. табл. 1), могло быть объяснено, в том числе физическим взаимодействием между микросферами МП и клеточной мембраной, приводящим к её повреждению. Так, известно, что непосредственный контакт клеточной мембраны с МП связан с продукцией активных форм кислорода (АФК) из-за

нарушения равновесия химических реакций в клетках [27, 35]. Полученные нами результаты, демонстрируют, что наиболее неблагоприятное действие на жизнеспособность проявляется при контакте клетки более чем с одной частицей (см. табл. 3). Эти данные позволяют дополнить представления о влиянии МП на жизнеспособность клеток, имеющиеся на сегодняшний день.

Ограничением проведенного исследования является короткий промежуток времени инкубации, недостаточный для выделения из пластика токсичных веществ, таких как пластификаторы и мономеры. Тем не менее, в исследовании V. Paget и соавт. [36] был выявлен генотоксический эффект полистирольных наночастиц на линии легочных эпителиальных клеток (Calu-3) и в макрофагах (THP-1) уже через 1,2 и 4 часа. А. Salimi и соавт. [35] обнаружили цитотоксичность МП из поливинилхлорида ПВХ на лимфоцитах крови человека в течение 3-х часового воздействия, которая была связана с образованием внутриклеточных активных форм кислорода, повреждением лизосомальных мембран, падением митохондриального мембранного потенциала. Хотя мы и выявили небольшое снижение жизнеспособности в общей суспензии мононуклеаров крови после 2-х часового воздействия частиц МП, длительное воздействие потенциально может вызвать более выраженный эффект. Кроме того, используемый в исследовании МП был сферической формы и не подвергался непосредственному воздействию окружающей среды, механической деструкции и характеризовался отсутствием микроорганизмов и загрязняющих веществ. Актуальным представляется исследование эффектов МП, подвергшихся механическому воздействию, поскольку острые края частиц при контакте с клеткой вызывают механические повреждения мембраны и скорый биохимический ответ [11].

Кроме того, в дальнейших исследованиях следует

оценить влияние различных концентраций МП. Так, S. Ballesteros и соавт. [28] исследовали влияние пластика на лейкоциты периферической крови человека в концентрации пластика 1,10,25,50,100 мкг/мл, причем наибольшая экспрессия провоспалительных цитокинов наблюдалась в концентрации 25 мкг/мл. Н. Çobanoglu и соавт. [37] оценивали эффекты частиц полистирольного МП крупного диаметра 10–45 мкм с концентрацией 25, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл, генотоксическое действие по отношению к МЯЛ периферической крови были зафиксировано в высоких концентрациях–250 и 500 мкг/мл. Y. Park и соавт. [32] работали с низкой концентрацией МП 0.05 мкг/мл, средней– 5 мкг/мл и высокой– 50 мкг/мл. Мы исследовали концентрацию полистирольного МП 25 мкг/мл, несколько превосходящую ту, что обнаружена в крови человека (1,6 мкг/мл) [19]. Полученные результаты помогли выявить некоторые первичные сдвиги, наблюдаемые в жизнеспособности МЯЛ периферической крови.

Заключение. В ходе проведенного исследования было обнаружено, что воздействие полистирольного микропластика (1,7–2,2 мкм, Light Yellow, High Intensity (Spherotech) в концентрации 25 мкг/мл приводит к значимому снижению общей жизнеспособности моноядерных лейкоцитов крови человека после 2-х часов *in vitro* инкубации, при этом снижается жизнеспособность моноядерных лейкоцитов крови, имевших прямой контакт с частицами МП на протяжении всего периода *in vitro* инкубации. На 4-м часу инкубации наблюдается падение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови при контакте с двумя и более частицами МП, что указывает на зависимость показателя жизнеспособности от числа проконтактировавших с клеткой частиц МП. Проточная цитометрия с визуализацией является современным методом для оценки негативного влияния МП на клеточном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

- Hirt N., Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*. 2020; 17: 57. DOI: 10.1186/s12989-020-00387-7.
- De Marco G., Conti G.O., Giannetto A., Cappello T., Galati M., Iaria C., et al. Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Research*. 2022; 208: 112552. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112552.
- Prata J. C., Silva A. L., Walker T. R., Duarte A. C., Rocha-Santos T. COVID-19 pandemic repercussions on the use and management of plastics. 2020; 54(13): 7760–5. DOI: 10.1021/acs.est.0c02178.
- Facciola A., Visalli G., Pruiti Ciarello M., Di Pietro A. Newly Emerging Airborne Pollutants: Current Knowledge of Health Impact of Micro and Nanoplastics. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18: 2997. DOI: 10.3390/ijerph18062997.
- Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainte-Rose B., Aitken J., Marthouse R., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports*. 2018; 8: 4666. DOI: 10.1038/s41598-018-22939-w.
- European Food Safety Authority (EFSA). "Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood." EFSA Journal 14.6 (2016): e04501. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4501.
- Zhang Q., Xu E.G., Li J., Chen Q., Ma L., Zeng, E.Y., Shi H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54: 3740–51. DOI: 10.1021/acs.est.9b04535.
- Revel M., Châtel A., Mouneyrac C. Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 2018; 1: 17–23. DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.003.
- Cox K.D., Covernton G.A., Davies H.L., Dower J.F., Juanes F., Dudas S.E. Human Consumption of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2019; 53: 7068–74. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
- Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17: 1212. DOI: 10.3390/ijerph17041212.
- Han, S., Bang, J., Choi, D., Hwang, J., Kim, T., Oh, Y. et al. Surface pattern analysis of microplastics and their impact on human-derived cells. *ACS Applied Polymer Materials*. 2020; 2(11): 4541–50. DOI: 10.1021/acsapm.0c00645.
- Deng Y., Zhang Y., Lemos B., Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* 2017; 7: 46687. DOI: 10.1038/srep46687.
- Ершова А. А., Еремина Т. Р., Дунаев А. Л., Макеева И. Н., Татаренко Ю. А. Исследование загрязнения микропластиком морей российской Арктики и Дальнего Востока. *Арктика: экология и экономика*. 2021; 11(2): 164. DOI: 10.25283/2223-4594-2021-2-164-177.
- Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsics T., Trauner M., Reiberger T. et al. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine*. 2019; 171(7): 453–7. DOI: 10.7326/M19-0618.
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali, O. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*. 2021; 146: 106274. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106274.
- Amato-Lourenço L. F., Carvalho-Oliveira R., Júnior G. R., dos Santos Galvão L., Ando R. A., Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*. 2021; 416: 126124. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
- Horvatits T., Tamminga M., Liu B., Sebode M., Carambia A., Fischer, L. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine*. 2022; 82. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104147.
- Ibrahim Y. S., Tuan Anuar S., Azmi A. A., Wan Mohd Khalik W. M. A., Lehata S., Hamzah S. R. et al. Detection of microplastics in human colectomy specimens. *JGH open*. 2021; 5(1): 116–21. DOI: 10.1002/jgh3.12457.
- Leslie H. A., Van Velzen M. J., Brandsma S. H., Vethaak A. D., Garcia-Vallejo J. J., Lamoree M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*. 2022; 163: 107199.
- Ferrante M., Cristaldi A., Oliveri Conti G. Oncogenic Role of miRNA in Environmental Exposure to Plasticizers: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11: 500. DOI: 10.3390/jpm11060500.
- Elsaesser A., Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 129–137. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001.
- Smith M, Love D.C., Rochman C.M., Neff R.A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports*. 2018; 5: 375–86. DOI: 10.1007/s40572-018-0206-z.
- Poma A., Vecchiotti G., Colafarina S., Zarivi O., Aloisi M., Arrizza L. *In vitro* genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast Hs27 cell line. *Nanomaterials*. 2019; 9(9): 1299. DOI: 10.3390/nano9091299.
- Dong C. D., Chen C. W., Chen Y. C., Chen H. H., Lee, J. S., Lin, C. H. Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of hazardous materials*. 2020; 385: 121575. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121575.
- He Y., Li J., Chen J., Miao X., Li G., He Q. et al. Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*. 2020; 723: 138180. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
- Jangsun H., Daheui C., Seora H., Jung S.Y., Jonghoon C., Jinkee H. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
- Hwang J., Choi D., Han S., Jung S. Y., Choi J., Hong, J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 7391. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9.
- Ballesteros S., Domenech J., Bargailla I., Cortés C., Marcos R., Hernández A. Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after ex vivo exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*. 2020; 7(11): 3431–46. DOI: 10.1039/

DOI:10.51620/0869-2084-2024-69-8-377-386

29. Basiji D., Lau A., Wong T., Shum H. C., Wong K., Tsia K. et al. Imaging flow cytometry: methods and protocols. N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev (Eds.). Springer New York, 2016.
30. Kik K., Bukowska B., Krokosz A., Sicińska P. Oxidative Properties of Polystyrene Nanoparticles with Different Diameters in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (*In Vitro* Study). *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 4406. DOI: 10.3390/ijms22094406.
31. Купцова, Д. Г., Радыгина, Т. В., Мурашкин, Н. Н., Петричук, С. В. Активность транскрипционного фактора NF-κB в лимфоцитах у детей с псориазом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(54): 34-5.
32. Park Y., Abihssira-García I. S., Thalmann S., Wiegertjes G. F., Barreda D. R., Olsvik P. A. et al. Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 203. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00203.
33. Бельских Э. С., Урясьев О. М., Звягина В. И., Фалетрова, С. В. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью легких. *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. 2018; 6(2): 203-10. DOI: 10.23888/HMJ201862203-210.
34. Бельских Э. С., Урясьев О. М., Звягина В. И., Фалетрова С. В. Сукцинат и сукцинатдегидрогеназа моноядерных лейкоцитов крови как маркеры адаптации митохондрий к гипоксии у больных при обострении хронической обструктивной болезни легких. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020; 28(1): 13-20. DOI: 10.23888/PAVLOVJ202028113-20.
35. Salimi A., Alavehzhadeh A., Ramezani M., Pourahmad, J. Differences in sensitivity of human lymphocytes and fish lymphocytes to polyvinyl chloride microplastic toxicity. *Toxicology and Industrial Health*. 2022; 38(2): 100-11. DOI: 10.1177/07482337211065832.
36. Paget V., Dekali S., Kortulewski T., Grall R., Gamez C., Blazy K. et al. Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123297. DOI: 10.1371/journal.pone.0123297.
37. Çobanoğlu H., Belivermiş M., Sıkdokur E., Kılıç Ö., Çayır, A. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere*. 2021; 272: 129805. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129805.
- 10.1016/j.coesh.2017.10.003.
9. Cox K.D., Covernton G.A., Davies H.L., Dower J.F., Juanes F., Dudas S.E. Human Consumption of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2019; 53: 7068–74. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
10. Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17: 1212. DOI: 10.3390/ijerph17041212.
11. Han, S., Bang, J., Choi, D., Hwang, J., Kim, T., Oh, Y. et al. Surface pattern analysis of microplastics and their impact on human-derived cells. *ACS Applied Polymer Materials*. 2020; 2(11): 4541-50. DOI: 10.1021/acsapm.0c00645.
12. Deng Y., Zhang Y., Lemos B., Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci Rep*. 2017; 7: 46687. DOI: 10.1038/srep46687.
13. Ershova A. A., Eremina T. R., Dunaev A. L., Makeeva I. N., Tatarenko Yu. A. Investigation of microplastic pollution of the seas of the Russian Arctic and the Far East. *Arktika: ekologiya i ekonomika*. 2021; 11(2): 164. DOI: 10.25283/2223-4594-2021-2-164-177. (in Russian)
14. Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsecs T., Trauner M., Reiberger T. et al. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine*. 2019; 171(7): 453-7. DOI: 10.7326/M19-0618.
15. Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali, O. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*. 2021; 146: 106274. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106274.
16. Amato-Lourenço L. F., Carvalho-Oliveira R., Júnior G. R., dos Santos Galvão L., Ando R. A., Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*. 2021; 416: 126124. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
17. Horvatits T., Tamminga M., Liu B., Sebode M., Carambia A., Fischer, L. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine*. 2022; 82. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104147.
18. Ibrahim Y. S., Tuan Anuar S., Azmi A. A., Wan Mohd Khalik W. M. A., Lehata S., Hamzah S. R. et al. Detection of microplastics in human colostomy specimens. *JGH open*. 2021; 5(1): 116-21. DOI: 10.1002/jgh3.12457.
19. Leslie H. A., Van Velzen M. J., Brandsma S. H., Vethaak A. D., Garcia-Vallejo J. J., Lamoree M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*. 2022; 163: 107199.
20. Ferrante M., Cristaldi A., Oliveri Conti G. Oncogenic Role of miRNA in Environmental Exposure to Plasticizers: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11: 500. DOI: 10.3390/jpm11060500.
21. Elsaesser A., Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 129–37. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
22. Smith M., Love D.C., Rochman C.M., Neff R.A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports*. 2018; 5: 375–86. DOI: 10.1007/s40572-018-0206-z.
23. Poma A., Vecchiotti G., Colafarina S., Zarivi O., Aloisi M., Arrizza L. *In vitro* genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast Hs27 cell line. *Nanomaterials*. 2019; 9(9): 1299. DOI: 10.3390/nano9091299.
24. Dong C.D., Chen C.W., Chen Y.C., Chen H.H., Lee J.S., Lin C.H. Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of hazardous materials*. 2020; 385: 121575. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121575.
25. He Y., Li J., Chen J., Miao X., Li G., He Q. et al. Cytotoxic effects of polystyrene nanoparticles with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*. 2020; 723: 138180. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
26. Jangsun H., Daheui C., Seora H., Jung S.Y., Jonghoon C., Jinkee H. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
27. Hwang J., Choi D., Han S., Jung S. Y., Choi J., Hong, J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
28. Ballesteros S., Domenech J., Bargailla I., Cortés C., Marcos R., Hernández A. Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after *ex vivo* exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*. 2020; 7(11): 3431-46. DOI: 10.1039/

REFERENCES

1. Hirt N., Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*. 2020; 17: 57. DOI: 10.1186/s12989-020-00387-7
2. De Marco G., Conti G.O., Giannetto A., Cappello T., Galati M., Iaria C., et al. Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Research*. 2022; 208: 112552. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112552.
3. Prata, J. C., Silva, A. L., Walker, T. R., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. COVID-19 pandemic repercussions on the use and management of plastics. 2020; 54(13): 7760-5. DOI: 10.1021/acs.est.0c02178.
4. Facciola A., Visalli G., Pruiti Ciarello M., Di Pietro A. Newly Emerging Airborne Pollutants: Current Knowledge of Health Impact of Micro and Nanoplastics. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18: 2997. DOI: 10.3390/ijerph18062997.
5. Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainte-Rose B., Aitken J., Marthouse R., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports*. 2018; 8: 4666. DOI: 10.1038/s41598-018-22939-w.
6. European Food Safety Authority (EFSA). "Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood." *EFSA Journal*. 14.6 (2016): e04501. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4501.
7. Zhang Q., Xu E.G., Li J., Chen Q., Ma L., Zeng, E.Y., Shi H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54: 3740–51. DOI: 10.1021/acs.est.9b04535.
8. Revel M., Châtel A., Mouneyrac C. Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 2018; 1: 17–23. DOI:

- DOI:10.3390/ijms22094406.
29. Basiji D., Lau A., Wong T., Shum H. C., Wong K., Tsia K. et al. Imaging flow cytometry: methods and protocols. N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev, eds. Springer New York; 2016.
 30. Kik K., Bukowska B., Krokosz A., Sicińska P. Oxidative properties of polystyrene nanoparticles with different diameters in human peripheral blood mononuclear cells (*In Vitro Study*). *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 4406. DOI: 10.3390/ijms22094406.
 31. Kuptsova D. G., Radygina T. V., Murashkin N. N., Petrichuk S. V. The activity of transcription factor NF-KB in lymphocytes in children with psoriasis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(S4): 34-5. (in Russian)
 32. Park Y., Abihssira-García I. S., Thalmann S., Wiegertjes G. F., Barreda D. R., Olsvik P. A. et al. Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 203. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00203.
 33. Bel'skikh E. S., Uryas'ev O. M., Zvyagina V. I., Faletrova, S. V. Investigation of oxidative stress and mitochondrial function in mononuclear blood leukocytes in patients with chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Nauka molodykh – Eruditio Juvenium*. 2018; 6(2): 203-10. DOI: 10.23888/HMJ201862203-210. (in Russian)
 34. Bel'skikh E. S., Uryas'ev O. M., Zvyagina V. I., Faletrova S. V. Succinate and succinate dehydrogenase of mononuclear leukocytes as markers of mitochondrial adaptation to hypoxia in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2020; 28(1): 13-20. DOI: 10.23888/PAVLOVJ202028113-20. (in Russian)
 35. Salimi A., Alavehzadeh A., Ramezani M., Pourahmad, J. Differences in sensitivity of human lymphocytes and fish lymphocytes to polyvinyl chloride microplastic toxicity. *Toxicology and Industrial Health*. 2022; 38(2): 100-11. DOI: 10.1177/07482337211065832.
 36. Paget V., Dekali S., Kortulewski T., Grall R., Gamez C., Blazy K. et al. Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PloS One*. 2015; 10(4): e0123297. DOI: 10.1371/journal.pone.0123297.
 37. Çobanoğlu H., Belivermiş M., Sıkdokur E., Kılıç Ö., Çayır, A. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere*. 2021; 272: 129805. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129805.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© ГАДЖИЕВ Н.ДЖ., ЭЙНУЛЛАЕВА Н.А., 2024

Гаджиев Н. Дж., Эйнуллаева Н. А.

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ ПРИ ОСТРОМ КАЛЬКУЛЕЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

Азербайджанский медицинский университет, 1022, Баку, Азербайджан

Цель исследования - изучение значения интегральных гематологических индексов (ИГИ) в ранней диагностике деструктивных форм острого калькулезного холецистита. Приведены результаты исследования 116 больных острым калькулезным холециститом. Больные разделены на 3 группы: I группа - 53 больных с катаральной, II группа - 38 больных с флегмонозной, III группа - 25 больных с гангренозной формой заболевания. У всех больных при поступлении брали кровь для изучения гематологических индексов. Изучены следующие показатели: лимфоцитарный индекс (ЛИ), индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ), индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ), индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ), индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ), индекс соотношения лимфоцитов и СОЭ (ИСЛОЭ), лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ЛГИ), общий индекс (ОИ), индекс иммунореактивности (ИРИ), лейкоцитарный индекс интоксикации по В.К. Островскому (ЛИИ), индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК). Анализ интегральных гематологических показателей периферической крови служит ранним ориентиром в диагностике деструктивных форм калькулезного холецистита.

Ключевые слова: острый калькулезный холецистит; интегральные гематологические индексы

Для цитирования: Гаджиев Н. Дж., Эйнуллаева Н. А. Интегральные гематологические индексы при остром калькулезном холецистите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (8): 387-393.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-387-393>

Для корреспонденции: Гаджиев Новруз Джаббар оглы, д-р мед. наук, проф. каф. общей хирургии; e-mail: novruz.gadjiev@rambler.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила	19.04.24
Принята к печати	04.07.24
Опубликовано	01.08.24

Hajiyev N.J., Eynullayeva N.A.

INTEGRAL HEMATOLOGICAL INDEXES IN ACUTE CALCULUS CHOLECYSTITIS

Azerbaijan Medical University, 1022, Baku, Azerbaijan

The aim of the research was to study the importance of integral hematological indexes (IHI) in the early diagnosis of destructive forms of acute calculus cholecystitis. The results of the research of 116 patients with acute calculus cholecystitis are presented. The patients were divided into 3 groups: group 1 - 53 patients with catarrh, group 2 - 38 patients with phlegmon and group 3 - 25 patients with gangrene. The blood samples were taken from all patients at their admission to study hematological indexes. The following indicators were studied: lymphocyte index (LI), lymphocyte-to-monocyte ratio index (LMRI), neutrophil-to-lymphocyte ratio index (NLRI), neutrophil-to-monocyte ratio index (NMRI), neutrophil-to-eosinophil ratio index (NERI), lymphocyte-to-ESR ratio index (LESRRRI), lymphocyte-granulocyte index (LGI), general index (GI), immunoreactive index (IRI), leukocyte index of intoxication according to V.K. Ostrovsky (LII), blood leukocyte shift index (BLSI). Integrated analysis of hematological parameters of peripheral blood serves as an early guide in the diagnosis of destructive forms of calculus cholecystitis.

Key words: acute calculus cholecystitis; integral hematological indexes

For citation: Hajiyev N.J., Eynullayeva N.A. Integral hematological indexes in acute calculus cholecystitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 387-393 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-387-393>

For correspondence: Novruz Jabbar Hajiyev, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of General Surgery of Azerbaijan Medical University; e-mail: novruz.gadjiev@rambler.ru

Information about authors:

Hajiyev N. J., <https://orcid.org/0000-0001-9820-4746>;

Eynullayeva N.A., <https://orcid.org/0009-0009-1187-6933>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.04.2024

Accepted 04.07.2024

Published 01.08.2024

Введение. С каждым годом совершенствуются диагностические возможности, однако не всем лечебным учреждениям доступны современные высокотехнологичные методы диагностики и исследования, что определяется оснащением и возможностями лабораторных служб лечебного учреждения. Общеклинический анализ периферической крови всегда остается доступным и распространенным методом обследования. К большому сожалению, и в наши дни на фоне дорогостоящих обследований диагностическая информативность «рутинных» показателей клинического анализа крови остается в «тени» и требует пересмотра.

Не следует забывать, что именно кровь служит внутренней интегральной средой, играющей главную роль в неспецифических и специфических реакциях защиты организма и тем самым влияющей на его реактивность и резистентность. Кровь является транспортной системой для химических веществ и газов, благодаря чему беспрерывно происходят обменные процессы в организме.

Форменными элементами крови являются эритроциты, лейкоциты (гранулоциты: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и агранулоциты: лимфоциты, моноциты), тромбоциты. Основной функцией нейтрофильных гранулоцитов является фагоцитоз; клетки выполняют защитную роль. Эозинофилы участвуют в основном в аллергических реакциях, хотя и способны к фагоцитозу. Лимфоциты являются центральным звеном специфических иммунологических реакций и носителями иммунологической памяти. Моноцитам – наиболее крупным клеткам – свойственен фагоцитоз, особенно в отношении фрагментов клеток, чужеродных мелких тел и т. п.

На развитие воспалительного процесса в организме кровь отвечает соответствующими изменениями клеточного состава. В хирургической практике убедительным доказательством воспаления обычно считается лейкоцитоз с нейтрофилезом.

Учитывая физиологические функции и специфические свойства лейкоцитов и их субпопуляций, с учетом значений интегральных гематологических индексов (ИГИ), в том числе лейкоцитарных, можно судить о состоянии организма и его изменениях при патологических процессах. Работами ряда авторов [1-8] доказана информативность ИГИ периферической крови в диагностике острых гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации и ряда других патологий, мониторинге их течения и прогнозировании исходов.

Острое воспаление желчного пузыря как наиболее распространенное осложнение желчнокаменной болезни у 35% пациентов имеет стертую клиническую симптоматику, что приводит к запоздалой диагностике, развитию деструктивных форм холецистита и желчного перитонита и, тем самым, к запоздалому оперативному вмешательству, что значительно повышает риск развития гнойно-воспалительных осложнений и процент летальности в послеоперационном периоде.

Цель работы: оценка значения интегральных гематологических индексов (ИГИ) в ранней диагностике деструктивных форм острого калькулезного холецистита.

Материал и методы. Под нашим наблюдением находились 116 больных (19 мужчин, 97 женщин) в возрасте от 19 до 87 лет, поступивших в клинику с диагнозом «острый калькулезный холецистит» (ОКХ). 105 больным (90,5%) впоследствии проведена лапаро-

скопическая, 11 (19,5%) - открытая холецистэктомия. В зависимости от клинической формы ОКХ пациентов разделили на группы: I группа - 53 больных с катаральной, II группа - 38 больных с флегмонозной, III группа - 25 больных с гангренозной формой заболевания. У всех больных при поступлении брали кровь из периферической вены в пробирки с EDTA-K2, выполняли клинический анализ крови на гематологическом анализаторе MINDRAY BC-6200 (Китай), определяли гематологические индексы. Ежедневно проводили внутренний контроль качества исследований, внешняя оценка качества осуществлялась в системе KBUDEK (External Quality Control Program). Рассчитывали следующие гематологические индексы:

1. ЛИ (лимфоцитарный индекс) - абсолютное (#) и процентное (%) соотношение лимфоцитов и нейтрофилов: $ЛИ \# = (лимф. \#) / (нейтр. \#)$ и $ЛИ \% = (лимф. \%) / (нейтр. \%)$;
2. ИСЛМ (индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов) - абсолютное (#) и процентное (%) значение: $ИСЛМ \# = (лимф. \#) / (мон. \#)$ и $ИСЛМ \% = (лимф. \%) / (мон. \%)$;
3. ИСНЛ (индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов) - абсолютное (#) и процентное (%) значение: $ИСНЛ \# = (нейтр. \#) / (лимф. \#)$ и $ИСНЛ \% = (нейтр. \%) / (лимф. \%)$;
4. ИСНМ (индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов) - абсолютное (#) и процентное (%) значение: $ИСНМ \# = (нейтр. \#) / (мон. \#)$ и $ИСНМ \% = (нейтр. \%) / (мон. \%)$;
5. ИСЛЭ (индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов) - абсолютное (#) и процентное (%): $ИСЛЭ \# = (лимф. \#) / (эоз. \#)$ и $ИСЛЭ \% = (лимф. \%) / (эоз. \%)$;
6. ИЛСОЭ (индекс соотношения лимфоцитов и СОЭ): $ИЛСОЭ = (лимф. \% \times СОЭ) / 100$;
7. ИЛГ (лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс): $ИЛГ = (лимф. \% \times 10) / (эоз. \% + нейтр. \%)$;
8. ОИ (общий индекс) = $ИЛСОЭ + ИЛГ$;
9. ИРИ (индекс иммунореактивности) = $(лимф. \% + эоз. \%) / (мон. \%)$;
10. ЛИИ (О) - лейкоцитарный индекс интоксикации по В.К. Островскому: $ЛИИ (О) = (нейтр. \%) / (баз. \% + эоз. \% + мон. \%)$ [9];
11. ИСЛК (индекс сдвига лейкоцитов крови) $ИСЛК = (нейтр. \# + эоз. \# + баз. \#) / (лимф. \# + мон. \#)$.

За норму принимали изученные показатели у 20 практически здоровых лиц. Полученные в ходе проведенных исследований числовые данные статистически обработаны с использованием с вычислением $M \pm m$ и критерия Уилкоксона-Манна-Уитни, порогом достоверности различий было принято значение $p < 0,05$.

Результаты проведенных лабораторных исследований в трёх группах больных представлены в таблице.

