

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский алфавит

№ 5 / 2020



Modern
LABORATORY

MEDICAL ALPHABET
Russian Professional Medical Journal

Современная ЛАБОРАТОРИЯ

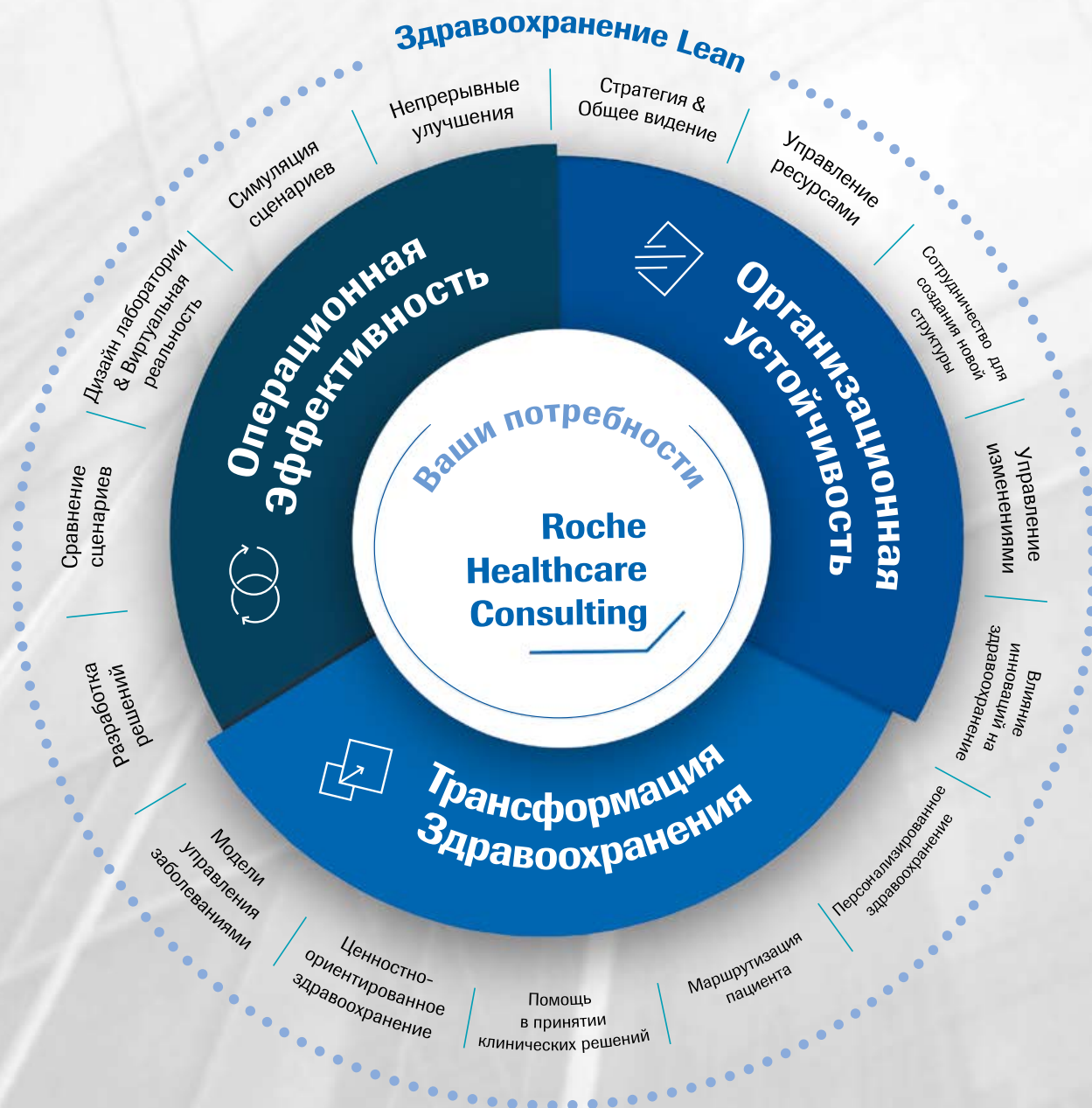
Специальности ВАК

14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика

- 14.01.01 Акушерство и гинекология
- 14.01.04 Внутренние болезни
- 14.01.05 Кардиология
- 14.01.10 Кожные и венерические болезни
- 14.01.11 Нервные болезни
- 14.01.12 Онкология
- 14.01.17 Хирургия
- 14.01.22 Ревматология
- 14.01.25 Пульмонология
- 14.02.02 Эпидемиология
- 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru
www.med-alphabet.com



Консалтинг Roche работает по трем направлениям:

- Операционная эффективность
- Организационная устойчивость
- Трансформация здравоохранения

и предлагает достигать эффективности, устойчивости и трансформации через внедрение системы управления Lean (бережливое производство)

Серии журналов для специалистов № 5 (419)
Серия «Современная лаборатория» (1)

www.medalfavit.ru
www.med-alphabet.com

Издатель: издательство медицинской литературы ООО «Альфмед», тел. (495) 616-48-00, e-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор издательства Т. В. Синица

Почтовый адрес редакции: 129515, г. Москва, а/я 94, ООО «Альфмед»

Адрес редакции: 129515, г. Москва, ул. Академика Королева, 13, стр. 1, 8 этаж, к. 56, оф. 804 А, Б

Главный редактор журнала «Медицинский алфавит» А. С. Ермолов

Объединенный редакционный совет журнала «Медицинский алфавит»

Акимкин Василий Геннадьевич, д. м. н., проф.
Амхадова Малкан Абдурашидовна, д. м. н., проф.
Балан Вера Ефимовна, д. м. н., проф.
Барбараш Ольга Леонидовна, д. м. н., проф., чл.-корр. РАН
Брико Николай Иванович, д. м. н., проф.
Бутров Андрей Валерьевич, д. м. н., проф.
Вавилова Татьяна Владимировна, д. м. н., проф.
Голубев Валерий Леонидович, д. м. н., проф.
Громова Ольга Алексеевна, д. м. н., проф.
Данилов Алексей Борисович, д. м. н., проф.
Евдокимов Евгений Александрович, д. м. н., проф.
Ермолов Александр Сергеевич, д. м. н., проф.
Журавлева Марина Владимировна, д. м. н., проф.
Захаров Владимир Владимирович, д. м. н., проф.
Козлов Игорь Александрович, д. м. н., проф.
Королева Ирина Станиславовна, д. м. н., проф.
Крихели Нателла Ильинична, д. м. н., проф.
Круглова Лариса Сергеевна, д. м. н., проф.
Кузнецова Ирина Всеволодовна, д. м. н., проф.
Кулаков Анатолий Алексеевич, д. м. н., проф.
Малеев Виктор Васильевич, д. м. н., проф.
Мартынюк Тамара Витальевна, д. м. н., проф.
Михин Вадим Петрович, д. м. н., проф.
Оганов Рафаэль Гегамович, д. м. н., проф.
Орлова Наталья Васильевна, д. м. н., проф.
Остроумова Ольга Дмитриевна, д. м. н., проф.
Плавнов Николай Филиппович, д. м. н., проф.
Проценко Денис Николаевич, д. м. н., проф.
Покровский Валентин Иванович, д. м. н., проф.
Покровский Вадим Валентинович, д. м. н., проф.
Путилина Марина Викторовна, д. м. н., проф.
Скоромец Александр Анисимович, д. м. н., проф.
Стручков Петр Владимирович, д. м. н., проф.
Стрюк Раиса Ивановна, д. м. н., проф.
Тапильская Наталья Игоревна, д. м. н., проф.
Улитовский Сергей Борисович, д. м. н., проф.
Ушаков Рафаэль Васильевич, д. м. н., проф.
Шилова Маргарита Викторовна, д. м. н., проф.
Щербо Сергей Николаевич, д. м. н., проф.
Эмануэль Владимир Леонидович, д. м. н., проф.

Председатель редакционного совета журнала «Медицинский алфавит» серии «Современная лаборатория»: С. Н. Щербо

Руководитель отдела рекламы и маркетинга: Т. Е. Чикмарева, medalfavit@bk.ru

Руководитель отдела продвижения, распространения и выставочной деятельности Б. Б. Будович, medalfavit_pr@bk.ru

Редакция оставляет за собой право сокращения Редакция оставляет за собой право сокращения и стилистической правки текста без дополнительных согласований с авторами. Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов опубликованных материалов. Редакция не несет ответственности за последствия, связанные с неправильным использованием информации.

Журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати, теле-, радиовещания и средств массовых коммуникаций. Рег. номер ПИ № 77-11514 от 04.01.2002.

Формат А4. Цена договорная.

При перепечатке ссылка на журнал «МА» обязательна. За содержание рекламы ответственность несет рекламодатель. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несет автор.

Подписан в печать 10 марта 2020 года.

Содержание

- 5 Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым инфекционным заболеваниям. II. Инфекции, передаваемые половым путем
С. Н. Щербо, Д. С. Щербо, А. Л. Тищенко, М. И. Савина, Т. И. Туркина
- 8 Анализ лабораторного мониторинга и перспективы использования его результатов в деятельности специализированной клинко-диагностической лаборатории
В. В. Бибикина, В. Л. Эмануэль
- 13 Роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе и диагностике неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы и собственные данные)
Д. В. Сидоренко, В. Д. Назаров, С. В. Лапин, В. Л. Эмануэль
- 19 Орфанный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе
Ю. В. Миролюбова, Н. С. Тимофеева, В. А. Барт, Е. В. Толстопопова, Е. С. Фетисов, В. В. Стругов, В. М. Соловьев, А. Ю. Зарицкий, Т. В. Вавилова
- 25 Влияние эндогенных факторов на уровень концентрации глюкозы в пробах крови пациентов различных возрастных групп
Д. П. Пискунов, Л. А. Данилова, Л. В. Борисова, А. С. Пушкин, Т. А. Ахмедов, В. Л. Эмануэль
- 28 Оценка качества иммунохимических исследований с помощью сигмометрии
О. В. Петрова, Д. К. Твердохлебова, О. И. Мурыгина, Д. М. Никулина
- 30 Интенсивность роста ламеллы как характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов человека
М. С. Макаров
- 34 Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта на нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории)
М. С. Пименов, А. В. Васильев, П. С. Садовников, О. В. Ляшенко, З. В. Севрук, Л. Б. Копеева, И. И. Скибо, Т. В. Вавилова
- 38 Место грибов рода Candida в этиологической структуре инфекционных осложнений у пациентов онкологического стационара
С. А. Цитренко, Е. Ю. Лукьянова, М. В. Полуэктова, Л. Ю. Гривцова
- 40 Клиническое значение и особенности лабораторного определения витамина D
Л. Б. Дрыгина
- 46 Гормонально-микроэлементный гомеостаз мальчиков с ожирением и задержкой полового развития
В. А. Попова, А. А. Кожин, Н. А. Друкер, С. Н. Селютин, О. З. Пузикова
- 50 Энзимодиагностика осложнений офтальмогерпеса
Н. А. Терехина, С. Э. Реук
- 54 Современные тенденции в аналитическом определении витамина D
С. В. Хабаров, Н. А. Вислоцкий, О. В. Денисова, Д. Г. Навасардянт
- 59 Возможности применения нейромышечной электростимуляции для лечения полинейропатии при непереносимости глютена (клиническое наблюдение)
Е. Р. Баранцевич, Е. Е. Смирнов, А. А. Потапчук, А. В. Артемова, Ю. В. Эмануэль
- 66 Подписка

Contents

- 5 Genetic predisposition and resistance to certain infectious diseases. II. Sexually transmitted infections
S. N. Scherbo, D. S. Shcherbo, A. L. Tishchenko, M. I. Savina, T. I. Turkina
- 8 Laboratory monitoring analysis and prospects for using its results in specialized clinical diagnostic laboratory
V. V. Bibikova, V. L. Emanuel
- 13 Role of molecular genetic factors in pathogenesis and diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (literature review and own data)
D. V. Sidorenko, V. D. Nazarov, S. V. Lapin, V. L. Emanuel
- 19 Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia
Yu. V. Mirolyubova, N. S. Timofeeva, V. A. Bart, V. M. Solovyov, E. V. Tolstopoyatova, E. S. Fetisov, V. V. Strugov, A. Yu. Zaritsky, T. V. Vavilova
- 25 Influence of endogenous factors on glucose level in blood tests of patients of different age groups
D. P. Piskunov, L. A. Danilova, L. V. Borisova, A. S. Pushkin, T. A. Akhmedov, V. L. Emanuel
- 28 Assessment of quality of markers of myocardial damage using sigmometry
O. V. Petrova, D. K. Tverdokhlebova, O. I. Murygina, D. M. Nikulina
- 30 Intensity of lamella growth as morphofunctional feature of human platelets
M. S. Makarov
- 34 Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results)
M. S. Pimenov, A. V. Vasilyev, P. S. Sadovnikov, O. V. Lyashenko, Z. V. Sevruck, L. B. Kopeeva, I. I. Skibo, T. V. Vavilova
- 38 Place of Candida fungi in etiological structure of infectious complications in patients of oncological hospital
S. A. Tsitrenko, E. Yu. Lukyanova, M. V. Poluektova, L. Yu. Grivtsova
- 40 Clinical significance and features of laboratory determination of vitamin D
L. B. Drygina
- 46 Hormone-microelement homeostasis of boys with obesity and delayed sexual development
V. A. Popova, A. A. Kozhin, N. A. Drukker, S. N. Selyutina, O. Z. Puzikova
- 50 Enzymodiagnosics of ophthalmoherpes complications
N. A. Teryokhina, S. E. Reuk
- 54 Current trends in analytical determination of vitamin D
S. V. Khabarov, N. A. Vislotskiy, O. V. Denisova, D. G. Navasardiyants
- 59 Possibilities of using neuromuscular electrostimulation for treating polyneuropathy in gluten intolerance (clinical observation)
E. R. Barantsevich, E. E. Smirnov, A. A. Potapchuk, A. V. Artyomova, Y. V. Emanuel
- 66 Subscription

Редакционная коллегия



Главный редактор серии «Современная лаборатория»

Щербо Сергей Николаевич, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, главный ученый секретарь ассоциации «Федерация лабораторной медицины», г. Москва

Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., проф., зав. кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Гильманов Александр Жанович, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии и лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, г. Уфа

Годков Михаил Андреевич, д.м.н., врач высшей категории, рук. отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского», президент Ассоциации «Федерация лабораторной медицины», г. Москва

Долгих Татьяна Ивановна, д.м.н., проф., секретарь профильной комиссии по клинической лабораторной диагностике Минздрава России, г. Москва

Косырев Александр Борисович, к.м.н., доцент кафедры биохимии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», г. Москва, ген. директор ООО ТПО «Медиолаб», г. Москва

Падюков Леонид Николаевич, проф. отделения ревматологии медицинского отдела Каролинского института, г. Стокгольм (Швеция)

Первухин Юрий Владиславович, к.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь

Рысулы Мустафа Рысулович, д.м.н., проф., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Казахского национального медицинского университета имени С.Д. Асфендиярова, президент Казахской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, г. Алматы (Казахстан)

Терёхина Наталья Александровна, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь

Шипулин Герман Александрович, к.м.н., рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

Эмануэль Владимир Леонидович, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор Научно-методического центра молекулярной медицины Минздрава России ФГБОУ ВО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Editorial Board

The Editor in Chief

Shcherbo S.N., MD, DMSci, professor, Russian National Research Medical University n. a. N.I. Pirogov, Moscow

Vavilova T.V., MD, DMSci, professor, North-Western State Medical University n. a. I.I. Mechnikov, St. Petersburg

Gilmanov A. Zh., MD, DMSci, professor, Bashkir State Medical University, Ufa

Godkov M. A., MD, DMSci, Research Institute of Emergency Medicine n.a. N. V. Sklifosovsky, Moscow

Dolgikh T. I., MD, DMSci, professor, Omsk State Medical Academy, Omsk

Kosyrev A. B., PhD, associate professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Mediolab, Moscow

Padyukov L. N., professor of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Pervushin Y. N., PhD, professor, Stavropol State Medical University, Stavropol

Rysuly M. R., MD, DMSci, professor, Kazakh National Medical University, president of Kazakh Medical Laboratory Diagnostics Association, Almaty, Kazakhstan

Teryokhina N. A., MD, DMSci, professor, Perm State Medical Academy n.a. acad. E.A. Wagner, Perm

Shipulin G. A., PhD, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Emanuel V. L., MD, DMSci, professor, First State Medical University of St. Petersburg n. a. I.P. Pavlov, St. Petersburg

Журнал «**Медицинский алфавит**» включен в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук по специальностям:

- 14.01.01 – Акушерство и гинекология (медицинские науки);
- 14.01.04 – Внутренние болезни (медицинские науки);
- 14.01.05 – Кардиология (медицинские науки);
- 14.01.06 – Психиатрия (медицинские науки);
- 14.01.10 – Кожные и венерические болезни (медицинские науки);
- 14.01.11 – Нервные болезни (медицинские науки);
- 14.01.12 – Онкология (медицинские науки);
- 14.01.13 – Лучевая диагностика, лучевая терапия (медицинские науки);
- 14.01.14 – Стоматология (медицинские науки);
- 14.01.17 – Хирургия (медицинские науки);
- 14.01.22 – Ревматология (медицинские науки);
- 14.01.25 – Пульмонология (медицинские науки);
- 14.01.28 – Гастроэнтерология (медицинские науки);
- 14.02.01 – Гигиена (медицинские науки);
- 14.02.02 – Эпидемиология (медицинские науки);
- 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки);
- 14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

В связи с продвижением контента журнала в международном научном сообществе и расширением его индексирования в наукометрических базах данных, в т.ч. Scopus, Research4Life, Worldcat, Crossref и т.п., просим оформлять ссылки для цитирования по данному образцу.

Для цитирования: Пименов М.С., Васильев А.В., Садовников П.С., Ляшенко О.В., Севрук З.В., Копеева Л.Б., Скибо И.И., Вавилова Т.В. Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта на нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории). *Медицинский алфавит*. 2020;(5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>

For citation: Pimenov M.S., Vasilyev A.V., Sadovnikov P.S., Lyashenko O.V., Sevruk Z.V., Kopeeva L.B., Skibo I.I., Vavilova T.V. Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results). *Medical alphabet*. 2020; (5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>

Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым инфекционным заболеваниям.

II. Инфекции, передаваемые половым путем

С. Н. Щербо, д.б.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО¹

Д. С. Щербо, к.б.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО¹

А. Л. Тищенко, д.м.н., проф., зав. кафедрой кожных и венерических болезней с курсом косметологии ФНМО медицинского института²

М. И. Савина, д.б.н., проф., проф. кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО¹

Т. И. Туркина, д.б.н., проф., проф. кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО¹

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Genetic predisposition and resistance to certain infectious diseases.

II. Sexually transmitted infections

S. N. Scherbo, D. S. Shcherbo, A. L. Tishchenko, M. I. Savina, T. I. Turkina

Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, People's Friendship University of Russia; Moscow, Russia

Резюме

В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с генетической предрасположенностью и устойчивостью к инфекциям, передаваемым половым путем (ИППП). Генетические факторы в значительной мере определяют восприимчивость организма к различным заболеваниям, в том числе инфекционным. Основное влияние уделяется генам главного комплекса гистосовместимости и toll-подобных рецепторов. Рассмотрены некоторые ИППП и генетические полиморфизмы, ответственные за устойчивость и предрасположенность к инфекциям и связанным с ними клиническим последствиям. Знание молекулярно-генетических биомаркеров необходимо для выделения групп риска, проведения предиктивных мероприятий, в частности вакцинации.

Ключевые слова: инфекции, передаваемые половым путем; однонуклеотидные полиморфизмы; лабораторные биомаркеры; хламидиоз; кандидоз; вирус папилломы человека; toll-подобные рецепторы.

Summary

The review addresses issues related to genetic predisposition and resistance to sexually transmitted infections (STI). Genetic factors largely determine the susceptibility of the body to various diseases, including infectious ones. The main influence is given to the genes of the main histocompatibility complex and toll-like receptors. Some STI and genetic polymorphisms responsible for resistance and susceptibility to infections and related clinical consequences are considered. Knowledge of molecular genetic biomarkers is necessary to identify risk groups, conduct predictive measures, in particular vaccination.

Key words: sexually transmitted infections, single nucleotide polymorphisms, laboratory biomarkers, chlamydia candidiasis, human papillomavirus, toll-like receptors.

Помимо очевидной роли антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA) в формировании адаптивного иммунного ответа, генетические полиморфизмы в рецепторах распознавания образов и сигнальных молекулах связаны с повышенной или пониженной восприимчивостью к инфекциям, что позволяет предположить, что их обнаружение может иметь большое влияние на лечение и профилактику инфекционных заболеваний. Согласно аналитическим исследованиям, более 60% из 1400 инфекционных заболеваний, известных на сегодняшний день современной медицине, способны поражать и животных, и человека. Большинство этих заболеваний (такие как сибирская язва, бубонная чума, болезнь Лайма и оспа обезьян) являются зоонозными, то есть изначально они возникли у животных, но затем преодолели межвидовой барьер и стали опасны для человека. Исторически предрасположенность к различным инфекционным заболеваниям формировалась длительное время. Так, развитие современных людей и неандертальцев шло разными путями: первые жили на территории Африки, а вторые мигрировали и заселили Европу и Азию. По-видимому, благодаря неандертальцам люди могли приобрести повышенную стойкость к гриппу, лихорадке Денге, гепатиту С, а также

ВИЧ. Известно также, что вирус папилломы человека – 16 (ВПЧ16) практически не встречается у африканцев, зато его штаммы широко распространены в Евразии. Скорее всего, у первых сапиенсов, живших на востоке Африки, этого вируса не было, и его получили их потомки уже в ходе своих переселений. Время формирования ВПЧ оценивают примерно 600 тысяч лет назад, Homo sapiens как вида тогда еще не было, но были неандертальцы. Заражение сапиенсов этим вирусом произошло около 80 тысяч лет назад, что приблизительно совпадает со временем расселения наших предков из Африки и их первыми контактами с неандертальцами. Интеграция генома ВПЧ в геном человека обнаруживается с помощью полногеномного секвенирования (WGS) при раке шейки матки [1], а также головы и шеи. Показано, что аллели В*07:02 и С*07:02 генов главного комплекса гистосовместимости ассоциируются с повышенным риском цервикального рака и связаны с передачей генетического материала от неандертальцев. Еще одним локусом, связанным с ВПЧ, является HLA-DQB1 – LOC102725019 (rs9357152) [2]. Иммунологическая система играет важную роль в решении инфекций. В этом контексте отметим хемокины, которые являются важными регуляторами развития вирусных

инфекций и воспаления, среди которых выделяется *CXCL12* благодаря провоспалительным свойствам, выступает в качестве хемоаттрактанта, рекрутирующего иммунные клетки. Несколько полиморфизмов были идентифицированы в гене *CXCL12*, включая rs1801157 в 3'-нетранслируемой области, которая характеризуется заменой гуанина на аденин [3]. В данном исследовании 195 женщин были классифицированы как неинфицированные ВПЧ, а 169 – как инфицированные ВПЧ. ДНК ВПЧ была исследована с помощью полимеразной цепной реакции, и продемонстрировано, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) гена *CXCL12* (rs1801157) независимо связан с инфекцией ВПЧ и оказывает влияние на развитие плоскоклеточных интраэпителиальных повреждений высокой степени и, как предполагается, является многообещающим генетическим биомаркером восприимчивости к развитию поражений. Полиморфизм аллеля С для ОНП T-1237C в toll-подобном рецепторе – 9 (TLR-9) (rs5743836) находится в предполагаемом промоторе гена *TLR-9* и оказывает влияние на хронические воспалительные процессы, однако, как было показано, не связан в значительной степени с уровнем или персистенцией в риске заражения ВПЧ.

Течение другой важной среди ИППП герпесвирусной инфекции сопровождается дисбалансом продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови с поляризацией иммунного ответа по Th-пути. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении подверженности герпесвирусной инфекции, является гомозиготный генотип ТТ-полиморфизма Е-330G гена интерлейкина-2. Степень риска прогрессирования рецидивирующего течения и неблагоприятного исхода инфекции положительно ассоциирована с гетерозиготным генотипом TG промоторного региона Е-330G гена интерлейкина-2, а также с гомозиготным генотипом СС и аллелем С промоторного региона С-590Т гена интерлейкина-2 [4]. Вариант полиморфизма 554Ser гена *TLR-3* также был связан с энцефалитом и ВПГ-1, который изменял передачу сигналов в ответ на инфекцию вирусом и действовал доминантно-негативным образом, а его присутствие может способствовать восприимчивости хозяина к инфекции и, возможно, определять клинический исход [5]. Наконец, TLR-9 распознает ДНК ВПГ -1/-2 и метилированные мотивы цитозин-фосфат-гуанозин (CpG) из бактерий и вирусов [6].

Известно, что большое количество ОНП генома человека связано с различной восприимчивостью тяжести урогенитальной хламидийной инфекции. Так, ОНП идентифицированы в рецепторах внутри- и внеклеточного распознавания патогенов, а также в цитокинах и хемокинах, участвующих в иммунном ответе и моделирующих его после заражения *Chlamydia trachomatis*. Некоторые из них имеют ОНП, которые приводят к повышенному риску инфицирования или осложнений после заражения, в то время как другие оказывают защитное действие. Существует четыре хорошо изученных и описанных гена *TLR 2+2477 G/A* (rs5743708), *NOD 1+32656 T/GG* (rs6958571), *CXCR 5+10950 T/C* (rs3922) и интерлейкина-10–1082 A/G (rs1800896). TLR2 играет важную роль

как фактор врожденного иммунного ответа на *Chlamydia trachomatis* в ранней репродукции медиаторов воспаления и развития хронической воспалительной патологии [7], причем существенно повышает риск развития патологии маточных труб (OR = 17,51; 95 % ДИ: 0,9–343; p = 0,015) [8]. Хламидия-трахоматис-серопозитивные женщины – носительницы NOD 1 GG также имеют повышенный риск развития патологии труб (OR = 2,25; 95 % ДИ: 1,08–4,67; p = 0,04) [9]. NOD 1 обычно функционирует как рецептор, связывающий бактериальные пептидогликан, но вставка GG создает стоп-кодон, что ухудшает функционирование гена. В отличие от мутаций TLR 2 и NOD 1, ОНП в гене *CXCR 5* является защитным. Генотип СС хемокинового рецептора защищает хламидия-трахоматис-позитивных женщин с OR = 0,10 от развития патологии труб [10]. SNPL10, который находится в промоторной области этого иммуносупрессивного цитокина, также является защитной функцией с OR = 0,14 для развития тяжелого повреждения маточных труб (95 % ДИ: 0,02–0,8; p = 0,03) [11]. При развитии тяжелых осложнений было показано, что перенос мутантных аллелей NOD 1+3256 T-/GG ассоциировался с симптоматическим течением инфекции и интерлейкин-10–1082 A/G с повышенным риском развития поздних осложнений после хламидийной инфекции [7]. Полиморфизм Ser602Ile TLR-1 также связан с инфекциями мочевыводящих путей, при этом 1805TT (602Ile гомозиготный) демонстрирует защиту от пиелонефрита, по сравнению с 1805GT (Ser602Ile гетерозиготный) или генотипом GG (Ser602 гомозиготный), и хламидийной инфекции при хламидиозе у афроамериканок с воспалительными заболеваниями органов малого таза [12].

Распространенность инфекций кровотока с *Candida spp.* в последние годы неуклонно растет из-за более широкого использования инвазивных процедур, лечения злокачественных новообразований и аутоиммунных заболеваний с помощью химиотерапии и иммунодепрессантов, а также длительного пребывания в отделениях интенсивной терапии; смертность от этого заболевания остается высокой – от 30 до 40 %. В нескольких эпидемиологических исследованиях была оценена роль полиморфизмов TLR в восприимчивости к распространенному кандидозу. Предполагается, что полиморфизм Asp299Gly TLR 4 действует как признак восприимчивости к системному кандидозу [13], а полиморфизм Asp753Gln TLR 2 приводит к изменению профиля цитокинов у пациентов с сепсисом *Candida* [14]. Тем не менее эти результаты не могут быть подтверждены в гораздо большей когорте, включая пациентов и подобранных контрольных лиц [15], предполагая, что в предыдущих исследованиях когорты были слишком малы. Исследования, посвященные выявлению общих генетических вариантов, предрасполагающих к инфекциям кровотока, выявили значительную роль полиморфизмов в TLR 1, из которых три были связаны с повышенным риском развития кандидемии по сравнению с контрольными пациентами в госпитализированных условиях [15]. Эти полиморфизмы TLR 1 приводят к потере функции рецептора и, следовательно, уменьшают цитокиновые ответы, индуцированные через гетеродимер TLR 1 / TLR 2.

В той же когорте инвазивного кандидоза было показано, что персистенция фунгемии связана с промоторным полиморфизмом в генах цитокинов интерлейкинов -12В и -10 [16], которые влияют на транскрипцию цитокинов и тем самым влияют на способность продуцировать интерлейкины -10 и -12 врожденных иммунных клеток [17]. Было показано, что персистенция инфекции коррелирует со снижением интерлейкина-12 и повышенной продукцией интерлейкина-10, вызванной *Candida*, что, вероятно, приводит к ингибированию ответа T-helper 1, который, как известно, имеет решающее значение для системного иммунитета против *Candida* [18]. Многочисленные исследования были посвящены изучению роли дефицита маннозосвязывающего лектина при инфекциях с *Candida spp.* Действительно, генетические ассоциации дефицита маннозосвязывающего лектина с риском инфицирования наблюдались в когортах пациентов с кандидемией и абдоминальными инфекциями [19]. Другой распространенной инфекцией *Candida* является кандидоз ротоглотки, колонизация слизистой оболочки рта и верхних отделов пищеварительного тракта, которая часто наблюдается у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека. Генетическая изменчивость врожденного иммунитета человека также может способствовать восприимчивости к кандидозу ротоглотки. Интересное исследование было посвящено потенциальной роли генетических вариантов рецепторов распознавания образов в восприимчивости к кандидозу ротоглотки у пациентов с ВИЧ в Западной Африке, что выявило потенциальную роль другого генетического варианта *dectin-1*, специфичного для африканских популяций [20]. Описанные выше генетические исследования инфекций *Candida* варьируются в зависимости от размера когорты пациентов и статистической обработки. В то время как некоторые исследования имеют относительно большие когорты с соответствующим статистическим анализом, другие ограничены небольшими группами пациентов, которые не позволяют сделать окончательные выводы.