Как следует из представленных данных, у больных с ОКХ наблюдались изменения ИГИ, глубина которых зависела от клинической формы ОКХ. Лимфоцитарный индекс (ЛИ), отражающий взаимоотношение гуморального и клеточного звена иммунитета и сбалансированность иммунного ответа в целом [10], у больных при поступлении в абсолютном (#) и в процентном (%) отношении снижен ($p < 0,001$) по сравнению с показателями у здоровых лиц. У больных с катаральной

ИГИ у больных в зависимости от клинической формы острого калькулезного холецистита

Показатели	Форма ОКХ	Число обследованных	M	± m	min	max	P _U	P _{U1}	P _{U2}
ЛИ #	Норма	20	0,494	0,033	0,354	0,935			
	Катаральная	53	0,313	0,010	0,137	0,455	<0,001*		
	Флегмонозная	38	0,168	0,009	0,078	0,304	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	0,113	0,007	0,070	0,211	<0,001*	<0,001*	<0,001*
ЛИ %	Норма	20	0,546	0,026	0,371	0,717			
	Катаральная	53	0,330	0,009	0,142	0,494	<0,001*		
	Флегмонозная	38	0,188	0,008	0,081	0,354	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	0,156	0,007	0,082	0,229	<0,001*	<0,001*	0,005*
ИСЛМ #	Норма	20	3,98	0,17	2,67	5,60			
	Катаральная	53	2,32	0,09	0,84	4,00	<0,001*		
	Флегмонозная	38	1,40	0,06	0,59	2,06	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	1,09	0,06	0,60	1,75	<0,001*	<0,001*	0,001*
ИСЛМ %	Норма	20	4,17	0,20	2,56	5,83			
	Катаральная	53	2,37	0,07	1,27	3,61	<0,001*		
	Флегмонозная	38	1,29	0,06	0,79	2,56	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	1,16	0,06	0,61	1,66	<0,001*	<0,001*	0,574
ИСНЛ #	Норма	20	2,16	0,11	1,07	2,83			
	Катаральная	53	3,43	0,14	2,20	7,27	<0,001*		
	Флегмонозная	38	6,84	0,44	3,29	12,81	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	9,65	0,54	4,75	14,32	<0,001*	<0,001*	<0,001*
ИСНЛ %	Норма	20	1,92	0,10	1,40	2,70			
	Катаральная	53	3,18	0,11	2,02	7,02	<0,001*		
	Флегмонозная	38	5,73	0,29	2,83	12,33	<0,001*	<0,001*	
	Гангренозная	25	6,81	0,39	4,36	12,16	<0,001*	<0,001*	0,005*
ИСНМ #	Норма	20	8,39	0,40	4,43	11,33			
	Катаральная	53	7,75	0,37	3,31	15,12	0,038*		
	Флегмонозная	38	8,88	0,46	5,21	19,29	0,954	0,032*	
	Гангренозная	25	10,09	0,59	6,22	15,89	0,105	0,001*	0,074
ИСНМ %	Норма	20	7,79	0,37	5,43	10,34			
	Катаральная	53	7,28	0,20	5,02	14,55	0,182		
	Флегмонозная	38	6,96	0,18	5,19	10,20	0,095	0,201	
	Гангренозная	25	7,57	0,36	5,81	15,13	0,568	0,524	0,055
ИСЛЭ #	Норма	20	15,5	0,7	10,95	21,63			
	Катаральная	53	13,6	0,9	3,19	33,33	0,109		
	Флегмонозная	38	12,4	1,2	3,30	29,80	0,084	0,233	
	Гангренозная	25	7,5	0,9	1,67	19,83	<0,001	<0,001	<0,01
ИСЛЭ %	Норма	20	21,0	2,3	11,92	45,88			
	Катаральная	53	20,0	2,2	4,94	77,33	0,113		
	Флегмонозная	38	18,7	2,9	2,49	66,00	0,021*	0,157	
	Гангренозная	25	10,0	1,4	1,31	31,00	<0,001	<0,001	0,039*
ИЛСОЭ	Норма	20	3,29	0,44	0,74	7,46			
	Катаральная	53	2,70	0,19	0,40	7,20	0,266		
	Флегмонозная	38	2,82	0,22	0,22	5,85	0,589	0,445	
	Гангренозная	25	4,12	0,39	1,36	9,72	0,110	<0,001	<0,05
ИГЛ	Норма	20	5,30	0,25	3,64	6,77			
	Катаральная	53	3,21	0,09	1,42	4,81	<0,001		
	Флегмонозная	38	1,84	0,08	0,79	3,38	<0,001	<0,001	
	Гангренозная	25	1,52	0,07	0,82	2,20	<0,001	<0,001	<0,01
ОИ	Норма	20	8,58	0,54	5,13	11,95			
	Катаральная	53	5,92	0,22	3,42	11,16	<0,001		
	Флегмонозная	38	4,66	0,25	1,77	8,15	<0,001	<0,001	
	Гангренозная	25	5,65	0,40	2,76	11,64	<0,001	0,268	0,070
ИРИ	Норма	20	4,39	0,21	2,74	5,95			
	Катаральная	53	2,55	0,08	1,31	3,98	<0,001		
	Флегмонозная	38	1,43	0,07	0,85	2,89	<0,001	<0,001	
	Гангренозная	25	1,35	0,07	0,66	2,09	<0,001	<0,001	0,911
ЛИИ (О)	Норма	20	1,46	0,07	1,05	2,05			
	Катаральная	53	2,06	0,06	1,48	3,83	<0,001		
	Флегмонозная	38	2,89	0,10	1,86	5,02	<0,001	<0,001	
	Гангренозная	25	3,23	0,15	2,02	5,54	<0,001	<0,001	<0,05
ИСЛК	Норма	20	1,77	0,08	0,93	2,26			
	Катаральная	53	2,41	0,09	1,50	4,97	<0,001		
	Флегмонозная	38	3,83	0,19	2,07	7,56	<0,001	<0,001	
	Гангренозная	25	4,93	0,23	2,81	7,38	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание. Статистическая значимая разница по U-критерию Mann-Whitney:

P_U – с показателями контрольной группы; P_{U1} – с показателями группы с катаральной формой; P_{U2} – с показателями группы с флегмонозной формой; * - «нулевая» гипотеза отвергается.

формой воспаления при поступлении ЛИ (#) и ЛИ (%) ниже по сравнению с нормой соответственно на 36,7% ($p<0,001$) и 39,6% ($p<0,001$), с флегмонозной - на 66,1% ($p<0,001$) и 65,6% ($p<0,001$), с гангренозной - на 77,1% ($p<0,001$) и 71,3% ($p<0,001$). Понижение ЛИ при наличии воспаления в желчном пузыре можно расценить как связанное с тенденцией к незавершенности иммунных реакций. Изменения ЛИ указывают на недостаточный ресурс адаптационных механизмов организма, особенно при деструктивных формах ОКХ, поскольку лимфоциты, как одно из ведущих звеньев иммунитета, отражают реакции адаптации. У больных с ОКХ, особенно с деструктивными формами заболевания, уро-

вень ЛИ показывает несбалансированность иммунного ответа клеток крови.

Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ), свидетельствующий о взаимоотношениях афферентной и эффекторной цепи иммунного ответа, в целом по группе и в зависимости от клинической формы воспаления желчного пузыря существенно снижен. Наиболее низкий показатель отмечен у больных с флегмонозной и гангренозной формой (см. таблицу, рис. 1). Анализ абсолютного количества и процентного содержания лимфоцитов в периферической крови больных выявил их достоверное прогрессирующее уменьшение у больных с деструктивными формами ОКХ.

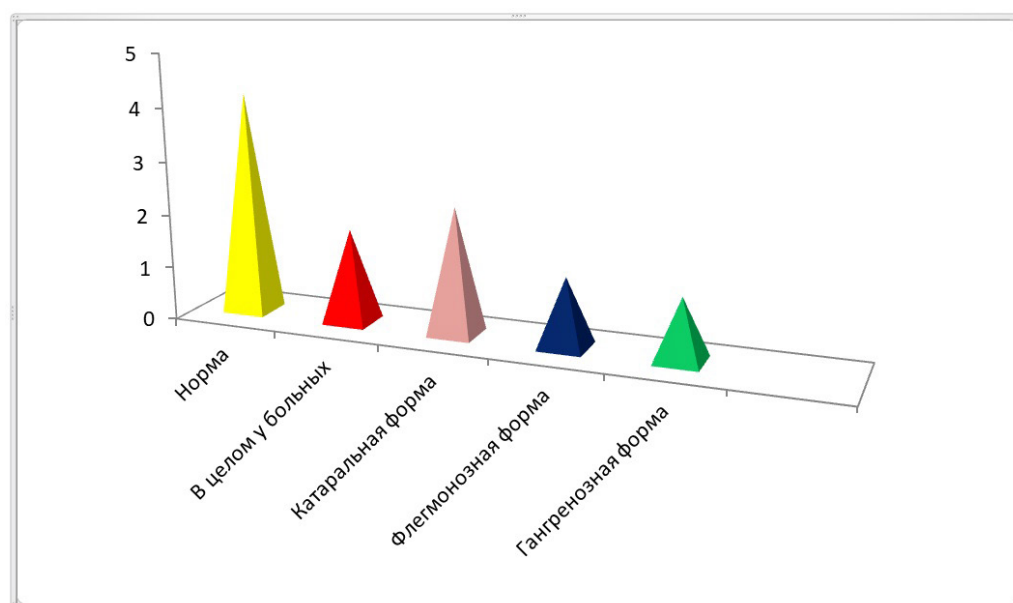


Рис. 1. Сравнительная оценка уровня ИСЛМ в зависимости от формы воспаления желчного пузыря.

ИСНЛ - индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, характеризующий реакции врожденного и адаптивного иммунитета при воспалении [11], при поступлении в целом у больных повышен в абсолютном выражении в 2,7 раза ($p<0,001$) и в процентном - в 2,5 раза ($p<0,001$) по отношению к норме. У больных с катаральной формой ОКХ ИСНЛ (#) и ИСНЛ (%) по сравнению с показателями у здоровых людей больше соответственно на 58,7% ($p<0,001$) и 65,9% ($p<0,001$), с флегмонозной формой - в 3,2 ($p<0,001$) и в 3,0 раза ($p<0,001$), с гангренозной формой - в 4,5 ($p<0,001$) и в 3,5 раза ($p<0,001$). Повышение показателя ИСНЛ свидетельствует об интенсификации воспалительных процессов в организме и связано с повышением основной популяции лейкоцитов периферической крови - сегментоядерных нейтрофилов.

Индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ) отражает состояние компонентов микрофагальной и макрофагальной системы, т. е. клеточно-фагоцитарной защиты, и свидетельствует о фагоцитарной активности в очаге воспаления [12]. В целом, у больных при поступлении значения ИСНМ (#) и ИСНМ (%) соответственно на 2,8% больше и на 7,1% меньше, при

катаральной форме - на 7,6% ($p<0,05$) и на 6,5% меньше, при флегмонозной форме - на 5,8% больше и 10,7% меньше, при гангренозной форме - на 20,3% больше и на 2,8% меньше по сравнению с показателями у здоровых лиц. У больных при всех формах воспаления желчного пузыря наблюдалось повышение абсолютного и процентного содержания нейтрофилов и моноцитов. Вероятно, это обусловлено тем, что в реализации воспалительного процесса при данной патологии ведущую роль играют нейтрофилы, а при утилизации разрушенных клеток на первый план выходят моноциты.

ИСЛЭ - индекс соотношения лимфоцитов к эозинофилам, косвенно отражающий процессы гиперчувствительности немедленного и замедленного типа [12], в целом у больных снижен по сравнению со здоровыми людьми. Значения ИСЛЭ (#) и ИСЛЭ (%) при деструктивных формах ОКХ снижались, особенно значительно при гангренозной форме - на 39,7% и 46,4% соответственно по сравнению с аналогичными показателями у больных с флегмонозной формой (см. таблицу).

ИЛСОЭ - индекс соотношения лейкоцитов и СОЭ - при поступлении у больных недостоверно (на 7,3%) ниже, чем у здоровых лиц, в том числе при катараль-

ной форме - на 17,7%, при флегмонозной - на 14,3% меньше по сравнению с нормой, но при гангренозной - на 46,5% ($p < 0,001$) больше, чем при флегмонозной. Повышение ИЛСОЭ при гангренозной форме ОКХ указывает на наличие интоксикации, что, вероятно, свидетельствует об инфекционном характере воспалительного процесса в желчном пузыре.

Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ), отражающий активность воспаления и позволяющий дифференцировать аутоинтоксикацию от инфекционной интоксикации [13], в целом у больных статистически достоверно снижен (на 54,7%), при катаральной форме - на 39,3%, при флегмонозной - на 65,3%, при гангренозной форме - на 71,3% относительно значения у здоровых лиц.

ИСЛК - индекс сдвига лейкоцитов крови - в целом у больных увеличен на 93,5% ($p < 0,001$) по сравнению с нормой, что свидетельствует об активности воспалительного процесса и нарушении иммунологической реактивности организма [13]. Сравнительная оценка показателя ИСЛК в зависимости от клинической формы ОКХ выявила, что данный показатель в наибольшей степени повышается при деструктивных формах (рис. 2) и отражает адекватность и своевременность иммунного ответа клеток периферической крови. У больных со всеми формами ОКХ в лейкоцитарной формуле периферической крови выявлено увеличение абсолютно количества нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов на фоне снижения относительного количества лимфоцитов.

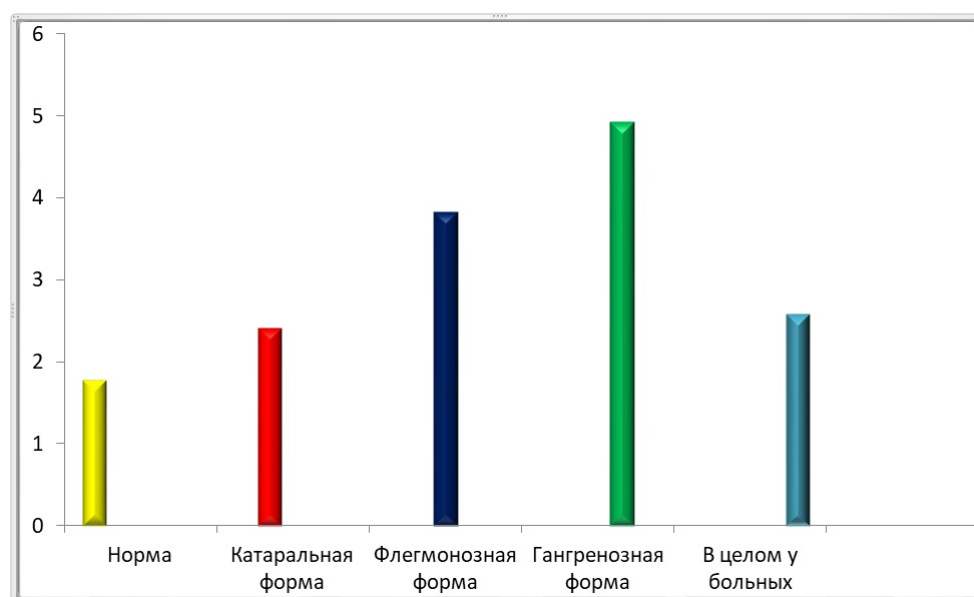


Рис. 2. Сравнительная оценка уровня ИСЛК в зависимости от клинической формы ОКХ.

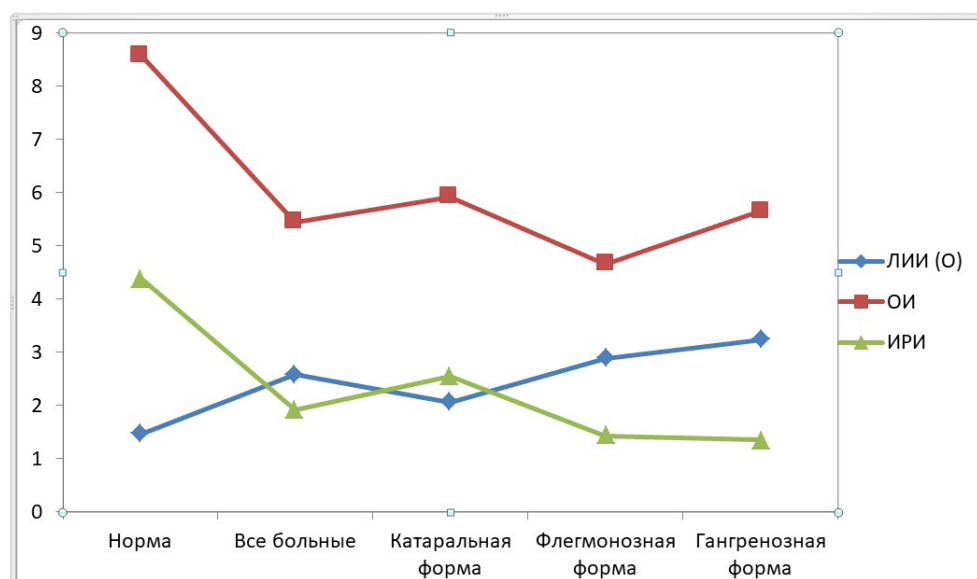


Рис. 3. Связь уровня показателей ЛИИ (О), ОИ и ИРИ с формой воспаления желчного пузыря.

Повышение уровня ЛИИ (О) как показателя процессов тканевой дегенерации и уровня эндогенной интоксикации [14] в зависимости от клинической формы воспаления в желчном пузыре у больных наблюдалось на фоне снижения показателей ОИ и ИРИ (рис. 3).

Можно констатировать, что воспалительные процессы в желчном пузыре при ОКХ отражаются на составе периферической крови, сопровождаясь сдвигами интегральных гематологических индексов. Их изменения позволяют судить о состоянии иммунной системы, выраженности и тяжести воспалительного процесса и глубине эндогенной интоксикации. Классические биомаркеры воспаления - количество лейкоцитов и нейтрофилов - не всегда отражают активность воспаления и порой не повышаются. Для объективизации количественных показателей лейкоцитов крови при оценке течения и выраженности воспалительных процессов в настоящее время с успехом применяют ряд ИГИ, поскольку их определение является простым, экономически выгодным и всегда доступным в диагностике острых воспалительных процессов.

Современные биомаркеры воспаления (С-реактивный протеин, прокальцитонин, пресепсин, ИЛ-6 и др.) являются более информативными и чувствительными, однако их определение не всегда доступно для широкого круга больных, особенно в острых случаях. В этой ситуации, в том числе при поступлении в лечебные учреждения, ИГИ могут служить дополнительными показателями, позволяющими оценить иммунные сдвиги в организме при гнойно-воспалительных процессах, в том числе при ОКХ.

Заключение. Интегральные гематологические индексы периферической крови позволяют оценить работу эффекторных механизмов иммунной защиты, врожденного иммунитета, интенсивность воспалительного процесса, глубину эндогенной интоксикации. Анализ интегральных гематологических показателей периферической крови представляет собой доступный, ранний, простой и дешевый ориентир для диагностики деструктивных форм калькулезного холецистита. В диагностике острого холецистита, наряду с клинико-инструментальными исследованиями, можно рекомендовать использовать интегральные гематологические показатели, особенно у больных старшего возраста и при стертом клиническом течении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стрельцова Е.И., Пешкова И.В., Саматов И.Ю., Валеева В.А., Верещагин Е.И. Лимфопения как фактор, определяющий тяжесть сепсиса, как точный критерий диагностики и как объект терапии. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020; 3: 108-25. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-3-108-12.
2. Фурманова О.В., Зак К.П., Попова В.В., Тронько Н.Д. Лейкоцитарный состав и индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в крови у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от величины избыточной массы тела/ожирения. *Международный эндокринологический журнал*. 2020; 16(7):526-33. DOI: 10.22141/2224-0721.16.7.2020.219006.
3. Макаров С.В., Смолькина А.В., Островский В.К., Демин В.П., Барбашин С.И. Лабораторный мониторинг у пациентов с синдромом диабетической стопы. *Современные проблемы науки и образования*. 2018; 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27662>.
4. Li X.T., Fang H., Li D., Xu F.Q., Yang B., Zhang R. et al. Association of platelet to lymphocyte ratio with in-hospital major adverse cardiovascular events and the severity of coronary artery disease assessed by the Gensini score in patients with acute myocardial infarction. *Chinese medical journal*. 2020; 133(4): 415-23. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000650.
5. Yu C., Chen M., Chen Z., Lu G. Predictive and prognostic value of admission neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with CHD. *Herz*. 2016; 41(7): 605-13. DOI: 10.1007/s00059-015-4399-8.
6. Wasilewski J., Pyka Ł., Hawranek M., Osadnik T., Kurek A., Skrzypek M. et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in patients with ischemic and nonischemic heart failure. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2016; 126(3):166-73. DOI: 10.20452/pamw.3316.
7. Benites-Zapata V. A., Hernandez A. V., Nagarajan V., Cauthen C.A., Starling R.C., Tang, W. H. Usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio in risk stratification of patients with advanced heart failure. *The American journal of cardiology*. 2015; 115(1):57-61. DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.10.008.
8. Papa A., Emdin, M., Passino C., Michelassi C., Battaglia D., Cocci F. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta*. 2008; 395(1-2): 27-31. DOI: 10.1016/j.cca.2008.04.019.
9. Островский В.К., Алимов Р.В., Машенко А.В. Некоторые данные о показателях нормы лейкоцитарного индекса интоксикации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2003; 1: 45-6.
10. Кобец Т.В., Некрасов В.Н., Мотрич А.К. Роль лейкоцитарных индексов в оценке адаптационно-компенсаторных возможностей чукотских детей, больных рецидивирующим бронхитом, на этапе санаторно-курортного лечения. *Вестник физиотерапии и курортологии*. 2003; 1: 47-8.
11. Орехова Н.С., Цепова Е.Л. Интегральные гематологические индексы при гингивите у беременных. *Пародонтология*. 2007; 43 (2): 9-10.
12. Коваленко Л.А., Суходолова Г.Н. Интегральные гематологические индексы и иммунологические показатели при острых отравлениях у детей. *Общая реаниматология*. 2013; 5: 24-8.
13. Дудченко М.А., Ляховский В.И., Савченко А.Г., Шапошник О.А., Дудченко М.А. Оценка интегральных гематологических индексов у больных ишемической болезнью сердца с острым инфарктом миокарда. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2012; 12(3): 27-31. http://nbuv.gov.ua/UJRN/apsm_2012_12_3_8.
14. Наргов Б.С. Очерки о нейтрофильном лейкоците. Нальчик: Эльбрус; 1986.

REFERENCES

1. Streltsova E.I., Peshkova I.V., Samatov I.Yu., Valeeva V.A., Vereshchagin E.I. Lymphopenia as a determinant factor of sepsis severity, as an exact diagnostic criterion, and as an object of therapy. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020; 3: 108-25. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-3-108-12. (in Russian)
2. Furmanova O.V., Zak K.P., Popova V.V., Tron'ko M.D. Blood leukocyte composition and neutrophil to lymphocyte ratio in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus depending on the degree of overweight/obesity. *Mezhdunarodnyi endokrinologicheskii zhurnal*. 2020; 16(7):526-33. DOI: 10.22141/2224-0721.16.7.2020.219006. (in Russian)
3. Makarov S.V., Smolkina A.V., Ostrovsky V.C., Demin V.P., Barbashin S.I. Laboratory monitoring in patients with diabetic stop syndrome. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2018; 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27662>. (in Russian)
4. Li X.T., Fang H., Li D., Xu F.Q., Yang B., Zhang R. et al. Association of platelet to lymphocyte ratio with in-hospital major adverse cardiovascular events and the severity of coronary artery disease assessed by the Gensini score in patients with acute myocardial infarction. *Chinese medical journal*. 2020; 133(4): 415-23. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000650.
5. Yu C., Chen M., Chen Z., Lu G. Predictive and prognostic value of admission neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with CHD. *Herz*. 2016; 41(7): 605-13. DOI: 10.1007/s00059-015-4399-8.
6. Wasilewski J., Pyka Ł., Hawranek M., Osadnik T., Kurek A., Skrzypek M. et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in patients with ischemic and nonischemic heart failure. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2016; 126(3):166-73. DOI: 10.20452/pamw.3316.

- pek M. et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in patients with ischemic and nonischemic heart failure. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2016; 126(3):166-73. DOI: 10.20452/pamw.3316.
7. Benites-Zapata V. A., Hernandez A. V., Nagarajan V., Cauthen C. A., Starling R. C., Tang, W. H. Usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio in risk stratification of patients with advanced heart failure. *The American journal of cardiology.* 2015; 115(1):57-61. DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.10.008.
 8. Papa A., Emdin, M., Passino C., Michelassi C., Battaglia D., Cocci F. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 395(1-2): 27-31. DOI: 10.1016/j.cca.2008.04.019.
 9. Ostrovsky V.K., Alimov R.V., Mashchenko A.V. On the normal indicators of the leukocyte index of intoxication. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2003; 1: 45-6. (in Russian)
 10. Kobets T.V., Nekrasov V.N., Motrich A.K. The role of leukocyte indices in an assessment of adaptation and compensatory opportunities of the Chukchi children sick with recurrent bronchitis, at a stage of sanatorium treatment. *Vestnik fizioterapii I kurortologii.* 2003; 1: 47-8. (in Russian)
 11. Orekhova N.S., Tsepova E.L. Hematological indices in pregnancy gingivitis. *Paradontologiya.* 2007; 43 (2): 9-10. (in Russian)
 12. Kovalenko L.A., Sukhodolova G.N. Integral hematological indices and immunological parameters in acute poisoning in children. *Obshchaya reanimatologiya.* 2013; 5: 24-8. (in Russian)
 13. Dudchenko M.A., Lyakhovsky M.A., Savchenko A.G., Shaposhnik O.A., Dudchenko M.A. Evaluation of integrated hematological indices in patients with ischemic heart disease and acute myocardial infarction. *Aktual'nye problemy chastnoy meditsiny.* 2012; 12(3): 27-31. DOI: https://nbuv.gov.ua/UJRN/apsm_2012_12_3_8. (in Russian)
 14. Nagoev B.S. Essays on neutrophil leukocyte. Nalchik: El'brus; 1986. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© МИРОНОВА А. В., 2024

Миронова А. В.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА КУЛЬТУР КРОВИ ЮНОНА® LABSTAR В РУТИННОЙ ПРАКТИКЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ Г. МОСКВЫ

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

Результат гемокультивирования предоставляет важную клинически значимую информацию, способствующую лечению пациента и сокращению пребывания пациента в стационаре.

Материал и методы. Проанализирован опыт использования анализатора культур крови ЮНОНА®Labstar в рутинной практике микробиологической лаборатории многопрофильного стационара г. Москвы.

Результаты. В видовом спектре микроорганизмов, вызывавших инфекции кровотока, превалировал вид *E. coli* (31,0%), далее следовали коагулазоотрицательные стафилококки (KOC) - 23,2%, *K. pneumoniae* - 17,4%, *S. aureus* - 9,0%. Прочие виды микроорганизмов встречались менее чем в 5,0% случаев. Анализ среднего времени культивирования микроорганизмов показал, что 68,9% положительных проб крови подали сигнал тревоги в первые сутки культивирования, 37,5% проб - в интервале времени от 12 до 24 часов. За период до 6 часов просигнализовали положительными 8,6%. Две трети от всех положительных проб крови приходились на пациентов ОРИТ (29,5%) и онкогематологии (39,3%), далее следовали отделение хирургии - 7,1% и отделение реабилитации ЦНС - 5,5%. Доля встречаемости бактериемий в других отделениях стационара не превышала 2%.

Обсуждение. Формы кривых роста микроорганизмов при использовании флаконов, предназначенных для гемокультиваторов других марок, в отличие от оригинальных флаконов производителя, различаются по точке начала логарифмической фазы, а также по высоте подъёма кривой в данной фазе. Применение медицинских изделий не в соответствии с их регистрацией запрещено Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», и соответствующими постановлениями Правительства, и приказами Минздрава Российской Федерации. Нарушение влечёт за собой применение статьи 238.1 Уголовного кодекса Российской Федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ.

Заключение. Гарантией достоверности получаемых результатов при диагностике бактериемии является использование стандартизированных коммерческих флаконов от производителя анализатора.

Ключевые слова: инфекции кровотока; гемокультиватор; ЮНОНА® Labstar; культура крови; диагностика бактериемии

Для цитирования: Миронова А.В. Опыт применения автоматического бактериологического анализатора культур крови ЮНОНА® Labstar в рутинной практике микробиологической лаборатории г. Москвы. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (8): 394-401.

DOI: https://doi.org/ 10.51620/0869-2084-2024-69-8-394-401

Для корреспонденции: Миронова Анна Владимировна, врач-бактериолог лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний; e-mail: annamir_88@mail.ru

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила	10.06.2024
Принята к печати	13.06.2024
Опубликовано	01.08.2024

Mironova A. V.