Исследования генетических ассоциаций, касающиеся редких моногенных расстройств или распространенных грибковых инфекций среди пациентов с ослабленным иммунитетом, позволили получить фундаментальное представление о механизмах, обеспечивающих устойчивость к грибковому патогену *C. albicans*. В частности, были идентифицированы цитокины, которые играют решающую роль в противогрибковой защите хозяина, включая интерлейкины -17 и -22, при инфекциях слизистой оболочки. Будущие исследования должны переместиться от оценки возрастающего числа генов-кандидатов до широких геномных массивов, когда будут доступны большие когорты. Кроме того, было высказано предположение, что только 10–15 % генетической предрасположенности к болезням можно обнаружить в основных эффектах отдельных общих полиморфизмов, а остальное, скорее всего, скрыто в редких генетических вариантах и сложных взаимодействиях между генами и окружающей средой. Это требует более детальной оценки генетической изменчивости путем глубокого секвенирования генов-кандидатов, путей и в будущем (поскольку анализы становятся более рентабельными) целых экзотов или даже геномов пациентов.

Носительство одного из биомаркеров бактериального вагиноза, *Atopobium vaginae*, в первой половине беременности было достоверно связано с наличием вариации TLR-1 743A>G (rs4833095) и незначительно ассоциировалось с промотором TLR-1 7202A>G вариацией [21]. Однако даже если эти ассоциации представляют собой подлинное биологическое явление, общий риск этих полиморфизмов, по-видимому, ограничен. Другой Toll-подобный рецептор 4 играет роль в распознавании патогенных микроорганизмов, и общие полиморфизмы могут изменять восприимчивость хозяина к инфекционным заболеваниям. Рассмотрена связь двух общих полиморфизмов (TLR 4896A>G и TLR 41196C>T) с инфекционными заболеваниями [22]. Обобщенная метрика отношения шансов (ORG) была использована для количественной оценки влияния вариантов TLR 4 на предрасположенность к заболеванию. Был проведен мета-анализ результатов: 11 из 37 были значительными. TLR 4896A>G повышает риск развития всех паразитарных инфекций (ORG = 1,59; 95 % ДИ: 1,05–2,42), малярии (1,31; 95 % ДИ: 1,04–1,66), бруцеллеза (2,66; 95 % ДИ: 1,66–4,27), кожного лейшманиоза (7,22; 95 % ДИ: 1,91–27,29), нейроцистицеркоз (4,39; 95 % ДИ: 2,53–7,61), тонзиллярная болезнь *Streptococcus pyogenes* (2,93; 95 % ДИ: 1,24–6,93), брюшной тиф (2,51; ДИ 95 %: 1,18–5,34) и инфекции мочевыводящих путей у взрослых (1,98; 95 % ДИ: 1,04–3,98), но они были защитными при проказе (0,36; 95 % ДИ: 0,22–0,60). Эффекты TLR 41196C>T были аналогичны эффектам TLR 4896A>G при бруцеллезе, кожном лейшманиозе, лепре, брюшном тифе и болезни миндалин *S. pyogenes* и были защитными для бактериального вагиноза во время беременности (0,55; 95 % ДИ: 0,31–0,98) и *Haemophilus influenzae* тонзиллярная болезнь (0,42; 95 % ДИ: 0,17–1,00). Большинство значимых ассоциаций были преимущественно среди азиатских групп населения, при этом редкими среди европейских групп.

Итак, ОНП в TLR действительно могут указывать на восприимчивость человека к инфекционному заболеванию, однако его проявление происходит не просто из-за наличия или отсутствия определенного ОНП, а из-за аддитивного взаимодействия между различными генетическими, эпигенетическими факторами и окружающей средой. Следовательно, несмотря на вклад генетических ассоциаций, исследования должны также сместиться в сторону включения дополнительных областей, таких как последовательности интронов, регуляторные элементы, молекулы РНК, и исследования вклада эпигенетических факторов, паттернов метилирования и посттрансляционных модификаций, которые следует также рассматривать в различных микро- или макросредах. Поскольку идея о том, что все болезни и признаки могут быть объяснены с помощью единичных мутаций, давно доказала свою несостоятельность, влияние ОНП на сложные признаки и заболевания необходимо оценивать более конкретно в контексте всех вышеперечисленных параметров. Одним из способов достижения этой цели могли бы стать использование крупномасштабных когорт и переход к полногеномным исследованиям. Поскольку TLR связаны

с другими рецепторами и молекулами, точное понимание механизмов, участвующих в иммунном и адаптивном ответе, является обязательным условием для усилий по разработке новых терапевтических стратегий и терапевтических средств для эффективного регулирования иммунной системы и в конечном итоге повышения качества жизни человека.

Список литературы

1. Ojesina A.I., Lichtenstein L., Freeman S.S., et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. // *Nature*. – 2014. – 506. – P. 371–375.
2. Chen D., McKay J.D., Clifford G., et al. Genome-wide association study of HPV seropositivity. // *Hum Mol Genet*. – 2011. – 20. – P. 4714–4723.
3. Okuyama N.C.M., Cezar-Dos-Santos F., Pereira É.R. Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. // *J Biomed Sci*. – 2018. – 25. – 1. – 69.
4. Наследникова И.О., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Аллельный полиморфизм генов IL-2 и IL-4 при герпесвирусной инфекции. // *Клини. лаб. диагностика*. – 2009. – 7. – С. 39–42.
5. Barkhash A.V., Babenko V.N., Voevoda M.I. et al. Association of IL28B and IL10 gene polymorphism with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population. // *Ticks Tick-Borne Dis*. – 2016. – 7. – P. 808–812.
6. Krug A., Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. // *Blood*. – 2004. – 103. – С. 1433–1437.
7. Hoenderboom B.M., Jukema J.B., van Benthem B.H. et al. The role of SNPs in the TLR2, NOD1, CXCR5, and IL10 genes in the course of Chlamydia trachomatis infections. // *Proceedings of the Fourteenth international symposium of human chlamydial infections*. – 2018. – July 1–6, Zeist, The Netherlands, 2018. P. 605–609.
8. Verweij S.P., Karimi O., Pleijster J. et al. TLR2, TLR4 and TLR9 genotypes and haplotypes in the susceptibility to and clinical course of Chlamydia trachomatis infections in Dutch women. // *Pathog. Dis*. – 2016. – 74. – 1.
9. Brankovic I., van Ess E.F., Noz M.P. et al. NOD1 in contrast to NOD2 functional polymorphism influence Chlamydia trachomatis infection and the risk of tubal factor infertility. // *Pathog. Dis*. – 2015. – 73. – 1. – P. 1–9.

10. Jiang J., Karimi O., Ouburg S. et al. Interruption of CXCL13-CXCR5 axis increases upper genital tract pathology and activation of NK cells following chlamydial genital infection. // *Plos One*. – 2012. – 7. – 11: e47487.
11. Ohman H., Tiitinen A., Halttunen M. et al. Cytokine polymorphism and severity of tubal damage in women with Chlamydia – associated infertility. // *J. Infect. Dis*. – 2009. – 199. – 9. – P. 1353–1359.
12. Taylor B.D., Darville T., Ferrell R.E., et al. Variants in Toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with Chlamydia trachomatis among women with pelvic inflammatory disease. // *J Infect Dis*. – 2012. – 205. – P. 603–609.
13. Van der Graaf C.A., Netea M.G., Morre S.A. et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. // *Eur Cytokine Netw*. – 2006. – 17. – P. 29–34.
14. Woehrlé T., Du W., Goetz A. et al. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during Candida sepsis in humans. // *Cytokine*. – 2008. – 41. – P. 322–329.
15. Plantinga T.S., Johnson M.D., Scott W.K. et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. // *J Infect Dis*. – 2012. – 205. – P. 934–943.
16. Johnson M.D., Plantinga T.S., van de Vosse E. et al. Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive candidiasis: A Prospective Cohort Study. // *Clin Infect Dis*. 2011.
17. Zeng L., Gu W., Chen K. et al. Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies. // *Crit Care*. – 2009. – 13. – R 188.
18. Romani L., Puccetti P., Mencacci A. et al. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with Candida albicans. // *J Immunol*. – 1994. – 152. – P. 3514–3521.
19. Giraldo P.C., Babula O., Goncalves A.K. et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. // *Obstet Gynecol*. – 2007. – 109. – P. 1123–1128.
20. Plantinga T.S., Hamza O.J., Willment J.A. et al. Genetic variation of innate immune genes in HIV-infected african patients with or without oropharyngeal candidiasis. // *J Acquir Immune Defic Syndr*. – 2010. – 55. – P. 87–94.
21. Verstraeten H., Verhelst R., Nuytink L. et al. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae. // *J Reprod Immunol*. – 2009. – 79. – P. 163–173.
22. Ziakas P.D., Prodromou M.L., El Khoury J. The role of TLR4896 A>G and 1196 C>T in susceptibility to infections: a review and meta-analysis of genetic association studies. // *PLoS One*. 2013 Nov 25. – 8 (11): e81047. DOI: 10.1371/journal.pone.0081047.

Для цитирования: Щербо С.Н., Щербо Д.С., Тищенко А.А., Савина М.И., Туркина Т.И. Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым инфекционным заболеваниям. II. Инфекции, передаваемые половым путем. Медицинский алфавит. 2020;(5):5–8. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-5-8>

For citation: Scherbo S.N., Shcherbo D.S., Tishchenko A.A., Savina M.I., Turkina T.I. Genetic predisposition and resistance to certain infectious diseases. II. Sexually transmitted infections. Medical alphabet. 2020; (5):5–8. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-5-8>



DOI: 10.33667/2078-5631-2020-5-8-12

Анализ лабораторного мониторинга и перспективы использования его результатов в деятельности специализированной клинико-диагностической лаборатории

В.В. Бибикина, ассистент Научно-методического центра по молекулярной медицине Минздрава России
В.Л. Эмануэль, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор Научно-методического центра по молекулярной медицине Минздрава России

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Laboratory monitoring analysis and prospects for using its results in specialized clinical diagnostic laboratory

V.V. Bibikova, V.L. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

В статье представлен ретроспективный анализ заявок, поступивших в специализированную клинико-диагностическую лабораторию (КДЛ) для проведения лабораторного мониторинга. Установлено, что в процессе деятельности специализированной КДЛ накапливаются большие массивы информации о редких, недостаточно изученных заболеваниях и особых видах патологии. Выявлено, что доля мониторинговых направлений на обследование составляет 17% и имеет тенденцию к росту, что может быть связано с совершенствованием методов лабораторной диагностики.

Summary

This article presents a retrospective analysis of the laboratory monitoring orders from the specialized clinical laboratory. It has been established that large amounts of information about rare, poorly understood diseases and special types of pathology are accumulated during the everyday activity of specialized clinical laboratory. This research indicated that the share of laboratory monitoring, with 17% of all orders, has a tendency to increase, which may be associated with the improvement of laboratory di-

Обсуждается возможность использования результатов лабораторного мониторинга для улучшения диагностического процесса путем составления оптимального алгоритма обследования пациентов, а также для изучения регионарной патологии. Оценены перспективы использования информации о лабораторном мониторинге в совершенствовании организации деятельности специализированной КДЛ.

Ключевые слова: специализированная клиничко-диагностическая лаборатория, лабораторный мониторинг, направление на обследование, совершенствование диагностического процесса, организация деятельности КДЛ.

agnostic methods. The possibility of laboratory monitoring results using in order to facilitate diagnostic process by the means of an optimal examination algorithm compiling, as well as to study regional pathology, is discussed. Besides, the prospects of using information on laboratory monitoring in improving the organization of specialized clinical laboratory's activity are assessed.

Key words: specialized clinical laboratory, laboratory monitoring, laboratory order, diagnostic process improvement, organization of clinical laboratory's activity.

Лабораторное обследование является неотъемлемой частью повседневной работы врача по ведению больных с хроническими заболеваниями. При проведении лечения дорогостоящими препаратами, а также медикаментами высокого риска в инструкциях по медицинскому применению или клинических рекомендациях устанавливаются не только объемы лабораторного тестирования, но также его периодичность [1, 3, 4]. В связи с этим за время хронической болезни на руках пациента накапливается значительный объем результатов лабораторного мониторинга по оценке эффективности терапии и уточнению активности заболевания. Аналогичные результаты хранятся в базе данных клиничко-диагностической лаборатории (КДЛ) и широко используются в научно-исследовательской работе. Однако, на наш взгляд, данные лабораторного мониторинга ограниченно применяются для совершенствования диагностического процесса при отдельных заболеваниях, а также для планирования и организации деятельности КДЛ. Особенно это относится к специализированным КДЛ, которые сосредотачивают активность вокруг редких, недостаточно изученных заболеваний и особых видов патологии, характеризующихся отсутствием научной ясности в понимании ряда вопросов, таких как прогрессирование болезни и ее неоднородность, опти-

мальные методы диагностики, профилактики или лечения определенных состояний [2, 5, 8, 9].

Цель работы: изучить объем и состав направлений на обследование за длительный период и оценить перспективы использования данной информации в совершенствовании организации деятельности специализированной КДЛ.

Материалы и методы

Для оценки перспектив использования информации о лабораторном мониторинге заболеваний был проведен 36-месячный ретроспективный анализ назначений, поступивших в специализированную лабораторию диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра по молекулярной медицине Минздрава России (ЛДАЗ) на базе Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (ПСПбГМУ). Были проанализированы все направления на лабораторные исследования больных из клиник университета по каналу финансирования ОМС в 2016–2018 годах, которые были разделены на две группы в зависимости от цели проведения обследования пациента: а) направления на лабораторные исследования с целью диагностики для подтверждения и (или) последующего установле-

ния диагноза; б) направления на лабораторные исследования с целью мониторинга для динамического наблюдения эффективности лечения или развития заболевания. Направления последней группы содержали установленный ранее клинический диагноз пациента.

Результаты

В 2016–2018 годах в ЛДАЗ из клиник ПСПбГМУ им. И. П. Павлова по каналу финансирования ОМС поступило 5462 направления. При этом 1452 назначения были исключены из рассмотрения из-за отсутствия необходимой информации для отнесения их к одной из групп в зависимости от цели обследования пациента. По 4010 направлениям, принятым к рассмотрению, было выполнено 11 тысяч исследований. Количество диагностических направлений по годам сравнения заметно превышает число мониторинговых направлений на исследования. Из всех направлений на долю мониторинговых пришлось всего 695, что составило 17,3 %. Хотя большинство исследований (86,5 %), выполненных лабораторией, проводилось в целях диагностики, однако в абсолютном выражении доля мониторинговых исследований составила значительную величину. В среднем на одно диагностическое направление приходилось три исследования, тогда

Таблица 1
Динамика количества направлений на исследования, поступивших в ЛДАЗ из клиник ПСПбГМУ им. И. П. Павлова в 2016–2018 годах

Год	С целью диагностики				С целью мониторинга				Всего			
	Направлений		Тестов		Направлений		Тестов		Направлений		Тестов	
	Единиц	Процент	Единиц	Процент	Единиц	Процент	Единиц	Процент	Единиц	Процент	Единиц	Процент
2016	889	83,7	2987	88,0	173	16,3	408	12,0	1062	100,0	3395	100,0
2017	1253	83,3	3508	86,2	252	16,7	561	13,8	1505	100,0	4069	100,0
2018	1173	81,3	3133	85,6	270	18,7	528	14,4	1443	100,0	3661	100,0
Итого за 2016–2018 гг.	3315	82,7	9628	86,5	695	17,3	1497	13,5	4010	100,0	11125	100,0

Примечание: источником информации послужили данные лабораторно-информационной системы.

Таблица 2
Динамика количества пациентов клиник ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, которые в течение календарного года обследовались в ЛДАЗ с целью мониторинга заболевания более одного раза по каналу финансирования ОМС в 2016–2018 гг.

Год	Обследовались дважды				Обследовались более двух раз				Всего			
	Пациентов		Тестов		Пациентов		Тестов		Пациентов		Тестов	
	Человек	Процент	Единиц	Процент	Человек	Процент	Единиц	Процент	Человек	Процент	Единиц	Процент
2016	30	68,2	73	68,9	14	31,8	33	31,1	44	100,0	106	100,0
2017	40	70,2	88	70,4	17	29,8	37	29,6	57	100,0	125	100,0
2018	37	64,9	71	66,4	20	35,1	36	33,6	57	100,0	107	100,0
Итого за 2016–2018 гг.	107	67,7	232	68,6	51	32,3	106	31,4	158	100,0	338	100,0

Примечание: источником информации послужили данные лабораторно-информационной системы.

как на одно мониторинговое – два лабораторных теста. Количество диагностических и мониторинговых направлений по годам представлено в табл. 1.

Естественно, что часть хронических больных вынуждены регулярно проходить лечение в клиниках университета, что влечет за собой повторное лабораторное обследование (табл. 2), но вместе с тем следует отметить стабильный ежегодный прирост числа пациентов, которым в ЛДАЗ проводили исследования с целью мониторинга заболевания (табл. 1).

Этот прирост может быть связан как с развитием методов лабораторной диагностики, так и с появлением новых нозологических форм аутоиммунных заболеваний в России. Несмотря на то что из года в год виды нозологий, с которыми пациенты направляются для мониторинга в ЛДАЗ, повторяются, информационная база заболеваний ежегодно расширялась (табл. 3). За 3 года количество не встречавшихся ранее патологий в направлениях на обследование в ЛДАЗ возросло на 17 нозологий (63 %), что также мо-

жет быть следствием появления новых диагностических возможностей.

Из 158 видов аутоиммунных заболеваний по данным направлений было зарегистрировано 44 вида аутоиммунной патологии. Следует отметить, что 114 диагнозов аутоиммунных заболеваний согласно классификации Autoimmune Registry [6] не встречались совсем. Среди них болезнь Эддисона, болезнь Деркума, антисинтетазный синдром, апластическая анемия, энцефалит Бикерстаффа и др.

Большая часть диагнозов, указанных в направлениях на обследование (75 %), относится к редким. В 2016–2018 годах эти заболевания встречались менее 10 раз (например, синдром Гудпасчера, синдром Шегрена, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, недифференцированное заболевание соединительной ткани и др.). В то же время 11 диагнозов (25 %) составляют основную, ядерную часть всей нозологии и охватывают 84 % от общего числа рассмотренных направлений (табл. 3).

С точки зрения использования данных специализированной КДЛ,

интересным представляется географическое распределение пациентов с изучаемыми патологиями в соответствии с направлениями. Так, почти половина пациентов (49,4 %), направления на обследование которых поступили в ЛДАЗ с целью мониторинга, проживали в г. Санкт-Петербурге и других субъектах Северо-Западного федерального округа (СЗФО), что является закономерным и ожидаемым ввиду расположения лаборатории и университета, в клиниках которого они обследовались.

Однако географическое распределение пациентов ЛДАЗ, вопреки ожиданиям, не ограничивается СЗФО, а включает также жителей Республики Северная Осетия – Алания, Самарской области, Камчатского края, Республики Чувашия, Республики Ингушетия, Ивановской области и других регионов. В общей сложности доля пациентов ЛДАЗ, проживающих за пределами СЗФО составляет более 17 % (см. рис.).

Очевидно, что по перечню накапливаемых в базе лаборатории направлений невозможно представить всю эпидемиологию аутоиммунных заболеваний в стране, но он отражает качественный состав обслуживаемых лабораторией больных. Это важно для повседневной диагностической работы как лечебного учреждения, поскольку ограничивает область диагностического поиска, так и специализированной КДЛ из-за возможности использования в совершенствовании организации деятельности. Аналогичный универсальный подход применим для любой КДЛ. Так, на преаналитическом этапе ориентация на заранее установленный состав больных позволяет КДЛ выстроить систему управ-

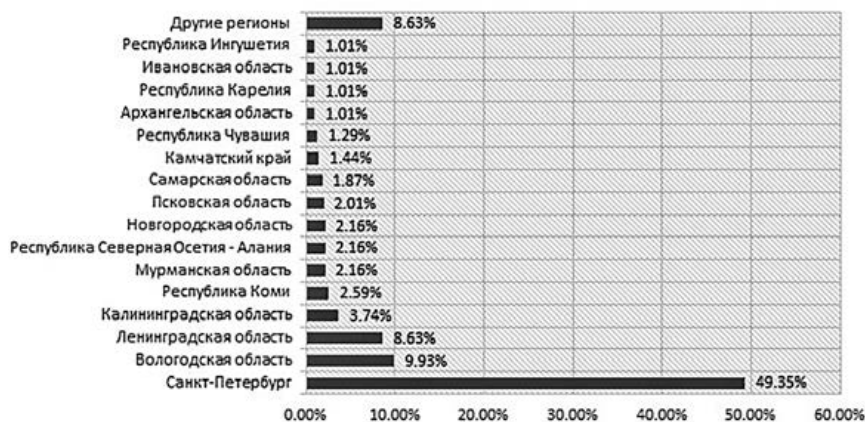


Рисунок. Распределение направлений на обследование с целью мониторинга, поступивших в ЛДАЗ в 2016–2018 годах, в зависимости от места постоянного проживания пациента.

Таблица 3
Распределение направлений ЛДАЗ по ранее установленным диагнозам

Заболевание	2016, направлений	2017, направлений	2018, направлений	Итого	
				Направлений	Процент
Ревматоидный артрит	39	22	28	89	17,3
Системная красная волчанка	23	41	44	108	21,0
АНЦА-ассоциированный васкулит	12	31	30	73	14,2
Саркоидоз	9	26	12	47	9,1
Микроскопический полиангиит	8	3	3	14	2,7
Язвенный колит	7	5	1	13	2,5
Системная склеродермия	7	5	11	23	4,5
Болезнь Крона	5	5	1	11	2,1
Синдром Гудпасчера	3	3	1	7	1,4
Васкулит	3	9	19	31	6,0
Эссенциальная смешанная криоглобулинемия	2	2	2	6	1,2
Синдром Шегрена	2	2	3	7	1,4
Псориатический артрит	1	2	1	4	0,8
Рассеянный склероз	1	1	1	3	0,6
Недифференцированное заболевание соединительной ткани	1	1	3	5	1,0
Локализованная склеродермия	1	1	10	12	2,3
IgA-нефропатия	2	2	–	4	0,8
Синдром Чарга-Стросса	1	2	–	3	0,6
Первичный билиарный цирроз	1	1	–	2	0,4
Первичный склерозирующий холангит	1	1	–	2	0,4
Анкилозирующий спондилит	4	–	–	4	0,8
IgA-васкулит (пурпура Шенлейна-Геноха)	3	–	1	4	0,8
Смешанное заболевание соединительной ткани	2	–	1	3	0,6
Болезнь Грейвса	1	–	–	1	0,2
Воспалительное заболевание кишечника (ВЗК)	1	–	–	1	0,2
Оптиконевромиелит (болезнь Девика)	1	–	–	1	0,2
Ювенильный артрит	1	–	–	1	0,2
Дискоидная красная волчанка	–	3	8	11	2,1
Уртикарный васкулит	–	2	–	2	0,4
Гигантоклеточный артериит	–	1	–	1	0,2
Дерматомиозит	–	1	–	1	0,2
Миастения Гравис	–	1	–	1	0,2
Микроскопический колит	–	1	–	1	0,2
Аутоиммунный тиреоидит	–	–	3	3	0,6
Псориаз	–	–	3	3	0,6
Склероатрофический лишай	–	–	3	3	0,6
Вульгарная (обыкновенная) пузырчатка	–	–	2	2	0,4
Сахарный диабет I типа	–	–	2	2	0,4
IgG4-опосредованное заболевание	–	–	1	1	0,2
Антифосфолипидный синдром	–	–	1	1	0,2
Аутоиммунная крапивница	–	–	1	1	0,2
Аутоиммунный полигландулярный синдром II типа	–	–	1	1	0,2
Полимиозит	–	–	1	1	0,2
Синдром Фишера-Эванса	–	–	1	1	0,2

Примечание: из рассмотрения исключены 180 направлений, так как указанные в них диагнозы не входили в перечень аутоиммунных заболеваний, принятый за базу сравнения.

ления лабораторными назначениями, включающую подбор наиболее информативных исследований, соответствующих диагнозу пациента и цели обследования, установление оптимальных интервалов ретестирования, формирование алгоритмов обследований по типу рефлекс-тестирования и исключение из перечня услуг КДЛ низкоинформативных видов исследований. На аналитическом этапе знание состава заболеваний дает возможность планировать реальную загруженность оборудования и график постановок в целях оптимального расходования ресурсов КДЛ при минимальном времени оборота теста (ТАТ). Применительно к постаналитическому этапу анализ мониторинговых направлений будет содействовать специалистам КДЛ в формировании диагностически значимых лабораторных заключений по наиболее распространенным болезням.

Обсуждение и заключение

Результаты исследования демонстрируют, что в процессе деятельности специализированной КДЛ накапливаются большие массивы информации о редких, недостаточно изученных заболеваниях, которые могут быть использованы в нескольких направлениях.

Прежде всего, данные мониторинговых направлений могут быть применимы для совершенствования диагностического процесса. Знание нозологических форм, характерных для места локализации специализированной КДЛ, а также причин и типичных схем заказа лабораторных услуг позволяет специалистам КДЛ составить оптимальный алгоритм обследования пациентов с соответствующими заболеваниями и обеспечить клиницистов инструментами в целях поддержки принятия решений в части заказов дорогостоящих лабораторных услуг, в том числе в соответствии с конкретными диагностическими целями. Это позволяет сократить использование малоинформативных исследований и количество ложноположительных результатов, избежать лишних затрат

и представляется важным инструментом гармонизации преаналитического этапа деятельности, в рамках которого специалисты КДЛ, основываясь на опыте работы с подобной патологией, способны подобрать нужные исследования нужному пациенту в нужное время [7].

Кроме того, обобщенные данные мониторинговых заявок специализированной КДЛ могут служить информационной базой для отделений лечебного учреждения по обслуживанию больных с редкой патологией, что часто сопряжено с неудовлетворенными потребностями, проявляющимися в недостаточном понимании особенностей заболевания, оптимальных методов диагностики, профилактики или лечения [2, 5, 8, 9].

Анализ географического распределения пациентов с определенными заболеваниями является инструментом изучения регионарной патологии. С одной стороны, объективные данные о распространенности редких заболеваний и вероятности развития тех или иных патологических процессов в конкретной местности могут выступать источником формирования локальных нормативов и рекомендаций по обследованию, не менее ценных, чем национальные или международные рекомендации. С другой стороны, данные о локализации заболеваний позволяют анализировать предпосылки и причины их возникновения, а также факторы, влияющие на особенность их протекания.

Наконец, в части управляющих и обеспечивающих процессов КДЛ знание видов и сложности выполняемых исследований при определенных заболеваниях наряду со спросом на эти услуги позволяет:

- определить потребность в специалистах конкретной квалификации, что влияет на стратегии подбора, обучения и мотивации персонала;
- выявить основные направления и пропорции развития производства;
- оптимально организовать менеджмент товарно-материальных запасов и планировать потребность в оборудовании, реагентах и рас-

ходных материалах, необходимых для выполнения востребованных исследований.

Список литературы

1. Geerts A., De Koning F., Van Solinge W., De Smet P. and Egberts T. (2012). Instructions on laboratory monitoring in 200 drug labels. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50 (8).
2. Giacomelli R., Afeltra A., Alunno A., Baldini C., Bartoloni-Bocci E., Berardicurti O., Carubbi F., Cauli A., Cervera R., Ciccia F., Cipriani P., Confi F., De Vita S., Di Benedetto P., Doria A., Drasos AA, Favalli EG, Gandolfo S, Gatto M, Grebbiale RD, Liakouli V, Lories R, Lubrano E, Lunardi C, Margiotta DPE, Massaro L, Meroni P, Minniti A, Navarini L, Pendolino M, Perosa F, Pers JO, Prete M, Priori R, Puppo F, Quartuccio L, Ruffatti A, Ruscitti P, Russo B, Sarzi-Puttini P, Shoenfeld Y, Somarakis GA, Spinelli FR, Tinazzi E, Triolo G, Ursini F, Valentini G, Valesini G, Vettori S, Vitali C, Tzioufas AG. International consensus: What else can we do to improve diagnosis and therapeutic strategies in patients affected by autoimmune rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, antiphospholipid syndrome and Sjogren's syndrome)? The unmet needs and the clinical grey zone in autoimmune disease management. *Autoimmun Rev.* 2017 Sep; 16 (9): 911–924.
3. Raebel M, Lyons E, Andrade S et al. Laboratory monitoring of drugs at initiation of therapy in ambulatory care. *J Gen Intern Med.* 2005; 20 (12): 1120–1126. DOI: 10.1111/j.1525-1497.2005.0257.x.
4. Rigby W., Lampl K., Low J. and Furst D. (2017). Review of Routine Laboratory Monitoring for Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biologic or Nonbiologic DMARDs. *International Journal of Rheumatology*, 2017, pp. 1–15.
5. Stephenson D., Hu M., Romero K., Breen K., Burn D., Ben-Shlomo Y., Bhattacharya A., Isaac M., Venuto C., Kubota K., Little M., Friend S., Lovestone S., Morris H., Grosset D., Sutherland M., Gallacher J., Williams-Gray C., Bain L., Avilés E., Marek K., Toga A., Stark Y., Forrest Gordon M. and Ford S. (2015). Precompetitive Data Sharing as a Catalyst to Address Unmet Needs in Parkinson's Disease 1. *Journal of Parkinson's Disease*, 5 (3), pp. 581–594.
6. The Autoimmune Registry. (2019). List of Autoimmune Diseases – The Autoimmune Registry. [online] Available at: www.autoimmuneregistry.org/the-list-1 [Accessed 12 Oct. 2019].
7. Wik A., Gordon T., Kavanaugh A., Lahita R., Reeves W., van Venrooij W., Wilson M. and Fritzler M. (2004). Cutting edge diagnostics in rheumatology: The role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Care & Research*, 51 (2), pp. 291–298.
8. Winthrop K., Strand V., van der Heijde D., Mease P., Crow M., Weinblatt M., Bathon J., Burmester G., Dougados M., Kay J., Mariette X., van Vollenhoven R., Sieper J., Melchers F., Breedfeld F., Kalden J., Smolen J. and Furst D. (2018). The unmet need in rheumatology: Reports from the targeted therapies meeting 2017. *Clinical Immunology*, 186, pp. 87–93.
9. Winthrop K., Weinblatt M., Crow M., Burmester G., Mease P., So A., Bykerk V., van Vollenhoven R., Dougados M., Kay J., Mariette X., Sieper J., Melchers F., Cronstein J., Shevach E., Breedfeld F., Kalden J., Smolen J. and Furst D. (2019). Unmet need in rheumatology: reports from the Targeted Therapies meeting 2018. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78 (7), pp. 872–878.

Роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе и диагностике неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы и собственные данные)

Д. В. Сидоренко, ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

В. Д. Назаров, к.м.н., м.н.с. лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины Минздрава России

С. В. Лапин, к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра молекулярной медицины Минздрава России

В. Л. Эмануэль, д.м.н. проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор Научно-методического центра по молекулярной медицине Минздрава России

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Role of molecular genetic factors in pathogenesis and diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (literature review and own data)

D. V. Sidorenko, V. D. Nazarov, S. V. Lapin, V. L. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Неалкогольная жировая болезнь печени является самым распространенным заболеванием печени и, как правило, имеет доброкачественное течение. Но при формировании стеатогепатита значительно увеличивается вероятность развития фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. На данный момент нет надежных предикторов агрессивного течения заболевания, но наиболее перспективными кандидатами на эту роль могут стать молекулярно-генетические методы. В статье рассматривается роль генов PNPLA3, TM6SF2, SERPINA1 и HFE в патогенезе и течение неалкогольной жировой болезни печени, а также приведены данные по распространенности патологических аллелей данных генов среди пациентов, проживающих в г. Санкт-Петербурге.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, ген PNPLA3, ген TM6SF2, ген SERPINA1, ген HFE.

Summary

Non-alcoholic fatty liver disease is the most common liver disease, which usually has a benign course. After the occurrence of steatohepatitis the risk of developing fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma significantly increases. At the moment, there are no reliable predictors of the aggressive course of this patients' disease, but genetic aberrations are the most promising predictor markers. This article devoted to the role of the PNPLA3, TM6SF2, SERPINA1 and HFE genes in the pathogenesis and course of non-alcoholic fatty liver disease. Data of the prevalence of pathological alleles of these genes among patients living in St. Petersburg is also included.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, PNPLA3 gene, TM6SF2 gene, SERPINA1 gene, HFE gene.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) остается самым распространенным заболеванием печени и одной из ведущих причин трансплантации этого органа в развитых странах наряду с вирусным гепатитом С и циррозом, ассоциированным с употреблением алкоголя [1]. В зависимости от возраста, пола и этнической принадлежности частота НАЖБП в развитых странах варьирует в широких пределах – от 6 до 35 % (медиана 20 %) [2]. Основной клинической формой течения заболевания является простой стеатоз или неалкогольный жировой гепатоз (НАЖГ), но в 10 % случаев, то есть 2–5 % от всей популяции, наблюдается активное воспаление и фиброз паренхимы печени [3], – такую форму

называют неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). По данным некоторых авторов, у 2,5 % больных с НАСГ можно ожидать развития цирроза или гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), при этом прогрессия заболевания в цирроз и ГЦК в среднем происходит через 57 и 28 лет от начала заболевания соответственно [4]. Несмотря на медленное развитие патологического процесса, в связи с поздней диагностикой и бессимптомным течением многие авторы причисляют НАЖБП к ведущей причине криптогенного цирроза [5].

Формально НАЖБП является мультифакториальным заболеванием, в развитии которого участвуют разные факторы, однако ведущая роль в ее развитии принадлежит инсулиноре-

зистентности (ИР) и метаболическому синдрому (МС). Под влиянием снижения восприимчивости периферических тканей к инсулину и при повышении его концентрации в плазме крови происходит усиление липолиза и повышение концентрации свободных жирных кислот (СЖК). Последние в свою очередь поступают в печень и накапливаются в виде триглицеридов (ТГ). При этом снижается интенсивность окисления СЖК и усиливается путь выведения липидов из печени путем секреции ЛПОНП и ЛПНП. Таким образом, нарушается баланс накопления и утилизации липидов печени, что со временем приводит к стеатозу. Вместе с этим в гепатоцитах активируется β -пероксисомное и Ω -микро-сомное окисление, накапливаются

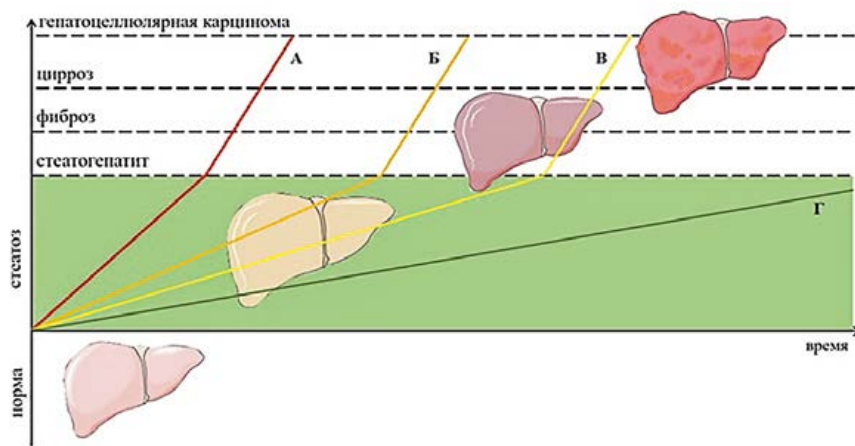


Рисунок 1. Варианты прогрессии НАЖБП с течением времени. Примечание: в зеленой зоне находится сравнительно доброкачественное течение болезни. Находясь в этой зоне, НАЖБП не влияет на продолжительность жизни больного (Г), однако при достижении стадии НАСГ заболевание прогрессирует до цирроза, и ГЦК значительно ускоряется (А, Б, В).

продукты перекисного окисления липидов, повреждающие митохондрии. Накопление FASL и ФНО запускает процессы апоптоза и некроза клеток печени, а воспалительная инфильтрация с течением времени приводит к фиброзу, циррозу и ГЦК [6]. Инсулинорезистентность ассоциирована с постоянным низкоактивным воспалением и выделением спектра паракринных медиаторов, высвобождающихся из иммунных и клеток жировой ткани, что опосредует повреждение печени и прогрессию заболевания [7]. Для формирования НАЖБП также важны факторы среды, такие как диета, ожирение, употребление медикаментов и сидячий образ жизни, дисбактериоз кишечника, а также различные генетические изменения [8].

Наиболее часто заболевание протекает в форме простого стеатоза, он сопровождается доброкачественным течением на протяжении многих лет и не является показанием к началу терапии (рис. 1 Г). Формирование стеатогепатита свидетельствует о более агрессивном течении НАЖБП и предрасполагает к стремительному прогрессу заболевания, который с высокой вероятностью приведет к сокращению продолжительности жизни (рис. 1 А, Б, В). Таким образом, для определения тактики ведения пациента необходимо спрогнозировать, как скоро произойдет конверсия НАЖГ в НАСГ.

На данный момент исследуется ряд модулирующих факторов, таких как показатели липидного спектра,

особенности питания, состав микробиоты кишечника, способных определять прогноз НАЖБП. В последнее время особое внимание привлекают генетические маркеры, способные не только усугублять течение заболевания, провоцируя формирования более агрессивных форм, но и быть основным триггером для его развития.

Так, в практических рекомендациях EASL по лечению НАЖБП уже появились упоминания о полиморфизмах I148M гена *PNPLA3* и E167K гена *TM6SF2* и их связи с риском развития НАСГ и ГЦК. Генетические маркеры, не имеющие прямой корреляции с механизмами инсулинорезистентности, способны определить прогноз для более широкой категории пациентов. Наличие полиморфизмов, связанных с развитием НАЖБП, может послужить основанием для более раннего начала терапии заболевания, определить показания к проведению биопсии печени, а также стать мишенью для таргетной терапии в дальнейшем. Сейчас рассматривается целый ряд генов-кандидатов, которые могут влиять на скорость развития заболевания, а также напрямую участвовать в патогенезе НАЖБП [9].

Полиморфизм I148M гена *PNPLA3*

В 2008 году в ходе исследований GWAS (Genome-Wide Association Studies) Romeo с коллегами обратили внимание на ген *PNPLA3* (*patatin like phospholipase domain containing 3*)

в связи со стойкой ассоциацией его полиморфизма I148M (rs738409 C>G) с повышенным накоплением жирового компонента в печени у больных НАЖБП [10].

Кодируемый белок гена *PNPLA3* (1-ацилглицерол-3-фосфат О-ацилтрансфераза [адипонутрин]) выполняет функции гидролазы триглицеридов, ацилтрансферазы лизофосфатидной кислоты и эстеразы ретинола пальмитата. В организме человека он преимущественно локализуется в звездчатых клетках печени и гепатоцитах, а также присутствует в сетчатке, коже, жировой ткани, почках, мозге и селезенке [11]. Адипонутрин в основном действует как триглицеридная гидролаза, переносящая полиненасыщенные жирные кислоты (ЖК) из триглицеридов в фосфатидилхолин, тем самым повышая соотношение ненасыщенных ЖК к насыщенным в печени [12].

При наличии I148M полиморфизма гена *PNPLA3* измененный белок теряет способность к гидролизу эмульсированных триглицеридов, откладывается вокруг жировых капель, препятствует фикциям других липолитических ферментов, что приводит к макровезикулярному стеатозу. Снижение внутривнутрипеченочного расщепления липидов нарушает секрецию липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП). При задержке гидролиза ретинола увеличивается жировая фракция в звездчатых клетках печени, которые активируются и трансформируются в миофибробластоподобные клетки, секретирующие коллаген. Нарушается соотношение функциональных клеток печени и соединительной ткани – развиваются фиброз и его осложнения [6].

В опытах на мышах с гиперэкспрессией I148M варианта гена *PNPLA3* было продемонстрировано повышение образования ЖК в печени, нарушение гидролиза ТГ и снижение в составе ТГ количества полиненасыщенных ЖК [13]. По данным других авторов, изолированное выключение гена у мышей с нормальным питанием не ведет к развитию НАЖБП, тогда как у мышей на диете с преобладанием сахарозы увеличивает риск заболевания в 2–3 раза [14]. В других

экспериментах при оглушении мутантного варианта гена с помощью антисмысловых олигонуклеотидов удалось добиться снижения содержания жирового компонента печени у мышей на высокоуглеводной диете, а также уменьшения процессов воспаления и фиброза в печени у животных с индуцирующим НАЖБП питанием [15]. Таким образом, можно говорить о том, что полиморфизм гена *PNPLA3* играет важную роль в патогенезе НАЖБП.

В мета-анализе, посвященном распространенности I148M полиморфизма гена *PNPLA3*, по данным 23 исследований по всему миру, в которых приняло более 16 тысяч человек, частота патологической G-аллели в группе контроля составила около 34,8 %, тогда как ее распространенность среди пациентов с НАЖБП – 49,5 % [16].

При изучении клинической значимости полиморфизма в дальнейших исследованиях S. Romeo с коллегами была установлена ассоциация между наличием полиморфизма гена *PNPLA3* и повышением значения АЛТ и сниженным содержанием адипонутрина [10]. S. Sookoian с коллегами обнаружили у гомозиготных носителей SNP I148M склонность к более интенсивному накоплению липидов в печени и более скорому формированию стеатогепатита по сравнению с гетерозиготами и пациентами без полиморфизма [17]. В опытах M. Krawczyk с коллегами наличие данного полиморфизма было названо самостоятельным фактором риска развития стеатоза S2–S3 и фиброза F2–F4, кроме того, носители чаще, нежели контрольная группа, нуждались в проведении биопсии печени [18]. Кроме того, было показано, что G-аллель полиморфизма в два раза повышает вероятность развития цирроза печени, в то время как у гомозиготных носителей риск утроен по сравнению с пациентами без мутации [19]. A. Khlaiphuengsin с коллегами было показано, что наличие I148M у больных с НАЖБП предрасполагает к формированию ГЦК, но не имеет влияния на ее прогноз [20]. Также не было установлено достоверной корреляции между наличием I148M

полиморфизма *PNPLA3* и ожирением (ИМТ), уровнями ТГ, ЛПНП, ЛПВП и сахарным диабетом второго типа [21] и индекса IR-HOMA [17]. Эти исследования позволяют предположить роль полиморфизма I148M как независимого от ИР механизма развития НАЖБП.

Таким образом, молекулярно-генетическое обследование на наличие полиморфизмов гена *PNPLA3* для прогноза скорости развития агрессивных форм НАЖБП может быть рекомендовано как пациентам с нарушением углеводного и жирового обменов, так и без них.

Полиморфизм E 167K гена *TM6SF2*

Еще одним геном, в отношении которого в ходе исследования GWAS была установлена связь с развитием НАЖБП, является *TM6SF2* (*transmembrane 6 superfamily member 2*) и его полиморфизм E 167K (rs2294918) [22].

Кодируемый белок гена *TM6SF2* осуществляет перенос нейтральных липидов из цитоплазмы в липидные капли в гепатоцитах, участвует в формировании ЛПОНП и ЛПНП [23]. Также ген широко экспрессируется в тонком кишечнике, в связи с чем исследователи предположили возможность его непосредственного влияния на абсорбцию жиров из ЖКТ. Эту гипотезу подтверждают эксперименты, выявившие более низкие уровни постпрандиальных ТГ крови у носителей данного полиморфизма [24].

Механизмы формирования стеатоза в данном случае недостаточно изучены, но известно, что супрессия гена приводит к снижению ЛПНП и холестерина плазмы, повышению внутриклеточного накопления ТГ и эфиров холестерина и повышению синтеза ТГ в печени [25]. Также отмечается перераспределение липидных фракций в печени в пользу более насыщенных, снижается содержание арахидоновой кислоты. Гепатоциты секретируют липопротеин-подобные фракции меньшего диаметра, количество эндосом и лизосом в них увеличивается, а активность митохондриального окисления, напротив, падает [26]. Также было установлено, что мутация повышает содержание циклина D1, p53 и Rb и снижает p27,

что нарушает энергетический метаболизм клеток и способствует развитию ГЦК [27].

В экспериментах нокаутирования *TM6SF2* с помощью малых интерферирующих РНК приводило к снижению экспрессии DGAT1 и DGAT2 (диацилглицерол О-ацилтрансфераза 1 и 2) и ACSS2 (ацил-коэнзим А синтетаза коротких цепей 2 семейства), эти ферменты необходимы для внутрипеченочного синтеза ТГ и продукции ЛПНП [28]. В опытах на мышах с дефицитом белка, кодируемого геном *TM6SF2*, были отмечены низкий уровень липидов плазмы и повышенное содержание липидного компонента в печени за счет угнетения секреции ТГ [29]. Таким образом, происходит перераспределение липидов в организме – липопротеины низких фракций задерживаются в печени, обуславливая ее стеатоз, но в то же время можно говорить о кардиопротективном действии мутации.

В исследовании, проведенном на 445 субъектах европеоидного происхождения, доля патологической аллели полиморфизма E 167K гена *TM6SF2* в контрольной группе составляет около 5,7 %, тогда как ее распространенность среди пациентов с НАЖБП – 11,5 % [30].

При изучении клинической значимости полиморфизма A. Viitasalo с коллегами обнаружили у носителей повышение уровня АЛТ, а также снижение содержания в плазме общего ХС, ТГ и ЛПНП [31]. P. Dongiovanni с коллегами установили, что, по данным биопсии, носители E 167K более интенсивно накапливают жировой компонент печени, а также быстрее развивают более агрессивные формы НАЖБП – стеатогепатит и фиброз [32]. Y. Liu с коллегами установили связь между наличием изменений в гене *TMSF2* и развитием фиброза посредством оценки выраженности признаков воспаления и баллонной дегенерации гепатоцитов в биоптатах печени. Также авторы установили, что наличие SNP E 167K коррелирует с наличием стеатоза и развитием фиброза у пациентов с НАЖБП независимо от других факторов, включая диабет, ожирение и генотип *PNPLA3* [33]. D. Kim с коллегами обнаружили ас-

социацию между наличием полиморфизма гена *TM6SF2* и повышенным риском развития диабета второго типа [34], что может являться дополнительным фактором накопления липидов в печени. Кроме того, E. Falletti с коллегами установили, что изменения в гене *TM6SF2* достоверно чаще обнаруживаются в пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, что может говорить о канцерогенном влиянии мутации [35].

Таким образом, данный полиморфизм обуславливает перераспределение липидных фракций в организме в пользу их отложения в печени и тем самым развитие более агрессивным форм течения НАЖБП.

Полиморфизм гена *SERPINA1*, кодирующего альфа1-антитрипсин

Воспаление играет большую роль в развитии ожирения и НАЖБП [36]. Детали этого механизма еще не до конца ясны, но установлено, что ФНО, ИЛ-1 β и ИЛ-18 способны влиять как на иммунитет, так и на метаболизм в целом [37]. В исследованиях на мышцах с дефицитом нейтрофильной эластазы (фермент, участвующий в синтезе предшественников вышеупомянутых цитокинов) была продемонстрирована устойчивость к набору веса, инсулинорезистентности и накоплению жиров в печени на высокожировой диете [38]. В связи с этим внимание исследователей привлек ген *SERPINA1* (*serine protease inhibitor; group A, member 1*), кодирующий белок α 1-антитрипсин (A1AT) или α 1-ингибитор протеиназы. Существует несколько вариантов аллелей *SERPINA1*, в европейской популяции наиболее распространены M1, M2, M3, M4, S и Z. Подтип M не вызывает патологии (100%-ная концентрация A1AT), а варианты S и Z снижают уровень A1AT в плазме до 50–60% и 10–15% соответственно [39].

Сывороточный белок α 1-антитрипсин выполняет функцию главного плазменного ингибитора сериновых протеаз с высокой аффинностью к нейтрофильной эластазе (НЭ), а также относится к группе острофазных белков. Его активность наиболее высока в рыхлой соединительной ткани нижних дыхательных путей, где он

препятствует бесконтрольному протеолизу в ответ на воспаление [40]. A1AT обладает иммуномодуляторной активностью – в экстрацеллюлярном матриксе он связывается с продуктами дегрануляции нейтрофилов и предотвращает их ферментативную активность, тем самым препятствуя образованию провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1 β и ИЛ-18) [41].

Основным механизмом повреждения печени при нарушениях в гене *SERPINA1*, особенно выраженном у P1*Z-фенотипа, является накопление дефектного A1AT и блок его секреции из ЭПС гепатоцитов. Это ведет к так называемому отклику неструктурированных белков, в результате которого клетка погибает апоптозом. Также это может приводить к пролиферации клеток, сопутствующему воспалению и фиброзу [42].

По данным мета-анализа 373 когорт, включавших в себя более 161 тысячи человек по всему миру, распространенность P1*S-аллели гена *SERPINA1* составила 2,95%, а P1*Z-аллели – 1,07% [43].

При изучении клинической изменений в гене *SERPINA1* K. Hamesch с коллегами у взрослых P1*ZZ-носителей зарегистрировали более выраженное накопление жира и нарушение выведения липидов из печени, а также более высокие показатели фиброза по сравнению с контрольной группой по данным неинвазивных методов исследования [44]. A. Regev с коллегами обнаружили, что пациенты с НАЖБП и P1MZ-фенотипом предрасположены к развитию более тяжелых повреждений печени и чаще нуждаются в трансплантации этого органа по сравнению с контрольной группой [45]. Это может говорить об отягощающем влиянии мутаций в генах *SERPINA1* на течение НАЖБП. Однако другие исследователи пришли к выводу, что мутации в гене *SERPINA1* ассоциированы с гиперферритинемией и накоплением железа в синусоидах печени и не связаны напрямую с повреждением печени при НАЖБП [46]. P. Strnad с коллегами при изучении когорты из 1184 человек с НАЖБП установили, что Z-аллель гена *SERPINA1* является фактором риска развития цирроза, в то время

как в отношении S-аллели такой корреляции установлено не было [47]. E. El-Rayah с коллегами установили, что Z-фенотип α 1-антитрипсина чаще встречается среди пациентов с НАЖБП-индуцированным циррозом, что может говорить о мутациях в гене *SERPINA1* как об отягощающем факторе течения заболевания [48].

Таким образом, исследование пациентов с НАЖБП на наличие мутаций в гене *SERPINA1* могут послужить в качестве дифференциальной диагностики с повреждением печени при дефиците α 1-антитрипсина, а также фактором прогноза развития агрессивных форм заболевания.

Гемохроматоз и НАЖБП

Гиперферритинемия рассматривается как одна из причин развития НАЖБП, обусловленная накоплением железа в гепатоцитах [49]. Отмечено, что перегрузка печени железом ведет к нарушению метаболизма инсулина в печени крыс [50]. Кроме того, диета с ограничением потребления железа у пациентов с НАЖБП не только снижала инсулинорезистентность сильнее, нежели простая коррекция образа жизни [51], но и напрямую влияла на уровень печеночных трансаминаз [52].

Полиморфизм C282Y гена *HFE* является ведущей причиной развития наследственного гемохроматоза во всем мире [53]. У млекопитающих контроль метаболизма железа достигается за счет регуляции его абсорбции в двенадцатиперстной кишке белком гепсидином. Он принимает участие в деградации экспортера железа ферропортина (FPN), таким образом снижая пассаж железа из энтероцитов в кровяное русло. Гепсидин синтезируется в печени, этот процесс стимулируется повышением концентрации железа крови и осуществляется посредством взаимодействия белка HFE с геном *HAMP* (*hepcidin antimicrobial peptide*) в гепатоците [54, 55].

Бесконтрольное повышение поступления железа приводит к полному насыщению буферной емкости трансферрина сыворотки. Это ведет к появлению в крови не связанных с трансферрином и обладающих высокой реактивностью форм железа.

Эти прооксидантные формы попадают в паренхиму печени, где образуются свободные активные радикалы [56]. Это приводит к повреждению ДНК, белков и мембран. Вызванное железом повреждение гепатоцитов приводит к паракринной индукции секреции коллагена звездчатыми клетками и перипортальными миофибробластами и в результате к фиброзу, длительно текущему микроузловому циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме [57].

В моделях НАЖБП, индуцированной высокожировой диетой, у нокаутированной по *HFE* мыши наблюдались нарушение накопления жиров в печени в пользу липогенеза и митохондриальная дисфункция, что может говорить о протективной роли гена в отношении липотоксичности. Также у животного были зарегистрированы более низкий уровень гепсидина и более выраженный стеатоз [58]. Кроме того, нокаутированная мышь продемонстрировала повышенный уровень внутривнутрипеченочной гипоксии даже на сбалансированной диете, а также увеличение уровня ФНО- α , свободных радикалов кислорода и активности макрофагов. Это отражает окислительное и провоспалительное действие избытка железа в печени [59].

При анализе 24 исследований, проводимых в Европе, с общим числом участников 6203 человека частота встречаемости полиморфизма C282Y гена *HFE* составила около 90 : 1000 в гетерозиготном варианте и 4 : 1000 – в гомозиготном [60].

При исследовании клинической значимости изменений в гене *HFE* Q. Ye с коллегами в мета-анализе, охватившем 43 исследования с 5758 больными НАЖБП и контрольной группой из 14741 человек, установили, что мутации C282Y и H63D повышают вероятность развития НАЖБП и ГЦК, но не цирроза печени [61]. Однако L. Valenti с коллегами установили, что отложение железа в гепатоцитах связано с более выраженным поражением печени при НАЖБП, при этом ассоциации между генотипом *HFE* и развитием фиброза обнаружено не было [51]. J. Raszeja-Wyszomirska с коллегами также назвали повышение уровня железа сыворотки фактором риска развития более агрессивных

Таблица
Распространенность патологических аллелей генов *PNPLA3*, *SERPIN1* и *HFE* среди
пациентов с НАЖБП, живущих в г. Санкт-Петербурге

<i>PNPLA3</i>	GG, %	GC, %	CC, %	
	11,1	47,2	41,7	
<i>SERPINA1</i>	MS, %	MZ, %	MM, %	
	8,3	5,6	86,1	
<i>HFE</i>	H63D, %	S65C, %	C282Y, %	WT, %
	16,7	2,8	5,6	75,0

форм НАЖБП, но не нашли такой связи с генотипом *HFE* [62]. Кроме того, в мета-анализе R. Hernaez и коллег, где оценивались 16 исследований из различных стран и включающих 1836 пациентов с НАЖБП и 7388 здоровых людей, не было установлено связи между развитием заболевания и генетическими вариантами гена *HFE* [63].

Таким образом, уровень сывороточного железа является более точным предиктором развития осложненных форм НАЖБП, нежели генотип *HFE*.

Исследование в Санкт-Петербурге

Для пилотного исследования, проведенного в г. Санкт-Петербурге, было отобрано 36 пациентов с подтвержденным диагнозом НАЖБП. Диагноз был верифицирован гистологическим методом (стеатоз в более 5 % гепатоцитов), по результатам теста ФиброМакс и эластометрии. В данной группе исследовалась распространенность патологических аллелей генов *PNPLA3*, *SERPINA1* и *HFE* для оценки их влияния на развитие и прогрессию заболевания. Точечные замены определялись с использованием метода ПЦР в реальном времени («ТестГен», Россия).

Данные о распространенности *PNPLA3* являются сопоставимыми с другими исследованиями, проводимыми среди пациентов с НАЖБП европейского, латиноамериканского и монголоидного происхождения (Kantartziset, 2009; Valenti, 2010; Peng, 2012). Полученные результаты говорят о большей распространенности мутантной аллели среди больных НАЖБП по сравнению со здоровой популяцией, что может указывать на участие мутации в формировании стеатоза гепатоцитов. Дальнейшего изучения требует взаимосвязь гомозиготного и гетерозиготного носитель-

ства H148M со скоростью прогрессии НАЖБП у пациентов данной группы.

Результаты исследования распространенности генетических aberrаций в гене *SERPINA1* говорят о большей частоте встречаемости мутантной аллели среди больных НАЖБП по сравнению с общей популяцией, в том числе по данным исследований, приводимых в России [64]. Это, с одной стороны, может говорить о важной роли гена *SERPINA1* в жировом обмене гепатоцитов, а с другой – о гиподиагностике дефицита α 1-антитрипсина, который в клинической практике принимают за НАЖБП. Также требует дальнейшего изучения вероятное влияние патологии гена *SERPINA1* на скорость прогрессии заболевания.

Данные о распространенности мутаций в гене *HFE* сопоставимы с частотой их встречаемости в здоровой популяции, что в совокупности с данными других авторов может говорить о преимущественном влиянии нарушений гена на течение уже имеющегося стеатоза печени. Однако требует дальнейшего исследования взаимосвязь носительства мутантных аллелей гена *HFE* и скорости формирования более продвинутых морфологических стадий НАЖБП.

Заключение

Неалкогольная жировая болезнь печени – одна из наиболее частых патологий печени в развитых странах, и ее распространенность продолжает расти. Ключевым моментом, когда течение болезни становится неблагоприятным и угрожает развитием цирроза и ГЦК, является переход простого неалкогольного стеатоза в стеатогепатит. Эту метаморфозу сложно спрогнозировать для конкретного пациента, но исследуется

целых ряд маркеров, способных предсказать переход болезни в более агрессивную стадию. На данный момент наиболее перспективными методами представляются молекулярно-генетические.

Первым геном, для которого накопилась наиболее прочная доказательная база, является *PNPLA3* и его полиморфизм I148M. В отношении его установлена связь с формированием НАЖБП, повышением уровня печеночных трансаминаз, более выраженным накоплением липидов в печени, более быстрым формированием фиброза, а также повышенным риском развития ГЦК. Второй ген, внесенный в рекомендации по диагностике и лечению НАЖБП [65], *TM6SF2* и его полиморфизм E 167K, также повышает вероятность развития заболевания, предрасполагает к повышенному накоплению липидов в печени, цитолитическому синдрому, развитию фиброза и цирроза. Исследование изменений в генах *SERPINA1* и *HFE* может быть полезным при дифференциальной диагностике НАЖБП с дефицитом $\alpha 1$ -антитрипсина и наследственным гемохроматозом. Кроме того, наличие Z-аллели гена *SERPINA1* также способно отягощать течение неалкогольного гепатоза и способствовать более скорому его переходу в стеатогепатит.

Таким образом, молекулярно-генетическое исследование на наличие полиморфизмов в генах *PNPLA3*, *TM6SF2*, *SERPINA1* и *HFE* может быть рекомендовано всем пациентам с НАЖБП для формирования более точного прогноза течения заболевания.