EXPERIENCE OF USING THE AUTOMATIC BACTERIOLOGICAL ANALYZER OF BLOOD CULTURES YUNON® LABSTAR IN THE ROUTINE PRACTICE OF THE MICROBIOLOGICAL LABORATORY OF MOSCOW

G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia

The result of hemocultivation provides important clinically relevant information that helps to treat the patient and reduce the patient's stay in the hospital.

Material and methods. The experience of using the JUNO® Labstar blood culture analyzer in the routine practice of the microbiological laboratory of a multidisciplinary hospital in Moscow is analyzed.

Results. In the species spectrum of microorganisms that caused bloodstream infections, *E. coli* prevailed (31.0%), followed by coagulase-negative staphylococci (CBS) - 23.2%, *K. pneumoniae* - 17.4%, *S. aureus* - 9.0%. Other types of microorganisms were found in less than 5.0% of cases. Analysis of the average time of cultivation of microorganisms showed that 68.9% of positive blood samples gave an alarm signal on the first day of cultivation, 37.5% of samples - in the time interval from 12.1 to 24 hours. For the period up to 6 hours, 8.6% were signaled positive. Two thirds of all positive blood samples were in ICU patients (29.5%)

and hematology patients (39.3%), followed by the Department of Surgery - 7.1% and the Department of Central Nervous System Rehabilitation - 5.5%. The incidence of bacteremia in other departments of the hospital did not exceed 2%.

Discussion. The shapes of the growth curves of microorganisms when using vials intended for hemocultivators of other brands, unlike the original vials of the manufacturer, differ in the starting point of the logarithmic phase, as well as in the height of the curve rise in this phase. The use of medical devices not in accordance with their registration is prohibited by Federal Law No. 323-FZ dated 11/21/2011 "On the Basics of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation", and relevant Government resolutions and orders of the Ministry of Health of the Russian Federation. Violation entails the application of Article 238.1 of the Criminal Code of the Russian Federation dated 06/13/1996 No. 63-FZ.

Conclusion. The use of standardized commercial vials from the analyzer manufacturer is a guarantee of the reliability of the results obtained in the diagnosis of bacteremia.

Key words: bloodstream infections; hemocultivator; YUNON® Labstar; blood culture; diagnosis of bacteremia

For citation: Mironova A. V. Experience of using the automatic bacteriological analyzer of blood cultures YUNON® LABSTAR in the routine practice of the microbiological laboratory of Moscow. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 394-401 (in Russ.).

DOI: https://doi.org/ 10.51620/0869-2084-2024-69-8-394-401

For correspondence: Mironova A.V., bacteriologist of the laboratory of diagnostics and prevention of infectious diseases; e-mail: annamir_88@mail.ru

Information about author:

Mironova A. V., [https:// orcid.org/ 0000-0001-8840-850X](https://orcid.org/0000-0001-8840-850X).

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

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Received 10.06.2024

Accepted 13.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. Одной из основных задач микробиологической лаборатории является исследование крови на стерильность [1]. Результат гемокультивирования предоставляет важную, клинически значимую информацию, способствующую лечению пациента и сокращению пребывания пациента в стационаре [2]. Своевременная диагностика инфекций кровотока может предотвратить развитие сепсиса и септикопиемии, состояний, связанных с высокой летальностью [3]. В настоящее время оптимальным решением для работы с гемокультурами являются системы непрерывного мониторинга культур крови. Сроки инкубирования проб крови варьируют от 5 до 7 суток, чаще 5 суток [4]. Вы-

явление клинически значимых патогенов в 98% всех положительных образцов крови происходит в течение первых 3-х суток [5]. Проведено исследование на 35,5 тыс. посевах крови, среди которых 2609 микроорганизмов являлись клинически значимыми патогенами и сигнализировали о положительной пробе в 74% случаев в первые сутки и 20% во вторые сутки, а 1097 - представляли собой возможные контаминирующие микроорганизмы (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus viridans*, *Propionibacterium* spp., *Neisseria* spp., *Aerococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. и др.), среди которых 41% подали сигнал тревоги в первые сутки культивирования, а 49% - на вторые сутки [5] (рис. 1).

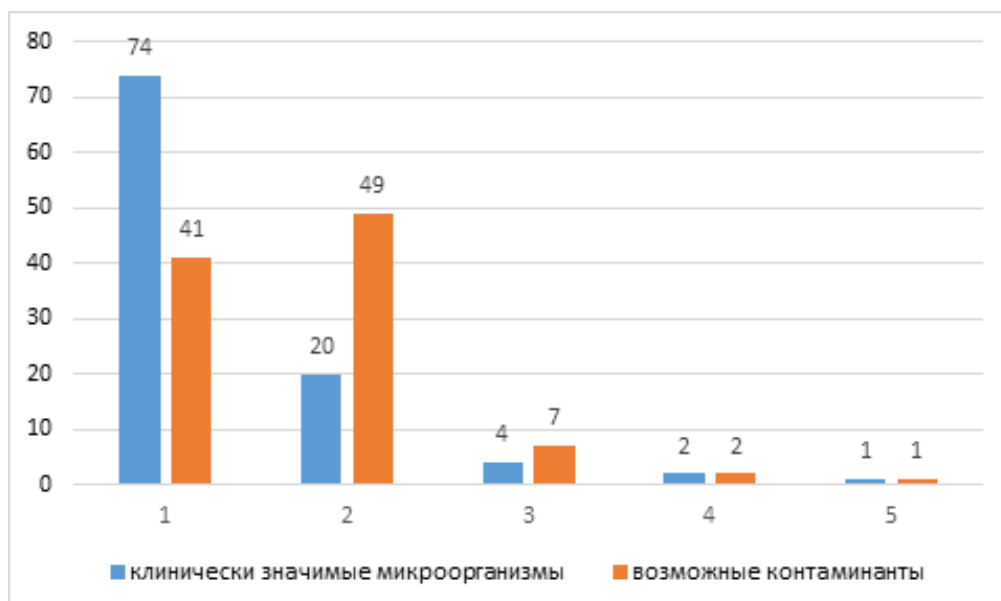


Рис. 1. Количество клинически значимых микроорганизмов и возможных контаминирующих микроорганизмов (в %) по суткам инкубирования.

Другое исследование продемонстрировало, что при использовании автоматического анализатора культур крови, 99,5% не связанных с эндокардитом инфекций кровотока и 100% эпизодов эндокардита выявлены в течение 5 суток инкубирования [6]. Эти данные позволяют сделать вывод, что продление сроков инкубирования, рекомендовавшееся ранее для выявления прихотливых микроорганизмов, включающих виды родов *Brucella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* spp., а также группу НАСЕК (*Haemophilus* (исключая *H. influenzae*) species, *Aggregatibacter* (ранее *Actinobacillus*) species, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella species*) [7], которые иногда вызывают эндокардит, обычно уже не требуется [8].

Применение современных автоматических гемокультиваторов открывает широкие возможности для анализа микробиологических исследований крови на стерильность, таких как фиксация времени культивирования и анализ кривых роста микроорганизмов. В настоящее время на отечественный рынок медицинской техники выходит всё больше качественных современных гемокультиваторов, в том числе из дружественных стран, включающих российские разработки. Проблема импортозамещения медицинских изделий находится в центре внимания законодателей ряд последних лет [9].

Проанализирован опыт применения современного бактериологического анализатора культур крови ЮНОНА® Labstar (Китай) в рутинной практике микробиологической лаборатории многопрофильного стационара г. Москвы. Исследован спектр выделенных микроорганизмов из отделений, из которых чаще поступали положительные пробы крови, определено время культивирования положительных проб крови, проведён анализ кривых роста микроорганизмов.

Цель исследования - оценка возможностей, предоставляемых гемокультиватором ЮНОНА® Labstar: анализ кривых роста микроорганизмов и фиксация времени культивирования проб крови, а также проведение этиологического анализа структуры инфекций кровотока.

Материал и методы. Проанализированы данные лабораторной информационной системы (ЛИС) микробиологической лаборатории за 2023 год, среди которых

таксономический состав выделенных микроорганизмов из отделений, из которых чаще поступали положительные пробы крови. С помощью базы данных гемокультиватора ЮНОНА® Labstar определено время культивирования положительных проб крови за весь период эксплуатации гемокультиватора с мая 2022 года по май 2024 года и проведён анализ кривых роста микроорганизмов.

Исследовано 183 штамма микроорганизмов, выделенных из крови взрослых пациентов многопрофильного стационара. Пробы крови, направленные на анализ повторно от одного и того же пациента и с выделенным тем же штаммом, из исследования исключены.

Образцы крови пациентов инокулировали в оригинальные коммерческие флаконы для гемокультивирования и инкубировали в анализаторе ЮНОНА® Labstar до момента регистрации роста микроорганизмов. На дне каждого оригинального коммерческого флакона расположен датчик, реагирующий на повышение содержания углекислого газа, выделяющегося при наличии и размножении микроорганизмов вследствие их метаболизма. Для детекции сигнала с датчиков оригинальных коммерческих флаконов в анализаторе ЮНОНА® Labstar используется колориметрический метод, основанный на оценке изменения цвета датчика. Анализ изменения цвета датчика оригинального коммерческого флакона проводится каждые 10 мин [10-12], что позволяет оперативно получать информацию о положительной пробе с прибора.

Из полученной гемокультуры готовили мазки и проводили микроскопическое исследование, делали посев на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя. Идентифицировали клинические изоляты до вида и определяли их антибиотикочувствительность.

Результаты. При ранжировании положительных проб крови по отделениям стационара, отмечено, что 29,5% всех положительных высевов крови за 2023 год приходились на отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), 39,3% - на отделение онкогематологии, 7,1% - на отделение хирургии, 5,5% - на отделение реабилитации ЦНС. Доля встречаемости бактериемий в других отделениях стационара не превышала 2% (рис. 2).

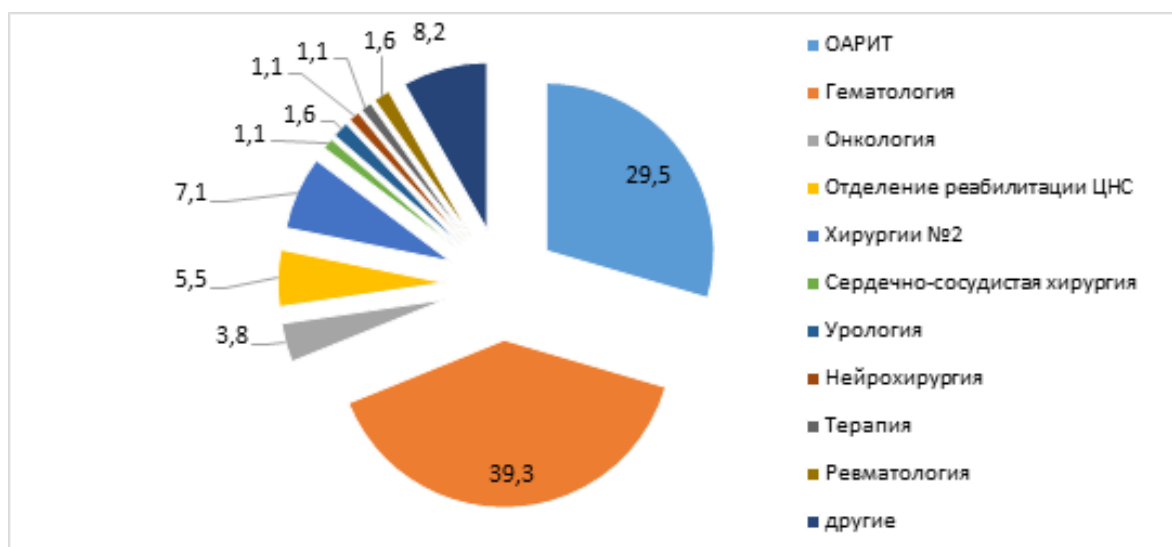


Рис. 2. Процент положительных проб крови с ранжированием по отделениям за 2023 год.

При анализе таксономического состава микроорганизмов выявлено, что вид *Escherichia coli* (31,0%) превалировал среди патогенов, выделенных из крови, далее следовали коагулазонегативные стафилококки

(KOC) – 23,2%, доля *Klebsiella pneumoniae* составила 17,4%, *Staphylococcus aureus* выделялся в 9,0% случаев. Прочие виды микроорганизмов встречались в менее чем 5,0% случаев (рис. 3).

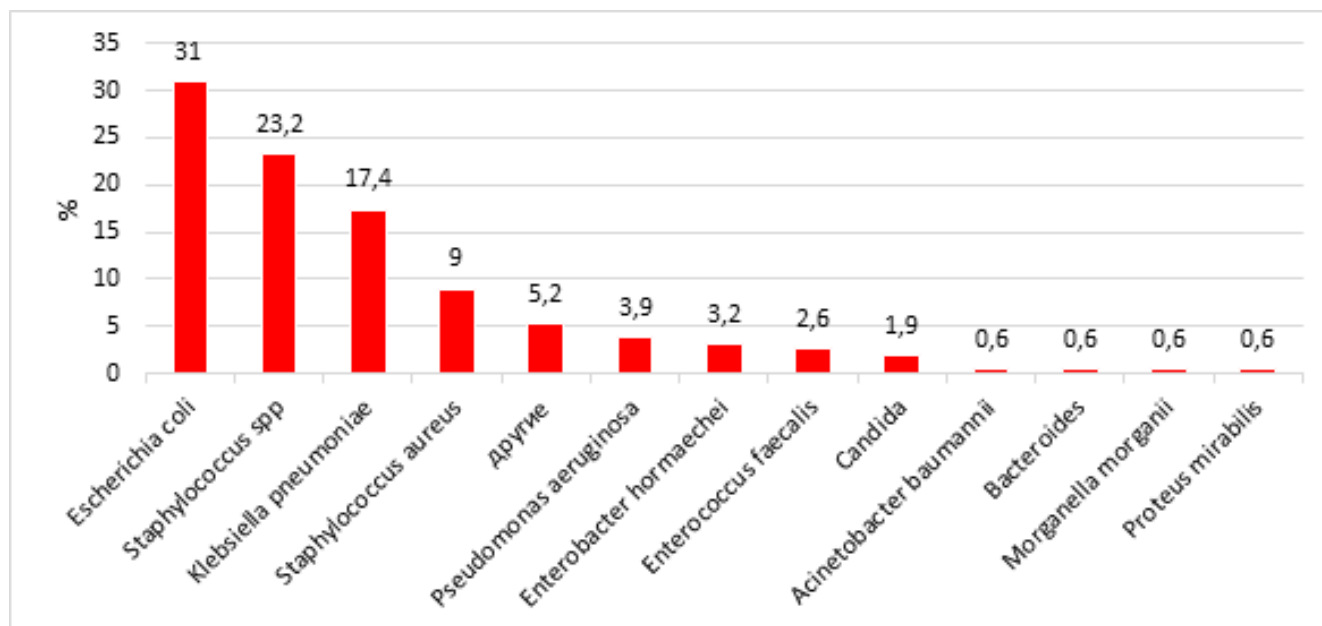


Рис. 3. Таксономический состав микроорганизмов, выделенных из крови за 2023 год.

За два года эксплуатации анализатора гемокультур ЮОНА® Labstar среднее время культивирования микроорганизмов составило 21,5 часов (рассчитано на 510 положительных проб крови). 68,9% всех положительных проб крови подали сигнал тревоги в первые сутки культивирования,

37,5% - просигнализировали в интервале времени от 12,1 до 24,0 часов, 8,6% - определены за период до 6 часов (самое малое за 2,7 часов). Интервалы времени культивирования проб крови и частота встречаемости положительных проб крови в эти интервалы представлены на рис. 4.

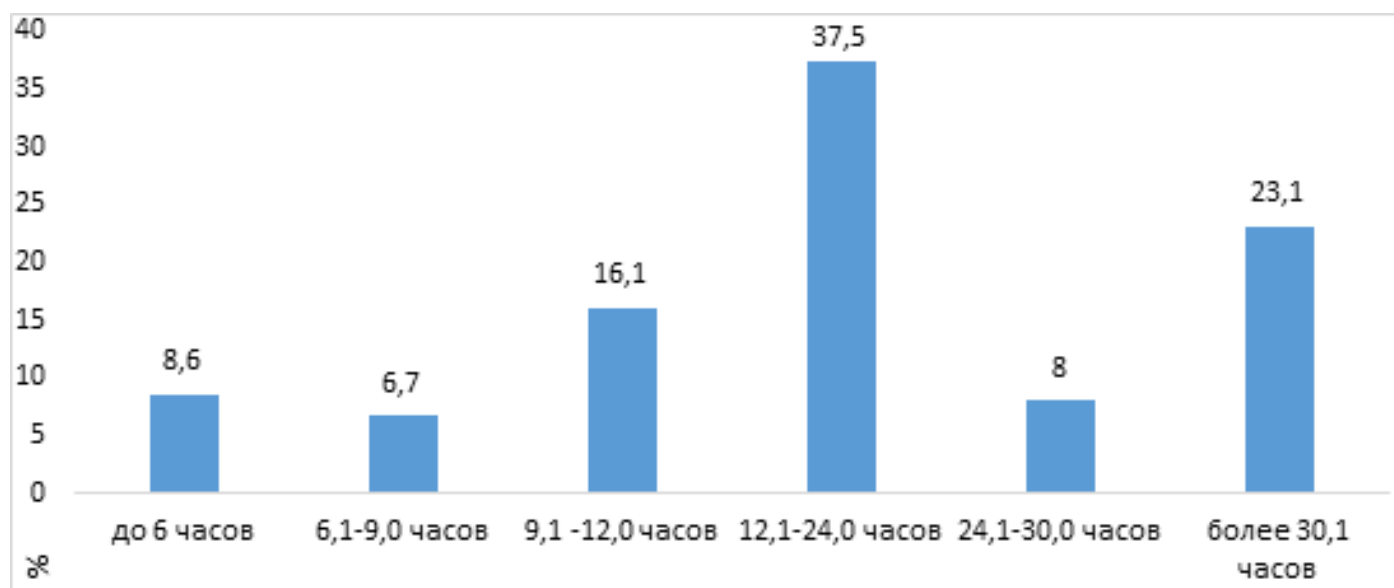


Рис. 4. Среднее время культивирования микроорганизмов на анализаторе гемокультур ЮОНА® Labstar.

Автоматический бактериологический анализатор гемокультур ЮОНОА® Labstar имеет наглядный интерфейс с возможностью анализа кривых роста микроорганизмов, которая определяется как функция количества микроорганизмов (или его логарифма) от времени. Оптическая плотность или колониеобразующие единицы (КОЕ) на мл обычно используются в качестве показателей количества клеток. Типичная форма кривой – сигмовидная, на которой можно выделить четыре основные фазы роста: лаг-фазу, фазу логарифмического роста, стационарную фазу и фазу замедления роста [1].



Типичная кривая роста микроорганизмов с выделенными четырьмя фазами и кривая роста *Escherichia coli*, выделенной из крови пациента отделения онкогематологии, полученная с анализатора гемокультур ЮОНОА® Labstar с применением питательных сред с нейтрализаторами антимикробных препаратов (АМП) для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов в оригинальных коммерческих флаконах производства ЮОНОА®, представлена на рис. 5. Красной точкой на графике справа показано начало логарифмической фазы, которая обозначена анализатором как точка подачи сигнала тревоги (положительная проба).

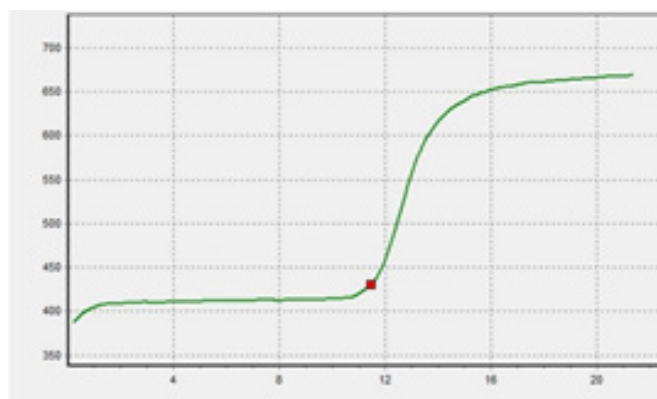


Рис. 5. Кривые роста аэробных и анаэробных микроорганизмов на питательных средах с нейтрализаторами АМП в оригинальных коммерческих флаконах, производства ЮОНОА®.

В качестве сравнения поставлены идентичные пробы крови в оригинальные коммерческие флаконы, предназначенные для использования совместно с анализатором гемокультур ЮОНОА® Labstar и во флаконы стороннего производителя. Кривые роста *Staphylococcus aureus*, выделенные из крови пациента ОРИТ, представлены на рис. 6. В левой части рисунка показана кривая роста микроорганизма из крови, взятой в оригинальные коммерческие флаконы для ЮОНОА® Labstar, в правой части рисунка – во флаконы, предназначенные для использования совместно с гемокультуратором другого производителя.

На рис. 6 отчётливо видно, что точка подачи сигнала тревоги (положительная проба) при применении оригинальных коммерческих флаконов находится в интервале 8-12 часов, а при использовании флаконов стороннего производителя – в интервале 12-16 часов. Формы кривых роста *Staphylococcus aureus* различаются по логарифму числа жизнеспособных клеток или оптической плотности в зависимости от использованных флаконов. В данном случае различия существенно не повлияли на результат, но мы можем ожидать возможного влияния на воспроизводимость результатов микробиологических исследований крови

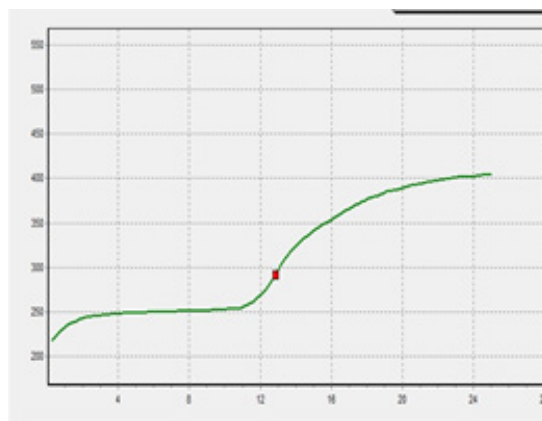
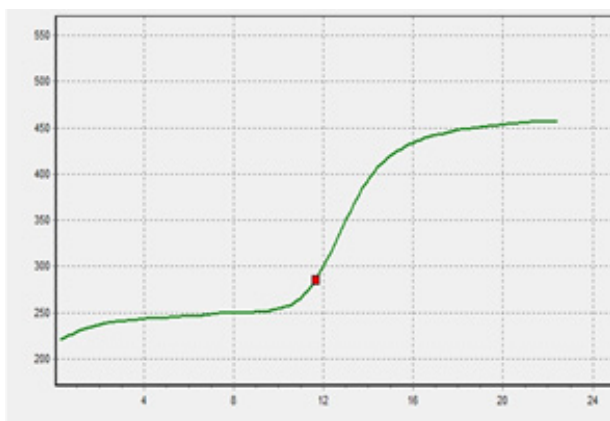


Рис. 6. Кривые роста *S. aureus*, выделенные из крови, при культивировании в оригинальных коммерческих флаконах ЮОНОА® Labstar (слева) и во флаконах, предназначенных для гемокультуратора другой фирмы (справа).

в случае выделения прихотливых к условиям культивирования видов микроорганизмов, обладающих сложными пищевыми потребностями. Гарантацией достоверности получаемых результатов при диагностике бактериемии является использование стандартизированных оригинальных коммерческих флаконов от производителя анализатора.

Обсуждение. Выявление бактериемии и фунгемии остается одной из важных задач клинической микробиологической лаборатории. Положительная гемокультура устанавливает или подтверждает наличие инфекционной этиологии заболевания. Более того, в результате мы получаем данные о патогене, вызвавшем инфекцию кровотока, и его антибиотикочувствительности для оптимизации терапии.

При анализе ключевых отделений крупного многопрофильного стационара, для которых наиболее актуальна тема развития инфекций кровотока, выявлено, что 2/3 всех положительных проб крови приходятся на отделения ОРИТ и онкогематологии. Это обусловлено, в первую очередь, иммунокомпрометированностью пациентов данных отделений, а также рядом иных факторов, обуславливающих тяжесть состояния данных больных.

Основными характеристиками экологической системы в ОРИТ, обуславливающими высокий процент встречаемости бактериемий, являются: искусственно созданная среда в относительно изолированном пространстве, высокая плотность микробных популяций, участвующих в эпидемическом процессе, пассаж возбудителя инфекции через иммунокомпрометированный организм, ослабленный основным заболеванием [14,15]. Относительно отделений гематологии стоит отметить, что применение современных методов лечения больных гемобластомами сопряжено с возникновением побочных эффектов, в частности, гранулоцитопении, нарушением клеточного и гуморального иммунитета и поражением барьерных тканей, что практически всегда связано с повышенным риском развития инфекционных осложнений, важнейшими из которых являются инфекции кровотока, приводящие к развитию сепсиса и септикопиемии [16].

Поскольку для пациентов ОРИТ и отделения онкогематологии инфекции кровотока являются одной из основных причин летальности [17], очень важно проводить постоянный мониторинг таксономической структуры возбудителей данных инфекций в целях назначения адекватной и своевременной терапии.

Анализ таксономического состава микроорганизмов, выделенных из крови, показал, что приоритетными патогенами крови в 2023 году являлись *E. coli* (31,0%), *Staphylococcus species* (23,2%), *K. pneumonia* (17,4%), *S. aureus* (9,0%).

Возможности современного анализатора гемокультур ЮНОНА® Labstar позволяют визуализировать кривые роста микроорганизмов: в качестве примеров, приведены кривые роста *E.coli* и *S.aureus*, в которых можно выделить четыре основные фазы роста микроорганизмов: лаг-фазу, во время которой бактерии приспосабливаются к новой среде; фазу логарифмического роста, во время которой размножение бактерий происходит с нарастающей скоростью; стационарную фазу, показывающую, что число образующихся клеток микроорганизмов соответствует числу отмерших; фазу

замедления скорости роста, во время которой бактерии теряют жизнеспособность и погибают [1].

Сравнение флаконов с питательными средами показало наличие возможного влияния на результат исследования (характер кривых роста и время культивирования пробы) таких факторов, как тип нейтрализатора АМП в питательной среде для культивирования крови; объем исследуемой крови или другого биологического материала, рекомендуемого для конкретного типа флаконов; состав питательной среды и её объема во флаконе; технические характеристики флаконов (толщина стенки флакона, тип пластика, тип датчика и др.); тип системы гемокультуратора [18-20]. Применение неоригинальных коммерческих флаконов сторонних производителей, не предназначенных для работы с конкретным гемокультуратором, может повлиять на воспроизводимость результатов микробиологических исследований крови. Более того, применение медицинских изделий не в соответствии с их регистрацией запрещено Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 25.12.2023 г.) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (с изм. и доп., вступил в силу с 01.04.2024 г.), а также соответствующими постановлениями Правительства и приказами Минздрава Российской Федерации. Нарушение влечёт за собой применение статьи 238.1 Уголовного кодекса Российской Федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ (ред. от 06.04.2024 г.) [21,22].

Возвращаясь к оценке применения в рутинной практике современного гемокультуратора ЮНОНА® Labstar, отметим возможность составления статистических отчетов, включающих время загрузки образца, время подачи сигнала тревоги и время изъятия пробы из анализатора, позволяющих повысить качество микробиологического исследования крови.

Современные инкубаторы гемокультур за счёт применения обогащённых питательных сред, содержащих сорбенты для АМП, в большинстве случаев позволяют определить рост гемокультуры в пределах первых суток проведения исследования [5, 23-27].

За два года эксплуатации анализатора гемокультур ЮНОНА® Labstar среднее время культивирования микроорганизмов составило 21,5 часа. 68,9% всех положительных проб крови подавали сигнал тревоги в первые сутки культивирования, 8,6% проб крови были определены за период до 6 часов (самое малое за 2,7 часа), что особенно важно для пациентов с септическим шоком, у которых каждый час задержки адекватной антибиотикотерапии приводит к увеличению смертности на 7,6% [28]. Пробы, подающие сигнал тревоги о наличии роста, после 30 часов культивирования должны быть всесторонне проанализированы врачом-бактериологом для принятия решения о наличии проблемного патогена или возможной контаминации образца крови, в том числе с учётом анализа кривой роста микроорганизма [5, 29,30].

Заключение. Импортозамещению в России уделяют особое внимание, чем и обусловлена актуальность обзора гемокультуратора ЮНОНА® Labstar из дружественной страны, включающего российские научно-технические разработки [13]. Опыт применения в рутинной практике микробиологической лаборатории анализатора гемокультур ЮНОНА® Labstar показал

возможность культивирования широкого видового спектра микроорганизмов. База данных прибора позволяет провести анализ кривых роста всех проб крови, загруженных когда-либо в анализатор, что повышает уровень достоверности результатов. Возможность составления статистических отчётов, включающих время загрузки образца, время подачи сигнала тревоги и время изъятия пробы из анализатора позволяют повысить качество микробиологического исследования крови.

Применение неоригинальных коммерческих флаконов сторонних производителей влияет на построение кривой роста микроорганизмов и удлиняет время подачи сигнала тревоги о положительной пробе, что может повлиять на воспроизводимость результатов микробиологических исследований крови. Следует помнить, что применение медицинских изделий не в соответствии с их регистрацией напрямую запрещено Федеральным законом ФЗ от 21.11.2011 № 323-ФЗ (редакция от 25.12.2023 г.) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.04.2024 г.), соответствующими постановлениями Правительства Российской Федерации и приказами Минздрава Российской Федерации, нарушение которых влечёт за собой уголовную ответственность в соответствии со статьёй 238.1 Уголовного кодекса Российской Федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ (ред. от 06.04.2024 г.).

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2, 4-8, 10-12 СМ. REFERENCES)

1. Миронов А. Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии. М.: Сеченовский Университет; 1997.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2015. ISBN 978-5-89481-895-5.
9. Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Шепелин А. П., Алёшкин В. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.
13. Виленский А.В., Хрусталев А.В., Деханова А.И. Локализация производства медицинских изделий в России: что предстоит? *Ремедиум*. 2014. 7-8: 10-5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/lokalizatsiya-proizvodstva-meditsinskih-izdeliy-v-rossii-chto-predstoit> (дата обращения: 13.06.2024).
14. Каргальцева Н. М., Борисова О. Ю., Миронов А. Ю., Кочеровец В.И., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Инфекция кровотока у госпитальных терапевтических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(6): 355-61. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-361.
15. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Бабаев С.Ю., Журавлев Р.В. Анализ различных проявлений возбудителей нозокомиальных заболеваний в многопрофильной больнице ОРИТ. Пензы. *Актуальные проблемы гуманитарных и медицинских наук*. 2015; 4-2: 210-2 URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-ekologicheskikh-osobennostey-vozbuditeley-nozokomialnyh-infektsiy-v-orit-mnogoprofilnogo-statsionara-g-penzy> (дата обращения: 03.06.2024).
16. Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С., Киселева Е.Е., Стижак Н.П., Кайтанджан Е.И., Бурылев В.В. Клинико-микробиологическая характеристика изменения течения у онкогематологических больных. *Онкогематология*. 2016; 11(3): 58-67. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-58-67.17.
17. Попов Д.А., Надточей Е.А. Алгоритм диагностики бактериемии у кардиохирургических больных в ОРИТ. *Анестезиология и реаниматология*. 2017; 5: 382-7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/algoritm-dagnostiki-bakteriemii-u-kardiohirurgicheskikh-bolnyh-v-orit> (дата обращения: 06.02.2024).
18. Кузвалова О.Ю., Козел Ю.Ю., Алавердян А.И., Гусак Д.А. Анализ этиологии структуры инфекций кровотока с использованием автоматического бактериологического анализатора ЮОНА® Labstar. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 67(2): 101-5. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105. (in Russian)
19. Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П., Панова С.А., Устюгова С.С. Лабораторный контроль качества питательных веществ для автоматического бактериологического анализатора ЮОНА® Labstar. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(2): 110-4. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114.
20. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю. Метод получения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (3): 185-90. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190.
21. Шепелин А.П. На какие документы опираться при процедуре посева крови, пока не вышел новый приказ. *Справочник заведующего КДЛ*. 2014; 6: 76.
22. Шепелин А.П., Каторгин Д.Ю., Мицевич М.Е. Современные подходы к государственным закупкам питательных сред. *Справочник заведующего КДЛ*. 2021; 5: 25-33.
23. Каргальцева Н.М., Борисова О. Ю., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А., Кочеровец В.И., Пастушенков В.Л. и др. Клинические маркеры заражения вирусом у амбулаторных пациентов *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016. 61(8): 494-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-494-497.
24. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Железозависимость биологических свойств *Candida albicans*. *Альманах клинической медицины*. 2017; 45(2): 133-7. DOI: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137.
25. Каргальцева Н. М., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю., Кочеровец В.И., Карпова Е.И., Данишук О.И. и др. Микробиом крови клинически здорового человека - миф или реальность? *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69(4): 142-9. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-142-149.
26. Каргальцева Н. М., Борисова О. Ю., Кочеровец В. И., Миронов А.Ю., Карпова Е.И., Данишук О.И. и др. Лабораторная диагностика внегоспитальной инфекции кровотока при терапевтической патологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(10): 581-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-10-581-587.
27. Каргальцева Н. М., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю. Сердечно-мозговые среды для гемокультур. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 375-81. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381.
29. Пашков Е.П., Миронов А.Ю., Култаев М.С., Плотица Ю.М. Питательная среда для культивирования неспорообразующих анаэробных бактерий. *Лабораторное дело*. 1988; 6: 47-9.
30. Леонов В.В., Булатов И.А., Миронов А.Ю. Рост и экспрессия факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов в сыворотке крови при разных вариантах гомеостаза железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(8): 498-501. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501.

REFERENCES

1. Mironov A.Yu. Fundamentals of clinical microbiology and immunology. Moscow: Sechenovskiy Universitet; 1997. (in Russian)
2. WHO guidelines on drawing blood: best practices in Phlebotomy. World Health Organization 2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599221_eng.pdf.
3. Medical Microbiology, virology and immunology. Vorobyev A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., eds. 2nd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2015. ISBN 978-5-89481-895-5. (in Russian)
4. Riley J.A., Heiter B.J., Bourbeau P.P. Comparison of recovery of blood culture isolates from two BacT/ALERT FAN aerobic blood culture bottles with recovery from one FAN aerobic bottle and one FAN anaerobic bottle. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:213-7.
5. Bourbeau P.P., Foltzer M. Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(5): 2506-9. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2506-2509.2005.
6. Cockerill F.R., Wilson J.W., Vetter E.A., Goodman K.M., Torgerson C.A., Harmsen W.S. et al. Optimal testing parameters for blood cul-

- tures. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 1724-30.
7. Clinical Infectious Disease. David Schlossberg, ed. Cambridge University Press; 2015.
 8. Baron E.J., Weinstein M.P., Dunne W.M., Yagupsky Jr.P., Welch D.F., Wilson D.M. Blood Cultures IV. Baron E.J., ed. Washington: ASM Press; 2005.
 9. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. The state and trends in the development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)
 10. Jashari R., Vanzebroeck S., Petit P., Rodriguez-Villalobos H., Zahra S., Ben Said N. et al. The BD BACTEC FX blood culture system with the gentlemacs dissociator is suitable for sterility testing of heart valve and vascular allografts-A validation study. *Cell and tissue banking*. 2021; 22(3): 453-66.
 11. Udayan U., Dias M. Evaluation of BACTEC™ blood culture system for culture of normally sterile body fluids. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian. *Society of Critical Care Medicine*. 2014; 18(12): 829-30. DOI: 10.4103/0972-5229.146331.
 12. Mazzulli T., Ratkov D., Guglielmin K., Gandhi B., Remington R. et al. Impact of implementation of BacT/Alert Virtuo on Blood Culture Time to Positivity in Sepsis Patients. *Microbiology spectrum*. 2023; 11(2): e0500322. Advance online publication. DOI: 10.1128/spectrum.05003-22.
 13. Vilenskiy A.V., Khrustalev A.V., Dekhanova A.I. Localization of medical device production in Russia: What's ahead? *Remedium*. 2014. 7-8: 10-5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/lokalizatsiya-proizvodstva-meditsinskih-izdeliy-v-rossii-chto-predstoit> (дата обращения: 13.06.2024). (in Russian)
 14. Kargal'tseva N. M., Borisova O. Yu., Mironov A. Yu., Kocherovets V.I., Pimenova A.S., Gadua N.T. Infection of the bloodstream in hospital therapeutic patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(6): 355-61. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-36. (in Russian)
 15. Mitrofanova N.N., Mel'nikov V.L., Babaev S.J., Zhuravlev R.V. Analysis of various manifestations of pathogens of nosocomial diseases in the intensive care unit of a multidisciplinary hospital. Penza. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i meditsinskih nauk*. 2015; 4-2: 210-2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analizekologicheskikh-osobennostey-vozbuditeley-nozokomialnyh-infektsiy-v-orit-mnogoprofilnogo-statsionara-g-penzy> (date of application: 03.06.2024). (in Russian)
 16. Chebotkevich V.N., Bessmel'tsev S.S., Kiseleva E.E., Stizhak N.P., Kaytandzhan E.I., Burylev V.V. Clinical and microbiological characteristics of changes in the course of oncohematological patients. *Onkogematologiya*. 2016; 11(3): 58-67. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-58-67. (in Russian)
 17. Popov D.A., Nadtochey E.A. Algorithm for diagnosing bacteremia in cardiac surgery patients in intensive care. *Anesteziologya i reanimatologiya*. 2017; 5: 382-7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/Algorithm-for-diagnosing-bacteremia-in-cardiac-surgery-patients-in-intensive-care> (date of application: 06.02.2024). (in Russian)
 18. Kutsevalova O.Y., Kozel Y.Y., Alaverdyan A.I., Gusak D.A. Analysis of the etiology of bloodstream infection structures using the automatic bacteriological analyzer Junon® Labstar. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 67(2): 101-5. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105. (in Russian)
 19. Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Panova S.A., Ustyugova S.S. Laboratory quality control of nutrients for the automatic bacteriological analyzer JUNON®Labstar. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(2): 110-4. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114. (in Russian)
 20. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu. A method for obtaining hemocultures in the diagnosis of bloodstream infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (3): 185-90. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190. (in Russian)
 21. Shepelin A.P. Which documents should be used for the procedure of blood seeding, until a new order is issued. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2014; 6: 76. (in Russian)
 22. Shepelin A.P., Katargin D.Yu., Mitsevich M.E. Modern approach to public procurement of nutrient media. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2021; 5: 25-33. (in Russian)
 23. Kargal'tseva N.M., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A., Kocherovets V.I., Pastushenkov V.L. et al. Clinical markers of bloodstream infection in outpatient patients *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016. 61(8): 494-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-494-497. (in Russian)
 24. Leonov V.V., Mironov A. Yu. Iron dependence of biological properties of *Candida albicans*. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2017; 45(2): 133-7. DOI: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137. (in Russian)
 25. Kargal'tseva N.M., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Karpova E.I., Danishchuk O.I. et al. Is the blood microbiome of a clinically healthy person a myth or reality? *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 69(4): 142-9. DOI 10.51620/0869-2084-2024-69-4-142-49. (in Russian)
 26. Kargal'tseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Karpova E.I., Danishchuk O.I. et al. Laboratory diagnostics of out-of-hospital infection of the bloodstream in therapeutic pathology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2022; 67(10): 581-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-10-581-87. (in Russian)
 27. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu. Cardio-cerebral media for hemocultures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 375-81. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381. (in Russian)
 28. Kumar A., Roberts D., Wood K., Light B., Parrillo J., Sharma S. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med*. 2006. 34(6): 1589-96.
 29. Pashkov E. P., Mironov A. Yu., Kul'taev M. S., Plotitsa Yu. M. A nutrient medium for the cultivation of non-spore-forming anaerobic bacteria. *Laboratornoe delo*. 1988; 6: 47-9. (in Russian)
 30. Leonov V.V., Bulatov I.A., Mironov A.Yu. Growth and expression of virulence factors of conditionally pathogenic microorganisms in the blood serum with different variants of iron homeostasis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(8): 498-501. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Давыденко В.С.¹, Останкова Ю.В.¹, Щемелев А.Н.¹, Тотолян А.А.^{1,2}

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Для прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии (АРТ), был разработан способ выявления делеционных «нулевых» гомо- и гетерозиготных полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* методом ПЦР в режиме реального времени. В работе были использованы образцы цельной крови, полученные от 176 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, 112 лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью терапии, 297 ВИЧ-инфицированных лиц на АРТ с гепатотоксическими проявлениями различной степени тяжести. В качестве контрольной группы обследовали 123 волонтера без ВИЧ, вирусных гепатитов и клинических проявлений хронических и/или острых заболеваний, включая гепатотоксические проявления. В ходе работы получали ДНК и проводили мультиплексную ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» фрагментов целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30*. Относительное число копий целевых генов определяли с использованием метода $\Delta\Delta CT$ в сравнении с охарактеризованным образцом-калибратором, имеющим две копии каждой из целевых последовательностей, на основании чего делали выводы о наличии аллеля «дикого» типа или делеционного полиморфизма в гетеро- или гомозиготном состоянии для каждого анализируемого гена и потенциальной функциональной состоятельности соответствующих ферментов. Разработанный метод расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию гепатотоксических побочных эффектов при лечении с использованием антиретровирусных препаратов и может быть использован для фундаментальных исследований, посвященных оценке значимости полиморфных вариантов генов хозяина для развития гепатотоксичности, прогрессирования ВИЧ-инфекции и ее осложнений.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; антиретровирусная терапия; гепатотоксичность; полиморфизм; гены биотрансформации ксенобиотиков; *GSTT1*; *GSTM1*; *CYP2D6*; прогностический анализ; персонифицированная медицина

Для цитирования: Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Тотолян А.А. Прогностическая оценка развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69(8): 402-410.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-402-410>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shenna1@yandex.ru

Финансирование. Отраслевая НИР «Изучение особенностей вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) при моно- и коинфекции и формирование иммунного ответа у иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных лиц в различных условиях, до начала терапии, а также при наличии и отсутствии ответа на терапию и в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила	06.05.2024
Принята к печати	14.06.2024
Опубликовано	01.08.2024

Davydenko V.S.¹, Ostankova Y.V.¹, Schemelev A.N.¹, Totolian A.A.^{1,2}

PROGNOSTIC ASSESSMENT OF HEPATOTOXICITY IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, St. Petersburg, Russia;

²First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, 197022, St. Petersburg, Russia.

For prognostic assessment of hepatotoxicity development in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy (ART), we developed a method to detect deletion 'null' homo- and heterozygous polymorphic variants of *GSTM1*, *GSTT1*, and *CYP2D6* genes by real-time PCR. Whole blood samples obtained from 176 HIV-infected patients with virological ineffectiveness of ART, 112 persons with newly diagnosed HIV infection, 400 HIV-infected persons with low adherence to therapy, 297 HIV-infected persons on ART with hepatotoxic

manifestations of different severity were used. As a control group, 123 volunteers without HIV, viral hepatitis and clinical manifestations of chronic and/or acute diseases, including hepatotoxic manifestations, were examined. In the course of work, DNA was obtained and multiplex PCR with real-time hybridisation-fluorescence detection of fragments of target genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* and reference gene *RPP30* was performed. The relative number of copies of the target genes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method in comparison with the characterised calibrator sample having two copies of each of the target sequences, on the basis of which conclusions were drawn about the presence of a wild-type allele or deletion polymorphism in the hetero- or homozygous state for each analysed gene and the potential functional status of the corresponding enzymes. The developed method expands the arsenal of methods designed to assess at the preclinical stage the human genetic predisposition to the development of hepatotoxic side effects during treatment with antiretroviral drugs and can be used for basic research to assess the significance of polymorphic variants of host genes for the development of hepatotoxicity, progression of HIV infection and its complications.

Key words: HIV infection; antiretroviral therapy; hepatotoxicity; polymorphism; xenobiotic biotransformation genes; *GSTT1*; *GSTM1*; *CYP2D6*; prognostic analysis; personalised medicine

For citation: Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Totolian A.A. Prognostic assessment of hepatotoxicity in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 402-410 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-402-410>

For correspondence: Ostankova Yu.V., PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Immunology and Virology HIV Infection; e-mail: shennal@yandex.ru

Information about authors:

Davydenko V.S., <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>;

Ostankova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;

Schemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>;

Totolian A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Acknowledgment. Branch research work «Study of human immunodeficiency virus (HIV) features in mono- and coinfection and formation of immune response in immunocompetent and immunocompromised individuals under different conditions, before the start of therapy, as well as in the presence and absence of response to therapy and depending on the genetic polymorphism of host genes».

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

Received 06.05.2024

Accepted 12.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), как и вызываемая им инфекция, остается важнейшей проблемой современного человечества. По данным на 2022 год в мире насчитывалось от 33,1 миллиона до 45,7 миллионов человек с диагнозом ВИЧ-инфекция, среди которых число новых случаев заражения составило около 1,3 миллиона [1]. В Российской Федерации за период 2022 года показатель заболеваемости ВИЧ-инфекции составил 43,29 случаев на 100 тысяч населения, однако в некоторых регионах заболеваемость гораздо выше [2]. Без лечения ВИЧ-инфекция постепенно ослабляет иммунную систему, делая людей очень восприимчивыми к развитию оппортунистических инфекций, что приводит к быстрой гибели [3]. Единственным способом лечения ВИЧ-инфекции на сегодняшний день является антиретровирусная терапия (АРТ), в рамках которой применяют различные схемы, включающие в себя комплекс антиретровирусных препаратов (АРП), действующих на разных стадиях жизненного цикла ВИЧ [4], что позволяет достичь уровня вирусной нагрузки ВИЧ в плазме ниже предела обнаружения (<20 копий/мл в зависимости от используемого анализа) [5]. Такое снижение является главной целью лечения, так как известно, что люди, которые придерживаются АРТ и достигают неопределяемой вирусной нагрузки, не передают вирус дальше [6]. Самым главным недостатком АРТ является возможность развития мутаций лекарственной устойчивости, приводящих к фармакорезистентности к тем или иным препаратам [7 - 9]. Это, в свою очередь, может приводить к инфицированию новых больных устойчивыми к лечению штаммами [10 - 12]. Для достижения вирусологической эффективности и устойчивого вирусоло-

гического ответа требуется высокая приверженность пациента к лечению [13, 14], так как при снижении концентрации препарата быстро появляются варианты вируса, обладающие мутациями фармакорезистентности. Недостаточное подавление вируса при длительном лечении почти наверняка приводит к развитию полной резистентности не только к используемому препарату, но и ко всей группе в целом. Таким образом, стратегии повышения приверженности к лечению являются неотъемлемыми компонентами достижения 90% сокращения числа новых случаев ВИЧ-инфицирования к 2030 году и, в перспективе, прекращению эпидемии ВИЧ [15].

Низкая приверженность АРТ зависит от многих факторов, в том числе, клинических: токсичность используемых лекарств, приводящая к побочным реакциям при приеме препаратов и, соответственно, плохой переносимости лечения из-за проявлений гепатотоксичности [16]. Гепатотоксичность представляет собой повреждение печени, вызванное чужеродными веществами (ксенобиотиками), в том числе лекарственными препаратами. Гепатотоксичность и ее выраженность зависят от токсического потенциала лекарственных препаратов, модифицируемых факторов риска и генетических особенностей пациента. Диагноз заболевания печени часто основывается на повышенных уровнях ферментов сыворотки, особенно аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Эти ферменты, участвующие в расщеплении аминокислот, служат индикаторами повреждения клеток печени, когда их уровень становится аномально высоким [17, 18]. В среднем, только у 25-30% ВИЧ-инфицированных лиц гепатотоксичность сопровождается клинически выраженными

симптомами, однако значимое поражение печени может привести к тяжелым последствиям и летальному исходу [19]. Это также является основной причиной изменения или прекращения АРТ, а также несоблюдения режима лечения, что, в конечном итоге, может привести к неудаче терапии [20]. Следует отметить, что понимание значимости гепатотоксичности при АРТ увеличивается с каждым годом по двум причинам. Во-первых, в связи с высокой распространенностью среди ВИЧ-инфицированных лиц хронических вирусных гепатитов В (ХГВ) и С (ХГС) [21, 22], так как у таких больных на фоне терапии чаще развиваются гепатотоксические эффекты [23]. Во-вторых, поскольку популяция ВИЧ-инфицированных пациентов стареет, а больные продолжают принимать АРТ, гепатотоксичность, вызванная ВИЧ, и метаболические нарушения, связанные с АРТ, все чаще встречаются в практике лечащих врачей и становятся серьезной проблемой общественного здравоохранения [24].

Белки семейства цитохромов (CYP) и семейства глутатион-S-трансфераз (GST) участвуют, соответственно, в первой и второй фазах двухэтапного процесса детоксикации ксенобиотиков, то есть широкого спектра токсинов окружающей среды, в том числе препаратов АРТ [25, 26]. При этом GST представляют собой ферменты фазы II метаболизма, предназначенные для детоксикации лекарств посредством специфичной конъюгации с глутатионом, наиболее известные из них, *GSTM1* и *GSTT1*, полиморфны у человека, делеция гена *GSTM1* может ухудшить способность человека к детоксикации некоторых канцерогенов, активных форм кислорода и некоторых лекарств, а делеция *GSTT1* снижает эффективность детоксикации лекарственных средств и их конъюгации с электрофильными и гидрофобными соединениями [27]. Цитохром P450 2D6 (CYP2D6) кодируется высокополиморфным геном *CYP2D6* и является ключевым ферментом реакции на лекарственные препараты, поскольку участвует в метаболизме практически 25% клинически назначаемых лекарств, в том числе метаболизирует антиретровирусные препараты

[28, 29]. Согласно литературным данным, определение нулевых/делеционных мутаций генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* у ВИЧ-инфицированных лиц даёт ценную прогностическую информацию в отношении возможного развития гепатотоксического эффекта при АРТ [25, 26]. Разработка сравнительно легко применимого в рутинной лабораторной диагностике метода определения таких полиморфных вариантов позволит выявлять пациентов с генетической предрасположенностью к развитию гепатотоксичности на фоне АРТ для углублённого обследования, своевременного назначения адекватной поддерживающей терапии, а также проведения комплекса профилактических мероприятий.

Цель нашей работы - разработать способ прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии на основе определения делеционного полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* человека.

Материал и методы. В работе были использованы образцы цельной крови, полученные от 176 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, 112 образцов крови от лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью терапии, 297 ВИЧ-инфицированных лиц на АРТ с гепатотоксическими проявлениями различной степени тяжести. В качестве контрольной группы обследовали 123 волонтеров без ВИЧ, вирусных гепатитов и клинических проявлений хронических и/или острых заболеваний, включая гепатотоксические проявления.

Экстракцию тотального препарата ДНК/РНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Полученный образец использовали для мультиплексной постановки ПЦР участков генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного нормировочного гена белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (*RPP30*) при условиях, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Параметры программы амплификации на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин		1
2	95	10 с		5
	61	30 с		
	72	15 с		
3	95	10 с	JOE/HEX, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange	30
	60	30 с *		
	72	15 с		

Примечание. * – Детекция флуоресцентного сигнала.

Состав амплификационной смеси представлял собой буферный раствор, содержащий Трис-HCl pH 8,8 (при 25 °C), KCl, 6-7 mM MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, *SynTaq* ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами

(или 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы, или Hot-start Taq ДНК-полимеразы). Использовали разработанный в ходе исследований комплекс олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов (табл. 2).

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для амплификации фрагментов целевых генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30*

Праймер/Зонд	Нуклеотидная последовательность
GSTM1F	5'–CACCTGCATTCGTTTCATGTGAC–3'
GSTM1R	5'–AAGCAAGAGCAGAGAGGAGAC–3'
GSTM1zondFAM	5'–FAM-GCCATGAGCAGGCACAGTGAGTGC-RTQ1/BHQ1–3'
GSTT1F	5'–GTCCCAGAGCACCTCACC–3'
GSTT1R	5'–GTGTGCATCATTCTCATTGTGG–3'
GSTT1zondHEX	5'–HEX-CACCATCCCCACCCTGTCTTCCA-BHQ1–3'
CYP2D6*5F	5'–TGAGCCCATCTGGGAAACA–3'
CYP2D6*5R	5'–GGTGTCCCAGCAAAGTTCATG–3'
CYP2D6*5zondCy5	5'–Cy5-CAGTGCAGGGGCCGAGGGAG-RTQ2/BHQ2–3'
RPP30F	5'–TTTGGACCTGCGAGCG–3'
RPP30R	5'–GAGCGGCTGTCTCCACAAGT–3'
RPP30-zondROX	5'–ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2–3'

Полученные результаты регистрировали посредством гибридационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени» с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР.

Параллельно с амплификацией анализируемых образцов проводили амплификацию контрольного образца, представляющего собой ранее охарактеризованный образец ДНК, в котором все три целевых гена дикого типа находятся в гомозиготном состоянии.

Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам: по каналу для флуорофора JOE/HEX – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *GSTT1*, по каналу для флуорофора FAM/Green сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *GSTM1*, по каналу для флуорофора Cy5/Red сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *CYP2D6*, по каналу для флуорофора ROX/Orange сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *RPP30*. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливали в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов. Результат амплификации по каналу считали положительным, если кривая однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения *Ct*), сомнительным во всех других случаях. Анализ *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*

проводили с нормализацией на эталонный ген *RPP30*, относительное число копий целевых генов определяли с использованием метода $\Delta\Delta CT$ [30] в сравнении с охарактеризованным образцом-калибратором, имеющим две копии каждой из целевых последовательностей, на основании чего делали выводы о наличии аллеля дикого типа или делеционного полиморфизма в гетеро- или гомозиготном состоянии для каждого анализируемого гена и потенциальной функциональной состоятельности соответствующих ферментов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., <https://www.graphpad.com/support/prism-5-updates/>). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хикватрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты. Согласно предложенному нами методу, полученный образец тотальной ДНК использовали для одновременной амплификации в одной емкости фрагментов целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30* с использованием олигонуклеотидных праймеров и соответствующих им олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители (см. табл.1). Основой для возникновения флуоресценции является амплификация целевых и эталонных фрагментов ДНК на специфических олигонуклеотидах. Для детекции накопления специфических продуктов ПЦР используются флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам амплификатора с функцией детекции флу-

оресценции в режиме реального времени.

На рис. 1 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов, вклю-

чая три целевых гена и один нормировочный, при «диком» генотипе, то есть, каждый целевой ген гомозиготен по «дикой» аллели, то есть, *GSTM1* +/+ *GSTT1* +/+ *CYP2D6* +/+.