Список литературы

1. Zezos P., and E.L. Renner. 2014. Liver transplantation and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 20: 15532–15538.
2. Younossi Z.M., Stepanova M., Afendy M., Fang Y., Younossi Y., Mir H., Sfrshord M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2011, 9, 524–530.
3. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Aug, 34 (3): 274–85.
4. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver versus nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015, 13: 643–654.
5. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004, 40: 578–84.
6. А. С. Тихомирова, В. А. Кисляков, И. Е. Байкова, И. Г. Никитин. Клинико-морфологические параллели полиморфизма гена *PNPLA3* у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. *Терапевтический архив.* 2018, 85–88.
7. Ercin, C.N., T. Dogru, H. Genc et al. 2015. Insulin resistance but not visceral adiposity index is associated with liver fibrosis in nondiabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 13: 319–325.
8. Kovalic AJ, Banerjee P, Tran QT, Singal AK, Satapathy SK. Genetic and Epigenetic Culprits in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol.* 2018 Dec, 8 (4): 390–402.
9. Danford CJ, Yao ZM, Jiang ZG. Non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review of genetics. *J Biomed Res.* 2018 Nov 20; 32 (5): 389–400.
10. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008 Dec 40 (12): 1461–5.
11. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, et al. *PNPLA3* has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet.* 2014; 23 (15): 4077–4085.
12. Mitsche MA, Hobbs HH, Cohen JC (2018) Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 promotes transfer of essential fatty acids from triglycerides to phospholipids in hepatic lipid droplets. *J Biol Chem* 293 (18): 6958–6968.
13. Li JJ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, Castro-Perez J, Cohen JC, Hobbs HH. Chronic overexpression of *PNPLA3*I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest.* 2012 Nov; 122 (11): 4130–44.
14. Smagris E, BasuRay S, Li J et al (2015) *Pnpla3*I148M knockin mice accumulate *PNPLA3* on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology* 61 (1): 108–118.
15. Lindén D, Ahnmark A, Pingitore P et al. *Pnpla3* silencing with antisense oligonucleotides ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in *Pnpla3* I148M knock-in mice. *Mol Metab.* 2019 Apr; 22: 49–61.
16. Xu R, Tao A, Zhang S, Deng Y, Chen G. Association between patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (*PNPLA3*) polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease: a HuGE review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015 Mar 20; 5: 9284.
17. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (*PNPLA3*) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2011 Jun, 53 (6): 1883–94.
18. Krawczyk M., Rau, M., Schattnerberg et al. (2016). Combined effects of the *PNPLA3*rs738409, *TM6SF2*rs58542926, and *MBOAT7*rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *Journal of Lipid Research*, 58 (1), 247–255.
19. Vespasiani-Gentilucci, U., Gallo, P., Porcari, A. et al. (2016). The *PNPLA3* rs738409 C > G polymorphism is associated with the risk of progression to cirrhosis in NAFLD patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51 (8), 967–973.
20. Khlaiphuengsin A, Kiatbumrung R, Payungporn S, Pinjaroen N, Tangkijvanich P. Association of *PNPLA3* Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Development and Prognosis in Viral and Non-Viral Chronic Liver Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015, 16 (18): 83.
21. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF. *PNPLA3* variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology.* 2010 Sep, 52 (3): 904–12.
22. Kozlitina J, Smagris E, Stender S et al. Exome-wide association study identifies a *TM6SF2* variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2014 Apr; 46 (4): 352–6.
23. Ehrhardt N, Doche ME, Chen S et al. Hepatic *TM6SF2* overexpression affects cellular ApoB-trafficking, plasma lipid levels, hepatic steatosis and atherosclerosis. *Hum Mol Genet.* 2017 Jul 15, 26 (14): 2719–2731.
24. E.A. O'Hare, R. Yang, L.M. Yerges-Armstrong, U. Sreenivasan, R. McFarland, C. C. Leitch, et al., *TM6SF2* rs58542926 impacts lipid processing in liver and small intestine, *Hepatology* 65 (5) (2017) 1526–1542.
25. Chen LZ, Xia HH, Xin YN, Lin ZH, Xuan SY. *TM6SF2* E167K variant, a novel genetic susceptibility variant, contributing to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Transl Hepatol* 2015; 3: 265–270.
26. Ruhanen H, Nidhina Haridas PA, Eskelinen EL, Eriksson O, Olkkonen VM, Käkälä R. Depletion of *TM6SF2* disturbs membrane lipid composition and dynamics in HuH7 hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017 Jul, 1862 (7): 676–685.
27. Du S, Lu L, Miao Y, Jin W, Li C, Xin Y, Xuan S. E167K polymorphism of *TM6SF2* gene affects cell cycle of hepatocellular carcinoma cell HEPA 1–6. *Lipids Health Dis.* 2017 Apr 13, 16 (1): 76.
28. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, et al. *TM6SF2* is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111: 8913–8918.
29. Smagris E, Gilyard S., BasuRay S., Cohen J.C. and Hobbs H.H. (2016) Inactivation of *TM6sf2*, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 291, 10659–10676.
30. Di Costanzo A, Belardinelli F, Bailetti D et al. Evaluation of Polygenic Determinants of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) By a Candidate Genes Resequencing Strategy. *Sci Rep.* 2018 Feb 27; 8 (1): 3702.
31. Viitasalo A, Pihlajamäki J, Paananen J, Atalay M, Lindi V, Lakka TA. Associations of *TM6SF2* 167K allele with liver enzymes and lipid profile in children: the PANIC Study. *Pediatr Res* 2016, 79: 684–688.
32. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 2015; 61: 506–514.
33. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB. *TM6SF2* rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014, 5: 4309.
34. Kim DS, Jackson AU, Li YK, Stringham HM, Kuusisto J, Kangas AJ. Novel association of *TM6SF2* rs58542926 genotype with increased serum tyrosine levels and decreased apoB-100 particles in Finns. *J Lipid Res* 2017; 58: 1471–1481.
35. Falletti E, Cussigh A, Cmet S, Fabris C, Toniutto P. *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2016; 48: 69–75.
36. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb, 11 (2): 98–107.
37. Netea MG, Joosten LA, Lewis E et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2006 Jun, 12 (6): 650–6.
38. Mansuy-Aubert V, Zhou QL, Xie X et al. Imbalance between neutrophil elastase and its inhibitor $\alpha 1$ -antitrypsin in obesity alters insulin sensitivity, inflammation, and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013 Apr 2, 17 (4): 534–48.
39. ATS/ERS, American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168 (2003) 818–900.
40. Silva, D., Oliveira, M. J., Guimarães et al. (2016). Alpha-1-antitrypsin (*SERPINA1*) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respiratory Medicine*, 116, 8–18.

41. Toldo S, Seropian IM, Mezzaroma E, Van Tassel BW, Salloum FN, Lewis EC, Voelkel N, Dinarello CA, Abbate A. Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Aug; 51 (2): 244–51.
42. Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, et al. alpha1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2016 и 2: 16051.
43. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest.* 2002 Nov; 122 (5): 1818–29.
44. Hamesch K, Mandorfer M, Pereira VM et al. European Alpha1-Liver Study Group. Liver Fibrosis and Metabolic Alterations in Adults With alpha-1-antitrypsin Deficiency Caused by the Pi*ZZ Mutation. *Gastroenterology.* 2019 Sep; 157 (3): 705–719.
45. Regev A, Guequeta C, Molina EG et al. Does the heterozygous state of alpha-1 antitrypsin deficiency have a role in chronic liver diseases? Interim results of a large case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul; 43 Suppl 1: S30–5.
46. Valenti L, Dongiovanni P, Piperno A et al. Alpha 1-antitrypsin mutations in NAFLD: high prevalence and association with altered iron metabolism but not with liver damage. *Hepatology.* 2006 Oct; 44 (4): 857–64.
47. Strnad P, Buch S, Hamesch K et al. Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis. *Gut.* 2019 Jun; 68 (6): 1099–1107.
48. El-Rayah EA, Twomey PJ, Wallace EM et al. Both alpha-1-antitrypsin Z phenotypes and low caeruloplasmin levels are over-represented in alcohol and nonalcoholic fatty liver disease cirrhotic patients undergoing liver transplant in Ireland. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Apr; 30 (4): 364–367.
49. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 172–178.
50. Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, et al. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol* 2008, 172: 738–747.
51. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 1251–1258.
52. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002, 122: 931–939.
53. Bacon B. R., P. C. Adams, K. V. Kowdley, L. W. Powell, and A. S. Tavill. 2011. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54: 328–343.
54. Fleming R. E., and P. Ponka. 2012. Iron overload in human disease. *N. Engl. J. Med.* 366: 348–359.
55. Chua A. C., R. M. Graham, D. Trinder, and J. K. Olynyk. 2007. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44: 413–459.
56. Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol* 2014, 45, 5.
57. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996, 13–30, 16.
58. Tan TC, Crawford DH, Jaskowski LA et al. Altered lipid metabolism in Hfe-knockout mice promotes severe NAFLD and early fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Nov, 301 (5): G865–76.
59. Wagner J, Fillebeen C, Halliotis T, Charlebois E, Katsarou A, Mui J, Valli H, Pantopoulos K. Mouse models of hereditary hemochromatosis do not develop early liver fibrosis in response to a high fat diet. *PLoS One.* 2019 Aug 23; 14 (8): e0221455.
60. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology.* *Am J Epidemiol.* 2001 Aug 1; 154 (3): 193–206.
61. Ye Q, Qian BX, Yin WL, Wang FM, Han T. Association between the HFE C282Y, H63D Polymorphisms and the Risks of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 5,758 Cases and 14,741 Controls. *PLoS One.* 2016 Sep 22; 11 (9): e0163423.
62. Raszeja-Wyszomirska J, Kurzawski G, Lawniczak M, Miezynska-Kurtycz J, Lubinski J. Nonalcoholic fatty liver disease and HFE gene mutations: a Polish study. *World J Gastroenterol.* 2010 May 28; 16 (20): 2531–6.
63. Hemaerz R, Yeung E, Clark JM, Kowdley KV, Brancati FL, Kao WH. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2011 Nov; 55 (5): 1079–85.
64. Первакова МЮ, Чудинов АЛ, Лапин СВ и др. Диагностическая и клиническая значимость определения фенотипа α-1-антитрипсина при системных васкулитах. Научно-практическая ревматология. 2017; 55 (2): 164–168.
65. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016 Jun; 64 (6): 1388–402.

Для цитирования: Сидоренко Д.В., Назаров В.Д., Лапин С.В., Эмануэль В.А. Роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе и диагностике неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы и собственные данные). Медицинский алфавит. 2020;(5):13–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-13-19>

For citation: Sidorenko D.V., Nazarov V.D., Lapin S.V., Emanuel V.L. Role of molecular genetic factors in pathogenesis and diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (literature review and own data). *Medical alphabet.* 2020; (5):13–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-13-19>



DOI: 10.33667/2078-5631-2020-5-19-24

Орфанный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе

Ю.В. Миролюбова, врач клинической лабораторной диагностики, ассистент кафедры лабораторной медицины и генетики
Н.С. Тимофеева, врач-гематолог
В.А. Барт, к.ф.-м.н., в.н.с. НИЛ биостатистики
Е.В. Толстомятова, врач клинической лабораторной диагностики
Е.С. Фетисов, врач клинической лабораторной диагностики
В.В. Стругов, врач-гематолог
В.М. Соловьев, клинический ординатор кафедры лабораторной медицины и генетики
А.Ю. Зарицкий, д.м.н. проф., директор института гематологии, г.н.с. НИЛ онкогематологии
Т.В. Вавилова, д.м.н. проф., зав. кафедрой лабораторной медицины и генетики

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia

Yu. V. Mirolyubova, N. S. Timofeeva, V. A. Bart, V. M. Solovyov, E. V. Tolstopyatova, E. S. Fetisov, V. V. Strugov, A. Yu. Zaritsky, T. V. Vavilova
 National Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Актуальность и цели. **Детекция минимальной остаточной болезни (МОБ) при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) методом многоцветной проточной цитометрии** нашла широкое применение в клинических исследованиях для оценки эффективности лечения. Метод совершенствуется в направлении поиска наиболее чувствительных и специфичных маркеров для применения в панели для 6–8 цветных цитометров. По литературным данным, ROR1 демонстрирует высокую экспрессию на ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых лимфоцитах, что отличает его от других маркеров, применяющихся для выявления МОБ при ХЛЛ. Цель исследования: определение информативности маркера ROR1 в четырехцветной панели для оценки минимальной остаточной болезни при ХЛЛ методом проточной цитометрии. Материалы и методы. Проанализировано 64 образца костного мозга 37 пациентов с верифицированным диагнозом ХЛЛ после 3-го и 6-го курса терапии по схеме «бендамустин + ритуксимаб» (BR) – 15 МОБ-отрицательных и 49 МОБ-положительных. Количественное определение МОБ проводилось стандартизованным методом четырехцветной проточной цитометрии по рекомендациям ERIC (Европейская инициатива по изучению ХЛЛ) с включением в диагностическую панель маркера ROR1. Выполнен дискриминационный анализ дифференцирующих свойств диагностических маркеров с помощью программы Statistica 10. Результаты. ROR1 продемонстрировал высокие дифференцирующие свойства в отношении ХЛЛ-клеток и зрелых лимфоцитов. Во всех проанализированных образцах отмечалась яркая мономорфная экспрессия ROR1 на ХЛЛ-клетках и В-клеточных предшественниках и отсутствие его экспрессии на зрелых лимфоцитах. Выводы. ROR1 является высокоспецифичным и чувствительным маркером для выявления ХЛЛ-клеток среди зрелых лимфоцитов. Высокая экспрессия ROR1 на нормальных В-клеточных предшественниках требует применения ROR1 в сочетании с маркером, дифференцирующим ХЛЛ-клетки от клеток-предшественников (CD81).

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, минимальная остаточная болезнь, ROR1.

Summary

Background and Aims. **The detection of minimal residual disease (MRD) of chronic lymphocytic leukemia (CLL) using multicolor flow cytometry** has been widely used in clinical studies to evaluate the effectiveness of treatment. The method is being improved by searching for the most sensitive and specific markers for use in panels for 6–8 color cytometers. According to published data, ROR1 shows high expression on CLL cells, and lack of expression on mature lymphocytes, which distinguishes it from other markers used to detect MRD in CLL. Aim: to determine a significance of ROR1 for detection of MRD CLL by flow cytometry in a 4-color panel. Materials and Methods. We analyzed 64 bone marrow samples of 37 patients with a verified diagnosis of CLL after the 3rd and 6th cycles of therapy according to bendamustine and rituximab (BR) regimen – 15 MRD-negative and 49 MRD-positive. Quantitative determination of MRD was carried out by the standardized method of 4-color flow cytometry according to the recommendations of ERIC (European research initiative on CLL) with the inclusion of ROR1 in the diagnostic panel. A discriminatory analysis of the differentiating properties of diagnostic markers was performed using Statistica 10. Results. ROR1 has demonstrated high differentiating properties on CLL cells and mature lymphocytes. All the analyzed samples showed a bright monomorphic expression of ROR1 on CLL cells and B-cell precursors, and the absence of its expression on mature lymphocytes. Conclusion. ROR1 is a highly specific and sensitive marker for the detection of CLL cells among mature lymphocytes. The high expression of ROR1 on normal B-cell precursors requires the use of ROR1 in combination with a marker that differentiates CLL cells from progenitor cells (CD81).

Key words: chronic lymphocytic leukemia, minimal residual disease, ROR1.

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – это заболевание, характеризующееся пролиферацией злокачественных В-лимфоцитов с иммунофенотипом CD19⁺, CD23⁺ и CD5⁺. [5, 9]. В диагностическую панель ХЛЛ входят как обязательные маркеры CD19, CD5, CD23, каппа, лямбда, так и дополнительные для проведения дифференциальной диагностики с другими В-клеточными опухолями: CD20, CD22, CD79b, CD43, CD200, CD10, ROR1 [6].

Важной проблемой лабораторной диагностики при лечении ХЛЛ представляется определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Большим клиническим вызовом является тот факт, что эрадикация клеток ХЛЛ любой доступной терапией, кроме аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, не приводит к излечению от заболевания, а лишь к временной ремиссии, во время которой заболевание не манифестирует клинически, но клетки ХЛЛ продолжают персистировать в организме. В дальнейшем они являются субстратом для прогрессии заболевания, количественно коррелируя со степенью риска рецидива [5–8].

Для выявления МОБ после проведения противоопухолевой терапии используется многоцветная проточная цитометрия в соответствии со стандартизированным протоколом [7, 8]. Этот многопараметрический анализ основан на скрининге антигенного представительства CD19, CD5, CD20, CD22, CD43, CD38, CD45, CD79b и CD81 [7, 8]. До настоящего времени нет единого мнения о том, какие маркеры следует включать в диагностические алгоритмы. Добавление новых высокоспецифичных маркеров к стандартизированным панелям может улучшить точность выявления МОБ. Для ХЛЛ таким маркером может быть подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор-1 (ROR1) [1–3, 10], учитывая его профиль экспрессии на опухолевых клетках.

ROR1 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ, состоящего из ROR1 и ROR2. ROR1 широко вовлечен в процессы нормального эмбрионального развития, но его экспрессия на большинстве зрелых клеток отсутствует. Во взрослом организме экспрессия ROR1 обнаружена в жировой ткани, паренхиме поджелудочной железы,

легких, на мезенхимальных клетках и на предшественниках В-лимфоцитов [1–3]. В последнее время возрос интерес к ROR1 в связи с его участием в патогенезе злокачественных новообразований. В большинстве исследований было высказано предположение, что ROR-1 может стимулировать различные сигнальные пути, результатом чего является увеличение выживаемости, пролиферации и метастазирования опухолевых клеток [1–3].

Первоначально отчетливая высокая экспрессия ROR1 была обнаружена на опухолевых клетках при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ), в то время как ROR2 на них не определяется. В дальнейшем экспрессия ROR1 была обнаружена при неходжкинских лимфомах, остром лимфобластном лейкозе, раке легкого, толстой кишки, поджелудочной железы, матки, яичника, молочной железы, яичка, предстательной железы и меланоме [1–3]. В работе Uhrmacher *et al.* [10] уровень ROR1 был определен у 177 пациентов с ХЛЛ: из них 105 пациентов ранее не получали лечение и 72 прошли различное количество курсов противоопухолевой тера-

пии. В ходе анализа полученных данных было выявлено, что ROR1 равномерно и высоко экспрессирован в 96,8 % (80,1–99,8 %) случаев на CD19⁺/CD5⁺-клетках на момент постановки диагноза ХЛЛ. Стадия и сопутствующая патология никак не влияли на профиль экспрессии ROR1, также не было выявлено значимой разницы уровня экспрессии ROR1 на ХЛЛ-клетках на всех стадиях лечения, независимо от режима проводимой противоопухолевой терапии. Уровень экспрессии ROR1 не был ассоциирован с такими прогностическими факторами, как CD38 и ZAP70. В качестве контроля были проанализированы образцы периферической крови здоровых доноров. Для исследования были выбраны популяции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и NK-клеток. Экспрессия ROR1 была стабильно низкой на всех контрольных группах проанализированных клеток.

Данные о применении ROR1 для детекции МОБ при ХЛЛ впервые были представлены в работе Farren *et al* [4]. Минимальная остаточная болезнь была определена методом проточной цитометрии у 56 больных (86 образцов) с использовани-

Таблица 1
Четырехцветная панель для диагностики МОБ ХЛЛ (шесть пробирок)

№ пробирки	Флюорохромы для четырехцветной панели			
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
1	CD45	CD14	CD19	CD3
2	CD20	CD38	CD19	CD5
3	CD81	CD22	CD19	CD5
4	CD79b	CD43	CD19	CD5
5	slgk	slgλ	CD19	CD5
6	CD160	ROR1	CD19	CD5

Примечание: (FITC – изотиоцианат флуоресцеина, PE – фикоэритрин, PerCP-Cy5.5 – перидинин хлорофилл протеин-цианин 5.5, APC – аллофикоцианин, CD – кластер дифференцировки).

Таблица 2
Чувствительность (SE), специфичность (SP) и прогностическая значимость отрицательного и положительного результатов (NPV и PPV) диагностических маркеров для определения МОБ ХЛЛ

	CD20	CD38	CD22	CD81	CD79b	CD43	CD160	ROR1
SE	0,71	1,00	0,18	0,97	0,88	0,97	0,29	0,97
SP	0,43	0,36	0,43	0,50	0,50	0,43	1,00	0,93
NPV	0,81	0,83	0,50	0,86	0,86	0,84	0,93	0,96
PPV	0,50	1,00	0,13	0,88	1,00	0,86	0,29	0,93

ем антител CD2 FITC, CD5 Pe-Cy7, CD19 PerCP5.5, CD45 V500, CD160 PE, ROR-1AF647. В работе отмечались высокая специфичность, экономичность и простота исследования. Вместе с тем количество

проанализированных случаев было ограниченным. A. Rawstron отмечает, что ROR1 является перспективным маркером для детекции МОБ и его применение нуждается в дальнейшем исследовании [8].

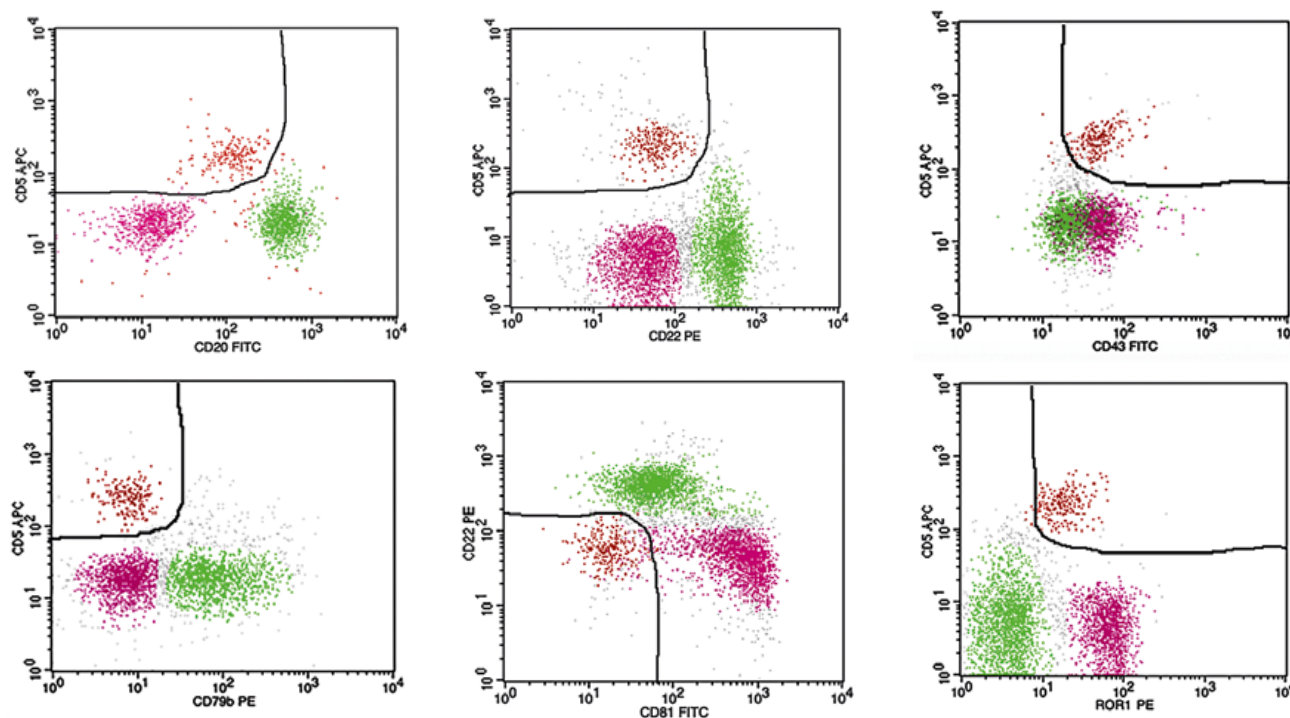


Рисунок 1. Выделение популяции ХЛЛ-клеток (выделены красным цветом) среди всех В-клеток (зеленые – зрелые В-лимфоциты, малиновые – В-клеточные предшественники или гематопоны).

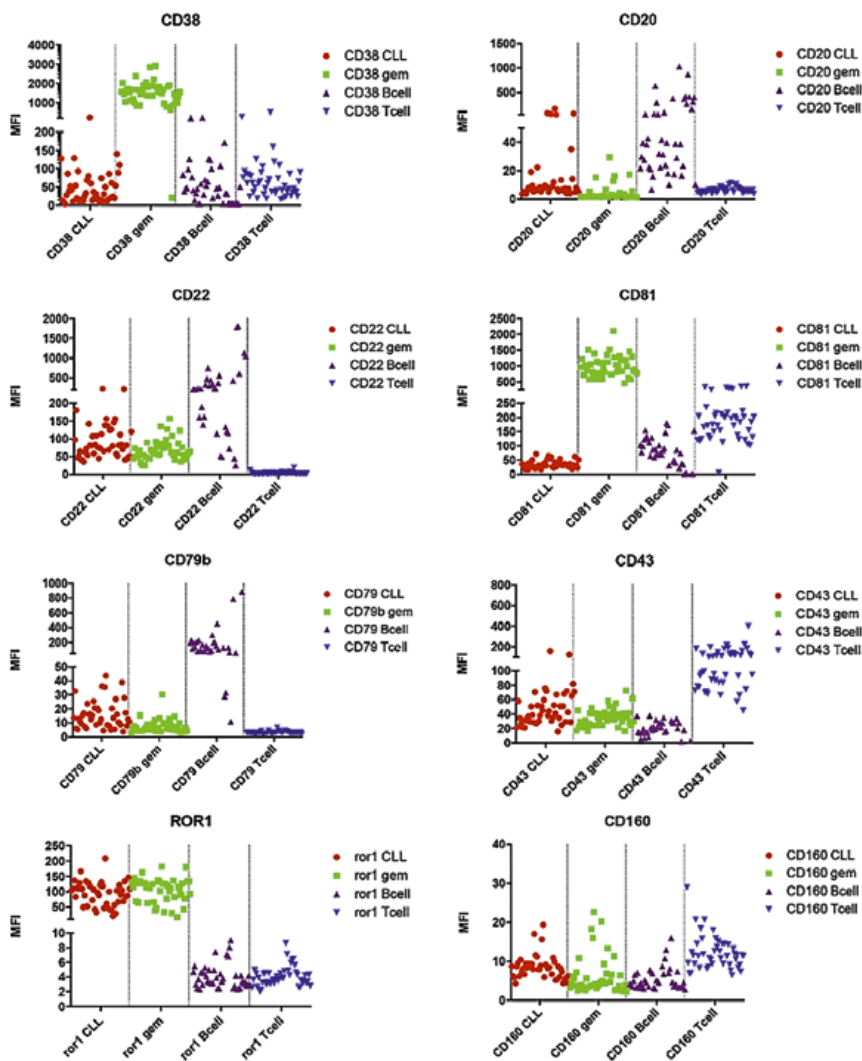


Рисунок 2. Средняя интенсивность экспрессии ROR1 и других диагностических маркеров на популяциях ХЛЛ-клеток (CLL), В-клеточных предшественников (gem), В-лимфоцитов (B-cell), Т-лимфоцитов (T-cell).

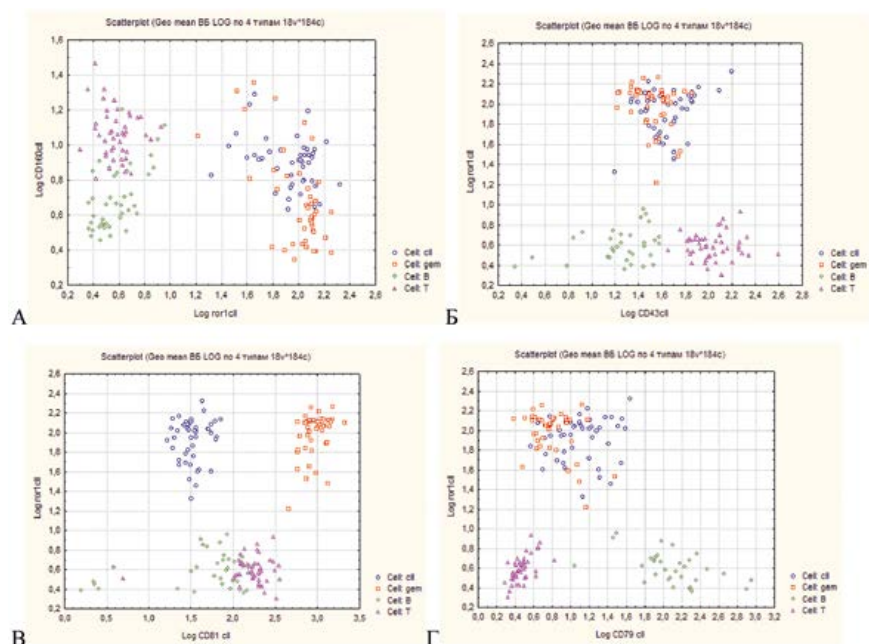


Рисунок 3. Попарные диаграммы рассеяния Geomean в четырех типах клеток: А – ROR1 и CD160; Б – ROR1 и CD43; В – ROR1 и CD81; Г – ROR1 и CD79b. ХЛЛ-клетки выделены голубым цветом, В-клеточные предшественники – красным, В-лимфоциты – зеленым, Т-лимфоциты – фиолетовым.

Целью исследования было определение возможности использования маркера ROR1 в четырехцветной панели проточной цитометрии для оценки МОБ при ХЛЛ.

Материалы и методы

В исследование были включены 64 образца 37 пациентов с подтвержденным диагнозом ХЛЛ после иммунохимиотерапии по схеме «бендамустин + ритуксимаб». МОБ оценивали после 3-го и 6-го курса лечения стандартизованным методом четырехцветной проточной цитометрии на приборе BD FACS Calibur (США). Материалом для исследования был аспират костного мозга. Протокол подготовки был стандартной и включала в себя следующие этапы: определение клеточности образца с целью установления оптимального объема пробы, мечение (окраска) моноклональными антителами, лизис эритроцитов, отмывку.

Для протокол подготовки использовались реактивы BD FACS Lyse, Cell Wash и моноклональные антитела производства BD Biosciences (США) и Dako (США), в том числе моноклональные антитела к ROR1, меченые фикоэритрином, производства BD Biosciences (США) (клон 4A5) (табл. 1).

Для анализа собиралось 500 тысяч событий в гейте лейкоцитов (CD45⁺). Применялась стратегия гейтирования, рекомендованная ERIC [5], включающая в себя этапы выделения всех В-клеток по маркеру CD 19, исключение контаминации Т-лимфоцитами (по маркеру CD 3), выделение популяции ХЛЛ-клеток из всех В-клеток (пробирки № 2, 3, 4, 6).

Примеры выявления популяции опухолевых ХЛЛ-клеток среди всех CD19⁺ В-клеток (зрелых В-лимфоцитов и В-клеточных предшественников) представлены на рис. 1. Результат анализа выдавался в виде процента всех В-клеток и ХЛЛ-клеток от лейкоцитов костного мозга. МОБ-положительными считались образцы, содержащие 0,01 % и более ХЛЛ-клеток (1 и более ХЛЛ-клеток на 10 тысяч нормальных лейкоцитов).

Таким образом, в панели для диагностики МОБ ХЛЛ маркер CD45

обеспечивал подсчет количества проанализированных лейкоцитов, CD19 – выделение всех В-клеток (как опухолевых, так и нормальных), антитела к легким цепям каппа и лямбда – оценку клональности. Антитела CD5, CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1 служили для выявления ХЛЛ-клеток среди всех В-клеток. Средняя интенсивность экспрессии каждого из диагностических маркеров оценивалась по параметру Geomean в группе МОБ-положительных пациентов в каждой из следующих популяций: ХЛЛ-клетки, В-клеточные предшественники, зрелые В-лимфоциты, Т-лимфоциты. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10, графики построены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты исследования

Из 64 проанализированных образцов костного мозга, согласно стандартизированной стратегии и критериям ERIC [7], в 49 пробах была выявлена МОБ и 15 случаев были МОБ-отрицательными. На основании полученных данных по стандартной методике вычислены чувствительность (SE), специфичность (SP) и прогностическая значимость отрицательного и положительного результатов (NPV и PPV) по каждому из восьми маркеров – CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1 (табл. 2).

Оптимальное сочетание чувствительности и специфичности выявлено у ROR1, CD43, CD81 и CD79b. Во всех проанализированных случаях отмечались яркая мономорфная экспрессия ROR1 на В-клеточных предшественниках и ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых В-лимфоцитах.