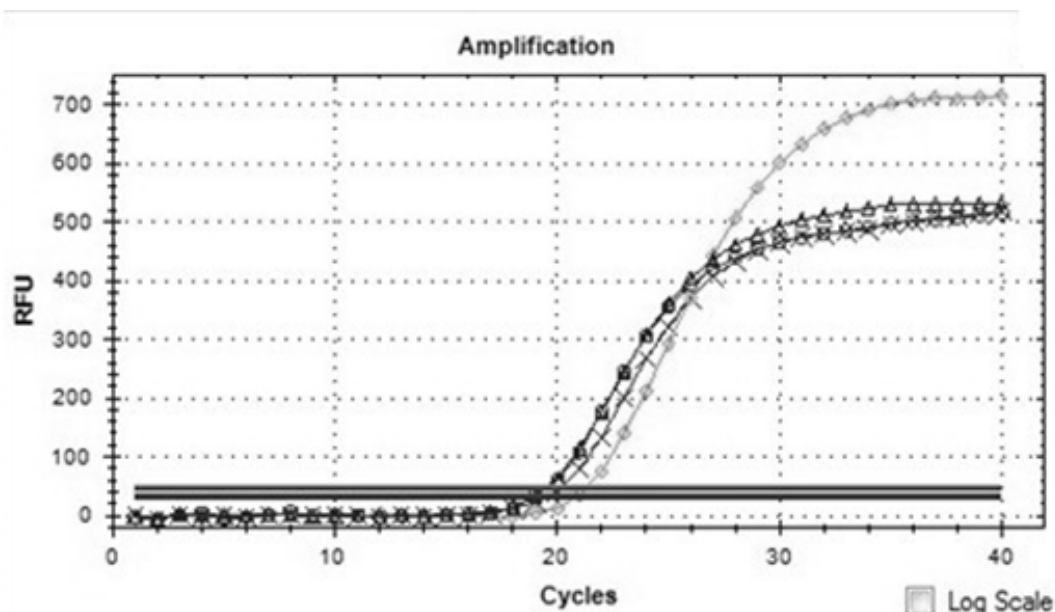


Рис. 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов при «диком» генотипе, включая целевые гены *GSTM1* (FAM – кружки), *GSTT1* (HEX – треугольники), *CYP2D6* (Cy5 – кресты) и эталонного гена *RPP30* (ROX – ромбы).

На рис. 2 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов при «дикой» гомозиготе (+/+) по гену *GSTT1*, ге-

терозиготе (+/0) по гену *GSTM1* и гомозиготной делеционной мутации (0/0) гена *CYP2D6*, о чем свидетельствует отсутствие продукта его амплификации.

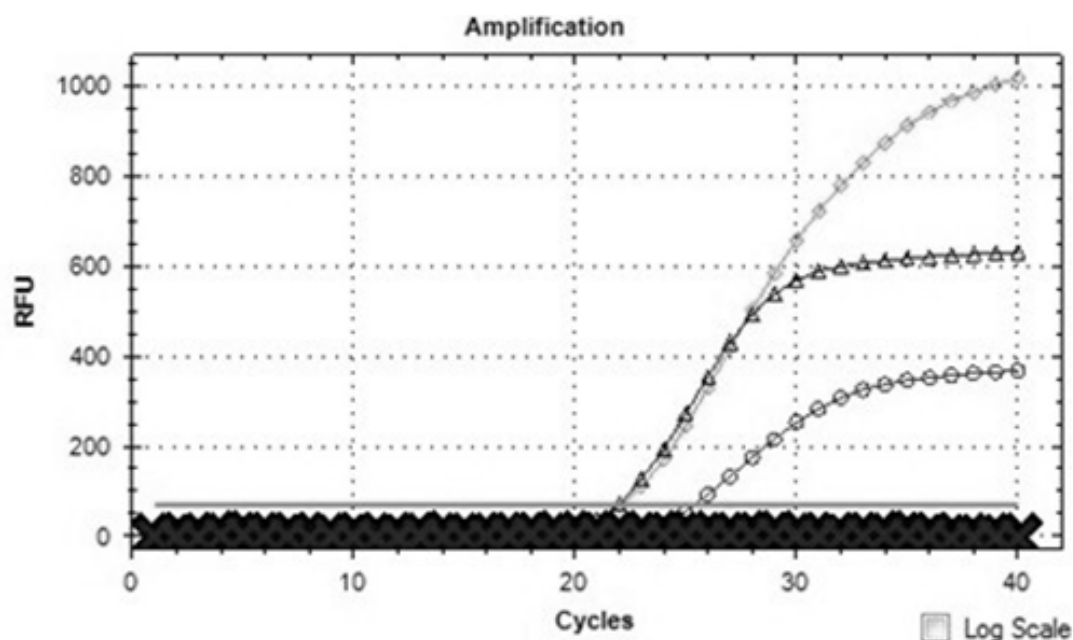


Рис. 2. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов. Обозначения: целевые гены *GSTM1* (FAM – кружки), *GSTT1* (HEX – треугольники), эталонный ген *RPP30* (ROX – ромбы).

На рис. 3 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов при «дикий» гомозиготе (+/+) по гену *GSTT1*

и гомозиготном делеционном полиморфизме по генам *GSTM1* (0/0) и *CYP2D6* (0/0), что выражается в отсутствии флуоресценции соответствующих зондов.

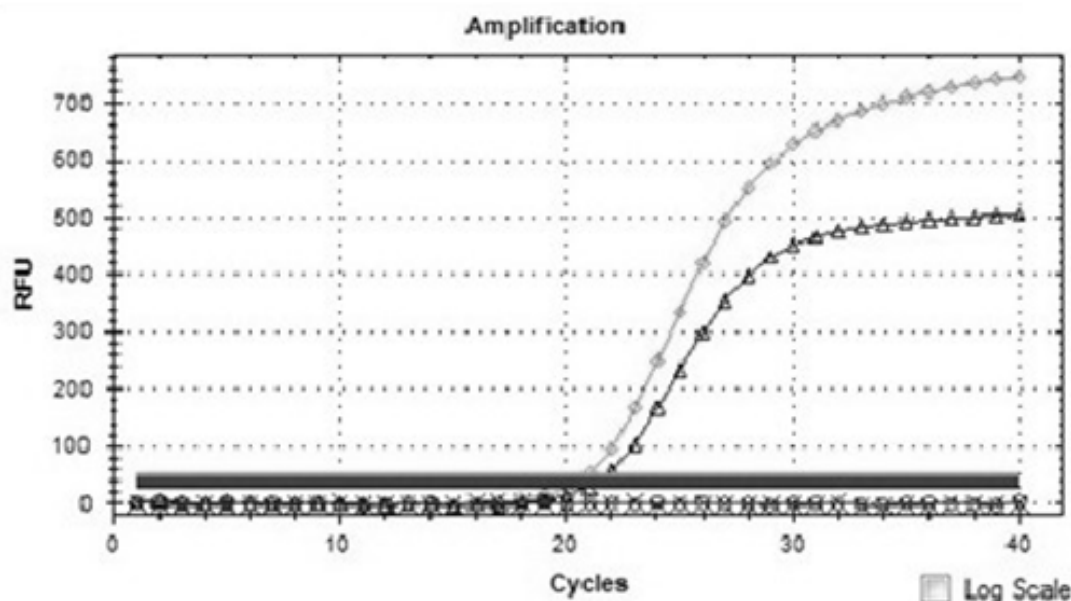


Рис. 3. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов. Обозначения: целевой ген *GSTT1* (HEX – треугольники), эталонный ген *RPP30* (ROX – ромбы).

В ходе апробации разработанного метода было показано, что частоты гомозиготных делеций *GSTM1* и *GSTT1* у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью АРТ составили 41,47% и 44,88%, соответственно, сочетанный генотип *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – 22,15% от группы. В контрольной группе сочетанный генотип *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – 12,19% от группы. При анализе распределения генотипов: *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* +/-, *GSTM1* +/- + *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0, *GSTM1* +/- + *GSTT1* +/-, где «-» – любой вариант, выявлены достоверные отличия между контрольной группой и ВИЧ-инфицированными лицами с неэффективной АРТ - $\chi^2=18,103$, $df3$, $p=0,0004$. Распределение генотипов генов *GST* в группе пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ не отличалось от такового в контрольной группе. Показан риск неэффективности АРТ при сочетанном генотипе *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – $OR=2,05$, $p<0,05$. Риск вирусологической неэффективности АРТ при *GSTM1* 0/- *GSTT1* 0/- *CYP2D6* 0/- более чем в пять раз выше, чем у лиц с генотипом *GSTM1* +/- *GSTT1* +/- *CYP2D6* +/- – $OR=5,7$, $p<0,05$.

Большинство ВИЧ-инфицированных больных с низкой приверженностью к АРТ сообщали о гепатотоксических проявлениях лечения антиретровирусными препаратами. Среди 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью терапии у 332 человек, что составило 83% обследованных, был представлен по крайней мере один из целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* с делеционной мутацией в гомозиготном состоянии. У 278

человек (69,5%) одновременно выявляли делеционную мутацию другого целевого гена в гомо- или гетерозиготном состоянии. У 161 (40,25%) ВИЧ-инфицированных больных с низкой приверженностью АРТ и гепатотоксическими проявлениями были выявлены сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ в присутствии *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+.

У 92,22% лиц с тяжелыми гепатотоксическими проявлениями выявляли следующие сочетания целевых генов: *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/+, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ *CYP2D6* 0/+. При оценке риска развития тяжелых гепатотоксических эффектов показано, что $OR=16,21$, $p<0,05$ при сочетанном генотипе *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0.

В связи с вышесказанным, авторы считают, что выявление сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ в присутствии *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+ свидетельствует о наличии у обследуемых генетической предрасположенности к развитию гепатотоксического эффекта при антиретровирусной терапии.

Обсуждение. В эпоху высокоактивной АРТ почти половина смертей среди госпитализированных пациентов, инфицированных ВИЧ, связана с заболеваниями печени. Клинические проявления при этом могут варьировать от первично бессимптомных с умеренным повышением активности печеночных ферментов до

цирроза печени и печеночной недостаточности. В различных работах исследователи освещают эту проблему как гепатотоксичность, развившуюся вследствие действия непосредственно инфекции, побочного эффекта АРТ и нескольких причин сразу. Индивидуальная адаптация к антиретровирусным препаратам, воздействию окружающей среды, сформированная культурными нормами и генетической предрасположенностью, потенциально может модулировать риск и прогрессирование заболеваний печени среди ВИЧ-инфицированных лиц [23, 24], в связи с чем, методы, позволяющие выявить повышенный риск развития у пациента гепатотоксичности, становятся необходимостью.

Ранее Н.О. Singh и соавторы [26] предлагали способ определения делеционных мутаций генов *GSTM1* и *GSTT1* у ВИЧ-инфицированных лиц для определения риска развития гепатотоксичности при АРТ, кроме того известен «Набор реагентов для выявления генетических полиморфизмов в генах *GSTT1* и *GSTM1* человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле "АмплиСенс® *GSTT1/GSTM1*-EPh)". Однако, методы, выявляющие только гомозиготные нулевые генотипы очевидно ограничены так как не позволяют определить гетерозиготы *GSTM1* +/0 и *GSTT1* +/0, ферментативная активность которых присутствует, но имеет сравнительно более низкий уровень, чем при гомозиготах *GSTM1* ++ и *GSTT1* ++. Кроме того, ограничением является необходимость использования агарозного геля-электрофореза для детекции результатов. Известен способ определения мутаций гена *CYP2D6*, включая делеционную мутацию, методом ПЦР с последующим секвенированием [31], что позволяет выявить разнообразие мутаций указанного гена, но очевидным ограничением метода является сложность его применения в рамках рутинной лабораторной диагностики. Проблему отчасти решили в своей работе I. Girault и соавторы [32], предложившие выявлять «нулевые» аллели *GSTT1* и *GSTM1* методом ПЦР в реальном времени, однако этот способ имел ряд технических проблем. В первых, крайне неудачно были выбраны нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, что в одних случаях приводило к повышенной возможности отжига синтетических последовательностей самих на себя, а в других, из-за разницы GC-состава и, соответственно, различных оптимальных температур отжига, к разнице в эффективности ПЦР целевых и нормировочного гена. Во-вторых, выявление делеционных аллелей только генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков, но отсутствие выявления делеционной мутации генов I фазы не позволяло оценить эффект суммарного влияния. Эти проблемы были успешно решены в рамках предложенного нами способа.

Необходимость разработки и внедрения предложенного нами способа для прогностической оценки предрасположенности к развитию гепатотоксичности при АРТ косвенно подтверждается тем, что наряду с повышенным риском распространённости вирусных гепатитов среди ВИЧ-инфицированных лиц, достоверно показано, что такая коинфекция существенно повышает риск развития тяжелой гепатотоксичности [23, 24]. К потенциальным механизмам повреждения печени у таких пациентов можно отнести усиление окислитель-

ного стресса печени, нарушение работы митохондрий, липотоксичность, аутоиммунные нарушения, цитотоксичность, накопление токсичных метаболитов, в том числе за счет нормальной/высокой активности ферментов I фазы биотрансформации и сниженной активности ферментов II фазы, системное воспаление, не исключено также влияние мутантных вариантов вируса гепатита В, которые могут способствовать тяжелой гепатотоксичности [24]. Таким образом, ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие высокоактивную антиретровирусную терапию, тем более при наличии коинфекции, требуют пристального внимания и регулярного контроля функции печени [24].

Отдельно следует отметить, что в ходе апробации метода, помимо ассоциации «нулевых» аллелей генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* с развитием гепатотоксичности, было показано влияние сочетанных нулевых генотипов исследуемых генов на вирусологическую эффективность АРТ. Поскольку маловероятна прямая связь вирусологической неэффективности АРТ с делеционными полиморфными вариантами исследуемых генов, можно предположить, что ассоциация опосредована повышенной частотой низкой/умеренной приверженности среди лиц с указанными генотипами из-за проявлений гепатотоксичности, о которых пациенты не сообщали своевременно. Еще одним неожиданным результатом оказалось то, что наибольшее ОР развития гепатотоксичности показано при сочетании генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ с *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+, в то время как логично было бы предположить наибольшую значимость при сочетании «нулевых» аллелей генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков с «диким типом» гена I фазы. Вероятнее всего, это может быть связано с многочисленностью генов биотрансформации обеих фаз и тем, что какой-то/какие-то из генов I фазы играет более важную роль при активации ксенобиотиков из ряда АРП, чем *CYP2D6*, однако необходимы дальнейшие исследования этого направления.

Заключение. Разработанный метод прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии на основе определения делеционного полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* человека расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию гепатотоксических побочных эффектов при лечении с использованием антиретровирусных препаратов. Кроме того, представленный способ может быть использован для фундаментальных исследований, посвященных оценке значимости полиморфных вариантов хозяина для развития гепатотоксичности, прогрессирования ВИЧ-инфекции и ее осложнений.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1, 3-6, 10, 11, 13-15, 17, 18, 20, 23-32 СМ. REFERENCES)

2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный

- доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.
- Останкова Ю. В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65-72. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90.
 - Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А. и др. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(1): 28–37. DOI: 10.36233/0372-9311-216
 - Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э. и др. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 310-21. DOI: 10.36233/0507-4088-119.
 - Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Семенов А.В. и др. Риск неэффективности терапии первой линии у пациентов с ВИЧ в СевероЗападном федеральном округе России. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13(2): 302-8. DOI: 10.15789/2220-7619-RAO-2122.
 - Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Чайка Н.А., Келли Д., Амирханян Ю.А. Основные причины и современные методы коррекции низкой приверженности к антиретровирусной терапии у трудных пациентов. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2018; 10(4): 37-56. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-4-37-56.
 - Журавлева М.В., Прокофьев А.Б., Подымова А.С., Бердникова Н.Г., Сереброва С.Ю., Демченкова Е.Ю. Контроль за нежелательными реакциями при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ/СПИД при применении взаимозаменяемых лекарственных препаратов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2017; 5(3): 126-32.
 - Семенов А.В., Останкова Ю. В., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Тотолан Арег А. Оптимизация алгоритма диагностики маркеров хронического гепатита В у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(9): 574-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-574-579.
 - Останкова Ю.В., Валутите Д. Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boubaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ инфекцией. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 97-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105.
 - 393(10189): 2428-38. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30418-0.
 - Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.V., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2019; 11(4): 79-90. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90. (in Russian)
 - Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A. et al. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(1): 28-37. DOI: 10.36233/0372-9311-216. (in Russian)
 - Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E. et al. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Voprosy Virusologii*. 2022; 67(4): 310-21. DOI: 10.36233/0507-4088-119. (in Russian)
 - Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Detection of Patient HIV-1 Drug Resistance Mutations in Russia's Northwestern Federal District in Patients with Treatment Failure. *Diagnostics*. 2022; 12(8): 1821. DOI: 10.3390/diagnostics12081821.
 - Shchemelev A.N., Boubaly S., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Prevalence of drug resistant HIV-1 forms in patients without any history of antiretroviral therapy in the Republic of Guinea. *J. Med. Virol.* 2022; 95: e28184. DOI: 10.1002/jmv.28184.
 - Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Serikova E.N., Zueva E.B., Semenov A.V. et al. Risk assessment of firstline treatment failure in untreated HIV patients in Northwestern federal district of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13(2): 302–8. DOI: 10.15789/2220-7619-RAO-2122. (in Russian)
 - Rutledge S.E., Zhang J., Icard L.D., Jemmott J.B. Do syndemic conditions predict HIV medication adherence among urban African American men? *AIDS Care*. 2024; 36(6): 781-9. DOI: 10.1080/09540121.2024.2305149.
 - Patel D., Beer L., Yuan X., Tie Y., Baugher A.R., Jeffries W.L. et al. Explaining racial and ethnic disparities in antiretroviral therapy adherence and viral suppression among U.S. men who have sex with men. *AIDS*. 2024; 38(7): 1073-80. DOI: 10.1097/QAD.0000000000003860.
 - Dunn Navarra A.M., Gormley M., Liang E., Loughran C., Vorderstrasse A., Garcia D.R. Developing and testing a web-based platform for antiretroviral therapy (ART) adherence support among adolescents and young adults (AYA) living with HIV. *PEC Innov.* 2024; 4: 100263. DOI: 10.1016/j.pecinn.2024.100263.
 - Musatov V.B., Yakovlev A.A., Chaika N.A., Kelly J., Amirhanyan Yu.A. Main reasons and current methods of correction of poor adherence to antiretroviral treatment in difficult patients. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2018; 10(4): 37-56. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-4-37-56. (in Russian)
 - Ayelagbe O.G., Akerele O.P., Onuegbu A.J., Oparinde D.P. Drug hepatotoxicity in HIV patients on highly active antiretroviral therapy [HAART] in Southwest Nigeria. *IOSR J. Dent. Med. Sci. (IOSR-JDMS)*. 2014; 13(5): 67–70. DOI: 10.9790/0853-13566770.
 - Achila O.O., Abrhaley F., Kesete Y., Tesfaldet F., Alazar F., Fisshaye L. et al. Dyslipidemia and associated risk factors among HIV/AIDS patients on HAART in Asmara, Eritrea. *PLoS One*. 2022; 17(7): e0270838. DOI: 10.1371/journal.pone.0270838.
 - Zhuravleva M.V., Prokofiev A.B., Podymova A.S., Berdnikova N.G., Serebrova S.Yu., Demchenkova E.Yu. Control of adverse drug reactions in HIV/AIDS antiretroviral treatment with interchangeable medicines. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. 2017; 5(3):126-32. (in Russian)
 - Gebremicael G., Tola H.H., Gebreegziachew A., Kassa D. Incidence of Hepatotoxicity and Factors Associated During Highly Active Antiretroviral Therapy in People Living with HIV in Ethiopia: A Prospective Cohort Study. *HIV AIDS (Auckl)*. 2021; 13: 329-36. DOI: 10.2147/HIV.S283076.
 - Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Zueva E.B., Totolian A.A. Optimization of the algorithm diagnosis chronic hepatitis B markers in patients with newly diagnosed HIV infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(9): 574-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-574-579. (in Russian)
 - Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N.,

REFERENCES

- The path that ends AIDS: UNAIDS Global AIDS Update 2023. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2023. https://thepath.unaids.org/wp-content/themes/unaids2023/assets/files/2023_report.pdf (Accessed: 18.03.2024).
- On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022: State Report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka; 2023. (in Russian)
- Wondifraw Baynes H., Tegene B., Gebremichael M., Birhane G., Kedir W., Biadgo B. Assessment of the effect of antiretroviral therapy on renal and liver functions among HIV-infected patients: a retrospective study. *HIV/AIDS Res. Palliat. Care*. 2017; 9: 1–7. DOI: 10.2147/HIV.S120979.
- Richman D.D., Margolis D.M., Delaney M., Greene W.C., Hazuda D., Pomerantz R.J. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science*. 2009; 323(5919): 1304-7. DOI: 10.1126/science.1165706.
- HIV.gov Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents with HIV. 2023. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-arv/virologic-failure?view=full> (Accessed: 15.04.2024).
- Rodger A.J., Cambiano V., Bruun T., Vernazza P., Collins S., Degen O. et al. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive PARTNER taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*. 2019;

- Shchemelev A.N., Boumbaly S. et al. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 97-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105. (in Russian)
23. Kwofie T.B., Adigbli D., Osei-Yeboah J., Ativi E., Lokpo S.Y. Hepatitis B and C infections in HIV-1 patients on combination antiretroviral therapy (cART) in Ghana: implications for immunologic recovery, clinical response to treatment, and hepatotoxicity. *Heliyon*. 2021; 7(6): e07172. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07172.
24. Darge T., Babusha A., Chilo D., Dukessa A., Teferi S. Predictors of severe hepatotoxicity among retroviral infected adults on HAART regimen in Ilubabor Zone, Southwest Ethiopia. *Sci Rep*. 2024; 14(1): 8473. DOI: 10.1038/s41598-024-57900-7.
25. Nefic H. The Genetic Variation of CYP2D6 Gene in the Bosnian Population. *Med. Arch*. 2018; 72(6): 396-400. DOI: 10.5455/med-arch.2018.72.396-400.
26. Singh H.O., Lata S., Angadi M., Bapat S., Pawar J., Nema V. et al. Impact of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphism and risk of ARV-associated hepatotoxicity in HIV-infected individuals and its modulation. *Pharmacogenomics J*. 2017; 17(1): 53-60. DOI: 10.1038/tpj.2015.88.
27. Chanhom N., Jittikoon J., Wattanakapayakit S., Mahasirimongkol S., Charoenyingwattana A., Udomsinprasert W. et al. The Association of HLA-B*35 and GSTT1 Genotypes and Hepatotoxicity in Thai People Living with HIV. *J Pers Med*. 2022; 12(6): 940. DOI: 10.3390/jpm12060940.
28. Singh H., Lata S., Gangakhedkar R.R. Prevalence of CYP2D6*4 1934G/A polymorphism in Western Indian HIV patients. *APMIS*. 2018; 126(11): 842-51. DOI: 10.1111/apm.12893.
29. Twesigomwe D., Drögemöller B.I., Wright G.E.B., Adebamowo C., Agongo G., Boua P.R. et al. Characterization of CYP2D6 Pharmacogenetic Variation in Sub-Saharan African Populations. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2023; 113(3): 643-59. DOI: 10.1002/cpt.2749.
30. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
31. Kim E.Y., Lee S.S., Jung H.J., Jung H.E., Yeo C.W., Shon J.H. et al. Robust CYP2D6 genotype assay including copy number variation using multiplex single-base extension for Asian populations. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411(23-24): 2043-8. DOI: 10.1016/j.cca.2010.08.042.
32. Girault I., Lidereau R., Biche I. Trimodal GSTT1 and GSTM1 genotyping assay by real-time PCR. *Int. J. Biol. Markers*. 2005; 20(2): 81-6. DOI: 10.5301/JBM.2008.2569.

Точный диагноз не выходя из дома



Экспресс-тест
для диагностики
АНГИНЫ
«ИХА-СтрептоА»



Исследуемый
материал:
Мазок

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



Исследуемый
материал:
Капля крови
из пальца

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



Исследуемый
материал:
Мазок

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



Исследуемый
материал:
Мазок

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



Исследуемый
материал:
Образцы кала

WILDBERRIES

OZON



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



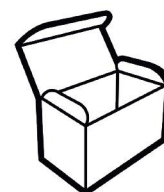
www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

ИНОЗИТОЛ МЕТИЛФОЛАТ

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



на курс

Покупайте
на маркетплейсах

БАД. Не является лекарственным средством



Экспресс-диагностика антибиотикорезистентности
бактериальных штаммов

ИХА-CARBA-5

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

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

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

Помощь в выборе противомикробной терапии
— своевременного назначения антибиотикотерапии
— коррекция антибиотикотерапии в отсутствие эффекта

Легко внедрить в любые лабораторные условия
— Необходимо только стандартное оснащение микробиологической лаборатории

Удобная комплектация
— для исследования 1 и 20 образцов

Быстрый результат
— определение карбапенемаз через 10 минут
— сокращение преаналитического этапа по сравнению со стандартными методами определения антибиотикорезистентности



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

Наборы ПЦР для диагностики Гепатита



Набор реагентов для качественного выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

«ГепазК В»

96 определений

№ РЗН 2023/21015 от 01.09.2023



Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«ГепазК В-q»

96 определений

№ РЗН 2023/21014 от 01.09.2023



Набор реагентов для качественного выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

«ГепазК С»

96 определений

№ РЗН 2023/21226 от 27.09.2023



Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«ГепазК С-q»

96 определений

№ РЗН 2023/21400 от 24.10.2023



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Омельчук Е.П., Тимошкина Н.Н., Росторгуйев Э.Е., Дженкова Е.А.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ БИОМАРКЕРЫ ГЛИОМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону, Россия

Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями центральной нервной системы, которые чрезвычайно агрессивны и имеют неутешительный прогноз. Инвазивная диагностика глиальных опухолей несет значительные риски для пациента и не всегда целесообразна, а магнитно-резонансная томография не дает возможности дифференциальной диагностики заболевания. В связи с этим активно развивается направление малоинвазивной диагностики глиом. Целью настоящего обзора стала систематизация имеющихся данных о циркулирующих биомаркерах глиом для потенциального клинического применения. Поиск литературы за последние 10 лет был проведен по ключевым словам «glioma liquid biomarkers» с использованием баз данных PubMed, Elsevier, Российской научной электронной библиотеки eLIBRARY и поисковой системы Google Scholar. Было выявлено более 5000 ссылок, после их проверки проанализировано 277 статей, из которых 62 источника были выбраны для написания настоящего обзора. Согласно литературным данным идентификация потенциальных циркулирующих биомаркеров глиом, включая опухолевые клетки, внеклеточные везикулы, протеины, а также ДНК и РНК, проводится в основном в крови и спинномозговой жидкости. Чувствительность и специфичность отдельных биомаркеров характеризуется высокой вариабельностью. Среди наиболее перспективных выделяют отдельные микро-РНК, экзосомы и внеклеточную ДНК. Проблема низких концентраций биомаркеров решается благодаря быстрому развитию методологической базы. Несомненным преимуществом жидкостной биопсии является возможность многократного отбора образцов, что позволяет осуществлять мониторинг заболевания. Тем не менее, на сегодняшний день ни один маркер глиом не внедрен в повседневную клиническую практику. Возможно, что панели нескольких типов биомаркеров станут в будущем стандартом диагностики и мониторинга глиом, поскольку биомаркеры, задействованные в различных молекулярных онко-ассоциированных путях, будут актуальны для большего количества пациентов, а также смогут суммарно повысить чувствительность и специфичность тестирования.

Ключевые слова: глиомы; циркулирующие маркеры; циркулирующие опухолевые клетки; внеклеточные везикулы; цДНК; цРНК, обзор

Для цитирования: Омельчук Е.П., Тимошкина Н.Н., Росторгуйев Э.Е., Дженкова Е.А.

Циркулирующие биомаркеры глиом (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (8): 411-420. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-411-420>

Для корреспонденции: Омельчук Екатерина Петровна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярной онкологии; e-mail: ekaterina.omelchuck@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема № 123030200082-9).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Гвалдину Дмитрию Юрьевичу за помощь в оформлении работы.

Поступила	31.05.2024
Принята к печати	18.06.2024
Опубликовано	01.08.2024

Omel'chuk E.P., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Dzhenkova E.A.

CIRCULATING BIOMARKERS OF GLIOMAS (REVIEW OF LITERATURE)

National Medical Research Centre for Oncology, 344037, Rostov-on-Don, Russia

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system, which are extremely aggressive and have a poor prognosis. Invasive diagnosis of glial tumors is not always advisable and carries significant risks for the patient, and magnetic resonance imaging does not allow differential diagnosis of the disease. Therefore, the direction of minimally invasive diagnosis of gliomas is actively developing. The purpose of this review was to systematize the available data on circulating glioma biomarkers for potential clinical application. A literature search over the last 10 years was carried out using the keywords "glioma liquid biomarkers" using the PubMed and Elsevier databases, the Russian Scientific Electronic Library eLIBRARY and the Google Scholar search engine. More than 5000 references were identified, and after verifying, 277 articles were analyzed, of which 62 sources were selected for this review. According to the literature, the identification of potential circulating glioma biomarkers, including tumor cells, extracellular vesicles, proteins, as well as DNA and RNA, is mainly performed in the blood and cerebrospinal fluid. The sensitivity and specificity of individual biomarkers are characterized by high variability; individual microRNAs, exosomes, and extracellular DNA are considered more promising. The problem of low concentrations of biomarkers is being solved due to the rapid development of the methodological framework. An undoubted advantage of liquid biopsy is the possibility of multiple sampling, which allows for disease monitoring. However, to date, no glioma marker has been introduced into everyday clinical practice. It is possible that panels of several types of biomarkers will become the future standard for diagnosing and monitoring gliomas, since biomarkers involved in different molecular cancer-associated pathways will be relevant for a larger number of patients and can also cumulatively increase the sensitivity and specificity of testing.

Key words: glioma; circulating biomarkers; circulating tumor cells; extracellular vesicles; ctDNA; ctRNA; review

For citation: Omel'chuk E.P., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Dzhenkova E.A.

Circulating biomarkers of gliomas (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 411-420 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-411-420>

For correspondence: Omel'chuk E.P., junior researcher of the Laboratory of Molecular Oncology; e-mail: ekaterina.omelchuck@yandex.ru

Information about authors:

Omel'chuk E.P., <https://orcid.org/0000-0003-0786-9684>;

Timoshkina N.N., <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>;

Rostorguev E.E., <https://orcid.org/0000-0003-2937-0470>;

Dzhenkova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>.

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

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Health of the Russian Federation (theme №123030200082-9).

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Dmitry Yurievich Gvaldin for his help in preparing the article.

Received 31.05.2024

Accepted 18.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. Глиомы являются наиболее распространенными инвазивными первичными опухолями мозга у взрослых, которые характеризуются высокими уровнями смертности и рецидивирования после хирургического удаления, с частотой встречаемости около 5 пациентов в год на 100 000 человек в мире. Глиомы поражают головной и спинной мозг и возникают в результате онкотрансформации глиальных клеток. Приблизительно 70% всех глиом относятся к злокачественным; 5-летний рубеж выживаемости преодолевают лишь 20% пациентов с данным заболеванием [1, 2].

Низкая эффективность лечения глиом объясняется, прежде всего, высокой морфогенетической гетерогенностью клеток опухоли и инвазивностью процесса, а также часто встречающейся на практике поздней постановкой диагноза, когда уже появляются явно выраженные

симптомы заболевания. Не решены вопросы скрининговой диагностики данных новообразований. Даже глиомы высокой степени злокачественности часто диагностируют тогда, когда процесс распространился за пределы возможностей эффективной хирургической резекции. Вследствие этого решение проблемы ранней диагностики глиом путем различных модальностей МРТ, РКТ, ПЭТ-КТ нейровизуализации в перспективе должно быть основано на изучении предиктивных диагностических молекулярных маркеров, что является весьма актуальной задачей будущих исследований [3].

В настоящее время наиболее точными прогностическими и предиктивными маркерами по сравнению с гистологическими типами глиом признаны их молекулярно-генетические особенности, влияющие на клиническое течение и выживаемость. Прогностические

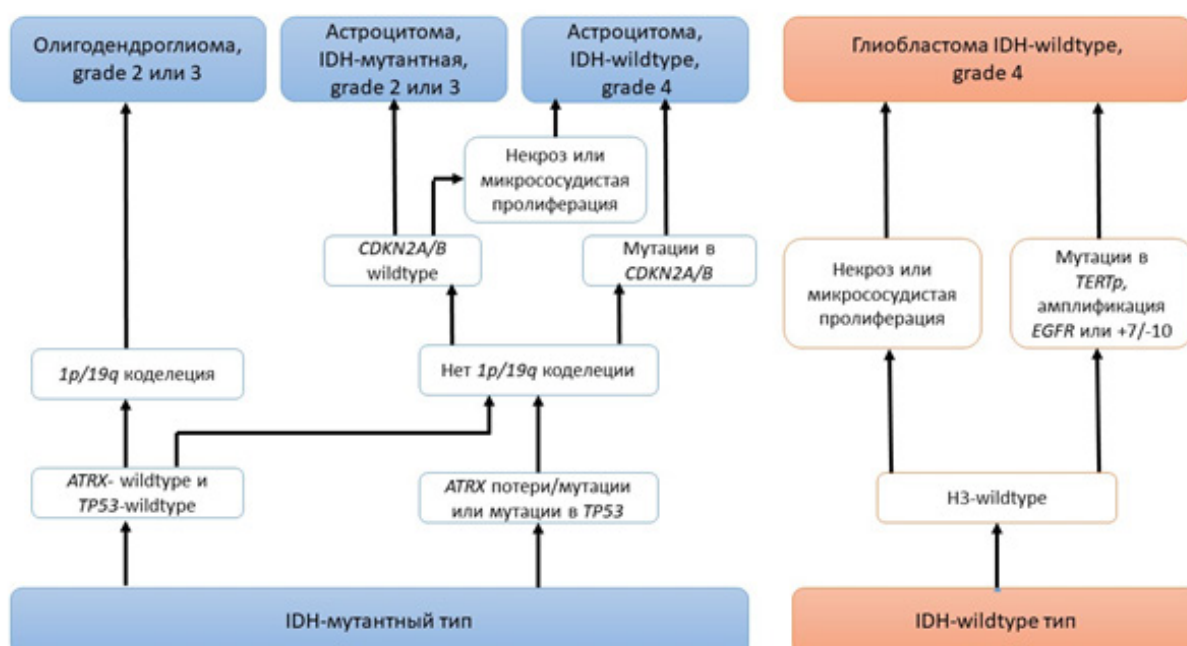


Рис. 1. Классификация диффузных глиом (взрослые) согласно ВОЗ 2021 года, 5-я версия.

факторы существенно различаются в зависимости от типа глиальной опухоли, что привело к значительной реструктуризации в классификации опухолей ЦНС (WHO 2021) (рис. 1) [4].

Опухоль-специфичные биомаркеры, обнаруживаемые в крови, моче, спинномозговой жидкости, то есть при так называемой «жидкостной биопсии», имеют преимущества в своей минимально инвазивной природе и обладают огромным потенциалом в области ранней диагностики, генотипирования опухолей, выявления минимальной остаточной болезни после радикального лечения, прогнозирования ответа на терапию и выявлении рецидивов [5]. Важно, что по сравнению с исследованием опухолевой ткани жидкостная биопсия может быть проведена многократно, что обеспечит мониторинг заболевания [6]. В настоящем обзоре мы рассмотрели текущие разработки и перспективы использования в клинике циркулирующих биомаркеров.

Жидкостная биопсия. Биологические жидкости человека (кровь, спинномозговая жидкость и моча) могут содержать компоненты опухоли, а именно циркулирующие опухолевые клетки, внеклеточные везикулы, нуклеиновые кислоты, белки и метаболиты.

Препятствием в разработке тестирования на базе циркулирующих биомаркеров может выступать их низкие уровни из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [7]. Однако появление таких методов как цифровая капельная ПЦР (ddPCR) и секвенирование следующего поколения (NGS) предоставили возможность анализировать крайние низкие концентрации маркеров. С помощью этих технологий проводится обнаружение мутаций, перестроек, изменений числа копий генов, эпигенетических модификаций и, с недавнего времени, фрагментации нуклеиновых кислот [8]. В тоже время проницаемость ГЭБ увеличивается по мере прогрессии опухоли за счет активности провоспалительных цитокинов, хемокинов и ангиогенных сигналов, экстрагируемым злокачественными клетками. В итоге, закономерно повышается концентрация опухолевых компонентов в биологических жидкостях на поздних стадиях заболевания [1]. Дополнительно вносит вклад характерная черта глиом - накопление мутаций в генах, кодирующих клаудины, которые в основном и определяют целостность ГЭБ. Глиомы high-grade имеют более высокие показатели обнаружения циркулирующих биомаркеров и большую мутационную нагрузку, чем low-grade первичные опухоли [9].

Периферическая кровь является наиболее доступным биоматериалом, в котором детектируют аналиты с небольшой молекулярной массой, способных проникать через неповрежденный ГЭБ [10].

Спинномозговая жидкость (СМЖ) обеспечивает более эффективное обнаружение опухолевых компонентов в связи с анатомической близостью к первичному очагу [9]. Очень низкая клеточность ликвора (до 5 клеток мм³) по сравнению с плазмой позволяет с большей чувствительностью определить опухолевую ДНК [11]. Возможности СМЖ были использованы для количественного анализа опухолевой ДНК с целью оценки тяжести заболевания и прогноза [9]. Жидкостная биопсия посредством люмбальной пункции является вариантом выбора для пациентов, имеющих противопоказания к хирургическому вмешательству [10].

Моча также является возможным источником биомаркеров глиом. Показано, что в моче можно обнаружить метаболические изменения, характерные для ткани глиобластомы [12], реже некоторые онкоспецифические микро-РНК [13].

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) обнаруживают преимущественно в крови, их рассматривают как источник биомаркеров, и одновременно, как биомаркер злокачественного новообразования. Присутствие ЦОК в биологических жидкостях связывают с неблагоприятным прогнозом [1]. Интересно, что ЦОК обнаруживают в крови пациентов с глиобластомой в 20-40% случаев, однако при этом отсутствует ассоциация с метастазированием [14]. ЦОК отличает повышенный миграционный потенциал и мезенхимальный фенотип вследствие эпителиально-мезенхимального перехода, однако они сохраняют многие генетические и фенотипические признаки исходной опухоли [15]. Например, обнаружены молекулярные сигнатуры ЦОК, позволяющие разграничить первичные и вторичные опухоли головного мозга [16], а также отличить лучевой некроз от истинного рецидива глиомы [17].

Внеклеточные везикулы представляют собой ограниченные мембраной пузырьки с цитоплазмой, которые выделяются клетками при различных физиологических и патологических состояниях, играя важную роль в межклеточной коммуникации. Они могут содержать в себе нуклеиновые кислоты, белки, липиды, метаболиты и другие молекулы. При онкогенезе роль везикул злокачественных клеток распространяется на поддержание роста и выживаемости опухоли, стимуляции миграции и инвазии путем индукции ангиогенеза, участие в метаболическом перепрограммировании здоровых клеток путем активации гликолитических путей, на модуляцию противоопухолевых иммунных реакций, иммуносупрессии и химиорезистентности [18].

Внеклеточные везикулы подразделяют на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, различающиеся, главным образом, размерами и происхождением [19]. Апоптотические тельца имеют размер 1-5 мкм и образуются в результате фрагментации клетки при апоптозе. Микровезикулы размером от 50 до 1300 нм, ограничены, как и апоптотические тельца, клеточной мембраной [20].

Экзосомы происходят из эндосом и имеют размер от 40 до 150 нм, что позволяет им проникать через интактный ГЭБ и циркулировать в жидкостях организма [1]. Подтверждена способность внеклеточных везикул проникать через неповрежденный ГЭБ путем транцитоза [21]. В целом, доля экзосом, выделяемых глиальными опухолями, составляет менее 10% от всех циркулирующих экзосом [22]. Тем не менее, они более стабильны и их концентрация в крови выше по сравнению с ЦОК, а также по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с другими заболеваниями ЦНС. Положительная динамика уровня экзосом ассоциирована с рецидивом и прогрессией глиобластомы [18]. Как и ЦОК внеклеточные везикулы могут быть изолированы из биологических жидкостей человека, что дает возможность валидировать опухоль-специфичность биомаркеров в виде нуклеиновых кислот, белков и т.п. [23].

С диагностической точки зрения в качестве биомаркеров наибольший интерес представляют циркулирую-

щие нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). Высвобождаваясь из опухолевых клеток, они могут обнаруживаться в составе либо липидных/белковых структур, либо внеклеточных везикул. У здоровых людей циркулирующие нуклеиновые кислоты быстро элиминируются из кровотока. Напротив, у онкологических пациентов фиксируют накопление ДНК и РНК в кровотоке [24].

Циркулирующая опухолевая ДНК (цодНК) обнаруживается у 50% пациентов с первичными опухолями головного мозга [25], в том числе при отсутствии в крови ЦОК [16], при этом показано соответствие мутационного статуса опухолевой ткани и цодНК [6, 26]. По сравнению с ЦОК цодНК обладает более высокой чувствительностью и предоставляет более широкий спектр опухолевых маркеров [1]. Уровень внеклеточной ДНК может варьировать в зависимости от типа, расположения и размера опухоли, что необходимо учитывать при дизайне и анализе результатов исследования [11]. Интересно, что характер фрагментации цодНК в плазме/СМЖ (<145 п.н.) и моче (<82 п.н.) отличается [8].

Проблемы разработки биомаркеров на основе цодНК связаны низкой представленностью молекул в жидкостной биопсии [25] и неоднозначной специфичностью: в цодНК обнаруживают опухолеспецифичные генетические изменения при подозрении на злокачественное новообразование головного мозга и при доброкачественных опухолях ЦНС [11]. Ряд исследователей сообщают, что чувствительность цодНК-тестов варьирует в зависимости от опухолевой нагрузки и grade [12]. Противоречивая информация связана, очевидно, с методическими проблемами анализа внеклеточной ДНК: нет общепризнанных рекомендаций по её сбору и хранению [11], отсутствуют оптимальные высокочувствительные подходы для обнаружения и определения порога выявления мутаций в цодНК [1]. Для преодоления трудностей, в частности для повышения чувствительности тестирования на базе цодНК, предлагается использовать образцы СМЖ [11]. Предложено также использовать молекулярное профилирование цодНК ликвора для выявления групп высокого риска среди low-grade глиом и для дифференциации глиом согласно классификации ВОЗ [24].

Количественное определение внеклеточной ДНК в плазме крови больных с глиомами также может стать биомаркером, например, показано, что уровни вкДНК до лучевой терапии коррелируют с результатами лечения независимо от других прогностических факторов [17]. Отметим, что с большей вероятностью в жидкостях организма можно обнаружить митохондриальную ДНК (мтДНК) благодаря её высокой копияности в клетке [16]. Выявлена достоверная корреляция уровня циркулирующей мтДНК с объемом опухоли и рецидивированием [27], опухолевой нагрузкой [16], общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессирования [28]. Предложено на базе количественной оценки мтДНК осуществлять мониторинг терапевтического ответа и прогрессирования заболевания [16].

Развитие молекулярных технологий обещает повысить чувствительность и надежность анализа цодНК: высокопроизводительное и нанопоровое секвенирование, количественная ПЦР, а также цифровая капельная ПЦР уже используются для анализа вкДНК, цодНК и мтДНК [6]. Кроме того, для выявления и количествен-

ного определения соматических мутаций в цодНК предложено применить BEAMing технологию, представляющую собой высокочувствительный метод цифровой ПЦР, сочетающий эмульсионную ПЦР и проточную цитометрию [29].

Генетические маркеры. Как уже упоминалось ранее, глиомы классифицируют в соответствии с их генетическим профилем (см. рис. 1), что предполагает перспективность генетических маркеров для разработки дифференциальной диагностики опухолей. Принципиальным маркером, подразделяющим все глиомы взрослых на два класса, является мутантный статус гена изоцитатдегидрогеназы (*IDH1/2*) – фермента цикла трикарбоновых кислот, который связан с лучшим прогнозом течения заболевания [4]. Закономерно определение статуса генов *IDH1/2* в различных биологических жидкостях предлагается рассматривать в качестве диагностического и прогностического биомаркера [30]. Аналогично биомаркерами могут быть генетические изменения, дифференцирующие олигодендроглиомы и астроцитомы (grade 2 или 3), такие как 1p/19q или потеря/мутацией в *ATRX*, мутации в *TP53*, *CDKN2A/B* (рис.1).

Наиболее полно разработаны циркулирующие генетические маркеры глиобластом, генетические профили которых дифференцируют группу на подтипы [31]. В частности, мутации в генах опухолевых супрессоров *NF1*, *PTEN* и *TP53* типизируют мезенхимальный подтип; мутации в гене *EGFR*, но не в *TP53* – классический подтип; мутации в *TP53*, *PDGFRA* и *IDH1* – пронеуральный подтип; сверхэкспрессия генов *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* и *SLC12A5* – нейральный подтип. Опухоли вышеописанных подтипов способны изменять свои молекулярные характеристики в результате прогрессирования или под действием лечения [32]. Q. Wang и соавторы [33] показали возможность перехода классического подтипа в пронеуральный или мезенхимальный после рецидива заболевания.

В цодНК были выявлены опухолеспецифичные мутации генов *JAK2*, *NF1*, *NRAS* (*G12D*, *G13R*, *Q61K*, *Q61R*), *GNAS*, *ATM* (*K342*, *R3008H*, *R3012*), *BRCA1* (*Q380*, *R1835*), *PTEN*, *RB1*, *CDKN2A/B*, *CIC*, *PDGFRA* (*PIK3CA*, *PIK3R1*, *MSH6*, *HER2*, *MET* и *POU3F3*) [25]. V. Palande и соавторы [34] обнаружили в вкДНК из плазмы пациентов с глиобластомой слияния генов *KDR*-*PDGFRA*, *NCDN*-*PDGFRA*, *BCR*-*ABL1*, *COL1A1*-*PDGFB*, *NIN*-*PDGFRB*, *FGFR1*-*BCR*, *CEP85L*-*ROS1* и *GOPC*-*ROS1*. Комбинация выявления наличия генных мутаций и слияний в перспективе поможет в первичном обнаружении глиобластомы.

Изменение геномного профиля опухоли может быть связано с лечением. Например, у пациентов, перенесших химио- и лучевую терапию, мутации в *TP53*, *ATM*, *GNAS* и *JAK2* встречаются чаще и коррелируют с неблагоприятным прогнозом [35], что можно использовать для мониторинга заболевания. Мониторинг изменения числа мутантных аллелей *pTERT* в цодНК показал ассоциацию с клиническим течением заболевания, в том числе с ответом на терапию и прогрессированием [17].

Параллельно новый метод классификации глиом TeloDIAG, предложенный P. Billard и соавторами [36], оказался эффективен для разработки малоинвазивной диагностики глиом на базе цодНК. TeloDIAG основан на анализе механизма альтернативного удлинения

теломер (ALT – мутация промотора *TERT* и потеря *ATRX*), мутационного статуса IDHmt и гистологического типа опухоли. Эта классификация определила пять подтипов: tOD (олигодендроглиома), tLGA (low-grade астроцитома с мутацией IDH), tGBM IDHmt (глиобластома с мутацией IDH), tGBM (глиобластома без мутации IDH), tAIV (ALT+ глиобластома без мутации IDH). Она соответствует классификации ВОЗ на 99% и дополняет её.

Изменение числа копий (CNV) некоторых генов является одним из ранних признаков канцерогенеза, свидетельствуя о геномной нестабильности. CNV целых хромосом или их частей приводит к модификации кариотипов клеток и является источником генетической гетерогенности [31]. Идентичность профилей CNV во внеклеточных везикулах и тканях глиобластомы продемонстрировали С.Л. Maïre и соавторы [23].

Кратное увеличение копийности гена *EGFR* с лиганд-независимой активностью наблюдается примерно у 40% пациентов с глиобластомой, обосновывая диагностическую и прогностическую ценность биомаркера [30]. D. Piccioni и соавт. [25] выявили во вкДНК амплификацию генов *ERBB2/HER2*, *MET*, *KIT*, *BRAF*, *EGFR*, *CCND1*, *CCND2*, *CDK6* и *PDGFRA* у пациентов с первичными опухолями головного мозга.

Противоположный процесс (потеря гетерозиготности (LOH) вследствие делеций) также распространенное событие при опухолях головного мозга. Так, LOH длинного плеча 10 хромосомы характерно для 60-80% первичных и вторичных опухолей головного мозга. В частности, утрачивается участок 10q23-24, на котором локализован важный онкосупрессор *PTEN*. Для первичных опухолей головного мозга характерна делеция локуса 22q12.3, которая приводит к LOH гена-супрессора опухоли *TIMP-3*. Кроме того, LOH ещё ряда генов *CDKN2A/B*, *MXI1*, *DMBT1*, *LGII*, *FGFR2* и *WDR11* имеет клиническое значение и ассоциировано с прогрессированием и переходом от 2-3 к 4 grade [30].

Метилирование ДНК. Наряду с генетическими альтерациями в индукции канцерогенеза принимают участие эпигенетические изменения. Метилирование ДНК является основным эпигенетическим изменением, характерным для глиальных опухолей, как на ранних, так и на более поздних стадиях онкогенеза [37]. Эпигенетическая дифференцировка глиом имеет высокую прогностическую ценность независимо от других известных предикторов общей выживаемости, таких как возраст и грейд [38]. Известно, что профиль метилирования ДНК во вкДНК соответствует таковому в опухолевой ткани и позволяет дифференцировать глиомы разных подтипов друг от друга и от других экстракраниальных онкологических заболеваний, метастазов экстракраниальных опухолей в головной мозг и условно здоровых людей [39].

Гипометилирование промоторов генов *CXCR6* и *PVT1* (и соответственно их сверхэкспрессия) наблюдается в IDHwt опухолях и ассоциировано с плохим прогнозом. Помимо этого, уровни их метилирования были ассоциированы с прогрессией, псевдопрогрессией и с ответом на лечение [40].

Хорошо известно клиническое значение метилирования промотора *MGMT*, кодирующего фермент репарации ДНК. Метилирование *MGMT* наблюдается в

45-75% случаев глиомных опухолей и расценивается как положительный прогностический фактор для применения лекарственной терапии. Гиперметилирование промотора *MGMT* приводит к сайленсингу гена, что повышает эффективность цитостатического препарата темозоломида [15]. Исследования продемонстрировали возможность малоинвазивного анализа метилирования *MGMT*, используя цоДНК крови и ликвора, причем специфичность в обоих случаях составляет 100%, а чувствительность – 37% и 65% соответственно [38].

Гипометилирование мобильных элементов генома часто описывается как механизм реализации генетической нестабильности в ходе канцерогенеза. В частности, ДНК, выделенная из плазмы пациентов с глиобластомой, имела более низкие уровни метилирования *Alu* последовательностей, чем у здоровых доноров, отрицательно коррелируя с тяжестью заболевания и продолжительностью жизни пациентов [40]. Кроме того, низкие уровни метилирования *Alu* в цоДНК положительно коррелировали с отсутствием мутаций в *IDH1/2* и наличием мутации в *TERT* [41]. По результатам полногеномного метилирования цоДНК спинномозговой жидкости L. Dai и соавторам [42] удалось идентифицировать 8 генов-кандидатов для диагностики рецидивирующей глиобластомы и прогноза (*FLRT2*, *ETV1*, *NTRK3*, *C1orf226* – высокий риск, *NKD1*, *GNB5*, *COMMD1*, *CHI3L2* – низкий риск).

Таким образом, определение профиля метилирования ДНК глиом является источником потенциальных биомаркеров жидкостной биопсии, которые будут ценны при выборе терапии, для диагностики, мониторинга минимальной остаточной болезни и ответа на лечение.

Циркулирующие опухолевые РНК (цоРНК) являются многообещающими биомаркерами глиом и могут обнаруживаться как в свободном виде (периферической крови, СМЖ и моче), так и в составе внеклеточных везикул [19]. Несмотря на то, что нет единого мнения насчет наиболее приемлемой биологической жидкости для анализа цоРНК, наиболее оптимальным источником цоДНК считается СМЖ [15]. Из всего многообразия типов РНК выделяют некодирующие короткие микро-РНК (18-25 п.н.), которые регулируют экспрессию множества генов-мишеней либо путем разрушения специфических мРНК, либо подавлением трансляции, таким образом участвуя в многих физиологических и патологических процессах [19]. В отличие от многих потенциальных биомаркеров микро-РНК способны проникать через неповрежденный ГЭБ и обнаруживаться в биологических жидкостях с высокой чувствительностью и специфичностью [43]. Ожидаемо уровень микро-РНК отличается в нормальных и онкоктрансформированных клетках мозга. Для характеристики глиальных опухолей в биологических жидкостях разрабатываются диагностические панели [44]. Изменение экспрессии микро-РНК предполагает связь с опухолевой нагрузкой и прогнозом пациента, но никак не связано с полом и возрастом [43]. Кроме того, циркулирующие микро-РНК могут быть использованы с целью диагностики, мониторинга и прогнозирования заболевания (см. таблицу).

Длинные некодирующие РНК (днкРНК) имеют длину от 200 нуклеотидов до 100 тыс. нуклеотидов; по сравнению с белок-кодирующими генами, экспресси-

руются тканеспецифично. При развитии глиом показано функциональное участие ряда днкРНК в индукции пролиферации, инвазии, миграции, ангиогенезе, эпителиально-мезенхимальном переходе, метастазировании, развитии лекарственной устойчивости [45]. Циркулирующие днкРНК предлагается использовать в качестве маркеров диагностики, химиорезистентности и прогноза для пациентов с первичными опухолями головного мозга [46] (см. таблицу).

Развитие глиом также сопровождается изменением паттерна экспрессии кольцевых РНК (кцРНК), которыми богаты нейрональные ткани. Кольцевые РНК высо-

костабильны, консервативны и тканеспецифичны. Согласно данным литературы, кцРНК, участвующие в онкогенезе, в основном блокируют действие микро-РНК, связываясь с ними [19]. Первичные опухоли головного мозга обнаруживают aberrантную экспрессию кцРНК [47], которая ассоциирована с иницированием и прогрессированием глиального онкогенеза через контроль метаболизма, миграции, пролиферации, инвазии, ангиогенеза и апоптоза. Уровни кцРНК показывают разнонаправленную корреляцию с прогрессией, рецидивом, радио- и химиорезистентностью, а также выживаемостью пациентов [48] (см. таблицу).