Для определения совокупного вклада групп маркеров и их оптимального сочетания был выполнен дискриминантный анализ методом пошагового исключения позиций. Метод позволяет изъять те переменные, которые не несут статистически значимой информации для дискриминации (различения) групп

Таблица 3
Характеристики включения маркеров пошаговым критерием в итоговую дискриминантную комбинацию

Маркер	Частичная лямбда Уилкса	F-статистика	P	Толерантность
ROR1	0,1727	239,5632	0,000000000	0,9535
CD81	0,2042	194,8611	0,000000000	0,8165
CD22	0,6450	27,5249	0,000000000	0,8025
CD43	0,6720	24,4002	0,000000000	0,8469
CD79	0,7597	15,8177	0,000000005	0,8192
CD38	0,8581	8,2145	0,000042755	0,8397
CD160	0,8913	6,0603	0,000639468	0,8977
CD20	0,9313	3,6643	0,013830630	0,7620

Таблица 4
Факторные нагрузки и коэффициенты дискриминантных функций (ДФ) для ХЛЛ-клеток, В-клеточных предшественников, В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов

	Факторные нагрузки		
	ДФ1	ДФ2	ДФ3
CD 22	–0,50	–0,64	–0,08
CD81	–0,06	0,29	0,83
CD79b	–0,13	–0,75	–0,12
CD43	0,20	0,34	–0,11
ROR1	–0,77	0,55	–0,20

на основании F-статистики или критерия Фишера. В нашем случае такой переменной являлась средняя интенсивность экспрессии (Geomean) каждого из исследуемых маркеров (CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1). А группами, которые мы должны различить между собой, были популяции ХЛЛ-клеток, В-предшественников, зрелых В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов. Поэтому в качестве предварительной процедуры была оценена средняя интенсивность экспрессии (Geomean) каждого из исследуемых диагностических маркеров (ROR1, CD43, CD81, CD20, CD22, CD38, CD79b и CD160) на популяциях ХЛЛ-клеток, В-предшественников (гематогонов), зрелых В-лимфоцитов и Т-лимфоцитах (рис. 2).

Нами было показано, что разница в экспрессии каждого из маркеров на различных популяциях клеток в части случаев значительна, а на части графиков неочевидна. Разделение всех типов клеток по паре выбранных маркеров графически представлено на диаграмме рассея-

ния. Для восьми исследованных маркеров и четырех типов клеток было построено 28 диаграмм рассеяния, которые представили дискриминирующие качества различных комбинаций маркеров. Примеры наиболее информативных таких комбинаций представлены на рис. 3. Следует отметить, что полного разделения всех четырех типов клеток по изученным парам маркеров не выявлено.

Процедура дискриминантного анализа с пошаговым исключением была применена для построения решающего правила дифференциации клеток ХЛЛ и роли каждого из маркеров в этом процессе. Результаты суммированы в табл. 3.

F-статистика Фишера определяет меру различия между типами клеток для конкретного маркера (его чувствительность), лямбда Уилкса представляет меру сходства, а толерантность демонстрирует степень зависимости маркера от других маркеров, уже включенных в дискриминантные функции. При высокой степени связи всех восьми маркеров друг с другом ROR1 имеет наибольшую чувстви-

тельность (F), три маркера (CD20, CD160, CD38) были исключены пошаговым критерием (табл. 3). В итоговой комбинации осталось пять маркеров из восьми (CD22, CD81, CD79, CD43, ROR1).

Факторные нагрузки дискриминантной функции (ДФ) показывают, какие переменные в данной модели имеют наибольшее дискриминирующее значение для каждой из групп, и поэтому позволяют подобрать наилучшее сочетание переменных. В частности, ДФ1 в нашей модели представляет разделение Т-лимфоцитов от ХЛЛ-клеток и В-предшественников, ДФ2 – В-лимфоцитов от ХЛЛ-клеток и В-предшественников а ДФ3 – дискриминатор ХЛЛ-клеток и В-предшественников друг от друга (табл. 4).

Уровень статистической значимости различий по F-критерию составил $p < 0,0001$. Точность классификации по выборке составила 100 % (отсутствие инверсий). При анализе факторных нагрузок видно, что для дифференцировки ХЛЛ-клеток от зрелых лимфоцитов наибольшее значение имеют маркеры ROR1, CD22, CD79b, CD43. Лучшим и единственным маркером в данной панели для разделения ХЛЛ-клеток и В-клеточных предшественников является CD81.

Обсуждение

Выбор диагностических маркеров для диагностики МОБ при ХЛЛ определен современными протоколами и обусловлен вариабельностью иммунофенотипа при ХЛЛ при первичной диагностике, изменением его после терапии, а также характеристиками проточного цитометра. Так, например, известным фактом является потеря экспрессии CD20 ХЛЛ-клетками на фоне широко применяющейся иммунохимиотерапии анти-CD20 моноклональными антителами (ритуксимаб), которая снижает диагностическую ценность данного маркера [6]. Проблему при выявлении МОБ ХЛЛ представляют случаи со сниженной экспрес-

сией CD5, яркой экспрессией CD20, CD79b, и сниженной экспрессией CD43, особенно когда исследователь не имеет подробной информации о характеристиках первичного иммунофенотипа [1, 3, 6, 7]. На этапе детекции МОБ небольшое количество клеток с подобным фенотипом могут интерпретироваться как нормальные В-лимфоциты. С другой стороны, возможны случаи гипердиагностики МОБ за счет наличия в костном мозге и периферической крови нормальных клеток с ХЛЛ-подобным иммунофенотипом или контаминации В-клеточного гейта Т-лимфоцитами [6].

Поэтому включение в диагностическую панель опухолевоспецифичного маркера, не экспрессирующегося на нормальных клетках, является актуальным. Маркер ROR1 демонстрирует свойства, полезные для детекции МОБ при ХЛЛ: отмечается его мономорфная и стабильная экспрессия на ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых клетках периферической крови [8–10]. В нашем исследовании ROR1 показал высокие дифференцирующие свойства в отношении ХЛЛ-клеток и зрелых В- и Т-лимфоцитов. Во всех случаях наблюдалась его яркая мономорфная экспрессия на ХЛЛ-клетках и В-клеточных предшественниках. Однако именно высокая экспрессия ROR1 на В-клеточных предшественниках оказалась лимитирующим фактором для этого маркера в плане его дифференцирующих свойств. Поэтому в диагностической панели для МОБ ХЛЛ он должен применяться в сочетании с маркером, надежно разделяющим ХЛЛ-клетки и В-клеточные предшественники (CD 81). Примененная процедура дискриминантного анализа позволила определить наиболее информативные цитометрические маркеры для дифференцировки ХЛЛ-клеток от нормальных лимфоцитов. Этот анализ позволил исключить ряд маркеров из панели как не несущих дополнительной информации (CD 20, CD160,

CD38). Вместе с тем он показал высокие дифференцирующие свойства маркеров ROR1, CD79b, CD22, CD81 для выявления МОБ при ХЛЛ.

Выводы

1. ROR1 является высокоспецифичным и чувствительным маркером для выявления ХЛЛ клеток среди зрелых лимфоцитов.
2. Высокая экспрессия ROR1 на нормальных В-клеточных предшественниках требует применения ROR1 в сочетании с маркером, дифференцирующим ХЛЛ-клетки от клеток-предшественников (CD 81).

Список литературы

1. Baskar S., Kwong K. Y., Hofer T., Levy J. M., Kennedy M. G., Lee E., Staudt L. M., Wilson W. H., Wiesner A. & Rader C. (2008) Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14, 396–404.
2. Broome HE 1, Rassenti LZ, Wang HY, Meyer LM, Kipps TJ. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2011 Oct; 35 (10): 1390–4.
3. Daneshmanesh AH, Porwit A, Hajjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Tamm KP, Grandér D, Lehmann S, Norin S, Shokri F, Rabbani H, Mellstedt H, Österborg A. Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leukemia Lymphoma*. 2013 Apr; 54 (4): 843–50.
4. Farren T. W. Combined ROR1 and CD160 Detection for Improved Minimal Residual Disease in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). / Farren TW, Liu F, Macey MG, et al. // *Blood*. – 2013. – Vol. 22, N21.
5. Hallek M. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. / Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. // *Blood*. – 2018. – Vol. 131, N25. – P. 2745–2760.
6. Rawstron AC. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. / Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A. et al. *Cytometry B Clin Cytom.* – 2018. – Vol. 94, № 1. – P. 121–128.
7. Rawstron A. C., N. Villamor, M. Ritgen, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21, N5. – P. 956–964.
8. Rawstron AC. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. / Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30, N4. – P. 929–936.
9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Press. 2017.
10. Uhrmacher S, Schmidt C, Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA. Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia Research*, Vol. 35, Pages 1360–1366.

Для цитирования: Миролюбова Ю. В., Тимофеева Н. С., Барт В. А., Толстопова Е. В., Фетисов Е. С., Стругов В. В., Соловьев В. М., Зарицкий А. Ю., Вавилова Т. В. Орфаный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе. *Медицинский алфавит*. 2020; (5): 19–24. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-19-24>

For citation: Mirolyubova Yu. V., Timofeeva N. S., Bart V. A., Soloviyov V. M., Tolstopova E. V., Fetisov E. S., Strugov V. V., Zariitsky A. Yu., Vavilova T. V. Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Medical alphabet*. 2020; (5): 19–24. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-19-24>



Влияние эндогенных факторов на уровень концентрации глюкозы в пробах крови пациентов различных возрастных групп

Д. П. Пискунов, аспирант¹, врач отдела биохимических исследований КДЛ³

Л. А. Данилова, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии¹

Л. В. Борисова, врач отдела клинических исследований КДЛ³

А. С. Пушкин, к.м.н., доцент², зав. отделом экстренных исследований КДЛ³

Т. А. Ахмедов, к.м.н., доцент², зав. отделом иммунологических исследований КДЛ³

В. Л. Эмануэль, д.м.н., проф. зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

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

³СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», г. Санкт-Петербург

Influence of endogenous factors on glucose level in blood tests of patients of different age groups

D. P. Piskunov, L. A. Danilova, L. V. Borisova, A. S. Pushkin, T. A. Akhmedov, V. L. Emanuel

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, City Multidisciplinary Hospital No. 2; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Цель исследования: выявить влияние биохимических процессов клеточного дыхания дифференцированно в различных популяциях гемограммы человека на диагностическую информативность определения уровня глюкозы в венозной крови. **Материалы и методы.** Проведено исследование на 115 образцах крови в пробирках типа Vacutainer с активатором свертывания крови от пациентов в возрасте от 21 до 90 лет, находившихся на лечении в стационаре на базе офтальмологического, терапевтического и хирургического отделений. Проведена оценка корреляционной зависимости влияния гематологического состава крови на изменения уровня глюкозы в процессе хранения образцов всей сформированной популяции. **Результаты.** В трех группах, ранжированных в зависимости от величины каждого исследуемого показателя, выявлено влияние количества лимфоцитов, эозинофилов, тромбоцитов, а также величины тромбокрит, среднего объема тромбоцитов и относительной ширины распределения тромбоцитов по объему, возраста пациентов на изменения показателей глюкозы за 24 и 48 часов хранения образцов крови при температуре +4 °С. **Выводы.** Эндогенные факторы, характеризующие пробы крови, необходимо учитывать как элементы преаналитического этапа при валидации результатов клинических лабораторных исследований.

Ключевые слова: эндогенные факторы, преаналитический этап, гематологические индексы, уровень глюкозы в крови.

Summary

Aim. Investigation of biochemical processes effect from cellular respiration on diagnostic information about level of glucose in venous blood. **Materials and Methods.** We examined 115 blood samples in Vacutainer-type tubes with coagulation activator from patients aged 21 to 90 years. Patients were treated in ophthalmological, therapeutic and surgical departments of hospital. We evaluated correlation dependence of hematological factors effect on changes in glucose level during storage of samples. **Results.** Three groups were ranked according to the size of each studied indicator. We have found effect of lymphocyte counts, eosinophils, platelets, as well as thrombocrit value, average platelet volume and relative width of platelet distribution by volume, age of patients on changes in glucose values for 24 and 48 hours of blood samples storage at a temperature of +4 °C. **Conclusion.** Endogenous factors of blood samples is the important elements of pre-analytical phase in validating the results of clinical laboratory tests.

Key words: endogenous factors, preanalytical phase, hematological indices, blood glucose level.

Введение

Среди разнообразных причин ошибок на преаналитической стадии лабораторного исследования малоизученными являются влияния свойств самих биопроб, то есть эндогенных факторов.

Цель исследования: выявить влияние биохимических процессов клеточного дыхания в различных популяциях гемограммы человека на диагностическую информативность исследования уровня глюкозы в венозной крови.

Материалы и методы

Исследование проведено на 115 образцах крови от пациентов в возрасте

от 21 до 90 лет, находившихся на плановом лечении в стационаре на базе офтальмологического, терапевтического и хирургического отделений СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», в пробирках типа Vacutainer с активатором свертывания крови

Критериями исключения являлись патологические показатели крови при онкологических заболеваниях. Пробы были подвергнуты центрифугированию при 1200 g 10 минут согласно ГОСТ Р 53079.4–2008. Исследование включало два этапа. На первом была проведена оценка корреляционной зависимости влияния гематологических показателей на изменения

уровня глюкозы. Для оценки влияния использовались такие гематологические параметры, как скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество лейкоцитов (WBC), количество нейтрофилов (NEUT), процентное содержание нейтрофилов (NEUT%), количество лимфоцитов (LYM), процентное содержание лимфоцитов (LYM%), количество моноцитов (MON), процентное содержание моноцитов (MON%), количество эозинофилов (EOS), процентное содержание эозинофилов (EOS%), количество базофилов (BAS), процентное содержание базофилов (BAS%), содержание гемоглобина (HbG), гематокрит (HCT), количество эритроцитов

Таблица 1
Разделение исследуемых показателей по группам

Параметр	Возраст, лет			Lym, 10 ⁹ /л			EOS, 10 ⁹ /л			PLT, 10 ⁹ /л		
Группы	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Количество образцов	38	38	39	38	38	38	38	38	39	38	38	39
Диапазон значений	21–58	58–72	72–90	0,4–1,66	1,66–2,35	2,36–5,62	0,00–0,11	0,11–0,23	0,24–1,30	71–175	175–418	424–981

Параметр	PCT, %			MPV, фл			PDW, %		
Группы	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Количество образцов	38	38	39	38	38	39	38	38	39
Диапазон значений	0,06–0,14	0,15–0,25	0,25–0,79	4,5–6,6	6,6–7,8	7,90–12,8	17,1–19,1	19,2–20,5	20,5–24,8

(RBC), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), средний объем эритроцита (MCV), коэффициент вариации распределения эритроцитов по объему (RDW-CV), количество тромбоцитов (PLT), тромбоцит (PCT), средний объем тромбоцитов (MPV), распределение тромбоцитов по объему (PDW).

Интерпретация коэффициента корреляции производилась исходя из уровня силы связи: $r = 0,01–0,29$ – слабая связь; $r = 0,30–0,69$ – средняя связь. Далее проведен сравнительный статистический анализ смещений уровня глюкозы при разделении общей выборки проб пациентов на три равные части в зависимости от величины каждого исследуемого показателя (табл. 1).

Уровень глюкозы в образцах исследовали глюкозооксидазным методом на биохимическом анализаторе Abbott Architect c8000 реактивами производителя оборудования. Данные, полученные при первом исследовании, были приняты за нулевую точку. Уровень глюкозы исследовали через 24 и 48 часов хранения при температуре +4 °С. Гематологические параметры определяли на гематологическом анализаторе Abbott CELL-DYN Ruby реагентами производителя оборудования.

Для определения уровня смещения (В%) глюкозы в пробах за 24 и 48 часов была использована формула

$$B = (x_i - ЦЗ) / ЦЗ \times 100\%,$$

где В – смещение, x_i – значение концентрации аналита каждого пациента, ЦЗ – целевое значение, за которое было принято значение уровня глюкозы каждого пациента на нулевой точке измерения.

При оценке значимости смещения учитывались значения неопределенности измерений (НИ) для каждой аналитической системы по формуле

$$НИ = \sqrt{CV^2 + d(B)^2 + \frac{|B|}{\sqrt{3}}},$$

где CV – коэффициент вариации внутрилабораторного контроля качества за 6 месяцев; $d(B)$ – среднее квадратическое отклонение относительной величины смещения по данным внешней оценки качества за тот же период; $|B|$ – абсолютное значение среднего смещения по данным внешней оценки качества за тот же период (6 месяцев).

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи пакета программ статистической обработки IBM SPSS Statistics и MS Excel. Все показатели проверялись на соответствие нормальному распределению по критерию Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий между двумя группами использовался критерий Манна-Уитни для независимых выборок. За пороговое значение уровня значимости принимали $p \leq 0,05$. Корреляционная зависимость оценивалась по критерию Спирмена для непараметрических данных.

Результаты

Оценка смещения уровня глюкозы была проведена с учетом данных о неопределенности измерений исследуемых параметров в используемых аналитических системах (табл. 2).

По результатам анализа корреляционной зависимости (табл. 3) выявлено, что обратная слабая и средняя корреляционные связи наблюдаются среди

показателей: лимфоциты (–0,261 для 24 часов и –0,287 для 48 часов); эозинофилы (–0,253 для 24 часов и –0,237 для 48 часов); тромбоциты (–0,254 для 24 часов и –0,312 для 48 часов); тромбоцит (–0,185 для 24 часов и –0,246 для 48 часов). Прямая слабая и средняя корреляционные связи наблюдаются среди показателей: средний объем тромбоцитов (0,285 для 24 часов и 0,333 для 48 часов); относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (0,315 для 24 часов и 0,361 для 48 часов). Также слабая корреляционная взаимосвязь обнаружена и по возрасту пациентов (0,258 для 24 часов и 0,282 для 48 часов). Слабая корреляционная связь берется во внимание для проверки дополнительных статистических разработок. Увеличение корреляционных индексов в зависимости от времени хранения образцов, возможно, связано с нелинейностью корреляционной зависимости.

Для дальнейшего изучения проведен сравнительный статистический анализ сформированных групп (табл. 1), наиболее информативным было сравнение групп 1 и 3, так как это группы с минимальными и максимальными значениями исследуемых параметров. Полученные данные представлены в табл. 4.

По данным табл. 4, прослеживаются статистически значимые отличия (в группах 1 и 3) изменения уровня глюкозы в зависимости от уровня представленных показателей: лимфоциты (0,050 для 24 часов и 0,025 для 48 часов); эозинофилы (0,001 для 24 часов и 0,003 для 48 часов); тромбоциты (0,008 для 24 часов и 0,001 для 48 часов); тромбоцит (0,012 для 24 часов

Таблица 2
Неопределенность измерений исследуемых параметров

Исследуемый параметр	Glucose	HCT	HGB	MCH	MCHC	MCV	PLT	WBC	RDW	RBC
Неопределенность измерений, %	4,02	4,02	3,02	5,05	3,66	4,35	7,36	7,67	4,70	3,51

Таблица 3
Корреляционная зависимость гематологических параметров и изменения уровня глюкозы

Параметр	Возраст	СОЭ	WBC	NEUT	NEUT%	LYM	LYM%	MON	MON%	EOS	EOS%	BAS
Смещение, 24 часа	0,258	-0,061	-0,135	-0,076	0,066	-0,261	-0,067	-0,128	-0,02	-0,253	-0,133	-0,156
Смещение, 48 часов	0,282	-0,076	-0,196	-0,137	0,034	-0,287	-0,049	-0,158	0,11	-0,237	-0,082	-0,21
Параметр	BAS%	HGB	HCT	RBC	MCH	MCHC	MCV	RDW-CV	PLT	PCT	MPV	PDW
Смещение, 24 часа	-0,017	0,028	0,112	0,078	0,094	0,146	0,067	-0,044	-0,254	-0,185	0,285	0,315
Смещение, 48 часов	0,029	0,048	0,037	0,021	0,09	0,129	0,058	0,038	-0,312	-0,246	0,333	0,361

Таблица 4
Расчеты статистической значимости сравнения исследуемых групп

Параметр	Возраст				Lym				EOS				PLT				PCT				MPV				PDW			
Группы	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2	1 и 3	2 и 3	1 и 2
Смещение, 24 часа	0,061	0,014	0,670	0,807	0,050	0,119	0,004	0,001	0,983	0,014	0,008	0,787	0,009	0,012	0,901	0,366	0,010	0,071	0,016	0,001	0,232							
Смещение, 48 часов	0,076	0,012	0,375	0,240	0,025	0,225	0,009	0,003	0,923	0,002	0,001	0,702	0,002	0,002	0,866	0,467	0,001	0,009	0,028	0,001	0,068							

и 0,002 для 48 часов); средний объем тромбоцитов (0,010 для 24 часов и 0,001 для 48 часов); относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (0,001 для 24 и 48 часов), $p \leq 0,05$, что свидетельствует о статистической значимости. Статистически значимые отличия (в группах 1 и 3) обнаружены также и по возрасту пациентов (0,014 для 24 часов и 0,012 для 48 часов).

Обсуждение

Традиционно снижение уровня глюкозы в пробах объясняют процессом гликолиза в эритроцитах. Однако результаты данного исследования свидетельствуют о незначительном влиянии эритроцитарных индексов крови на уровень снижения глюкозы в пробах. Очевидно, это связано с образованием сгустка в пробирке и препятствованием доступа глюкозы к красным клеткам крови.

Обнаружение корреляционной зависимости и статистически значимых отличий при сравнении смещения глюкозы у двух групп с разными уровнями лимфоцитов свидетельствует о влиянии количества лимфоцитов на уровень смещения глюкозы в пробах. По результатам исследования J. Nancie и соавт. [1], активированные лимфоциты резко увеличивают энергетические потребности для поддержки метаболических процессов, необходимых для роста, пролиферации и эффекторной функции. Таким образом, вклад лимфоцитов в снижение уровня глюкозы в пробах выглядит вполне логичным.

По данным исследования L. Porter и соавт. [2], нейтрофилы по сравнению

с эозинофилами демонстрируют значительно более активное базальное митохондриальное АТФ-связанное дыхание, максимальную запасную и дыхательную способность. Кроме того, эозинофилы имеют гораздо меньшие запасы гликогена по сравнению с нейтрофилами. Результаты нашего эксперимента логично подтверждают эти данные и свидетельствуют о влиянии количества эозинофилов на смещение глюкозы в пробах.

Корреляционная взаимосвязь смещения глюкозы и тромбоцитарных индексов, на наш взгляд, самая неочевидная. Однако, по данным M. Mibibula и соавт. [3], переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние требует кардинальных изменений в доступности АТФ. Тромбоциты обладают молекулярным механизмом, необходимым для генерации АТФ как в процессе гликолиза, так и окислительного фосфорилирования. Учитывая вышеизложенное, можно предположить о наличии влияния тромбоцитарных параметров на стабильность уровня концентрации глюкозы во время хранения образцов, что подтверждает наше исследование.

С возрастом происходит снижение внутриклеточного уровня окисления глюкозы во всех тканях организма. Возможные причины снижения эффективности инсулина при старении включают снижение физической активности, дисфункцию митохондрий, гормональные изменения (то есть снижение уровней IGF-1 и DHEA), повышенный окислительный стресс и воспаление [4]. Обнаруженная нами корреляция уменьшения

уровня смещения глюкозы в пробах у пациентов старших возрастных групп также подтверждает имеющиеся литературные данные.

Выводы

При изучении стабильности концентрации глюкозы в сыворотке крови при хранении образцов в течение 24 и 48 часов при температуре +4 °C выявлено статистически значимое влияние таких показателей, как количество лимфоцитов, эозинофилов, тромбоцитов, величина тромбокрита, средний объем тромбоцитов, относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, а также возраст пациентов (табл. 3).

Таким образом, указанные эндогенные факторы, характеризующие пробы крови, необходимо учитывать как элементы преаналитического этапа при валидации результатов клинических лабораторных исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Nancie J. MacIver, Sarah R. Jacobs, Heather L. Wieman, Jessica A. Wofford, Jonathan L. Colloff, and Jeffrey C. Rathmell. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol.* 2008; 84 (4): 949-957. doi.org/10.1189/jlb.0108024.
2. Linsey Porter, Nicole Toepfner, Kathleen R. Boshart, Jochen Guck, Margaret Ashcroft, Neda Farahi, Edwin R. Chilvers. Metabolic Profiling of Human Eosinophils. *Frontiers in immunology.* 2018; 9: 1404. doi.org/10.3389/fimmu.2018.01404.
3. M. Mibibula, K. M. Naseem, R. G. Sturmey. Glucose metabolism and metabolic flexibility in blood platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2018; 16: 2300-14. doi.org/10.1111/jth.14274.
4. Rita Rastogi Kalyani, Josephine M. Egan. Diabetes and Altered Glucose Metabolism with Aging. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013; 42 (2): 333-347. doi.org/10.1016/j.ecl.2013.02.010.

Для цитирования: Пискунов Д.П., Данилова Л.А., Борисова Л.В., Пушкин А.С., Ахмедов Т.А., Эмануэль В.А. Влияние эндогенных факторов на уровень концентрации глюкозы в пробах крови пациентов различных возрастных групп. Медицинский алфавит. 2020;(5):25-27. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-25-27>

For citation: Piskunov D.P., Danilova L.A., Borisova L.V., Pushkin A.S., Akhmedov T.A., Emanuel V.L. Influence of endogenous factors on glucose level in blood tests of patients of different age groups. Medical alphabet. 2020; (5):25-27. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-25-27>

Оценка качества иммунохимических исследований с помощью сигмометрии

О. В. Петрова, к.м.н., зав. клинико-диагностической лабораторией^{1,2}
 Д. К. Твердохлебова, врач клинической лабораторной диагностики¹
 О. И. Мурыгина, врач клинической лабораторной диагностики¹
 Д. М. Никулина, д.м.н., проф., зав. кафедрой биологической химии²

¹ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России, г. Астрахань

²ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань

Assessment of quality of markers of myocardial damage using sigmometry

O. V. Petrova, D. K. Tverdokhlebova, O. I. Murygina, D. M. Nikulina

Federal Centre for Cardiovascular Surgery, Astrakhan State Medical University; Astrakhan, Russia

Резюме

Цель: оценить качество исследования маркеров повреждения миокарда с помощью сигмометрии. **Материалы и методы.** Исследование проводили в ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии». Данные собирали за 2017–2018 годы. Ежедневно контролировались следующие показатели: высокочувствительный тропонин Т, миоглобин, фракция МВ креатинфосфокиназы. Исследование проводили на автоматическом иммунохимическом электрохемилюминесцентном анализаторе cobas e411. Значения сигмометрии были рассчитаны с использованием CV (коэффициента вариации), систематической погрешности (bias) и общей допустимой аналитической ошибки (TE_{max}). **Результаты.** Анализ качества лабораторных исследований с помощью расчета значений sigma в 2017 году выявил: значение sigma меньше 4 единиц отмечается при исследовании второго уровня контрольного материала на высокочувствительный тропонин Т, в то же время при исследовании первого уровня контрольного материала значения sigma больше 4 единиц и составило 6,26. Анализ качества лабораторных исследований в 2018 году показал следующее: значение sigma меньше 4 единиц отмечается при исследовании первого уровня контрольного материала на фракцию МВ-креатинфосфокиназы, в то же время при исследовании второго уровня контрольного материала значения sigma больше 4 единиц и составило 4,14. **Заключение.** На основании сигмометрии (расчета значений sigma) провели изменения в тактике проведения внутрилабораторного анализа, что позволило улучшить качество лабораторных исследований.

Ключевые слова: сигмометрия, внутрилабораторный контроль качества, маркеры повреждения миокарда, кровь.

Summary

The purpose. To evaluate study quality markers of myocardial damage using Sigmametry. **Materials and methods.** The study was conducted in a Federal Centre for Cardiovascular Surgery. Data were collected in 2017–2018. Daily there controlled the following indicators: high-sensitivity troponin T, myoglobin, the MB fraction of creatine phosphokinase. The study was performed on an automatic immunochemical electrochemiluminescence analyzer cobas e411. The sigmometry values were calculated using CV (coefficient of variation), systematic error (bias), and total analytical error (TE_{max}). **Results.** The analysis of the quality of laboratory studies using the calculation of sigma values in 2017 revealed: sigma values less than 4 are noted in the study of the second level of the control material for highly sensitive troponin T, at the same time in the study of the first level of the control material sigma values more than 4 and amounted to 6.26. Analysis of the quality of laboratory studies in 2018, showed the following: the values of sigma is less than 4 it is noted in the study of the first level of the control material at a fraction of MB – creatine phosphokinase, at the same time in the study of level 2 control material values of sigma greater than 4, and amounted to 4.14. **Conclusions.** On the basis of sigmometry (calculation of sigma values) changes in the tactics of intralaboratory analysis were held, what allowed to improve the quality of laboratory studies.

Key words: sigmometry, intralaboratory quality control, markers of myocardial damage, blood

На сегодняшний день сохраняется тенденция к увеличению количества выполненных оперативных вмешательств на сердце. Однако, несмотря на накопленный опыт, проблема периперационного повреждения миокарда остается актуальной. По данным разных авторов, периперационное повреждение миокарда встречается от 3 до 12% от общего числа выполняемых операций на сердце. При этом уровень госпитальной летальности при данной патологии достигает 36% [4].

Своевременная диагностика периперационного повреждения миокарда до сих пор является непростой задачей. Маркером периперационного повреждения миокарда является кардиоспецифический тропонин [2].

Отсутствие в арсенале лечебного учреждения возможности определения тропонина затрудняет своевременную диагностику повреждения, а следовательно, приводит к увеличению потребности к гемотрансфузиям, повторным операциям, продленной госпитализации, развитию полиорганной недостаточности, инфекционно-воспалительных заболеваний и летальности.

В связи с этим особое внимание уделяется качеству лабораторных исследований. На него влияют стадии лабораторного процесса: преаналитическая, аналитическая и постаналитическая.

Наибольшее значение имеет аналитическая стадия проведения лабораторных исследований. Для обеспечения качества лабораторных исследований лаборато-

рии участвуют в программах внешнего контроля качества, а также ежедневно проводят его внутрилабораторный контроль. Внешний и внутрилабораторный контроль качества лабораторных исследований имеют ограничения [1, 3].