Циркулирующие РНК маркеры глиом

Маркер	Применение	Ссылка
микро-РНК		
miR-21, miR-128, miR-342, miR-15b, miR-376a,b,c, miR-210, miR-320, miR-125b, miR-454, miR-29, miR-182, miR-133a, miR-548b-5p, miR-205, miR-221, miR-222, miR-16-5p, miR-130, miR-181b-5p, miR-208a, miR-100, miR-17-5p, miR-3180, miR-3180-3p, miR-6782-5p, miR-133b, miR-670-3p, miR-9, miR-92b, miR-124, miR-219-5p, miR-451a, miR-10b, miR-301a, miR-218-5p, miR-193b-3p, miR-331-3p, miR-374a-5p, 548c-3p, miR-520f-3p, miR-27b-3p, miR-30b-3p, miR-180, miR-574-4p, RNU6-1 (малая ядерная РНК)	Диагностика	[14, 49-51]
miR-574, miR-497, miR-125b, miR-342, miR-454-3p, miR-21, miR-15b, miR-23a, miR-150, miR-197, miR-548b-5p, miR-221, miR-222, miR-16, miR-19a-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-130, miR-181b-5p, miR-208a, miR-124-3p, miR-210, miR-301, miR-122-5p, miR-93, miR-593-3p, miR-133a, miR-486-3p, miR-107, miR-151a, miR-148a, miR-5096,	Дифференциальная диагностика	[49, 51-53]
miR-128, miR-454, miR-21, miR-182, miR-205, miR-221, miR-222, miR-210	Прогрессирование	[14, 49, 51]
miR-125b, miR-128, miR-342, miR-221, miR-222	Ответ на лечение	[49, 51]
miR-21, miR-125b, miR-454, miR-182, miR-221, miR-222, miR-20, miR-210, miR-301a	Прогноз	[49, 51]
кцРНК		
circSMARCA5, circHIPK3, circ0075828, circ0003828, circ0002976, circPINTexon2, circU2AF1, circCFH, circ104948, circ0001445, circWDR62, circMMP1, circ0012381, circ0024108,	Диагностика	[54-56]
CircNFIX, CircPOSTN, CircHEATR5B, CircCPA4, circ-E-Cad, Circ-SHPRH, Circ-FBXW7, Circ-RPL15, CircMMP9, CircGLIS3, CircSFMBT2, Hsa_circ0001017, Circ-ATXN1, CircNT5E, Circ-DICER1, CDR1as, CircPIP5K1A, Circ-MAPK4, CircNEIL3, circKIF18A, circBTG2, circMMP1, circ0001445, circ-METRN, circ0046701, circ001946, circ0012129, cZNF292, circTTBK2, circ14359, circSHKBP1, circ002136, circDICER1, circ0074362	Прогрессирование	[48, 56]
circRNA-ATP8B4, circ-METRN	Радиорезистентность	[57]
circ0055202, circ0074920, circ0043722, circ0005019, circ0000880, circ0006365, circ0001649, circHIPK3, circ0076248, circ0034642, circSMARCA5, circSHPRH, circFBXW7, circ0000177, circBRAF, circ0074362, circITCH, circCPA4, circ0051680	Прогноз	[15, 55, 56, 58]
днкРНК		
HOTAIR, LncRNA565, LncRNA641, DLX6-AS1, ELF3-AS1, ASB16-AS1, NEF, ANRIL, GSCAR, LINC00941	Диагностика	[15, 45, 46, 59, 60]
SBF2-AS1	Химиорезистентность	[61]
HOTAIR, GAS5, MALAT1, H19, LncRNA565, LncRNA641, HOXA11-AS, TUSC7, MCM3AP-AS, PART1, MIAT, RP11-838N2.4, NR_002809, XLOC_010967, BC002811, TPT1-AS1, AGAP2-AS1, LINC01198, SPRY4-IT1, ZEB1-AS1, KIAA0495	Прогноз	[45, 46, 59]

Основной проблемой разработки диагностических и прогностических тестов на базе оценки циркулирующих РНК остается высокая вариабельность свободных или везикулярных РНК и отсутствие стандартизированной методологии анализа [47].

Белки. На сегодняшний день не выявлен белковый маркер, специфичный для глиомных опухолей, поэтому протеомные исследования сосредоточены на анализе уровней циркулирующих белков, выделяемых опухолевыми клетками. Предполагается, что в этом случае белковыми маркерами глиом могут выступать участники/регуляторы воспалительного ответа, пролиферации,

гипоксии, ангиогенеза, деградации и ремоделирования внеклеточного матрикса.

Протеомное профилирование внеклеточных везикул повторяет специфичный для глиобластом паттерн, в частности отражает амплификацию *EGFR*, фиксирует мутантные *PTEN*, *IDH1/2* и *TP53* [18].

В исследовании Т. Pienkowski и соавторов [62] уровни циркулирующих в плазме белков GFAP, EGFR, VEGF и 2-HG дифференцировали low-grade и high-grade глиомы, коррелировали с размером опухоли, прогрессией, рецидивом, выживаемостью и прогнозом пациентов.

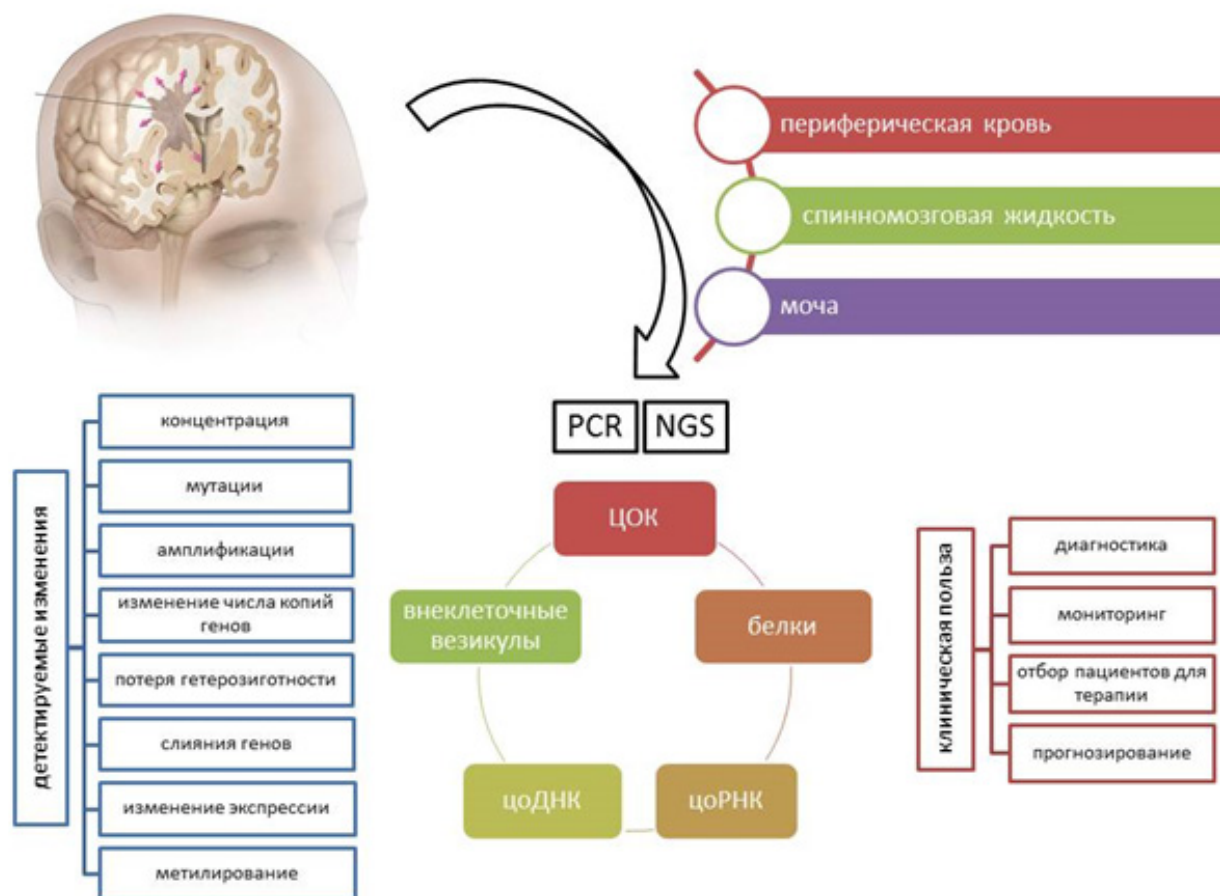


Рис. 2. Жидкостная биопсия глиальных опухолей.

Отметим, что определение циркулирующих белков методически является относительно простым и недорогим методом. Однако ограничения протеомных исследований являются высокий уровень фонового шума и нестандартизированные методики проведения анализа и оценки результатов [24].

Заключение. Золотым стандартом неинвазивной диагностики и мониторинга глиом головного мозга остается МРТ, однако дифференциальную и окончательную диагностику проводят на основании гистологического анализа опухолевого образца, отбор которого осложнен анатомическими особенностями локализации и гетерогенностью опухоли. В тоже время биомаркеры жидкостной биопсии значительно доступнее благодаря минимально инвазивной процедуре отбора, что позволяет определять их уровень многократно, в том числе в целях мониторинга заболевания и оценки эволюции опухоли. Однако не один циркулирующий биомаркер глиом не доведен до стадии внедрения в клиническую практику. Основными проблемами разработки тестов жидкостной биопсии являются: гетерогенная природа глиом, которая препятствует отбору общих для всех типов опухолей молекул-кандидатов, низкая частота глиом, а также физические препятствия для попадания маркеров в кровотоки и ликвор в виде ГЭБ также не способствует прогрессу выявления биомаркеров. Кроме того, частота обнаружения биомаркеров может зависеть от хронологического

изменения концентрации молекул, от типа образца, от типа опухоли, её классификации.

На текущий момент опубликовано множество работ, в которых были идентифицированы потенциальные циркулирующие биомаркеры глиом (рис. 2). Благодаря растущей чувствительности методов исследования сейчас возможно анализировать клетки, микровезикулы и отдельные молекулы (ДНК, РНК, белки и метаболиты), высвобождающиеся из опухоли и циркулирующие в крови, спинномозговой жидкости и моче. По сравнению с исследованием опухолевой ткани жидкостная биопсия может быть легко повторена, в том числе у неоперабельных пациентов.

Прямое количественное измерение ЦОК и внеклеточных везикул, которое возможно совмещать с общим анализом крови, являются привлекательными биомаркерами. Однако ограничения по частоте встречаемости ЦОК/внеклеточных везикул у пациентов с глиомами разной степени злокачественности не позволяет рассматривать их как отдельные маркеры.

Уникальные признаки глиом, такие как генетические изменения (SNP, перестройки, делеции, амплификации и т.п.) и эпигенетический профиль (ДНК метилирование), обнаруживаемые в образцах жидкостной биопсии, могут однозначно идентифицировать опухоль. В отличие от этого уровень и профиль некодирующих РНК, цкДНК, белков и метаболитов в

жидкостях организма дополнительно может отражать местную или системную реакцию организма на присутствие опухоли. Поэтому предлагается исследование цкРНК, белковых маркеров в ЦОК и эписомах; уделяется больше внимания циркулирующей мтДНК, обладающей большей копийностью в клетке и устойчивостью к эндогенному воздействию по сравнению с ядерной ДНК.

Поскольку отдельные маркеры жидкостной биопсии имеют невысокую точность, для клинического внедрения наиболее перспективными являются панели биомаркеров. Такой подход реализован, например, для колоректального рака: тест-система Cologuard (Exact Sciences Co.), получившая одобрение FDA в 2014 году, включает анализ на фекальный гемоглобин, определение мутаций в *KRAS* и метилирование генов *NDRG4* и *BMP3*. Разработка панелей маркеров может решить и проблему дисрегуляции биомаркеров по мере прогрессии злокачественности опухоли, так как уровни биомаркеров часто положительно/отрицательно коррелируют с grade, объемом опухоли и худшей выживаемостью. Таким образом, применение нескольких типов биомаркеров в одной панели может синергически использовать преимущества и частично уменьшать недостатки друг друга.

В целом для большинства известных в настоящее время биомаркеров глиом требуется дополнительная валидация, после которой они смогут существенно дополнить методы диагностики и/или мониторинга глиом.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1, 4-49, 51, 53-62 СМ. REFERENCES)

- Кузнецова Н.С., Гурова С.В., Гончарова А.С., Заикина Е.В., Гусарева М.А., Зинкович М.С. Современные подходы к терапии глиобластомы. *Южно-Российский онкологический журнал*. 2023; 4(1): 52–64. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-6.
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е., Франциянц Е.М., Панина С.Б. Молекулярно-генетические маркеры глиом. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(4): 132–40. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-4-132-140.
- Пушкин А.А., Гвалдин Д.Ю., Тимошкина Н.Н., Росторгуев Э.Е., Владимиров Л.Ю., Дженкова Е.А. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования базы Gene Expression Omnibus для идентификации микрорибонуклеиновых кислот в плазме крови пациентов с глиобластомой. *Res. Pract. Med. J.* 2022; 9(1): 54–64. DOI: 10.17709/2410-1893-2022-9-1-5.
- Аллуев И.А., Пушкин А.А., Кузнецова Н.С., Кавицкий С.Э., Росторгуев Э.Е. Оценка диагностической значимости циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. *Современные проблемы науки и образования*. 2020; 6: 135. DOI: 10.17513/spno.30309.
- Müller Bark J., Kulasinghe A., Chua B., Day B.W., Punyadeera C. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br. J. Cancer*. 2020; 122(3): 295–305. DOI: 10.1038/s41416-019-0603-6.
- Kuznetsova N.S., Gurova S.V., Goncharova A.S., Zaikina E.V., Gusareva M.A., Zinkovich M.S. Modern approaches to glioblastoma therapy. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2023; 4(1): 52–64. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-6. (in Russian)
- Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Rostorguyev E.Ye., Frantsiyants Ye.M., Panina S.B. Molecular genetic markers of gliomas. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 35(4): 132–40. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-4-132-140. (in Russian)
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I.A., Figarella-Branger D. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncol.* 2021; 23(8): 1231–51. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
- Pasqualetti F., Rizzo M., Franceschi S., Lessi F., Paiar F., Buffa F.M. New perspectives in liquid biopsy for glioma patients. *Curr. Opin. Oncol.* 2022; 34(6): 705–12. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000902.
- Díaz Méndez A.B., Tremante E., Regazzo G., Brandner S., Rizzo M.G. Time to focus on circulating nucleic acids for diagnosis and monitoring of gliomas: a systematic review of their role as biomarkers. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2021; 47(4): 471–87. DOI: 10.1111/nan.12691.
- Mathios D., Phallen J. Circulating biomarkers in glioblastoma: ready for prime time? *J. Cancer*. 2021; 27(5): 404–9. DOI: 10.1097/PP0.0000000000000541.
- Van Der Pol Y., Mouliere F. Toward the early detection of cancer by decoding the epigenetic and environmental fingerprints of cell-free DNA. *Cancer Cell*. 2019; 36(4): 350–68. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.09.003.
- Miller A.M., Shah R.H., Pentsova E.I., Pourmaleki M., Briggs S., Distefano N. et al. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*. 2019; 565(7741): 654–8. DOI: 10.1038/s41586-019-0882-3.
- Quinones A., Le A. The multifaceted glioblastoma: From genomic alterations to metabolic adaptations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1311: 59–76. DOI: 10.1007/978-3-030-65768-0_4.
- Hickman R.A., Miller A.M., Arcila M.E. Cerebrospinal fluid: A unique source of circulating tumor DNA with broad clinical applications. *Transl. Oncol.* 2023; 33: 101688. DOI: 10.1016/j.tranon.2023.101688.
- Le Rhun E., Seoane J., Salzet M., Soffietti R., Weller M. Liquid biopsies for diagnosing and monitoring primary tumors of the central nervous system. *Cancer Lett.* 2020; 480: 24–8. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.03.021.
- Kitano Y., Aoki K., Ohka F., Yamazaki S., Motomura K., Tanahashi K. et al. Urinary microRNA-based diagnostic model for central nervous system tumors using nanowire scaffolds. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021; 13(15): 17316–29. DOI: 10.1021/acsami.1c01754.
- Tamai S., Ichinose T., Nakada M. Liquid biomarkers in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 2023; 40(2): 66–77. DOI: 10.1007/s10014-023-00452-x.
- Birkó Z., Nagy B., Klekner Á., Virga J. Benefits of liquid biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20): 7522. DOI: 10.3390/ijms21207522.
- Mathios D., Srivastava S., Kim T., Bettegowda C., Lim M. Emerging technologies for non-invasive monitoring of treatment response to immunotherapy for brain tumors. *Neuromolecular Med.* 2022; 24(2): 74–87. DOI: 10.1007/s12017-021-08677-9.
- Nevel K. Circulating Tumor Cells and Cell-free Tumor DNA in Evaluation and Management of Gliomas: Current Evidence and Potential Future Clinical Use. *Adv. Oncol.* 2022; 2(1): 129–38. DOI: 10.1016/j.yao.2022.01.006.
- Del Bene M., Osti D., Faletti S., Beznoussenko G.V., DiMeco F., Pelicci G. Extracellular vesicles: The key for precision medicine in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2022; 24(2): 184–96. DOI: 10.1093/neuonc/noab229.
- Hutóczki G., Virga J., Birkó Z., Klekner A. Novel concepts of glioblastoma therapy concerning its heterogeneity. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(18): 10005. DOI: 10.3390/ijms221810005.
- Klekner Á., Szivos L., Virga J., Árkosy P., Bognár L., Birkó Z. et al. Significance of liquid biopsy in glioblastoma—A review. *J. Biotechnol.* 2019; 298: 82–7. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.04.011.
- Morad F., Carman C.V., Hagedorn E.J., Perlin J.R., Zon L.I., Mustafaglu N. et al. Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood–brain barrier via transcytosis. *ACS Nano*. 2019; 13(12): 13853–65. DOI: 10.1021/acsnano.9b04397.
- Fraser K., Jo A., Giedt J., Vinegoni C., Yang K.S., Peruzzi P. et al. Characterization of single microvesicles in plasma from glioblastoma patients. *Neuro Oncol.* 2019; 21(5): 606–15. DOI: 10.1093/neuonc/noy187.
- Maire C.L., Fuh M.M., Kaulich K., Fita K.D., Stevic I., Heiland D.H.

REFERENCES

- et al. Genome-wide methylation profiling of glioblastoma cell-derived extracellular vesicle DNA allows tumor classification. *Neuro Oncol.* 2021; 23(7): 1087–99. DOI: 10.1093/neuonc/noab012.
24. Jones J., Nguyen H., Drummond K., Morokoff, A. Circulating biomarkers for glioma: a review. *Neurosurgery.* 2021; 88(3): E221–E230. DOI: 10.1093/neuros/nyaa540.
25. Piccioni D.E., Achrol A.S., Kiedrowski L.A., Banks K.C., Boucher N., Barkhoudarian G. et al. Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS Oncol.* 2019; 8(2): CNS34. DOI: 10.2217/cns-2018-0015.
26. Orzan F., De Bacco F., Lazzarini E., Crisafulli G., Gasparini A., Dipasquale A. et al. Liquid biopsy of cerebrospinal fluid enables selective profiling of glioma molecular subtypes at first clinical presentation. *Clin. Cancer Res.* 2023; 29(7): 1252–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2903.
27. Mair R., Mouliere F., Smith C.G., Chandrananda D., Gale D., Marass F. et al. Measurement of plasma cell-free mitochondrial tumor DNA improves detection of glioblastoma in patient-derived orthotopic xenograft models. *Cancer Res.* 2019; 79(1): 220–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0074.
28. Chen Y., Zhang J., Huang X., Zhou X., Hu J., Li G. et al. High leukocyte mitochondrial DNA content contributes to poor prognosis in glioma patients through its immunosuppressive effect. *Br. J. Cancer.* 2015; 113(1): 99–106. DOI: 10.1038/bjc.2015.184.
29. Mair R., Mouliere F. Cell-free DNA technologies for the analysis of brain cancer. *Br. J. Cancer.* 2022; 126(3): 371–8. DOI: 10.1038/s41416-021-01594-5.
30. Jelski W., Mroczko B. Molecular and circulating biomarkers of brain tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(13): 7039. DOI: 10.3390/ijms22137039.
31. Arcella A., Limanaqi F., Ferese R., Biagioni F., Oliva M.A., Storto M. et al. Dissecting molecular features of gliomas: Genetic loci and validated biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(2): 685. DOI: 10.3390/ijms21020685.
32. Liu G., Bu C., Guo G., Zhang Z., Sheng Z., Deng K. et al. Molecular and clonal evolution in vivo reveal a common pathway of distant relapse gliomas. *iScience.* 2023; 26(9): 107528. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107528.
33. Wang Q., Hu B., Hu X., Kim H., Squatrito M., Scarpacci L. et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell.* 2017; 32(1): 42–56.e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.06.003.
34. Palande V., Siegal T., Detroja R., Gorohovski A., Glass R., Flueh C. et al. Detection of gene mutations and gene–gene fusions in circulating cell-free DNA of glioblastoma patients: an avenue for clinically relevant diagnostic analysis. *Mol. Oncol.* 2022; 16(10): 2098–2114. DOI: 10.1002/1878-0261.13157.
35. Okamura R., Piccioni D.E., Boichard A., Lee S., Jimenez R.E., Sicklick J.K. et al. High prevalence of clonal hematopoiesis-type genomic abnormalities in cell-free DNA in invasive gliomas after treatment. *Int. J. Cancer.* 2021; 148(11): 2839–47. DOI: 10.1002/ijc.33481.
36. Billard P., Guerriau C., Carpentier C., Juillard F., Grandin N., Lomonte P. et al. The TeloDIAG: how telomeric parameters can help in glioma rapid diagnosis and liquid biopsy approaches. *Ann. Oncol.* 2021; 32(12): 1608–17. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.09.004.
37. Mio C., Damante G. Challenges in promoter methylation analysis in the new era of translational oncology: a focus on liquid biopsy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2022; 1868(6): 166390. DOI: 10.1016/j.bbdis.2022.166390.
38. Della Monica R., Cuomo M., Buonaiuto M., Costabile D., Franca R.A., Del Basso De Caro M. et al. MGMT and whole-genome DNA methylation impacts on diagnosis, prognosis and therapy of glioblastoma multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(13): 7148. DOI: 10.3390/ijms23137148.
39. Sabedot T.S., Malta T.M., Snyder J., Nelson K., Wells M., DeCarvalho A.C. et al. A serum-based DNA methylation assay provides accurate detection of glioma. *Neuro Oncol.* 2021; 23(9): 1494–1508. DOI: 10.1093/neuonc/noab023.
40. Chen J., Huan W., Zuo H., Zhao L., Huang C., Liu X. et al. Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma. *Oncotarget.* 2016; 7(18): 26099–106. DOI: 10.18632/oncotarget.8318.
41. Tuaveva N.O., Falzone L., Porozov Y.B., Nosyrev A.E., Trukhan V.M., Kovatsi L. et al. Translational application of circulating DNA in oncology: review of the last decades achievements. *Cells.* 2019; 8(10): 1251. DOI: 10.3390/cells8101251.
42. Dai L., Liu Z., Zhu Y., Ma L. Genome-wide methylation analysis of circulating tumor DNA: A new biomarker for recurrent glioblastoma. *Heliyon.* 2023; 9(3): e14339. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14339.
43. Swellam M., Bakr N.M., El Magdoub H.M., Hamza M.S., Ezz El Arab L.R. Emerging role of miRNAs as liquid biopsy markers for prediction of glioblastoma multiforme prognosis. *J. Mol. Neurosci.* 2021; 71(4): 836–44. DOI: 10.1007/s12031-020-01706-5.
44. Shrivastava R., Gandhi P., Gothalwal R. The road-map for establishment of a prognostic molecular marker panel in glioma using liquid biopsy: current status and future directions. *Clin. Transl. Oncol.* 2022; 24(9): 1702–14. DOI: 10.1007/s12094-022-02833-8.
45. Gareev I., Ramirez M.D.J.E., Nurmukhametov R., Ivliev D., Shumadalova A., Ilyasova T. The role and clinical relevance of long non-coding RNAs in glioma. *Noncoding RNA Res.* 2023; 8(4): 562–70. DOI: 10.1016/j.ncrna.2023.08.005.
46. Amer R.G., Ezz El Arab L.R., Abd El Ghany D., Saad A.S., Bahie-Eldin N., Swellam, M. Prognostic utility of lncRNAs (LINC00565 and LINC00641) as molecular markers in glioblastoma multiforme (GBM). *J. Neurooncol.* 2022; 158(3): 435–44. DOI: 10.1007/s11060-022-04030-7.
47. Wu X., Shi M., Lian Y., Zhang H. Exosomal circRNAs as promising liquid biopsy biomarkers for glioma. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1039084. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1039084.
48. Tang C., He X., Jia L., Zhang X. Circular RNAs in glioma: Molecular functions and pathological implications. *Noncoding RNA Res.* 2023; 9(1): 105–15. DOI: 10.1016/j.ncrna.2023.10.007.
49. Ma C., Nguyen H.P., Luwor R.B., Styli S.S., Gogos A., Paradiso L. A comprehensive meta-analysis of circulation miRNAs in glioma as potential diagnostic biomarker. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0189452. DOI: 10.1371/journal.pone.0189452.
50. Pushkin A.A., Gvaldin D.Ju., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Vladimirova L.Ju., Dzhenskova, E.A. Analysis of Gene Expression Omnibus high-throughput sequencing data for the determination of microribonucleic acids in the blood plasma of patients with glioblastomas. *Res. Pract. Med. J.* 2022; 9(1): 54–64. DOI: 10.17709/2410-1893-2022-9-1-5. (in Russian)
51. Zhou Q., Liu J., Quan J., Liu W., Tan H., Li W. MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Sci.* 2018; 109(9): 2651–9. DOI: 10.1111/cas.13714.
52. Alliluev I.A., Pushkin A.A., Kuznetsova N.S., Kavitskiy S.Je., Rostorguev Ye.E. Estimation of the diagnostic significance of circulating microRNAs in blood plasma of patients with high grade gliomas. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2020; 6: 135. DOI: 10.17513/spno.30309. (in Russian)
53. Davidson C.L., Vengoji R., Jain M., Batra S.K., Shonka N. Biological, diagnostic and therapeutic implications of exosomes in glioma. *Cancer Lett.* 2024; 582: 216592. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216592.
54. Stella M., Falzone L., Caponnetto A., Gattuso G., Barbagallo C., Battaglia R. et al. Serum extracellular vesicle-derived circHIPK3 and circSMARCA5 are two novel diagnostic biomarkers for glioblastoma multiforme. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(7): 618. DOI: 10.3390/ph14070618.
55. Li P., Xu Z., Liu T., Liu Q., Zhou H., Meng S. et al. Circular RNA sequencing reveals serum exosome circular RNA panel for high-grade astrocytoma diagnosis. *Clin. Chem.* 2022; 68(2): 332–43. DOI: 10.1093/clinchem/hvab254.
56. Sun J., Li B., Shu C., Ma Q., Wang, J. Functions and clinical significance of circular RNAs in glioma. *Mol. Cancer.* 2020; 19(1): 1–18. DOI: 10.1186/s12943-019-1121-0.
57. Zhao M., Xu J., Zhong S., Liu Y., Xiao H., Geng L. et al. Expression profiles and potential functions of circular RNAs in extracellular vesicles isolated from radioresistant glioma cells. *Oncol. Rep.* 2019; 41(3): 1893–1900. DOI: 10.3892/or.2019.6972.
58. Xia D., Gu X. Plasmatic exosome-derived circRNAs panel act as fingerprint for glioblastoma. *Aging (Albany NY).* 2021; 13(15): 19575–86. DOI: 10.18632/aging.203368.
59. Saenz-Antoñanzas A., Auzmendi-Iriarte J., Carrasco-Garcia E., Moreno-Cugnon L., Ruiz I., Villanua J. et al. Liquid biopsy in glioblastoma: opportunities, applications and challenges. *Cancers (Ba-*

60. Wang Y., Zhao D., Wang H., Wang S., Zhang H., Liu H. et al. Long non-coding RNA-LINC00941 promotes the proliferation and invasiveness of glioma cells. *Neurosci. Lett.* 2023; 795: 136964. DOI: 10.1016/j.neulet.2022.136964.
61. Zhang Z., Yin J., Lu C., Wei Y., Zeng A., You Y. Exosomal transfer of long non-coding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 2019; 38(1): 1–16. DOI: 10.1186/s13046-019-1139-6.
62. Pienkowski T., Kowalczyk T., Kretowski A., Ciborowski M. A review of gliomas-related proteins. Characteristics of potential biomarkers. *Am. J. Cancer. Res.* 2021; 11(7): 3425–44. eCollection 2021.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Огарков О.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А.

РАЗРАБОТКА ПЦР-РВ МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ И НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск, Россия

Цель - разработка ПЦР метода с флуоресцентной детекцией в реальном времени для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале, в том числе за счет выявления свободно циркулирующей ДНК в крови, плевральной жидкости, других тканях и органах. Для выявления уникальных мутаций пригодных для дискриминации туберкулезных и не туберкулезных микобактерий проведен биоинформационный анализ референсных геномов микобактерий для их выравнивания по гомологичным нуклеотидным последовательностям. Анализ выровненных последовательностей M. tuberculosis complex, M. avium complex и других медленно и быстро растущих микобактерий, представленных в базе данных NCBI, выявил участок гена Rv0440 (GroEl2), содержащий в позициях 529633 и 529636 специфические однонуклеотидные замены, пригодные для одностадийной ПЦР-РВ идентификации ДНК возбудителей M. tuberculosis complex и дискриминации их от иных нетуберкулезных микобактерий. Проведено испытание разработанных компонентов ПЦР - праймеров и TaqMan зондов на чистых культурах туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий и клинических образцах от больных туберкулезом и микобактериозами. При разработке метода использованы образцы мокроты, крови, пунктатов лимфатических узлов более чем 150 больных туберкулезом и микобактериозами. Разработанные ПЦР реактивы успешно выявляли низкомолекулярную высоко-деградированную ДНК микобактерий, циркулирующую в крови и других тканях больных туберкулезом и микобактериозами. На исчерпывающей выборке референсных геномов микобактерий из NCBI показана высокая потенциальная специфичность разработанного теста. Виртуальной программой Primer-BLAST, и вручную сервисом Blastn показано, что разработанный метод будет успешно дискриминировать виды M. tuberculosis complex: M. tuberculosis, M. africanum, M. canettii, M. bovis, M. caprae, M. microti от 125 видов нетуберкулезных микобактерий.

Ключевые слова: ПЦР-РВ; TaqMan зонды; ген Rv0440; M. tuberculosis complex; нетуберкулезные микобактерии

Для цитирования: Огарков О.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А. Разработка ПЦР-РВ метода для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале на основе полиморфизма гена белка теплового шока. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (8): 421-426.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-421-426>

Для корреспонденции: Огарков Олег Борисович, д-р мед. наук, гл. науч. сотр., директор института Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: obogarkov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила	05.06.2024
Принята к печати	24.06.2024
Опубликовано	01.08.2024

Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Zhdanova S.N., Orlova E.A. Khromova P.A.

DEVELOPMENT OF A PCR-RT METHOD FOR DETECTION OF TUBERCULOUS AND NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN CLINICAL SAMPLES BY POLYMORPHISM OF GENE HEAT SHOCK PROTEIN

Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, 664003, Irkutsk, Russia

The aim of the study is to develop a real-time PCR method with fluorescent detection for the identification and discrimination of tuberculosis and non- tuberculosis mycobacteria in clinical material, including freely circulating DNA in blood, pleural fluid and other tissues and organs. Bioinformatics analysis of mycobacterial genomes was performed to align them with homologous nucleotide sequences. Aligned sequences of M. tuberculosis complex, M. avium complex and other slow and fast-growing mycobacteria presented in the NCBI database, were analysed, it was revealed the Rv0440 (GroEl2) gene region containing specific single-nucleotide substitutions in positions 529633 and 529636. This SNPs were suitable for design of a diagnostic test for one-step PCR of DNA of M. tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria. The developed PCR reagents - primers and TaqMan probes were tested on pure cultures of tuberculosis and nontuberculous mycobacteria and clinical samples from patients with tuberculosis and mycobacteriosis. Sputum, blood and lymph node samples from more than 150 patients with tuberculosis and mycobacteriosis were used in the development of the method. The developed PCR reagents successfully detected low molecular weight, highly degraded mycobacterial DNA circulating in the blood and other tissues of patients with tuberculosis and mycobacteriosis. Exhaustive sampling of mycobacterial reference genomes from NCBI demonstrated the high potential specificity of the developed test. Using the virtual program Primer-BLAST, as well as manually using the Blastn service, it was shown that the developed method successfully discriminates species of the M. tuberculosis complex: M. tuberculosis; M. africanum; M. canettii; M. bovis; M. caprae; M. microti from 125 species of nontuberculous mycobacteria.

Key words: PCR-RT; TaqMan probes; Rv0440 gene; *M. tuberculosis* complex; nontuberculous mycobacteria

For citation: Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A. Development of a PCR-RT method for detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in clinical samples by polymorphism of gene heat shock protein. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 421-426 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-421-426

For correspondence: Ogarkov O.B., MD., Ph.D., Dr.Sc., Head of Institute of Epidemiology and Microbiology, «Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems», Russia; e-mail: obogarkov@mail.ru

Information about authors:

Ogarkov O.B., <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>;

Sinkov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>;

Kondratov I.G., <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>;

Zhdanova S.N., <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>;

Elizaveta A. Orlova, <https://orcid.org/0000-0003-2169-0242>;

Khromova P.A., <https://orcid.org/0000-0002-6449-5060>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 05.06.2024

Accepted 24.06.2024

Published 01.08.2024

По оценкам ВОЗ, почти четверть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) [1]. Даже после пандемии COVID-19 туберкулёз (ТБ) остается ведущей причиной смертности от инфекционных заболеваний во всем мире [2]. Несмотря на то, что глобально общее количество случаев заражения МБТ снизилось, количество случаев заболеваний легких, вызванных нетуберкулезными условно-патогенными микобактериями (НТМ), возросло. На эту нозологию приходится более 90% клинических случаев заболеваний, вызванных НТМ [3]. В западной части РФ преобладающими видами НТМ, как и в большинстве стран мира, являются медленно растущие: *Mycobacterium avium* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. lentiflavum*, *M. goodii* и быстрорастущие: *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* [4-6]. НТМ, циркулирующие в восточной части России менее изучены, однако, по всей видимости, спектр НТМ не отличается принципиально от западных регионов России и мира в целом [7]. Из-за уникального характера развития этой инфекции и характеристик заболевания НТМ обычно устойчивы к противотуберкулезным препаратам первого ряда [8]. Клиническая идентификация видов НТМ имеет решающее значение для определения тактики лечения и оценки устойчивости к антибиотикам этих возбудителей [9]. По нашему опыту быстрая лабораторная диагностика сепсиса, вызванного *M. avium*, в буквальном смысле спасла жизнь ВИЧ-инфицированному пациенту [10]. Одним из очевидных трендов в клинической лабораторной диагностике в области инфекционных заболеваний является применение современных молекулярно-биологических методов в клинической практике, в первую очередь метода ПЦР. Новейшим подходом в этой области является исследование свободно циркулирующей в жидкостях организма бесклеточной ДНК (сцДНК) для этиологического доказательства той или иной инфекции. Такого рода исследования приводились при пневмониях [11], туберкулезных плевритах [12], туберкулезных менингитах у детей

[13] и т.д. Нами ранее методом полногеномного секвенирования показано, что в моче коинфицированных ВИЧ-инфекцией и туберкулёзом (ВИЧ/ТБ) больных преобладают низкомолекулярные фрагменты микобактериальной ДНК длиной от 19 до 44 пар оснований [14]. Имеются данные о плевритах, вызванных нетуберкулезными микобактериями [15]. Цель настоящего исследования - разработка ПЦР метода с флуоресцентной детекцией в реальном времени для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале, в том числе за счет выявления свободно циркулирующей ДНК в крови, плевральной жидкости и других тканях и органах.

Материал и методы. Штаммы микобактерий получены с плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена. Сбор и характеристика штаммов МБТ и НТМ в клиническом материале от больных с подозрением на микобактериоз проводилось, как описано ранее [7, 16]. При невозможности выделить ДНК в день взятия, инаktivацию и консервацию патогенного материала осуществляли 50% изопропиловым спиртом с 1% СТАВ, согласно описанной ранее методике [17]. Выделение геномной ДНК из штаммов МБТ или НТМ и клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость и т.д.) проводили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия). Измерение концентрации ДНК осуществляли на флуориметре Qubit 4 (СТРАНА). Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов разрабатывался самостоятельно, эти компоненты ПЦР синтезированы ЗАО «Синтол», остальные реагенты для ПЦР приобретались в виде готовых премиксов для ПЦР-РВ. Видовая идентификация выявленных МБТ или НТМ проводилась путем секвенирования по Сэнгеру полного рибосомального оперона 16S-ITS-23S или его фрагмента [7]. При биоинформационном анализе выровненных референсных геномов избегали использования нуклеотидных последовательностей элемента IS6110, поскольку он не является общим для всех штаммов микобактерий [18], по сходным причинам из выборки исключены последовательности гена

groB [18]. Исследование не ставило целью проверки чувствительности и специфичности сходных тестов, разработанных другими исследователями [19]. Наиболее важной задачей при дизайне праймеров и зондов для ПЦР-РВ авторы видели в создании высокочувствительного теста, направленного на мишень менее 100 п.н. [14] и пригодного для анализа сДНК микобактерий в крови и других жидкостях больных туберкулезом и микобактериозами. Представляет интерес тот факт, что проведенный биоинформационный анализ привел нас к использованию того же гена *Rv0440* (*GroEL2*), что изначально использовался для дифференцировки микобактерий путем ПЦР с после-

дующий рестрикционным анализом [20].

Структуры праймеров и зондов, температура отжига и размер ампликонов для индикации однонуклеотидных замен в позициях 529633A/C и 529636A/G относительно референсного генома *M. tuberculosis* NC_000962.3 приведены в табл. 1. Дизайн и анализ *in silico* праймеров и зондов выполнялся с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Разработанные тесты с детекцией ПЦР-РВ испытывали на амплификаторе CFX (Bio-Rad), с набором БиоМастер ОТ-ПЦР Премиум (БиоЛабМикс). Статистическую обработку результатов проводили в таблицах Excel.

Таблица 1

Праймеры и зонды, использованные для проведения исследования

Название гена и (позиция SNP в геноме)	Структура олигонуклеотида 5'→3'	Размер ампликона (п.н.)	Tm, °C	Позиция в геноме NC_000962.3	Примечание
<i>groEL2</i> (<i>Rv0440</i>)	[FAM]-CCATCGCCGG A CG A GTGG-[BHQ1]	97	63	529623-529640	Зонд для индикации ДНК <i>M. tuberculosis complex</i>
	[R6G]-CCATCGCCGG C CG G GTG-[BHQ1]				Зонд для индикации ДНК иных микобактерий
	ACCAAGGACGAGACCACCAT			529577- 529596	Прямой праймер для амплификации ДНК фрагмента гена <i>groEL2</i>
	GAGTCGCTGTCTCGATCTC			529655-529674	Обратный праймер для амплификации ДНК фрагмента гена <i>groEL2</i>

Для модельных экспериментов с деградированной ДНК использована смесь трех клинических штаммов МБТ генотипов Beijing (2 штамма) и LAM (1 штамм), смесь трех НТМ: *M. avium*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*. Для моделирования процессов деградации ДНК в организме человека, смеси ДНК МБТ и НТМ фрагментировали NEBNext dsDNA фрагментазой (M0348, New England Biolabs) в соответствии с рекомендациями производителя. Для получения фрагментов в диапазоне длин 50-200 п.н., 10 нг ДНК инкубировали в буфере с фрагментазой при 37 °C в течение 35 минут. Инактивацию фермента осуществляли кратковременным прогревом смеси до 95 °C в течение 5 минут. ПЦР проводили в режиме: 5 минут - 95° для активации Taq полимеразы; 10 секунд - 95°, 10 с - 63°, 10 с - 72° с детекцией по каналам FAM и HEX на этапе отжига праймеров; 45 циклов. В качестве модели загрязняющего фона использована высокомолекулярная ДНК буккального соскоба здорового добровольца в конечной концентрации 1 нг в 1 мкл при проведении всех ПЦР-РВ. Температура отжига праймеров подобрана с учетом минимизации фоновой флуоресценции от неспецифической гибридизации зондов с ДНК человека.

Результаты. Приведенные в табл. 1 набор праймеров и зондов успешно испытан при работе с клиническим материалом в 2019-2023 годах на базе лаборатории Иркутской областной клинической туберкулезной больницы более чем на 200 клинических образцах (мокро-та, ликвор, кровь, пунктаты лимфатических узлов)

[7, 10]. В 9 случаях получена чистая культура, и результат индикации НТМ подтвержден секвенированием рибосомального оперона *16S-ITS-23S* [7]. В одном случае [10] в плазме крови ВИЧ инфицированной больной разработанным тестом, однозначно показано наличие циркулирующих НТМ при отсутствии ДНК *M. tuberculosis complex*, выделена чистая культура и определен спектр лекарственной чувствительности и принадлежность штамма к *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* [7]. Для верификации структуры праймеров и зондов и их теоретической специфичности относительно современных данных о референсных геномах микобактерий проведен исчерпывающий поиск с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST (NCBI). Поиск проводился с использованием критериев «Referred sequence representative genomes» по разделу «Mycobacteriales (taxid:85007)»

Таксоны *Mycobacterium tuberculosis complex*, определенные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST, и вручную сервисом Blastn с разработанными праймерами и зондом (см. табл. 1) как *M. tuberculosis complex* (канал FAM): *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*.

Исключения составили: *M. pinnipedii* (референс геномы GCF_002982275.1 и GCF_003027795.2 и др.); *M. mungi* (референс геном GCF_001652545.1); *M. orygis* (референс геном GCF_000353205.1) недоступны для анализа.

Таксоны *Mycobacterium/Mycobacteroides*, опреде-

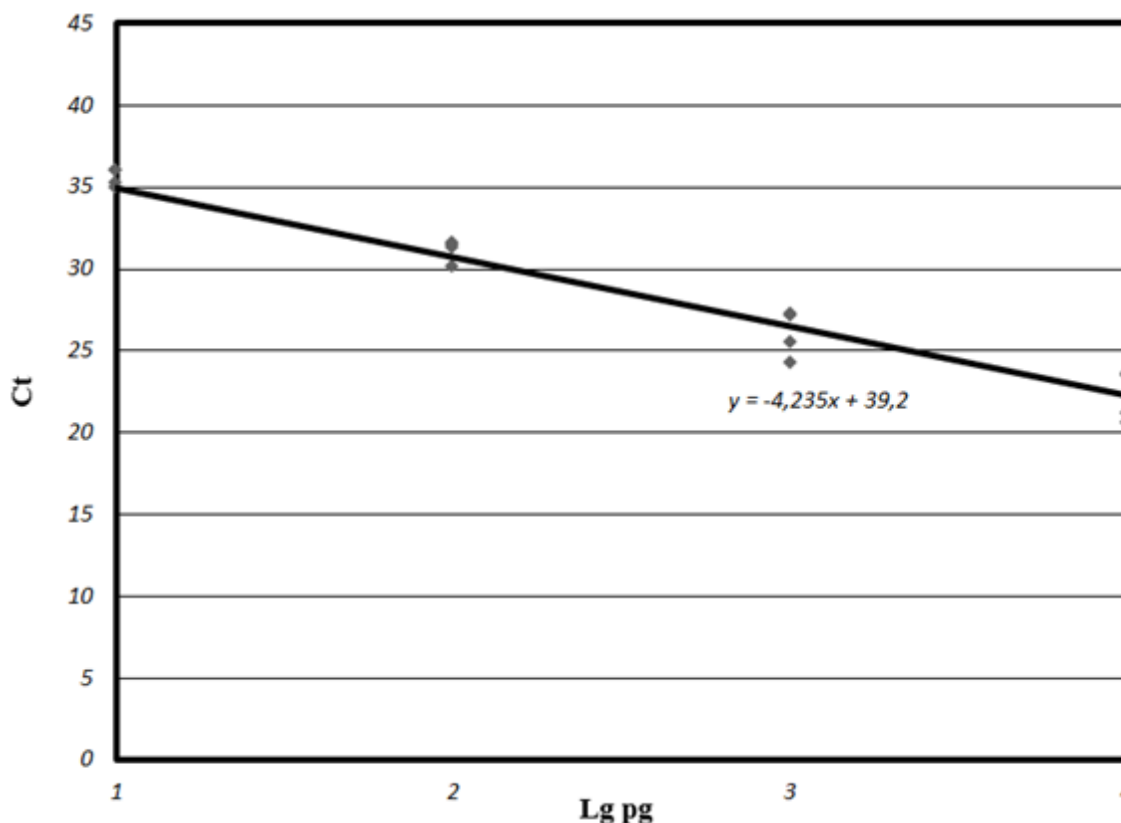
ленные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST и вручную сервисом Blastn с праймерами и зондом (см. табл. 1) как HTM (канал HEX): *M. abscessus*, *M. adipatum*, *M. ahvazicum*, *M. alsense*, *M. angelicum*, *M. aquaticum*, *M. arosiense*, *M. arupensis*, *M. asiaticum*, *M. attenuatum*, *M. avium*, *M. barrassiae*, *M. bouchedurhonense*, *M. bourgelatii*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. colombiense*, *M. conspicuum*, *M. europaeum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. florentinum*, *M. hackensackense*, *M. heidelbergense*, *M. helveticum*, *M. innocens*, *M. intracellulare*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. kubicae*, *M. kyogaense*, *M. kiyosense*, *M. lacus*, *M. lentiflavum*, *M. mantenii*, *M. marseillense*, *M. montefiorensense*, *M. nativiensis*, *M. nebraskense*, *M. numidiamassiliense*, *M. palustre*, *M. paraense*, *M. paragordonae*, *M. paraintracellulare*, *M. parmense*, *M. paraterrae*, *M. parascrofulaceum*, *M. paraseoulense*, *M. persicum*, *M. pinniadriaticum*, *M. rhizamassiliense*, *M. riyadhense*, *M. saopaulense*, *M. saskatchewanense*, *M. senriense*, *M. scrofulaceum*, *M. seoulense*, *M. sherrisii*, *M. shinjukuense*, *M. shimoide*, *M. shottsii*, *M. simulans*, *M. stomatepia*, *M. stomatepia*, *M. szulgai*, *M. talmoniae*, *M. terramassiliense*, *M. tilburgii*, *M. timonense*, *M. tuberculosis*, *M. vicinigorodonae*.

Таксоны *Mycolicibacterium*/*Mycolicibacter*, определенные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST и вручную сервисом Blastn с праймерами и зондом (см. табл. 1) как HTM (канал HEX): *M. austroafricanum*, *M. agri*, *M. aichiense*,

M. algericus, *M. anyangense*, *M. arabiense*, *M. arenosum*, *M. aromaticivorans*, *M. aubagnense*, *M. aurum*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. doricum*, *M. chlorophenolicum*, *M. chubuense*, *M. cosmeticum*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. engbaekii*, *M. hassiacum*, *M. flavescens*, *M. fluoranthenvorans*, *M. fortuitum*, *M. gilvum*, *M. goodii*, *M. helvum*, *M. heraklionensis*, *M. hiberniae*, *M. hippocampi*, *M. iranikum*, *M. koreensis*, *M. kumamotonensis*, *M. longobardus*, *M. monacense*, *M. moriokaense*, *M. murale*, *M. nonchromogenicus*, *M. obuense*, *M. palauense*, *M. pallens*, *M. parafortuitum*, *M. parakoreensis*, *M. phlei*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. pulveris*, *M. rufum*, *M. rutilum*, *M. sediminis*, *M. terrae*, *M. thermoresistibile*, *M. tokaiense*, *M. trivialis*, *M. vaccae*, *M. vanbaalenii*, *M. vinylchloridicum*, *M. vulneris*, *M. xanthum*, *M. wolinskyi*.

Исключения составили: *M. grossiae* и *M. deserti* для которых нуклеотидных последовательностей для гибридизации и праймеров и/или зонда для индикации ДНК иных микобактерий (канал HEX) в их геномах не обнаружено. По всей видимости, это связано с недостаточным качеством геномных последовательностей, представленных в NCBI.

Как видно из калибровочных данных, представленных на рисунке и в табл. 2. При концентрации ДНК МБТ в нативном виде (МБТ) или фрагментированном (МБТfr) и ДНК HTM в нативном (HTM) или фрагментированном (HTMfr) расхождение пороговых значений ПЦР-ПВ (Ct) статистически не значимы.



Графические значения калибровки ПЦР-ПВ по нативной и деградированной ДНК микобактерий в присутствии высокомолекулярной ДНК человека. По оси ординат - Ct (пороговые значения в циклах реакции) ПЦР-ПВ, по оси абсцисс - количество в образце микобактериальной ДНК в пикограммах в каждой реакции, выраженное в десятичных логарифмах (Lg): 1 пг - 0, 10 пг - 1; 100 пг - 2; 1000 пг (1 нг) - 3; 10000 пг (10 нг) - 4.

Таблица 2

Пороговые значения ПЦР-РВ при различных концентрациях нативной и деградированной ДНК МБТ и НТМ

Ст/концентрация	10 нг	1 нг	100 пг	10 пг	1 пг	ρ^*
МБТ	21,2	25,5	31,3	35	38	>0,05
МБТfr	23,6	27,3	31,6	36	39,3	
НТМ	20,6	24,3	30,1	35,3	37,8	
НТМfr	23,5	27,2	31,5	36	39,5	

Примечание. * - однофакторный дисперсионный анализ.

Обсуждение. Пятилетняя история применения разработанного ПЦР-РВ метода для быстрой дифференциальной диагностики МБТ и НТБ в клинических образцах с целью выявления больных микобактериозами при поступлении в туберкулезную больницу свидетельствует о востребованности теста и необходимости внесения такого рода разработок в клинические стандарты лечения больных туберкулезом. Основной проблемой лечения иммунокомпрометированных пациентов с микобактериозами в настоящее время является высокая вероятность ко-инфекции МБТ в процессе обследования по поводу подозрения на туберкулез в стационаре. С этой точки зрения, такого рода лабораторное обследование гораздо более целесообразно проводить в рамках поликлиник или Центров СПИД с целью минимизации контактов больных микобактериозами с больными туберкулезом. Ключевым вопросом такого рода разработок является высокая чувствительность и специфичность относительно ДНК мишени. Для высококонсервативного генома возбудителя туберкулеза подобрать специфическую нуклеотидную последовательность в большинстве случаев не составляет труда. Совершенно иная ситуация с диагностикой НТБ, потенциальный спектр которых постоянно расширяется в связи с открытием новых видов потенциально патогенных для иммунокомпрометированных лиц.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют, что разработанные реактивы (праймеры и флуоресцентные зонды) для ПЦР-РВ теста позволяют с высокой специфичностью дифференцировать подавляющее большинство видов НТМ от МБТ. Чувствительность теста при этом составляет менее 1 пг ДНК на реакцию, что соответствует количеству менее 400 геном-эквивалентов микобактериальной ДНК на одну ПЦР реакцию (расчеты не приводятся), независимо от степени «загрязнения» образца ДНК человека.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-3, 7-15, 17-20 СМ. REFERENCES)

- Эргешов А.Э., Шмелев Е.И., Ковалевская М.Н., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с заболеваниями органов дыхания (клинико-лабораторное исследование). *Пульмонология*. 2016; 26(3):303-08. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-303-308.
- Старкова Д. А., Журавлев В. Ю., Вязовая А. А., Соловьева Н. С., Куликова О. Н., Нарвская О. В. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом на территориях Северо-Западного федерального округа России. *Туберкулёз и бо-*

- лезни лёгких. 2019; (6):16-22. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-6-16-22.
- Макарова М.В., Гунтупова Л.Д. Нетуберкулезные микобактерии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020; 20(2):97-102. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102.
- Огарков О.Б., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А., Белькова Н.Л., Синьков В.В., и др. Секвенирование 16S-ITS-23S фрагмента рибосомального оперона обеспечивает необходимые и достаточные условия для идентификации микобактерий. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12(5):976-80. DOI: 10.15789/2220-7619-ROS-1871.
- Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., и др. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулёза *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (10): 622-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627.

REFERENCES

- Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>.
- Togun T., Kampmann B., Stoker N.G., Lipman M. Anticipating the impact of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control programmes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1):21. DOI: 10.1186/s12941-020-00363-1.
- Koh W.J. Nontuberculous Mycobacteria-Overview. *Microbiol. Spec-tr.* 2017; 5(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016.
- Ergeshov A.E., Shmelev E.I., Kovalevskaya M.N., Larionova E.E., Chernousova L.N. Nontuberculous mycobacteria in patients with respiratory diseases (a clinical study). *Pul'monologiya*. 2016; 26(3):303-08. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-303-308.
- Starkova D.A., Zhuravlev V.Yu., Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Kulikova O.N., Narvskaya O.V. Species diversity of non-tuberculous mycobacteria in patients with mycobacteriosis in the North-Western Federal District of Russia. *Tuberkul'oz i bolezni legkikh*. 2019; 97(6):16-22. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-6-16-22. (in Russian)
- Makarova M.V., Guntupova L.D. Nontuberculous mycobacteria. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020; 20(2):97-102. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102. (in Russian)
- Ogarkov O. B., Zhdanova S. N., Orlova E. A., Khromova P. A., Belkova N. L., Sinkov V.V., et al. 16S-ITS-23S rRNA operon segment sequencing provides necessary and sufficient conditions for bacterial species-specific identification. *Infektsiya i immunitet*. 2022; 12(5): 976-80. DOI: 10.15789/2220-7619-ROS-1871. (in Russian)
- Saxena S., Spaink H.P., Forn-Cuní G. Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology (Basel)*. 2021; 10(2):96. DOI: 10.3390/biology10020096.
- Pennington K.M., Vu A., Challener D., Rivera C.G., Shweta F.N.U., Zeuli J.D., et al. Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease. *J. Clin. Tuberc. Other. Mycobact. Dis.* 2021; 24:100244. DOI: 10.1016/j.jctube.2021.100244.
- Ogarkov O., Zhdanova S.N., Sinkov V., Khromova P.A., Orlova E., Heysell S. Quantitative DST determination in a patient with sepsis

- from *M. avium* before isolation of strain. *Chest*. 2020; 157(S6). DOI: 10.1016/j.chest.2020.05.075
11. Bergin S.P., Chemaly R.F., Dadwal S.S., Hill J.A., Lee Y.J., Haidar G. et al. Plasma Microbial Cell-Free DNA Sequencing in Immuno-compromised Patients With Pneumonia: A Prospective Observational Study. *Clin. Infect. Dis.* 2024; 78(3):775-84. DOI: 10.1093/cid/ciad599.
12. Yang X., Che N., Duan H., Liu Z., Li K., Li H. et al. Cell-free *Mycobacterium tuberculosis* DNA test in pleural effusion for tuberculous pleurisy: a diagnostic accuracy study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(8):1089.e1-89.e6. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.11.026.
13. Li G., Cannon K., Sisniega C., Fergie J. Cell-free DNA blood test for the diagnosis of pediatric tuberculous meningitis. *J. Clin. Tuberc. Other. Mycobact. Dis.* 2024; 35:100421. DOI: 10.1016/j.jc-tube.2024.100421.
14. Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Plotnikov A.O., Gogoleva N.E., Zhdanova S.N., Pervanchuk V.L. et al. Metagenomic analysis of mycobacterial transrenal DNA in patients with HIV and tuberculosis coinfection. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 77:104057. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104057.
15. Bachar K., Shulimzon T., Segel M.J. Nontuberculous mycobacteria infections of the pleura: A systematic review. *Respir. Med.* 2022; 205:107036. DOI: 10.1016/j.rmed.2022.107036
16. Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseva E.Y., Tzyrenova T.A., et al. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(10):622-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627. (in Russian)
17. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732-36. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.10.005.
18. Zhou L., Ma C., Xiao T., Li M., Liu H., Zhao X., et al. A New Single Gene Differential Biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Non-tuberculosis Mycobacteria. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1887. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01887.
19. Ustinova V.V., Smirnova T.G., Sochivko D.G., Varlamov D.A., Laronova E.E., Andreevskaya S.N. et al. New assay to diagnose and differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019; 114:17-23. DOI: 10.1016/j.tube.2018.10.004.
20. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C., Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(2):175-8. DOI: 10.1128/jcm.31.2.175-178.1993.