В литературе показана возможность использования сигмометрии (расчета значений sigma) для оценки качества лабораторных исследований. Так, при значениях sigma меньше 4 единиц качество лабораторных исследований неудовлетворительное, необходимо произвести смену аналитической системы (реактивов, калибраторов, анализаторов и т.д.); при значениях больше 4 единиц качество лабораторных исследований удовлетворительное [5, 6, 7].

Цель: оценить качество исследования маркеров повреждения миокарда с помощью сигмометрии.

Материалы и методы

Исследование проводили в Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии (г. Астрахань). Проведен ретроспективный анализ данных ВЛКК с 2017 по 2018 год.

Контролировались следующие показатели: высокочувствительный тропонин Т (вчТнТ), миоглобин (Myo), фракция МВ-креатинфосфокиназы (СК-МВ).

Для контроля качества вчТнТ использовали контрольный материал PreciControl Troponin (Roche Diagnostics, Германия). Для контроля качества Myo и СК-МВ использовали контрольный материал PreciControl Cardiac II (Roche Diagnostics, Германия). Исследование вчТнТ, Myo и СК-МВ проводили на автоматическом иммунохимическом анализаторе cobas e411 (Roche Diagnostics, Германия) с использованием реактивов и калибраторов той же фирмы-производителя.

Количество сигм (*sigma*) вычисляли по формуле: $\sigma = (TE_{\max} - [\text{bias}]) / CV$, где $TE_{\max} (\%)$ – общая допустимая ошибка; *bias* (%) – худшая за период наблюдения систематическая погрешность; CV (%) – худший долгосрочный коэффициент вариации за период наблюдений [3].

Источником информации о систематической погрешности были данные ВОК лабораторных исследований, представленных программой «Клиническая химия» Bio-Rad EQAS (Bio-Rad, США). Источником информации о худшем CV – данные стадии ВЛКК с января 2017 по июнь 2017 года.

Результаты исследования и обсуждение

Значения $TE_{\max}$, B, CV контрольных измерений исследуемых аналитов представлены в табл. 1 и 2.

Анализ качества лабораторных исследований с помощью расчета значений σ в 2017 году позволил выявить следующее: значения σ меньше 4 единиц отмечаются при исследовании второго уровня контрольного материала на вчТнТ, в то же время при исследовании первого уровня контрольного

Таблица 1
Значения $TE_{\max}$, B, CV контрольных измерений за 2017 год

Показатель	Level 1				Level 2			
	$TE_{\max}$	B	CV	Sigma	$TE_{\max}$	B	CV	Sigma
вчТнТ	27,91	0,80	4,33	6,26	27,91	12,40	4,03	3,84
Myo	19,60	3,70	3,46	4,59	19,60	3,40	3,55	4,56
СК-МВ	30,06	3,20	6,40	4,19	30,06	2,50	6,62	4,16

Таблица 2
Значения $TE_{\max}$, B, CV контрольных измерений за 2018 год

Показатель	Level 1				Level 2			
	$TE_{\max}$	B	CV	Sigma	$TE_{\max}$	B	CV	Sigma
вчТнТ	27,91	3,4	4,53	5,41	27,91	10,30	3,98	4,42
Myo	19,60	3,7	2,39	6,65	19,60	3,40	3,30	4,90
СК-МВ	30,06	3,2	7,67	3,50	30,06	2,50	6,65	4,14

материала значения σ больше 4 единиц и составили 6,26 (табл. 1).

При исследовании контрольного материала на Myo и СК-МВ значения σ больше 4, что указывает на хорошее качество лабораторных исследований (табл. 1).

Для повышения качества исследований при значениях σ от 3 до 4 рекомендуется [5, 6, 7]:

- использовать контрольный материал двух уровней;
- контроль качества для вчТнТ проводить два раза в день в аналитической серии;
- для оценки качества лабораторных исследований использовать правило Westgard $1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/4_{1S}$.

На основании полученных данных и имеющихся в литературе рекомендаций [5, 6, 7] мы в 2018 году изменили частоту (кратность) проведения ВЛКК для определения вчТнТ. В 2019 году произвели расчет значений σ .

Анализ качества лабораторных исследований в 2018 году показал следующее: значения σ меньше 4 единиц отмечается при исследовании первого уровня контрольного материала на СК-МВ, в то же время при исследовании второго уровня контрольного материала значения SIGMA больше 4 единиц и составили 4,14 (табл. 2).

Для улучшения качества исследования СК-МВ в 2019 году необходимо изменить правила проведения ВЛКК – правила, принятые для вчТнТ, и оценить результаты по улучшению качества лабораторных исследований в 2020 году.

Значения Sigma от 3 до 4 единиц были при исследовании вчТнТ и СК-

МВ (табл. 1, 2), что указывало на неудовлетворительное качество исследуемых показателей. Несмотря на то что значения CV (показатель ВЛКК исследований) соответствовали указанным в нормативно-технической документации [5, 6, 7], и на основании соответствия в лаборатории принимались решения по правильности и воспроизводимости лабораторных показателей.

Результаты ВОК исследуемых показателей были удовлетворительными.

Таким образом, с помощью сигмометрии (расчета значений σ) можно оценить качество лабораторных исследований, на основании расчета значений σ изменить частоту и кратность проведения ВЛКК для повышения качества исследований.

Надеемся, что изменение мероприятий ВЛКК позволит улучшить определение маркеров повреждения миокарда.

Список литературы

1. Арефьева И. А., Федорова М. М., Мошкин А. В. Планирование аналитического качества количественных лабораторных исследований с использованием коммерческих контрольных материалов. Методические рекомендации. М.: Триада. 2013.
2. Дымова О. В. Современные биомаркеры в кардиологии. Медицинский совет. 2018; № 16: 118–123.
3. Калачева О. С., Плеханова О. С. Установка целей по качеству: вопросы выбора требований. Лабораторная служба. 2018; 7 (1): 51–54.
4. Константинов Б. А., Базылев В. В., Белов Ю. В., Кизыма А. Г. Принципы оценки риска развития кардиальных осложнений у больных перед операциями на периферических сосудах и брюшном отделе аорты. Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2008; № 1 (1): 27–33.
5. Hens K., Berth M., Armbruster D., Westgard S. Sigma metrics used to assess analytical quality of clinical chemistry assays: importance of the allowable total error (TEa) target. Clin Chem Lab Med. 2014; 52: 973–80.
6. Nanda S. K., Ray L. Quantitative application of sigma metrics in medical biochemistry. J Clin Diagn Res. 2013; 7: 2689–91.
7. Singh B., Goswami B., Gupta V. K., Chawla R., Malika V. Application of sigma metrics for the assessment of quality assurance in clinical biochemistry laboratory in India: a pilot study. Ind J Clin Biochem. 2011; 26: 131–5.

Интенсивность роста ламеллы как характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов человека

М. С. Макаров, к.б.н., с.н.с.

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

Intensity of lamella growth as morphofunctional feature of human platelets

M. S. Makarov

Research Institute of Emergency Care n.a. N. V. Sklifosovsky, Moscow, Russia

Резюме

Цель работы. Исследовать морфофункциональные особенности образования ламеллы в тромбоцитах здоровых людей и пациентов с тромбоцитическими осложнениями. **Материалы и методы.** В работе исследовали тромбоциты доноров крови, пациентов с тромбозами вен нижних конечностей, пациентов с тромбоцитическими осложнениями на фоне глубокой термической травмы. Морфофункциональный анализ проводили с помощью оригинального метода, основанного на витальном окрашивании клеток. **Результаты.** В крови пациентов с тромбозами вен морфофункциональный статус тромбоцитов был повышен, у ожоговых пациентов – резко снижен. Через 10–15 минут адгезии на стекле среди тромбоцитов выявлялись три субпопуляции: тромбоциты без ламеллы, склонные к быстрой дегрануляции (первый тип); тромбоциты с ламеллоподиями (второй тип); тромбоциты с широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (третий тип). В крови доноров большинство адгезирующих тромбоцитов первого и второго типов формировали обширную ламеллу через 1–2 часа адгезии, у пациентов с тромбозами вен – через 30–35 минут. При тромбозах вен интенсивный рост ламеллы в адгезирующих тромбоцитах сопровождался быстрой дегрануляцией клеток без ламеллы и образованием агрегатов на стекле. У пациентов с глубокими ожогами тромбоциты очень медленно адгезировали, рост ламеллоподий отмечен менее чем у 20% адгезирующих тромбоцитов. Среди доноров крови выявлена неоднородность по уровню тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул при контакте с адгезивным субстратом. **Выводы.** Отсутствие роста тромбоцитарной ламеллы может наблюдаться как при низком, так и высоком морфофункциональном статусе тромбоцитов. При тромбозах вен скорость роста ламеллы заметно увеличивается. Среди адгезивно активных тромбоцитов с гранулами существует субпопуляция клеток, способных к быстрому выбросу гранул как при патологии, так и в норме.

Ключевые слова: тромбоциты, гранулы, адгезия, ламелла, дегрануляция.

Summary

Aim. To study morphofunctional properties of platelet lamella's forming in donors and patients with thrombotic disorders. **Materials and methods.** We studied platelets of blood donors, patients with deep venous thrombosis, burned patients with thrombotic disorders. Morphofunctional analysis was performed, using original method, based on cell vital staining. **Results.** In patients with deep venous thrombosis morphofunctional platelet value was enhanced, in burned patients with thrombotic disorders platelet integrity was low. After 10–15 minutes of adhesion on glass spreading platelets maintained 3 subpopulations: cells without lamella, able to fluent granule efflux (1th type); cell with lamellipodias (2th type); cells with wide lamella, covering cell perimeter (3th type). In donors' blood most of spreading platelets formed lamella at 1–2 hours, in patients with deep venous thrombosis this process was noticeably accelerated, estimating 30–35 minutes, what is more, spreading platelets viewed both intensive lamella's growth and rapid degranulation of cells without lamella, followed by aggregation on the glass. Burned patients had significant decay of platelet adhesion, lamella formation was low-identified – less than 20% of spread platelets formed lamellipodias. Among blood donors one could notice heterogeneous level of platelets, capable to rapid granules' release during contact with adhesive substrate. **Conclusion.** The lack of lamella forming may occur both at low and high morphofunctional platelet rate. During deep venous thrombosis lamella's growth velocity was noticeably increased. Among spreading platelets with granules one could find subpopulation of cells, capable to rapid granules' release in norm and pathology.

Key words: platelets, granules, adhesion, lamella, degranulation.

При контакте с адгезивным субстратом в тромбоцитах человека происходит активная реорганизация элементов цитоскелета. В процессе адгезии тромбоциты способны формировать обширную ламеллу по всему периметру клетки [1, 2]. Ламелла значительно расширяет площадь контакта тромбоцитов с субстратом и с другими тромбоцитами, что ускоряет их активацию и образование агрегатов [3]. Таким образом, рост ламеллы влияет на интенсивность функционального ответа всей популяции тромбоцитов. Неспособность тромбоцитов к образованию ламеллы наблюдается как в результате их повреждения, так

и в случае их инактивации на фоне нормальной структурной целостности [9–11]. С другой стороны, гиперактивация тромбоцитов может происходить без активного роста ламеллы [4–7]. Есть данные, что интенсивный рост ламеллы препятствует дегрануляции тромбоцитов, то есть их переходу в необратимо активированное состояние [8]. Благодаря сканирующей электронной микроскопии можно отчетливо видеть, что тромбоциты из одной и той же крови по-разному контактируют с субстратом, имеют неодинаковое число псевдоподий и ламеллоподий через равные промежутки времени [8, 12]. Этот эффект

связывают со стимуляцией или подавлением внутриклеточных сигнальных путей, с типом субстрата, не учитывая морфофункциональные различия тромбоцитов. Стоит подчеркнуть, что в тромбоцитарной популяции неоднородность наблюдается даже среди клеток, имеющих интактную дискоидную форму (дискоцитов). Дискоциты различаются не только по линейным размерам, но также по насыщенности гранулами, с разной интенсивностью участвуют в функциональном ответе [11–15]. Можно предположить, что интенсивность роста ламеллы также может отражать особенности морфофункционального статуса тромбоцитов.

Целью настоящей работы было исследовать морфофункциональные особенности образования тромбоцитарной ламеллы в норме и при патологии.

Материалы и методы

Исследовали тромбоциты 40 доноров крови, 15 пациентов с тромбозом вен нижних конечностей, 8 пациентов с тромботическими осложнениями на фоне ожогов II–III степени по МКБ-10 площадью 22–70 %, индекс Франка более 30 единиц. Во всех случаях для исследования использовали образцы венозной крови, консервированной с цитратом или ЭДТА. Анализ тромбоцитов проводили с помощью оригинального метода, основанного на витальном окрашивании клеток с последующим их анализом во флуоресцентном микроскопе [10]. В процессе работы определяли следующие параметры: содержание тромбоцитов с гранулами, в процентах (в норме 35–75 %); долю больших округлых тромбоцитов, в процентах (клетки ранней стадии активации); долю клеток с обширной ламеллой среди адгезирующих на стекле тромбоцитов, в процентах. Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием программы MS Excel 2000. Вычисляли медиану, 1-й и 3-й квартили. Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95 % ($p < 0,05$).

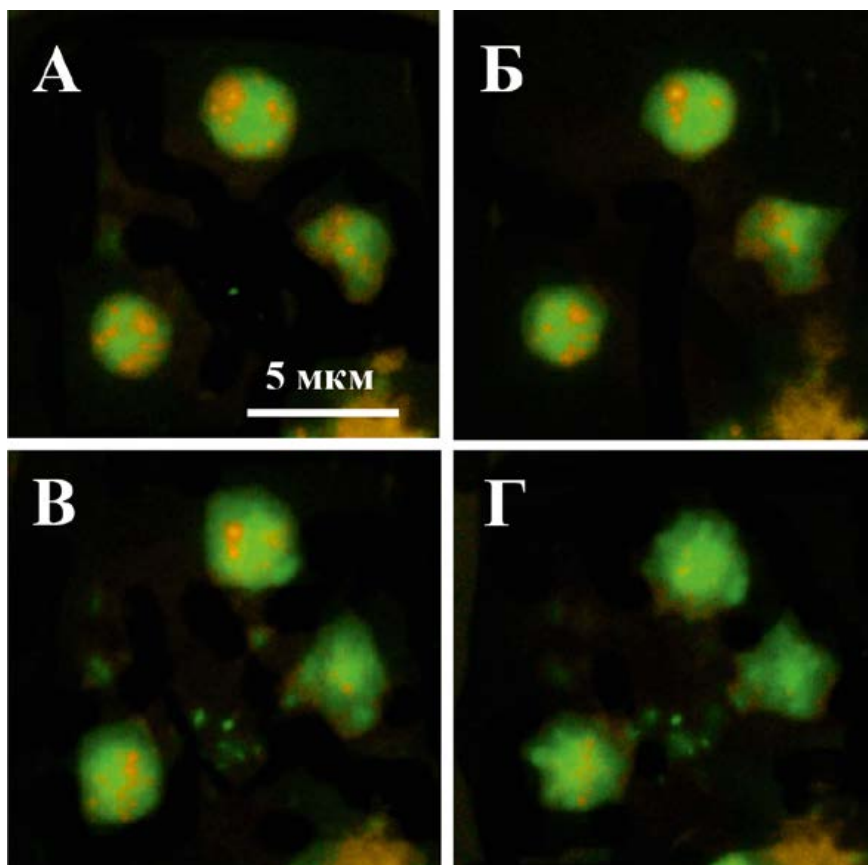


Рисунок 1. Адгезия тромбоцитов доноров на стекле при 37 °С. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – через 5 минут контакта со стеклом (смещение гранул к периферии тромбоцита); Б – через 10 минут (начало дегрануляции); В – через 15 минут (формирование ламеллоподий); Г – через 30 минут (полная дегрануляция).

Результаты и обсуждение

В крови доноров доля тромбоцитов с гранулами составила 52 % [43; 58], доля больших округлых тромбоцитов – 20 % [18; 21]. У пациентов с венозными тромбозами значения этих параметров были увеличены ($p < 0,05$), составляя соответственно 86 % [80; 90] и 28 % [23; 30]. Напротив, у ожоговых пациентов тромбоциты имели очень низкий

морфофункциональный статус: доля тромбоцитов с гранулами составила 5 % [3; 8], доля больших округлых тромбоцитов – 8 % [7; 10]. Стоит особо отметить, что в крови ожоговых пациентов значительная часть больших округлых тромбоцитов (70–90 %) не содержала гранул и не проявляла адгезивной активности. В литературе описана повышенная склонность больших округлых

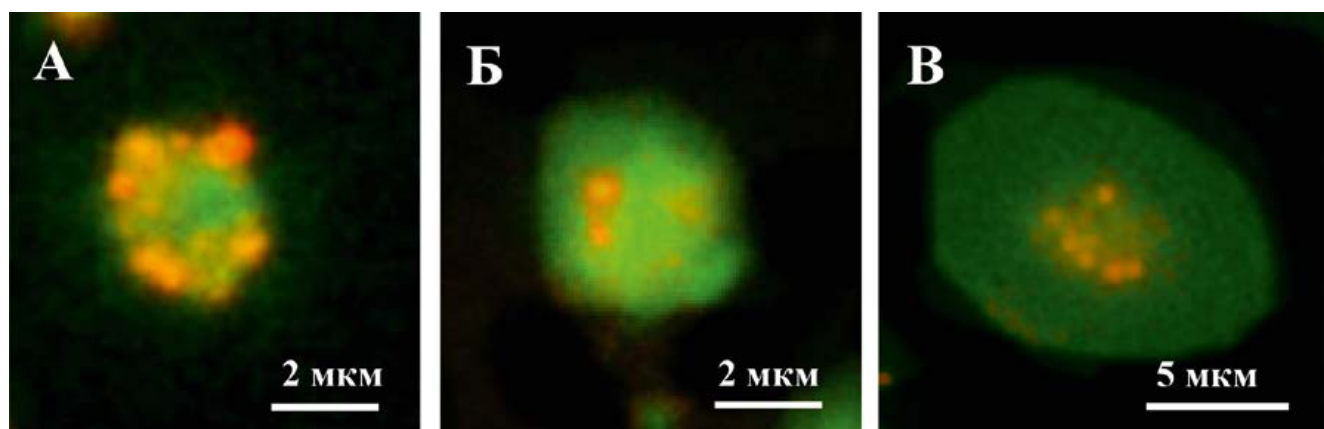


Рисунок 2. Разная интенсивность роста ламеллы в адгезирующих тромбоцитах человека после 10–15 минут контакта со стеклом. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – тромбоцит без ламеллы; Б – тромбоцит с умеренным ростом ламеллы; В – тромбоцит с сильным ростом ламеллы.

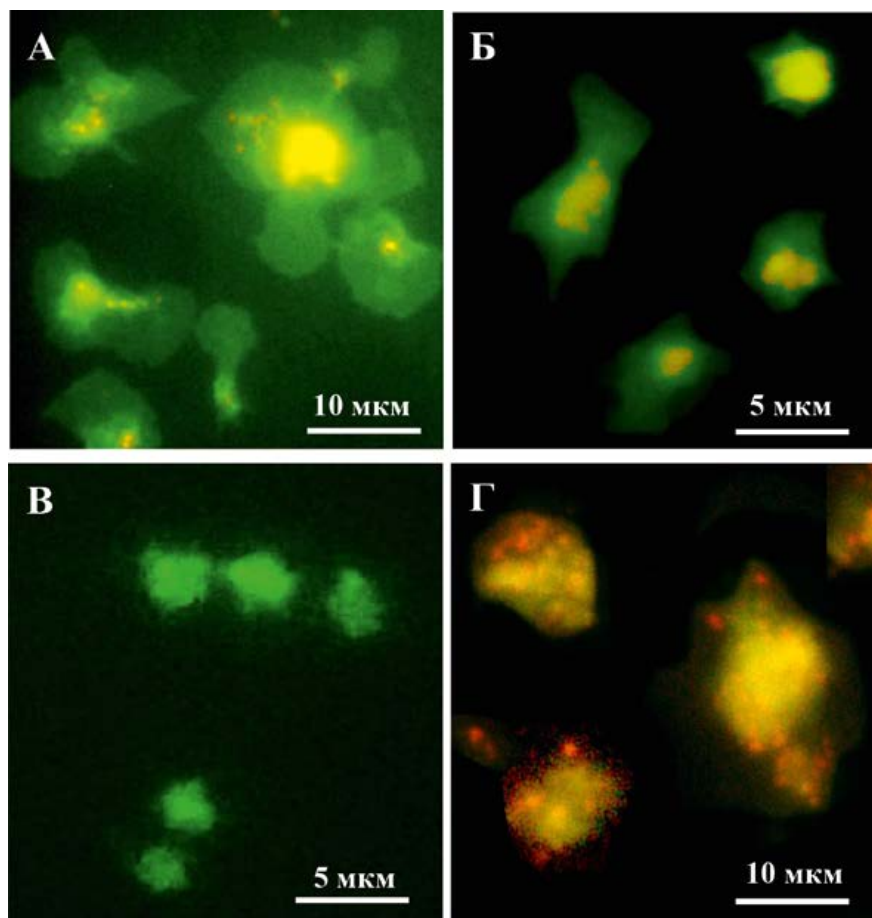


Рисунок 3. Адгезирующие тромбоциты доноров и пациентов с тромботическими осложнениями. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – тромбоциты доноров крови через 1 час контакта со стеклом; Б – тромбоциты пациентов с тромбозами вен нижних конечностей через 10 минут контакта со стеклом; В – тромбоциты ожоговых пациентов с тромботическими осложнениями через 1 час контакта со стеклом; Г – образование мелких агрегатов в крови пациентов с тромбозами вен через 15 минут после нанесения на стекло.

тромбоцитов к спонтанной активации и быстрой адгезии [5, 6, 9]. Однако при исследовании адгезии тромбоцитов на стекле скорость роста ламеллы не зависела от исходных размеров тромбоцита. По нашим данным, смещение гранул и образование выростов цитоплазмы в нормальных тромбоцитах начинается через 5–10 минут с момента контакта с предметным стеклом при 37 °С (рис. 1 А, Б). При этом псевдоподии и ламеллоподии нередко формировались уже после выхода части гранул за пределы тромбоцитов (рис. 1 В). Через 30 минут адгезии тромбоциты доноров выбрасывали практически весь объем гранул, их псевдоподии и ламеллоподии были отчетливо видны при витальном окрашивании (рис. 1 Г). Размер и количество цитоплазматических выростов заметно отличались у разных клеток. Морфофункциональное исследование тромбоцитов, контактировавших со стеклом в течение 10–15 минут,

позволило выявить три субпопуляции: первый тип – тромбоциты без широких выростов цитоплазмы (ламеллоподий), которые имели лишь узкие псевдоподии, но при этом очень быстро смещали гранулы к клеточной границе (рис. 2 А); второй тип – тромбоциты, образующие ламеллу на определенном участке клетки, но не по всему периметру (рис. 2 Б); третий тип – тромбоциты с выраженной, очень широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (рис. 2 В). В адгезирующих тромбоцитах первого и второго типа основная часть выявляемых гранул расположена вдоль клеточной границы или даже частично выходит за ее пределы. Напротив, в тромбоцитах третьего типа основной объем гранул сосредоточен в центральной части клетки, в зоне так называемого грануломера. Через 10–15 минут адгезии на стекле доля тромбоцитов третьего типа была невысокой у всех доноров

и составляла 10% [9; 14]. Соотношение клеток первого и второго типа могло заметно варьировать у разных доноров, однако во всех случаях подавляющее большинство тромбоцитов с гранулами через 10–15 минут контакта со стеклом не формировали ламеллы по всему периметру клетки. С другой стороны, в процессе длительной экспозиции на стекле при 37 °С (30 минут и более) тромбоциты первого и второго типа постепенно формировали широкую ламеллу. У доноров крови через 1–2 часа контакта со стеклом практически все адгезирующие тромбоциты были клетками третьего типа (рис. 3 А), их доля составляла 92% [90; 94]. У пациентов с венозными тромбозами рост ламеллы происходил быстрее – уже через 15 минут контакта со стеклом 59% тромбоцитов имели выраженные ламеллоподии (рис. 3 Б), а через 30–35 минут практически все такие тромбоциты образовывали широкую ламеллу по всей клеточной границе. Напротив, у пациентов с ожогами рост ламеллы был выражен крайне слабо, через 1 час контакта со стеклом ламеллоподии формировали лишь 17% [15; 18] от всех адгезирующих клеток, подавляющее большинство тромбоцитов имели немногочисленные псевдоподии (рис. 3 В). Неспособность таких тромбоцитов к росту ламеллы может быть обусловлена проводимой антиагрегантной терапией. Стоит особо отметить, что адгезирующие тромбоциты первого типа (без ламеллоподий) через 10–15 минут с момента адгезии могли образовывать мелкие агрегаты, в составе которых клетки очень быстро дегранулировали. Этот эффект наблюдался у большинства пациентов с тромбозами вен (рис. 3 Г), однако аналогичную картину можно было видеть и у доноров крови. При этом быстро дегранулирующие клетки встречались как среди больших округлых тромбоцитов, так и среди дискоцитов. В крови доноров адгезирующие тромбоциты первого типа выделяли все гранулы в течение 12–18 минут с момента контакта со стеклом на фоне отсутствия роста ламеллы. У 70% обследованных доноров доля таких клеток среди всех адгезирующих тромбоцитов варьировала от 8 до 13%, у 20% – от 14 до 20%, у 5% – от 21 до 30%, и еще

у 5% – от 31 до 40%. Таким образом, среди доноров наблюдается явная неоднородность по уровню тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул в процессе адгезии. Примечательно, что такие тромбоциты изначально не имели морфофункциональных отличий от других тромбоцитов с гранулами. Показано, что и у пациентов, и у здоровых людей чувствительность тромбоцитов к индукторам активации может сильно варьировать. Так, среди здоровых людей существуют субпопуляции с повышенной чувствительностью тромбоцитов к низким дозам АДФ и адреналина, с увеличенным числом рецепторов адгезии, с высокой склонностью к спонтанной активации *in vitro* [16–20]. Полиморфизмы рецепторных белков $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 2\beta 3$ повышают риск тромбоза, развития инфаркта миокарда и острого коронарного синдрома [14, 20, 21]. При этом неизвестно, есть ли связь между повышенной чувствительностью тромбоцитов к индукторам активации и высокой скоростью роста ламеллы. У пациентов с тромботическими осложнениями часто увеличены линейные размеры циркулирующих тромбоцитов [4–6], однако стоит подчеркнуть, что большие округлые тромбоциты в циркулирующей крови изначально не имеют ламеллоподий и образуют их только в процессе контакта с адгезивным субстратом. С другой стороны, при адгезии в таких тромбоцитах нередко наблюдается быстрый выброс гранул даже без образования псевдоподий. Есть данные, что дегрануляция и рост ламеллы в тромбоцитах не могут быть инициированы одновременно [8, 12]. Это может объяснить эффект, при котором тромбоциты с большой ламеллой дегранулируют дольше, чем тромбоциты без ламеллы. У пациентов, принимающих препараты – блокаторы рецепторов активации, тромбоциты слабо адгезируют на стекле и рост ламеллы заметно снижен [11]. С другой стороны, подавление роста ламеллы не исключает вероятности быстрой дегрануляции тромбоцитов, с учетом того, что тромбоциты могут быть активированы многими способами [3, 4, 22]. Выявление рисков спонтанной

активации тромбоцитов в настоящее время стоит весьма остро [23]. Существуют инструментальные подходы к решению этой проблемы, при этом известные методики часто не позволяют охарактеризовать морфофункциональный статус тромбоцитов [7, 15, 23]. Мониторинг интенсивности роста ламеллы может дать дополнительную информацию о склонности тромбоцитов к спонтанной активации с учетом их морфофункциональных свойств.

Заключение

Среди тромбоцитов с гранулами выявлена неоднородность по интенсивности образования ламеллы в ходе адгезии на стекле. Тромбоциты, склонные к быстрой дегрануляции, имеют низкую активность ламеллообразования. У пациентов с тромбозами вен нижних конечностей при адгезии тромбоцитов наблюдается одновременно интенсивный рост ламеллы и быстрая дегрануляция клеток без ламеллы с образованием агрегатов на стекле. У пациентов с глубокими ожогами образование тромбоцитарной ламеллы происходит очень медленно и лишь у незначительной части адгезирующих тромбоцитов. Содержание в крови тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул в процессе адгезии, у разных людей может сильно варьировать.

Список литературы

1. Васильев С. А., Виноградов В. Л., Карабудагов З. К. Структура и функции тромбоцитов // Гематология и трансфузиология. – 2010. – Том 55, № 5. – С. 4–9.
2. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов. – М.: Литерра, 2011. – 248 с.
3. Шиффман Ф. Дж. Патифизиология крови. Пер. с англ. Н. Б. Серебряная, В. И. Соловьев. – М.: Бином, 2016. – 448 с.
4. Feng Y., Yu M., Zhu F., Zhang S., Ding P., Wang M. IL-9 Promotes the development of deep venous thrombosis by facilitating platelet function // Thromb Haemost. – 2018. – Vol. 118, № 11. – P. 1885–1894.
5. Icli A., Aksoy F., Turker Y., Uysal B. A., Alpaly M. F., Dogan A., Nar G., Varol E. Relationship between mean platelet volume and pulmonary embolism in patients with deep vein thrombosis // Heart Lung Circ. – 2015. – Vol. 24, № 11. – P. 1081–1086.
6. Борисов В. С. Венозные тромбозы и эмболии. Осложнения при термической травме // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н. В. Склифосовского. – 2016. – № 4. – С. 37–41.
7. Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Kotova Y. N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D. Y., Obyednyy S. I., Kireev I. I., Gachet C., Ataullakhanov F. I., Mangin P. H., Panteleev M. A. Coagulation factors bound to

procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting // Blood. – 2016. – Vol. 128, № 13. – P. 1745–1755.

8. Bye A. P., Unsworth A. J., Gibbins J. M. Screening and High-Throughput Platelet Assays // Methods Mol Biol. – 2018. – Vol. 1812. – P. 81–94.
9. Колосова Е. И., Василенко И. А., Ковалева Л. Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом компьютерной морфометрии // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Том 31, № 2. – С. 58–63.
10. Макаров М. С., Хватов В. Б., Кобзева Е. Н., Боровкова Н. В., Высочин И. В. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 9. – С. 388–391.
11. Макаров М. С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии. Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 – Гематология и переливание крови / НИИ СП им. Н. В. Склифосовского. – М. 2014. – 124 с.
12. Kuchay S. M., Wieschhaus A. J., Marinkovic M., Herman I. M., Chishli A. H. Targeted gene inactivation reveals a functional role of calpain-1 in platelet spreading // J Thromb Haemost. – 2012. – Vol. 10, № 6. – P. 1120–1132.
13. Welsh JD, Poventud-Fuentes I, Sampietro S, Diamond SL, Stalker TJ, Brass LF. Hierarchical organization of the hemostatic response to penetrating injuries in the mouse macrovasculature // J Thromb Haemost. – 2017. – Vol. 15. – P. 526–537.
14. Gurbel PA, Tantry US. Do platelet function testing and genotyping improve outcomes in patients treated with anti-thrombotic agents? // Circulation. – 2012. – Vol. 125. – P. 1276–1287.
15. Vagdatli E., Gounari E., Lazaridou E., Katsibourlia E., Tsikopoulou F., Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation // Hippokratia. – 2010. – Vol. 14, № 1. – P. 28–32.
16. Зайцева Г. А., Ковтунова М. Е., Исаева Н. В., Матрохина О. И., Ивашкина Е. П. Показатели гемостаза у различных категорий доноров // Вестник службы крови России. – 2013. – № 4. – С. 20–22.
17. Момот А. П., Баркаган З. С. Исследование системы гемостаза у лиц пожилого возраста: основные цели и методы // Клиническая геронтология. – 2007. – Том 13, № 4. – С. 44–49.
18. Варламова С. В., Калинин Н. Н., Егорова М. О., Грибкова И. В., Шурхина Е. С., Шмаров Д. А., Ватагина Е. А., Мигунов В. Н., Городецкий В. М. Дополнительные критерии оценки состояния здоровья доноров аппаратах тромбоцитафереза // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Том 59, № 1. – С. 19–25.
19. Lindkvist M., Fernberg U., Ljungberg LU, Fåliker K, Fernström M, Hurtig-Wennlöf A, Grenegård M. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults // Thromb Res. 2019. – Vol. 174. – P. 5–12.
20. Хаспекова С. Г., Сироткина О. В., Шиманова Ю. В., Мазуров А. В. Вариации содержания гликопротеина IIb-IIIa (α2β3 интегрин) у здоровых доноров. Влияние на агрегационную активность тромбоцитов и эффективность действия аспирина // Биомедицинская химия. – 2008. – Том 54, № 3. – С. 361–371.
21. Зотова Т. Ю., Мяндина Г. И., Фролов В. А., Комарова А. Г., Зотов А. К. Влияние полиморфизма гена ITGB на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом // Клиническая медицина. – 2013. – Том 91, № 8. – С. 22–24.
22. Макаров М. С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2015. – Том 3, № 11. – С. 30–35.
23. Рахматуллина Д. М. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов // Вестник современной медицины. – 2017. – Том 10, № 3. – С. 60–65.

Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта в нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории)

М. С. Пименов, старший менеджер по направлению гемостаз и анализ мочи¹

А. В. Васильев, руководитель отдела по контролю качества клинических лабораторных исследований

П. С. Садовников, руководитель проектов²

О. В. Ляшенко, врач по контролю качества²

З. В. Севрук, врач по контролю качества²

Л. Б. Копеева, ведущий специалист клинико-диагностической лаборатории²

И. И. Скибо, директор по технологиям и проектным работам²

Т. В. Вавилова, д.м. н, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики³

¹ООО «Сисмекс РУС», г. Москва

²ООО НПФ «Хеликс», г. Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results)

M.S. Pimenov, A. V. Vasilyev, P.S. Sadovnikov, O. V. Lyashenko, Z. V. Sevruck, L. B. Kopaeva, I.I. Skibo, T. V. Vavilova

Sysmex RUS Co., Moscow; Helix Co., Saint Petersburg; North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Saint Petersburg; Russia

Резюме

Лабораторное определение волчаночного антикоагулянта необходимо для постановки диагноза «антифосфолипидный синдром» (АФС). Для достижения максимальной чувствительности из-за гетерогенной природы волчаночного антикоагулянта рекомендуется использовать две тест-системы с различными аналитическими принципами: тест с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT) и АЧТВ, чувствительный к волчаночному антикоагулянту. Целью данного исследования является проспективное определение референсных интервалов и пороговых значений нормализованного отношения в двух вариантах размораживания плазм. Точки cut-off нормализованного отношения (НО) составили 1,21; 1,18; 1,07 и 1,08 для НО LA1/LA1 (37 °C, 30 минут), НО LA1/LA1 (22–25 °C, 30 минут), НО FSL/FS (37 °C, 30 минут) и НО FSL/FS (22–25 °C, 30 минут) соответственно.

Ключевые слова: волчаночный антикоагулянт, пороговое значение, АФС, dRVVT, АЧТВ.

Summary

Laboratory tests for lupus anticoagulant (LA) are necessary for antiphospholipid syndrome (APS) diagnosis. Due to antibody heterogeneity, there are two test systems recommended to maximize detection rates: one of them is the dilute Russell's viper venom time (dRVVT) and the second one is the activated partial thromboplastin time (APTT). Current guidelines recommend getting the reference ranges and cut-off of the normalized screen/confirm ratio in dRVVT and APTT in every laboratory. The aim of this work is establishing of reference ranges and cut-off for the normalized ratio in dRVVT and APTT reagents using two type of sample preparation. The cut-off values of LA1/LA2 (37 °C, 30 minutes), LA1/LA2 (22–25 °C, 30 minutes), Actin FSL/Actin FS (37 °C, 30 minutes) and Actin FSL/Actin FS (22–25 °C, 30 minutes) pairs in the normalized ratio were 1.21, 1.18, 1.07 and 1.08, respectively.

Key words: lupus anticoagulant, cut-off values, APS, dRVVT, APTT.

Введение

Антифосфолипидный синдром (АФС) диагностируется у пациентов с сосудистым тромбозом или осложнениями во время беременности, лабораторные анализы которых демонстрируют наличие антифосфолипидных антител (АФЛ) [1]. Так как тромбоз и синдром потери плода неспецифичны для АФС, то диагноз будет зависеть от точного и надежного обнаружения АФЛ. Два критерия антитела: анти-

кардиолипиновые антитела (АКЛ) и антитела против β2-гликопротеина I (αβ2GPI) обнаруживаются методом ИФА, в то время как волчаночный антикоагулянт (ВА) выявляется путем проведения фосфолипид-зависимых клоттинговых тестов. Ни один из клоттинговых тестов не является чувствительным для всех ВА, и для достижения максимальной чувствительности и специфичности обнаружения необходимы две тест-системы

с различными аналитическими принципами [2, 3, 4]. Согласно международным руководствам основным тестом для выявления ВА является тест с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT) [2, 3, 4], и главным образом для специфичности выявления клинически значимого ВА в паре используют чувствительный к ВА реагент для определения активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ).

Классически каждый тип теста включает в себя первоначальный скрининг-тест с неразбавленной плазмой пациента, который при повышении значения продолжается тестом со смешиванием для доказательства ингибирования, и если он также повышен, то выполняется подтверждающий тест с неразбавленной плазмой для демонстрации фосфолипидной зависимости [2, 4].

Последние рекомендации Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) [4] и Британского общества гематологии (BSH) [2] поддерживают классический алгоритм. Тем не менее в рекомендациях BSH говорится, что при отсутствии других причин удлинения времени свертывания образцы с отрицательным тестом со смешиванием, но с положительным скринингом и подтверждением в неразбавленной плазме могут быть классифицированы как ВА-положительные. Это означает, что все три теста выполняются, а затем интерпретируются в свете комплексного анализа, а тест со смешиванием не используется для принятия диагностического решения как основного критерия. Руководство Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) переориентирует порядок тестирования (скрининг затем подтверждение, затем тест со смешиванием) и рекомендует, чтобы тест со смешиванием выполнялся только тогда, когда скрининг и подтверждение не являются четкими и (или) когда известны другие причины удлиненного времени свертывания или подозревается ВА [3]. В настоящее время все вышеперечисленные рекомендации [2, 3, 4] предлагают делать заключение о наличии ВА у пациентов на основании подсчета нормализованного отношения (НО), определения среднего нормального времени для каждого реагента и фиксировать пороговое значение (точку cut-off) в каждой лаборатории.

Целью данного исследования является проспективное определение референсных интервалов и порогового значения (точку cut-off) нормализованного отношения в двух вариантах размораживания плазмы для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и для теста АЧТВ, чувствительного к ВА.

Материалы и методы

Настоящее исследование проводилось в лабораторной службе «Хеликс» в городах Санкт-Петербург и Москва.

Пациенты и контроли

В исследование были включены 47 здоровых доноров обоих полов в равной пропорции со следующими критериями включения: отсутствие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, нарушений системы гемостаза, случаев тромбоза, два и более случая выкидышей, возраст от 18 до 60 лет. Критерии исключения: лица, принимающие антикоагулянты, дезагреганты, гормонзаместительную терапию и оральные контрацептивы, беременные женщины и лица, перенесшие вирусную инфекцию в течение последних 14 дней.

Кровь забирали из средней локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette с двойной стенкой с натрия цитратом 3,2 % (Greiner-Bio-One, Австрия) с использованием игл Vacuette 22 калибра (Greiner-Bio-One, Австрия) и минимального застоя. Все образцы дважды центрифугировали: 15 минут при 1500 g, затем 10 минут при более 2500 g для получения бедной тромбоцитами плазмы [6]. Каждую плазму после центрифугирования алиquotировали и замораживали при -20°C и хранили 7 дней до тестирования.

В соответствии с международными руководствами CLSI [3, 6], рекомендуется размораживать плазму на водяной бане в течение 5 минут, в то же время они позволяют валидировать свой режим разморозки, который больше соответствует технологическому процессу лаборатории. Для исследования было выбрано два режима разморозки: в термостате при 37°C в течение 30 минут и при комнатной температуре ($22\text{--}25^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут.

Оборудование и реагенты

Для проведения исследования использовали анализатор плазменного и тромбоцитарного гемостаза CS-5100 (Sysmex Corporation, Япония) и реагенты (Siemens Healthineers, Германия).

Тест dRVVT: реагент для скрининга LA1, реагент для подтверждения LA2.

Тест АЧТВ: реагент для скрининга Actin FSL, реагент для подтверждения Actin FS.

Нормализованное отношение вычислялось по формуле $(b/a) / (d/c)$, где a – среднее значение для скрининга, b – значение скрининга, c – среднее значение для подтверждения и d – значение подтверждения.

Статистическая обработка производилась с использованием программного обеспечения MedCalc версии 19.1 (MedCalc Software, Бельгия).

Метод Тьюки был использован для оценки выбросов, которые не использовались для подсчета средних значений.

Референсный интервал нормализованного отношения и скрининговых тестов вычисляли процедурой непараметрического бутстрепа. В качестве референсных интервалов принимали 95%-ный доверительный интервал в соответствии с рекомендациями CLSI [7].

Для анализа различий между двумя режимами разморозки проводили статистический анализ. Нормальность распределения в группе определялась тестом Шапиро-Уилка при 0,05 %-ном уровне значимости. Если распределение соответствовало закону нормального распределения, для установления различия от исходного уровня внутри группы применялись однофакторный тест ANOVA с последующим тестом Ньюмана-Келса и t-тест Стьюдента (для попарного сравнения двух режимов размораживания образцов). Если распределение в группе не соответствовало закону нормального распределения, для установления различия от исходного уровня внутри группы применялся непараметрический тест Крускала-Уоллиса с последующим тестом Данна и тест Манна-Уитни (для попарного сравнения двух режимов размораживания образцов).

Результаты

Полученные данные теста с разбавленным ядом гадюки Рассела (LA1 и LA2) проверили на выбросы двусторонним методом Тьюки. В скрининге были определены пять выпадающих значений при обоих режимах разморозки, которые не учитывались при подсчете среднего значения. В подтверждающем тесте выпадающих значений обнаружено не было, поэтому при подсчете нормализованного отношения были исключены пять значений. Средние значения

Таблица 1
Референсный интервал для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела (LA1 и LA2)

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Среднее время LA1 (скрининг), с	41,19	40,77
Среднее время LA2 (подтверждение), с	32,64	33,07
Отношение скрининг LA1 [90%-ный ДИ]	0,79 [0,7364; 0,8283] – 1,21 [1,1588; 1,2600]	0,81 [0,7697; 0,8530] – 1,20 [1,1539; 1,2350]
Отношение подтверждение LA2 [90%-ный ДИ]	0,90 [0,8761; 0,9163] – 1,11 [1,0865; 1,1275]	0,90 [0,8787; 0,9214] – 1,11 [1,0852; 1,1288]
Нормализованное отношение LA1/LA2 [90%-ный ДИ]	0,79 [0,7364; 0,8343] – 1,21 [1,1484; 1,2618]	0,82 [0,7827; 0,8570] – 1,18 [1,1356; 1,2247]

Таблица 2
Референсный интервал для теста АЧТВ (Actin FSL и Actin FS)

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Среднее время Actin FSL (скрининг), с	30,46	31,39
Среднее время Actin FS (подтверждение), с	26,67	27,34
Отношение скрининг Actin FSL [90%-ный ДИ]	0,86 [0,8281; 0,8891] – 1,14 [1,1031; 1,1712]	0,86 [0,8338; 0,8885] – 1,14 [1,1019; 1,1701]
Отношение подтверждение Actin FS [90%-ный ДИ]	0,85 [0,8224; 0,8834] – 1,17 [1,1277; 1,1978]	0,85 [0,8222; 0,8756] – 1,15 [1,1060; 1,1822]
Нормализованное отношение Actin FSL / Actin FS [90%-ный ДИ]	0,91 [0,8998; 0,9309] – 1,07 [1,0500; 1,0851]	0,90 [0,8848; 0,9240] – 1,08 [1,0549; 1,0957]

Таблица 3
Пороговые значения для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и для теста АЧТВ, чувствительного к ВА

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Отношение скрининг LA1	1,21	1,20
Нормализованное отношение LA1/LA2	1,21	1,18
Отношение скрининг Actin FSL	1,14	1,14
Нормализованное отношение Actin FSL/Actin FS	1,07	1,08

Таблица 4
Различия для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и теста АЧТВ, чувствительного к ВА

Группа	Статистически значимое отклонение от нормального распределения	Тест Ньюмана-Келса
LA1, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9812 – отклонения нет (P = 0,7095)	P > 0,05
LA1, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9537 – отклонения нет (P = 0,0879)	
Actin FSL, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9751 – отклонения нет (P = 0,5312)	P > 0,05
Actin FSL, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9666 – отклонения нет (P = 0,3089)	
LA2, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9828 – отклонения нет (P = 0,7112)	P > 0,05
LA2, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9799 – отклонения нет (P = 0,5889)	
Actin FS, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9530 – отклонения нет (P = 0,1120)	P > 0,05
Actin FS, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9693 – отклонения нет (P = 0,3742)	

для скрининга определены как 41,19 и 40,77 с для термостата и комнатной температуры соответственно, а средние значения для подтверждения – как 32,64 и 30,07 с.

Результаты теста АЧТВ (Actin FSL и Actin FS) также проверили на выбросы двусторонним методом Тьюки. В режиме термостата выпадающих значений не обнаружено. В случае разморозки при комнатной температуре были удалены из анализа одно значение в скрининге и два значения в подтверждении,

которые не учитывались при подсчете среднего значения. При подсчете нормализованного отношения итога было исключено три значения. Средние значения для скрининга определены как 30,46 и 31,39 с для термостата и комнатной температуры соответственно, а средние значения для подтверждения определены как 26,67 и 27,34 с.

Для принятия решения о наличии ВА у пациента необходимо рассчитать пороговое значение нормализованного отношения «скрининг / подтвержде-

ние». Пороговые значения (точки cut-off) определялись верхней границей референсного интервала нормализованного отношения и скрининга в соответствии с рекомендациями CLSI [7].

При сравнении значений, полученных в двух режимах разморозки (табл. 4), и попарного сравнения друг с другом (термостат и комнатная температура) статистических различий не выявлено, что говорит об одинаковом влиянии на результат двух режимов размораживания образцов.

Обсуждение

Отсутствие «золотого стандарта» и эталонной плазмы для обнаружения ВА позволяет многочисленным переменным способствовать неполной аналитической стандартизации в лабораторной диагностике ВА. Различия в составе реагентов и методах определения пороговых значений не допускают принять общие (международные) пороговые значения [9, 10] для определения ВА и, следовательно, обязательно рекомендуют локальное выведение или валидацию референсных интервалов и точек cut-off в каждой лаборатории [2, 3, 4, 5].

Полученные результаты приближены к рекомендуемым пороговым значениям (менее 1,2) [3] и соответствуют недавнему исследованию [8] на той же аналитической паре (реагент и анализатор).

Стоит отметить, что размораживание образца в термостате более стандартизировано за счет постоянной температуры и сезонные колебания температуры в помещении не будут сказываться на результате. В то же

время нельзя исключать человеческий фактор, поэтому даже непродолжительное превышение нахождения образца в термостате критически скажется на результате, и режим разморозки при комнатной температуре представляется менее рискованным.

Выводы

Определены референсные интервалы для скринингового реагента LA1 и Actin FSL / подтверждающего реагента LA2 и Actin FS. Пороговые значения (точки cut-off) нормализованного отношения составили 1,21; 1,18; 1,07 и 1,08 для HO LA1/LA1 (37 °C, 30 минут), HO LA1/LA1 (22–25 °C, 30 минут), HO FSL/FS (37 °C, 30 минут) и HO FSL/FS (22–25 °C, 30 минут) соответственно. Различия в результатах в двух режимах размораживания образца не обнаружены.

Список литературы

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.

2. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2012; 157: 47–58.
3. CLSI. Laboratory testing for the lupus anticoagulant; approved guide. CLSI document H60-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
4. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737–40.
5. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 163–71.
6. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
7. CLSI. document; Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
8. Moore GW, Kumano. Lupus anticoagulant assay cut-offs vary between reagents even when derived from a common set of normal donor plasmas. *J Thromb Haemost*, 2019. Oct 30.
9. Gardiner C, Mackie IJ, Malia RG, Jones DW, Winter M, Leeming D, Taberner DA, Machin SJ, Greaves M. The importance of locally derived reference ranges and standardized calculation of dilute Russell's viper venom time results in screening for lupus anticoagulant. *Br J Haematol* 2000; 111: 1230–1235.
10. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M, Devreese K, Dlott JS, Giacomello R, Gray E, Legnani C, Martinuzzi ME, Pradella P, Siegmund A, Subramanian S, Suchon P, Testa S. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants. Results of an international multicenter multipoint study. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1180–1190.

Для цитирования: Пименов М.С., Васильев А.В., Садовников П.С., Ляшенко О.В., Севрук З.В., Копеева Л.Б., Скибо И.И., Вавилова Т.В. Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта на нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории). *Медицинский алфавит*. 2020;(5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>

For citation: Pimenov M.S., Vasilyev A.V., Sadovnikov P.S., Lyashenko O.V., Sevruk Z.V., Kopeeva L.B., Skibo I.I., Vavilova T.V. Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results). *Medical alphabet*. 2020; (5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>



Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием

Здание Правительства Москвы. Новый Арбат, 36
19-20 марта 2020 г.

www.mdb2020.ru ; www.expodata.info

Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020

Регистрация на сайте www.expodata.info **ОБЯЗАТЕЛЬНА!**
Документация по данному мероприятию будет представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов для НМО.

Оргкомитет конференции:
ООО «Экспо пресс», 129515,
Москва, ул. Ак. Королева, 13, оф. 806
Тел.: (495) 617-36-43/44; Факс: (495) 617-36-79
E-mail: lvov.m.g@inbox.ru; www.expodata.info

Организатор:
ФБУН Центральный НИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора

Соорганизатор:
СМД
ЦЕНТР МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ

Технический организатор:


Место грибов рода *Candida* в этиологической структуре инфекционных осложнений у пациентов онкологического стационара

С. А. Цитренко, врач-бактериолог

Е. Ю. Лукьянова, врач-бактериолог

М. В. Полуэктова, к.б.н., зав. отделением лабораторной диагностики, врач клинической лабораторной диагностики

Л. Ю. Гривцова, д.б.н., зав. отделом лабораторной медицины, врач клинической лабораторной диагностики, аллерголог-иммунолог

Медицинский радиологический научный центр имени А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Калужская область

Place of Candida fungi in etiological structure of infectious complications in patients of oncological hospital

S. A. Tsitrenko, E. Yu. Lukyanova, M. V. Poluektova, L. Yu. Grivtsova

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

Резюме

В статье описывается спектр грибов рода *Candida*, выделенных от пациентов стационара в 2018 году, приводится анализ чувствительности грибов рода *Candida* к противогрибковым средствам.

Ключевые слова: грибы, *Candida*, чувствительность, противогрибковые препараты.

Summary

The article describes the spectrum of *Candida* fungi, isolated from hospital patients in 2018, provides an analysis of the sensitivity of *Candida* fungi to antifungal agents.

Key words: fungi, *Candida*, susceptibility, antifungal drugs.

Введение

Грибы рода *Candida* являются представителями нормальной микрофлоры человека. У здорового человека *Candida* колонизирует ЖКТ, влагалище, уретру, кожные покровы. Род *Candida* включает в себя около 400 видов, из которых клиническое значение для человека имеют около 20. Среди здоровых людей носительство *Candida* составляет 25–50 %, у онкологических больных, получающих химиотерапию, длительно находящихся в стационаре, носительство может достигать 50–70 %. Грибы рода *Candida* занимают четвертое место в мире по частоте выявления среди возбудителей нозокомиальных инфекций. В связи с увеличением числа пациентов с иммуносупрессией кандидозные инфекции вносят вклад в рост заболеваемости и смертности [1, 2, 4, 8]. Наиболее часто поражение грибковой инфекцией регистрируют у больных с опухолями лимфоидной и кроветворной системы, особенно после курсов высокодозной химиотерапии [6]. Широкое распространение инвазивных диагностических и лечебных процедур также приводит к увеличению риска развития поверхностных и инвазивных грибковых инфекций [7].

Цель исследования: определение спектра грибов рода *Candida*, выделенных из различных биоматериалов больных с инфекционными осложнениями в отделениях терапевтического и хирургического профиля, выявление доминирующих видов и определение их чувствительности к основным противогрибковым препаратам.

Материалы и методы

В 2018 году были исследованы 2361 образец биоматериалов от пациентов с инфекционными осложнениями. Исследовали кровь, мочу, кал, мазки из полости рта, носа, зева, отделяемое ран, мокроту, бронхиальные смывы, пунктаты плевральной полости. Посев и выделение культур микроорганизмов осуществляли по общепринятым методикам. Идентификацию и определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили на анализаторе Vitek 2 Compact (Bio Merieux, Франция). Для идентификации и определения чувствительности грибов были использованы карты YST и AST-YS 01 (включающую флюконазол, вориконазол, амфотерицин В, флуцитозин). К пациентам терапевтического профиля были отнесены больные, находящиеся в отделениях лечения гемобластозов и противоопухолевой терапии, проходившие курсы лучевой и химиотерапии. К пациентам хирургического профиля – больные после плановых хирургических вмешательств, у которых проводилась предоперационная подготовка, включающая общеукрепляющую терапию, профилактику инфекционных осложнений и коррекцию параметров гемостаза.

Результаты и обсуждение

В 2018 году из образцов, поступивших на исследование, было выделено 264 культуры грибов рода *Candida*, что составило 21,3 % от общего числа клинически значимых микроорганизмов (1242). Доля грибковой инфекции в отделениях терапевтического профиля (отделение лечения

гемобластозов, терапевтическое отделение) составила 38,3 % (рис. 1) хирургического – 12,9 % (рис. 2).

Наибольшее количество грибов выделено у пациентов, которые проходили курсы лучевой, химио- и антибиотикотерапии. Основная доля грибов была обнаружена в ассоциации с другими микроорганизмами: для отделений хирургического профиля – с грамотрицательной флорой, а для терапевтического профиля – с грамположительной.

Грибы рода *Candida* в зависимости от частоты обнаружения распределились следующим образом: *C. albicans* – 68,2 % (180), *C. glabrata* – 9,5 % (25), *C. krusei* – 6,4 % (17), *C. dubliniensis* – 4,5 % (12), что не противоречит литературным данным [4]. Грибы других видов были представлены единичными культурами (рис. 3).

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, в том числе грибов рода *Candida*, является основой выбора лекарственного препарата [3, 5, 6].

Результаты определения чувствительности часто встречающихся видов *Candida* к противогрибковым препаратам представлены в табл. 1. *C. albicans* проявляла чувствительность к амфотерицину В в 96,0 %, к флуцитозину – в 100,0 %, к флюконазолу – в 93,2 %, к вориконазолу – в 99,4 % случаев. В то время как чувствительность к флюконазолу у *C. glabrata* сохранилась лишь у 40,0 % штаммов, а выделенные штаммы *C. krusei* проявляли устойчивость к флюконазолу в 81,0 % случаев.

Большее количество грибов рода *Candida* (38,3 %) было выделено у больных опухолями лимфоидной и кроветворной системы, что обусловлено снижением иммунитета на фоне проводимой химиолучевой терапии и антибиотикотерапии по сравнению с больными хирургического профиля (12,9 %), прошедшими предоперационную подготовку.

Среди выделенных грибов преобладает *C. albicans* (68,2 %), сохраняющая чувствительность к основным противогрибковым препаратам. Неоднородность видового состава выделенных грибов и их различное отношение к антимикотикам диктуют необходимость определения чувствительности выделенного патогена к противогрибковым препаратам.

Список литературы

1. Toutounji M., Tokajian S., Khalaf R. A. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Candida albicans* Lebanese Hospital Isolates Resistant and Sensitive to Caspofungin, Fungal Genetics and Biology (2019), 127: 12–22.
2. Ashraf A. Kadry, Amira M. El-Ganiny, and Ahmed M. El-Baz, Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*, African Health Sciences (2018), 18 (4):1166–1174.
3. В. М. Гельфонд. Инфекционные осложнения у онкологических больных, Практическая онкология 2009, Т. 10, № 3 стр. 141–146.

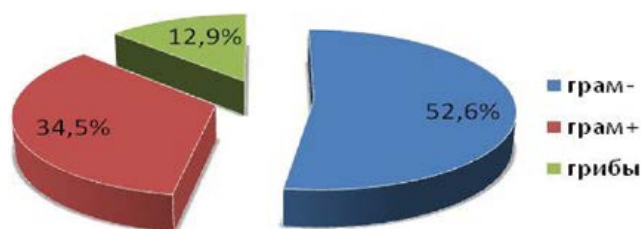


Рисунок 1. Распределение клинически значимых микроорганизмов в отделениях хирургического профиля.

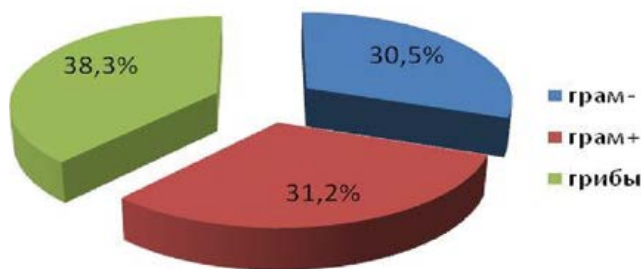


Рисунок 2. Распределение клинически значимых микроорганизмов в отделениях терапевтического профиля.

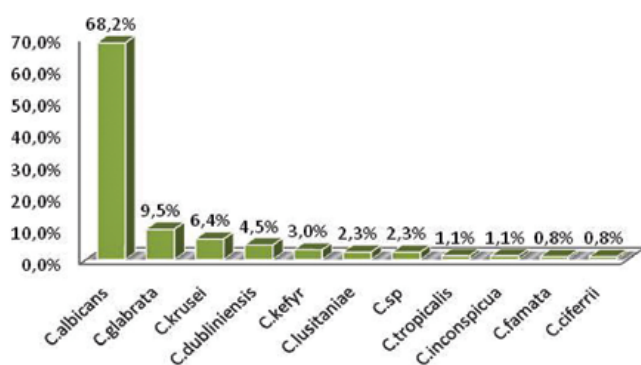


Рисунок 3. Видовое распределение грибов рода *Candida*.

4. А. В. Веселов, Р. С. Козлов. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия приложение 2016, Т. 18, № 2.
5. Веселов А. В., Васильева Н. В., Богомолова Т. С., Рауш Е. Р., Куцевалова О. Ю., Нижегородцева И. А., Петрова Л. В., Шмидт Н. В., Москвитина Е. Н., Сухорукова М. В., Иванчик Н. В., Козлов Р. С. Определение чувствительности клинических штаммов *Candida glabrata* к эхинокандинам с помощью системы Sensititre YeastOne. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018, Т. 20, № 1. 49–53.
6. Г. А. Клясова. Микотические инфекции: клиника, диагностика, лечение. Инфекции и антимикробная терапия. 2000. Т. 2, № 6. 184–189.
7. Н. Н. Клишко, Микозы: диагностика и лечение 2008. – 336 с.
8. Багирова Н. С., Дмитриева Н. В. Резистентность *Candida* spp. к амфотерицину в у онкологических больных. Журнал инфектологии. 2016; 8 (1): 26–31.

Таблица 1

Чувствительность грибов рода *Candida* к основным противогрибковым препаратам, 2018 год

Вид (количество штаммов)	Амфотерицин В			Флуцитозин			Флюконазол			Вориконазол		
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
<i>C. albicans</i> (180)	1,7	2,3	96,0			100,0	4,0	2,8	93,0	0,6		99,4
<i>C. glabrata</i> (25)	4,0		96,0			100,0	8,0	52,0	40,0	8,0	8,0	84,0
<i>C. krusei</i> (17)	25,0		75,0	43,8	56,3		81,0	19,0		12,5	6,3	81,3
<i>C. dubliniensis</i> (12)			100,0	8,3	91,7		8,3	92,0				100,0

Для цитирования: Цитренко С. А., Лукьянова Е. Ю., Полуэктова М. В., Гривцова Л. Ю. Место грибов рода *Candida* в этиологической структуре инфекционных осложнений у пациентов онкологического стационара. Медицинский алфавит. 2020;(5):38–39. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-38-39>

For citation: Tsitrenko S. A., Lukyanova E. Yu., Poluektova M. V., Grivtsova L. Yu. Place of *Candida* fungi in etiological structure of infectious complications in patients of oncological hospital. Medical alphabet. 2020; (5):38–39. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-38-39>

Клиническое значение и особенности лабораторного определения витамина D

Л. Б. Дрыгина, д.б.н., проф., в.н.с. НИО организации научной деятельности

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, г. Санкт-Петербург

Clinical significance and features of laboratory determination of vitamin D

L. B. Drygina

All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Классическая функция витамина D заключается в регуляции обмена кальция. Однако в настоящее время получены убедительные данные о взаимосвязи дефицита витамина D с развитием целого ряда заболеваний. В статье дается анализ результатов исследований последних лет, в которых представлены эффекты витамина D в отношении иммунной, сердечно-сосудистой систем и болезней печени. Рассматриваются механизмы поступления витамина D в организм, представлены новые данные о регуляции уровня активной формы витамина D фосфотонинами (FGF23, MEPE, sFRP-4) и белком Klotho. Представлена характеристика методов определения витамина D в сыворотке крови. Отдельно рассматриваются биологические факторы, которые влияют на результаты количественного определения витамина D разными методами.

Ключевые слова: витамин D, дефицит витамина D, методы количественного определения.

Summary

The classic function of vitamin D is to regulate calcium metabolism. Currently, however, convincing data have been obtained on the relationship of vitamin D deficiency with the development of a number of diseases. The article analyzes the results of recent studies that present the effects of vitamin D on the immune system, cardiovascular system and liver diseases. Discusses the mechanisms of admission of vitamin D in the body, presents new data on the regulation of levels of active form of vitamin D phosphatonins (FGF23, MEPE, sFRP-4) and protein Klotho. The characteristic of methods of determination of vitamin D in blood serum is presented. Biological factors that influence the results of quantitative determination of vitamin D with different methods are considered separately.

Key words: vitamin D, vitamin D deficiency, methods of quantitative determination.

Классическая, наиболее известная, функция витамина D заключается в регуляции кальциевого гомеостаза преимущественно за счет образования и резорбции костной ткани либо взаимодействия с парашитовидной железой, почками, кишечником. Витамин D поддерживает необходимые уровни кальция и фосфора для минерализации костной ткани. Он необходим для нормального функционирования остеобластов и остеокластов в процессе роста костей и их ремоделирования.

За последние годы представления о роли витамина D для организма человека существенно расширились. Более 80 тысяч публикаций на электронном ресурсе PubMed подтверждают связь дефицита витамина D не только с заболеваниями костной системы, но и с инсулинорезистентностью, сахарным диабетом второго типа, увеличением массы тела, сердечно-сосудистыми заболеваниями, репродуктивным здоровьем, иммунитетом и воспалением. Физиологические уровни витамина D необходимо поддерживать для предупреждения развития заболеваний, ассоциированных со старением человека.

В настоящее время имеются убедительные данные о недостаточности витамина D во всех возрастных группах населения Российской Федерации и многих стран мира. Однако широкий популяционный скрининг витамина D проводить не рекомендуется, так как пока не установлены высокие критерии доказательности взаимосвязи дефицита витамина D и развития внескостной патологии.

Согласно клиническим рекомендациям Ассоциации клинических эндокринологов (2015), определение запасов витамина D актуально для пациентов с факторами риска развития его дефицита [1]. К таким группам относятся лица с заболеваниями костей, пожилые с переломами и падениями в анамнезе, пациенты с ожирением (ИМТ более 30 кг/м²), с синдромом мальабсорбции, пациенты, длительно принимающие глюкокортикоиды и некоторые другие лекарственные препараты. Передозировка витамина D развивается довольно редко и только при длительном ежедневном приеме в дозе 50000 Ед. При передозировке витамина D происходит интенсивное всасывание кальция, поступающего

с пищей, он откладывается в мягких тканях, артериях, роговице, мышцах и особенно в почках в виде кальцификатов, что также является крайне опасным для организма состоянием. Таким образом, как недостаток, так и избыток витамина D могут приводить к развитию патологических состояний.

Витамин D – это общее название группы биологически активных соединений с одинаковыми биологическими функциями, но которые различаются по своей биологической активности и способам получения. Известны не менее шести форм витамина D, например D₁ был впервые выделен в 1924 году из растительных масел, а D₂ и D₃ – в 1931-м. Наиболее активными являются две формы D₂ и D₃, они обеспечивают биологические эффекты на уровне организма человека.

Основная часть витамина D (90%) образуется в коже в виде витамина D₃ под воздействием УФ-лучей, и только 10% поступает в организм с пищей в виде провитамина D₂. Под термином «витамин D» принято понимать общую концентрацию форм D₂ и D₃ [7].

В печени витамин D от обоих источников превращается в 25-ги-

дроксивитамин D (кальцидиол или [25(OH)D]). Именно эта форма витамина циркулирует в крови в связанном с транспортным витамин-D-связывающим белком состоянии. [25(OH)D] имеет продолжительный период полураспада около 15 дней и по этой причине используется для оценки уровня или статуса витамина D в организме.

Дефицит витамина D у жителей Российской Федерации считается при уровне [25(OH)D] в сыворотке крови менее 20 нг/мл (50 нмоль/л), недостаток – 20–30 нг/мл (50–75 нмоль/л), адекватный уровень – 75 нмоль/л, рекомендуемые целевые значения при коррекции дефицита витамина D – 30–60 нг/мл (75–150 нмоль/л) [1]. Принятые нормы отличаются от значений, установленных в других странах, например США.

Кальцидиол – это биологически инертная форма, для ее активации требуется повторное гидроксилирование в почках с образованием 1,25-дигидроксивитамина D (кальцитриола или [1,25(OH)₂D]). Только биологически активный кальцитриол может связываться со специфическими рецепторами.

Многие клетки имеют рецептор витамина D (RVD), либо в тканях присутствует 1 α -гидроксилаза, за счет которой они сами могут вырабатывать [1,25(OH)₂D]. В таких ситуациях наблюдаются высокие внутриклеточные концентрации [1,25(OH)₂D] без увеличения концентрации витамина D в общем кровотоке.

RVD относятся к суперсемейству, в которое включены рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов и все рецепторы ретиноевой кислоты [21]. Наблюдается структурная и функциональная гомология этих рецепторов.

RVD обнаружены в 35 органах и тканях, в том числе у большинства клеток иммунной системы [16]. RVD экспрессируются в тонком кишечнике. Экспериментальные исследования на крысах показали, что 88% RVD экспрессируется в подвздошной кишке, 4% – в тощей кишке и 8% – в двенадцатиперстной кишке [18]. При многих состояниях важно определять не только статус витамина D, но и уровень экспрессии RVD. Например, при про-

грессировании остеопороза костной ткани важное значение имеют факторы, связанные не только с нарушением метаболизма витамина D, но и с дефицитом RVD, при котором возникает толерантность к витамину D. В кишечнике витамин D способствует усилению экспрессии кальциевого канала клеток эпителия, кальцийсвязывающего белка и других белков, участвующих в транспорте ионов кальция из просвета кишечника в кровяной ток. Витамин D увеличивает активность поглощения кальция и кишечный транспорт ионов кальция. Витамин D классически регулирует транспорт ионов кальция в организме, отсюда его название «кальциферол», что в переводе означает «несущий кальций». Нарушение кальциевого обмена имеет большое клиническое значение [2].

1,25-дигидроксивитамин D поступает внутрь клетки, связывается с рецептором клеточных ядер и активизирует гены, контролирующие синтез функциональных транспортных белков для ионов кальция. 1,25-дигидроксивитамин D также взаимодействует с RVD на поверхности остеобластов и стимулирует экспрессию RANKL (активатора рецептора лиганда транскрипционного фактора каппа-B). Это приводит к каскадному эффекту, усиливающему созревание остеокластов из их предшественников, что в свою очередь приводит к выходу запасов ионов кальция из костной ткани для поддержания кальциевого гомеостаза.

Активность 1 α -гидроксилазы (CYP27B 1) обнаружена, помимо почек, во многих органах и клетках, например в паращитовидной железе, кератиноцитах, остеокластах, макрофагах, эпителиоцитах толстой кишки, головном мозге, простате, молочных железах, легких, β -клетках поджелудочной железы [16, 17]. В этих клетках также происходит образование кальцитриола, оказывающего аутокринные и паракринные эффекты на близлежащие клетки.

Кальцитриол способен регулировать активность более 200 генов, связанных с процессами пролиферации и дифференцировки клеток. Роль кальцитриола состоит в торможении размножения клеток и стимуляции их конечной дифференцировки.

Локальный синтез кальцитриола играет важную роль в регуляции кальциевого обмена, формируя ряд отрицательных обратных связей. Так, местное образование кальцитриола в тканях паращитовидной железы приводит к подавлению синтеза паратиреоидного гормона (ПТГ). Повышение уровня кальцидиола в результате введения препарата витамина D закономерно приводит к снижению уровня ПТГ, но не сопровождается существенным повышением уровня кальцитриола и кальция в системном кровотоке [12].

В коже кальцитриол вызывает усиление формирования меланоцитов, что приводит к значительному уменьшению воздействия УФ-излучения на кератиноциты, а следовательно, к уменьшению образования витамина D₃ и формированию кальцидиола [12]. В результате местный синтез кальцитриола в коже также формирует отрицательную обратную связь, препятствуя чрезмерному повышению концентрации кальцидиола при интенсивной инсоляции. Уровень витамина D₃ у темнокожих ниже, чем у светложкожих людей.

В пожилом возрасте нарушаются процессы образования активных форм метаболитов витамина D и их рецепции в органах-мишенях. С возрастом уменьшается способность кожи продуцировать витамин D₃, и первостепенное значение для поддержания статуса витамина D приобретает поступление провитамина D₂ с пищевыми продуктами или биодобавками. С возрастом при усилении пигментации кожи выработка витамина D также снижается. Под воздействием УФ-лучей в коже 70-летнего человека образуется в четыре раза меньше витамина D₃, чем у 20-летнего.

Способностью тормозить образование кальцитриола и реабсорбцию фосфора в почках обладают фосфонины (FGF23, MEPE, sFRP-4) и белок Klotho. Взаимодействие фактора роста фибробластов 23 (FGF23) с рецептором требует присутствия кофактора – белка Klotho. Нарушение синтеза любого из этих белков в эксперименте приводит к тяжелой фосфатемии, гиперпаратиреозу, массивной внескостной кальцификации.

У человека FGF23 постоянно циркулирует в крови [20]. FGF23, секретируемый остеоцитами костной ткани, способствует активации 24-гидроксилазы (CYP24A1) в ответ на высокие концентрации кальцитриола и повышению концентрации фосфора в крови. Под действием 24-гидроксилазы высокие концентрации кальцитриола переводятся в неактивную форму – кальцитроевую кислоту, которая выводится из организма с желчью.

Прием препаратов витамина D в высоких дозах (300 000 МЕ в сутки) увеличивает концентрацию $[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$ и FGF-23 [28]. Выявлены положительная корреляция между концентрацией в крови FGF-23 и сывороточными фосфатом ($r = 0,36$; $p = 0,024$) и кальцием ($r = 0,532$; $p < 0,001$) и отрицательная корреляция между $1,25(\text{OH})_2$ -витамином D и FGF-23 ($r = -0,32$; $p = 0,036$). FGF-23 ингибирует *in vivo* и *in vitro* эффект высоких концентраций витамина D.

Белок Klotho выполняет роль не только кофактора фосфотонинов. Этот белок секретируется паращитовидными железами при значительном падении уровня кальция в крови. Он вызывает усиление высвобождения ПТГ, активирует кальциевые каналы. Гормональные эффекты белка Klotho приводят к снижению концентрации фосфора и повышению концентрации кальция в результате прямого стимулирования его всасывания в кишечнике и реабсорбции в почках [20, 27].

Гипокальциемия с низким уровнем фосфора обычно связана с остеопорозом, обусловленной дефицитом витамина D или нарушением действия его метаболитов. В этом случае нарушается всасывание кальция в кишечнике и реабсорбция в почках.

Дефицит витамина D часто наблюдается вследствие мутации активности α -гидроксилазы и снижения синтеза $[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$ (витамин D – зависимость I типа), так и мутации гена рецептора витамина D (витамин D – зависимость II типа), в результате чего развивается резистентность тканей к действию $[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$. Концентрация кальцитриола в сыворотке крови обычно не снижается до тех пор, пока дефицит витамина D не достигнет критических значений.

Дефицит витамина D становится все более острой проблемой во всем мире. Большое число эпидемиологических исследований показали недостаточность витамина D среди разных популяций и географических регионов: до 30–42 % жителей планеты имеют уровень витамина D менее 50 нмоль/л.

Для жителей Российской Федерации дефицит витамина D связан в основном с небольшим количеством солнечных дней в регионах и тем обстоятельством, что с ноября по март из-за более острого угла падения солнечных лучей кожа человека практически не вырабатывает витамин D. Недостаточность витамина D в экваториальных странах с достаточной инсоляцией связана в основном с темным цветом кожи у населения, особенностями ношения национальной одежды, продолжительным временем работы в помещениях, использованием солнцезащитных кремов. Кроме того, на дефиците витамина D может сказываться недостаточно активное всасывание витамина D из желудочно-кишечного тракта, а у лиц с избыточной массой тела дефицит витамина D увеличивается из-за его депонирования в подкожно-жировой клетчатке.

За последние годы сложилось представление о витамине D как универсальном медиаторе различных физиологических процессов в организме человека [18]. В клинических рекомендациях (2015) обобщены установленные в настоящее время функции витамина D [1]. Так, витамин D представляет собой мощный эндокринный регулятор экспрессии ренина, а дефицит витамина D – это новый фактор риска прогрессирования болезни почек. Витамин D проявляет мощный протективный эффект в развитии злокачественных образований, прежде всего рака толстого кишечника. У мужчин применение витамина D связано с повышением уровня тестостерона в крови, хотя механизмы этого процесса не установлены. В результате того, что RVD и CYP27B1 широко распространены во всех отделах головного мозга, витамин D способствует фагоцитозу амилоидных бляшек, а дефицит витамина D связан с высоким риском снижения когнитивной функции.

В обзоре [6] обобщены патогенетические механизмы вовлеченности биологически активной формы витамина D $[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$ во многие биологические процессы, включая модуляцию иммунной системы. Кроме того, присутствие рецептора витамина D было обнаружено почти во всех иммунных клетках, и некоторые из его полиморфизмов были связаны с увеличением частоты аутоиммунных заболеваний. Это открытие привело к предположительной связи между дефицитом витамина D и аутоиммунными заболеваниями. Выявлено, что у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями уровень витамина D был значительно ниже, чем у здоровых людей [6]. Однако пока неясно, является ли дефицит витамина D причиной или скорее следствием заболевания. Ограничения проведенных исследований, такие как небольшое число пациентов, гетерогенность выбранных групп, условия окружающей среды, методы измерения концентрации витамина D в сыворотке крови и другие факторы, пока не позволяют прийти к однозначным результатам, подтверждающим взаимосвязь между низким уровнем витамина D и развитием аутоиммунного заболевания.

Витамин D, связываясь с RVD, запускает каскад реакций синтеза катионных белков кателицидина и β -дефенсинов, оказывающих мощное защитное действие против микобактерий туберкулеза [22]. Снижение сывороточного уровня витамина D наблюдалось у больных активными формами туберкулеза по сравнению со здоровыми. Установлено, что уровни мРНК RVD достоверно ниже у больных активными формами туберкулеза по сравнению с постоянно контактирующими с ними лицами и здоровым контролем, а уровни кателицидина выше. Требуются дальнейшие исследования для определения роли добавок витамина D в профилактике и лечении туберкулеза.

По результатам 20-летнего когортного исследования (обследовано 3946 жителей Австралии в возрасте от 25 до 84 лет) была установлена высокая взаимосвязь уровня 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови и смертности от сердечно-сосудистых

заболеваний (ССЗ) [30]. Показано, что уровни витамина D в крови ниже 55–65 нмоль/л являются предикторами смертности от ССЗ, в том числе сердечной недостаточности. Однако прием препаратов витамина D не всегда оказывает положительный эффект на снижение смертности от ССЗ. Так, результаты некоторых когортных исследований, представленные в обзоре [31], свидетельствуют о негативном влиянии на исходы ССЗ приема препаратов витамина D в высоких дозах, особенно если уровень $[25(\text{OH})\text{D}]$ в сыворотке крови пациентов превышает 100 нмоль/л. В исследовании принимали участие пациенты с дефицитом 25-гидроксивитамина D (то есть с концентрацией в сыворотке крови менее 30 нмоль/л согласно нормам США), авторы сделали заключение, что важное значение имеет лабораторное мониторирование уровня 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови и нельзя допускать превышения концентрации более 100 нмоль/л.

Потенциальными факторами риска ССЗ являются не только повышенные концентрации гомоцистеина в сыворотке крови, но и дефицит витамина D. Повышенный уровень гомоцистеина считается при концентрации более 13 мкмоль/л. Проанализированы данные 4475 участников профилактической программы здоровья [23]. Пациенты принимали препараты витамина D, а затем проводилось повторное определение в сыворотке крови $[25(\text{OH})\text{D}]$ и гомоцистеина. Наблюдения показали, что временное улучшение статуса витамина D достоверно снижает концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови и, следовательно, потенциально может способствовать первичной профилактике ССЗ.

Ключевую роль в выявлении пациентов с повышенным риском ухудшения прогноза развития сердечной недостаточности и сокращения продолжительности жизни играет определение витамина D и основного маркера кальцификации сосудов остеопротегерина (ОПГ) [9]. Авторы исследования показали, что уровень 25-гидроксивитамина D_3 был достоверно ниже у пациентов с сердечной недостаточностью ($20,49 \pm 7,31$ против $37,09 \pm 4,59$ нг/мл в контрольной

группе; $p < 0,001$). Значения ОПГ были достоверно выше у пациентов с сердечной недостаточностью (CH) по сравнению с контрольной группой ($4,7 \pm 0,25$ против $1,3 \pm 0,67$ нг/мл; $p < 0,001$). Значения ОПГ достоверно коррелировали с конечно-диастолическим объемом левого желудочка LVEDV ($r = 0,862$; $p < 0,001$), функцией выброса левого желудочка LVEF ($r = -0,832$; $p < 0,001$) и скоростью каротидно-бедренной пульсовой волны C-f PWV ($r = 0,833$; $p < 0,001$), а также с концентрацией $[25(\text{OH})\text{D}_3]$ в сыворотке крови ($r = -0,636$; $p < 0,001$).

Гиповитаминоз D, как показали эпидемиологические исследования [24], связан с факторами (воспаление, инсулинорезистентность, окислительный стресс, ожирение и дислипидемия), вызывающими неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), которая в настоящее время имеет глобальное распространение. Установлено, что уровень дефицита витамина D напрямую связан с тяжестью НАЖБП. Предполагается, что витамин D может помочь в лечении НАЖБП путем положительного влияния на факторы риска. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

В последние годы значительное число исследований было посвящено изучению профилактической роли витамина D в ряде различных новообразований, однако их результаты крайне противоречивы. H. Wei и соавт. показали, что применение высоких доз препаратов витамина D не обеспечивает защиту от канцерогенеза рака легких. Так, увеличение приема витамина D на 100 МЕ в сутки снижало риск рака легких всего на 2,4% [29]. Авторами был сделан вывод, что уровень витамина D не связан с риском рака легких. В последнее время была выдвинута гипотеза о том, что гиперфосфатемия может быть промежуточным фактором в ассоциации пониженного уровня витамина D и повышенного риска развития опухолевого процесса [8].

Впервые были проанализированы различные компоненты сигнальных путей витамина D при агрессивной меланоме, включая анализ экспрессии RVD, активирующих и инактивирующих гидроксилаз CYP27B1

и CYP24A1 соответственно, в этой опухоли [19]. Показано, что уровень меланина агрессивной меланомы обратно коррелировал с экспрессией VDR, также установлено, что витамин D метаболизируется при меланоме. Результаты исследований могут способствовать разработке новых методов диагностики и лечения меланомы.

В настоящее время витамин D входит в четверку наиболее назначаемых лабораторных тестов. Специфических клинических симптомов низкого уровня витамина D нет, поэтому необходимо определять его уровень в крови надежными методами. В основном для его определения в биологических пробах применяются методы связывания, такие как иммуоферментный анализ, хемилюминесцентный анализ и другие, иммунохимические методы анализа. Эти методы легко автоматизируются, с их помощью можно проводить анализ одновременно большого количества проб, и они широко распространены к клинической практике. Однако эти методы анализа имеют свои недостатки, они не совсем пригодны для определения стероидных гормонов (тестостерон, эстрадиол), к числу стероидов относится и витамин D. Стандартом определения общего витамина D в сыворотке крови служит метод тандем-масс-спектрометрии LC/MS/MS [13].

Тандемная масс-спектрометрия – это метод идентификации, обнаружения и количественного определения вещества в биологическом образце, основанный на отношении массы к заряду ионов, которое это вещество может образовывать под влиянием ионизирующих факторов. Тандемная масс-спектрометрия имеет ряд преимуществ перед иммунохимическими методами анализа. Детекция вещества в биологической пробе методом селекции массы позволяет добиться более надежных и достоверных результатов, в то время как для методов иммунохимического анализа характерно кросс-наложение, искажающее конечный результат. Из недостатков тандемной масс-спектрометрии следует отметить длительную пробоподготовку, которая проводится вручную и включает целый ряд последователь-

ных процедур. Кроме этого, постоянный контакт с анализируемым образцом при пробоподготовке увеличивает потенциальный риск контаминации проб и риск инфицирования персонала. Для решения перечисленных проблем предназначены автоматизированные станции пробоподготовки, например CLAM-2000 (Shimadzu) [4].

Совсем недавно разработано новое поколение методов иммуноанализа на платформе iSYS для определения витамина D. Получено полное соответствие результатов iSYS и LC/MS/MS, что дает возможность измерения уровней [25(OH)D] в клинических лабораториях на экспертном уровне [10].

Производители иммунохимических анализаторов пытаются совершенствовать процедуру определения витамина D. Проведено сравнение трех автоматизированных методов хемилюминесцентного определения общего 25-гидроксивитамина D с определением 25-гидроксивитамина D₃ и 25-гидроксивитамина D₂ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детекцией (Agilent 1200) [14]. Хемилюминесцентные исследования проводили с использованием анализатора Abbott Architect i4000SR (Abbott Laboratories, Германия), ADVIA Centaur (Siemens, США) и Liaison XL (DiaSorin Inc, США). Все методы показали достоверные отличия по сравнению с иммунохимическим методом DiaSorin ($p < 0,001$ для Abbott, $p < 0,05$ для Siemens и $p < 0,0001$ для ВЭЖХ). Сравнение иммунохимического метода Siemens с ВЭЖХ также было достоверным; $p < 0,05$. Средняя величина DiaSorin была на 38 % ниже, чем среднее значение измерений методом ВЭЖХ. Незначительную разницу показало сравнение Abbott с ВЭЖХ, а также Abbott с Siemens. Результаты измерения общего 25-гидроксивитамина D были следующими: Abbott Laboratories – $70,2 \pm 24,2$ нмоль/л; Siemens – $67,6 \pm 27,9$ нмоль/л, DiaSorin – $53,5 \pm 17,1$ нмоль/л и ВЭЖХ – $82,4 \pm 40,0$ нмоль/л. Сравнение методики DiaSorin иммунохимического анализа с другими методами показало наибольшее отклонение результата определения 25-гидроксивитамина D. Средняя величина DiaSorin была на 38 % ниже,

чем среднее значение измерений методом ВЭЖХ. По результатам метода DiaSorin у большинства пациентов, получавших витамин D, не был достигнут необходимый оптимальный уровень 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови, и это может негативно повлиять на клиническое решение.

Внедрение в лабораторную практику только стандартизированных методов определения витамина D является проблемой настоящего времени [5]. Основные причины расхождения результатов определения витамина D следующие. Не все методы иммунохимического анализа определяют формы D₂ и D₃ в эквивалентных концентрациях [7]. Кроме того, витамин D в крови находится в связанном с белком состоянии, и для определения витамина D сначала необходимо разорвать связь с транспортным белком и провести экстракцию свободного витамина D. Для этого используются различные органические растворители, в частности в методиках LC/MS/MS или в радиоиммунном анализе. Однако в методиках иммунохимического анализа органические растворители использовать невозможно. Для высвобождения витамина D из комплекса с транспортными белками производители реагентов для иммунохимического анализа разрабатывают так называемые неорганические высвобождающие агенты, у каждого производителя наборов реагентов они свои. Эти особенности анализа существенно сказываются на результатах определения витамина D, полученных разными диагностическими методами. Однако каждый производитель оборудования и реагентов для иммунохимического анализа стремится приблизить результат определения витамина D к референтному методу LC/MS/MS или ВЭЖХ. В сравнении двух методов определение концентрации витамина D новым методом усиленной хемилюминесценции и референтным ВЭЖХ показало хорошее совпадение результатов в диапазоне низких и высоких значений. Общая корреляция результатов измерения составила 0,77 [4].

В 2010 году была разработана Международная программа стандартизации результатов определения витамина D (VDSP). Почти все

опубликованные до этого времени исследования витамина D основаны на нестандартизированных лабораторных измерениях [25(OH)D] [25]. Программа VDSP предполагает стандартизировать ранние клинические исследования определения витамина D на основе эталонной процедуры измерения внутреннего стандарта NIST (Гентский университет) и протоколов внешней оценки качества (DEQAS) [11]. Проблема стандартизации особенно актуальна для исследований, в которых был выявлен дефицит витамина D, так как это может существенно повлиять на правильный выбор дозы препарата витамина D для профилактического применения.

Заключение

Связь между статусом витамина D в организме и соматической патологией убедительно доказана целым рядом эпидемиологических исследований. Представлены данные о влиянии витамина D на инфекционные процессы и рост злокачественных опухолей. Количественное определение витамина D надежными методами анализа имеет важное клиническое значение, и такие методы сегодня имеются в арсенале современных лабораторий.

Список литературы

1. Дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение, применение. Клинические рекомендации. – М., 2015. – 75 с.
2. Жилев Е. В. Клиническое значение нарушения кальциевого обмена / Е. В. Жилев, А. В. Глазунов, П. А. Глазунов // *Клин. медицина*. – 2011. – № 4. – С. 13–17.
3. Снопов С. А. Механизмы действия витамина D на иммунную систему / *Медицинская иммунология*. – 2014. – Т. 16, № 6. – С. 499–530.
4. Abdel-Wareth L. Total vitamin D assay comparison of the Roche Diagnostics "Vitamin D total" electrochemiluminescence protein binding assay with the Chromsystems HPLC method in a population with both D2 and D3 forms of vitamin D / L. Abdel-Wareth, A. Haq, A. Turner, S. Khan, A. Salem, F. Mustafa, N. Hussein, F. Pallinalakam, L. Grundy, G. Patras, J. Rajah // *Nutrients*. – 2013. – Vol. 22, T. 5. – N3. – P. 971–980; DOI: 10.3390/nu5030971.
5. Atef S. H. Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges / S. H. Atef // *www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28242262*–2018/–T. 175. P. 136–137; DOI: 10.1016/j.jsmb.2017.02.011.
6. Bizzaro G. Vitamin D and autoimmune Diseases: is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit? / G. Bizzaro, A. Antico, A. Fortunato, N. Bizzaro // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2017. – Vol. 19, N7. – P. 438–443.
7. Bouillon R. Is Vitamin D2 Really Bioequivalent to Vitamin D3? / R. Bouillon, L. Verlinden, A. Verstuyf // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157, N9. – P. 3384–3387; DOI: 10.1210/en.2016–1528.
8. Brown R. B. Vitamin D, cancer, and Dysregulated phosphate metabolism / R. B. Brown // *Endocrine*. – 2019. Jun 23. DOI: 10.1007/s12020–019–01985-y. [Epub ahead of print]

9. Buleu F.N. Correlations between vascular stiffness indicators, OPG, and 25-OH Vitamin D3 status in heart failure patients / F.N. Buleu, C.T. Luca, A. Tudor, M. Badalica-Petrescu, A. Caraba, A. Pah, D. Georgescu, R. Christodorescu, S. Dragan // *Medicina (Kaunas)*. – 2019. – Vol. 25, T. 55. – N6. – E309; DOI: 10.3390/medicina55060309.
10. Denimal D. Evaluation of the new restandardized 25-hydroxyvitamin D assay on the iSYS platform / D. Denimal, S. Roux, L. Duvillard // *Clin Biochem*. – 2018. – T. 52. – P. 156–160; DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.11.011.
11. Durazo-Arzu R.A. The Vitamin D Standardization Program (VDSP) Manual for Retrospective Laboratory Standardization of Serum 25-Hydroxyvitamin D Data / R.A. Durazo-Arzu, L. Tian, S.P.J. Brooks, K. Sarafin, K.D. Cashman, M. Kiely, J. Merkel, G.L. Myers, P.M. Coates, C.T. Sempos // *JAOAC*. – 2017. – Vol. 1, T. 100. – N5. – P. 1234–1243; DOI: 10.5740/jaoacint.17-0196.
12. Hillman L.S. Percent true calcium absorption, mineral metabolism, and bone mass in children with arthritis effect of supplementation with vitamin D3 and calcium / L.S. Hillman et al. // *Arthritis Rheum.* – 2008. – Vol. 58. – P. 3255–3263.
13. Huang M. Mechanism of error caused by isotope-labeled internal standard: accurate method for simultaneous measurement of vitamin D and pre-vitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / M. Huang, A.B. Cadwallader, R. Heltsley // *Rapid Commun Mass Spectrom*. – 2014. – Vol. 15, T. 8. – N 19. – P. 2101–2110; DOI: 10.1002/rcm.6987.
14. Klapkova E. A comparison of four methods (Immunochemistry and HPLC) for Determination of 25-(OH)-Vitamin D in postmenopausal women. / E. Klapkova, J. Cepova, M. Pechova, K. Dunovska, K. Kotaska, R. Prusa // *Clin Lab*. – 2017. – Vol. 1, T. 63. – N2. – P. 385–388; DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160509.
15. Kudlacek S. Assessment of vitamin D and calcium status in healthy adult Austrian / S. Kudlacek, et al. // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 33. – P. 323–331.
16. Kulie T., Groff A., Redmer J. Vitamin D // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – F8–28;
17. Marino R. Extra-Skeletal Effects of Vitamin D / R. Marino, M. Misra // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 27, T. 11. – N7. – E 1460; DOI: 10.3390/nu11071460.
18. Markiewicz A. Vitamin D Receptors (VDR), hydroxylases CYP27B1 and CYP24A1 and retinoid-related orphan receptors (ROR) level in human uveal tract and ocular melanoma with Different melanization levels. / A. Markiewicz, A.A. Brożyna, E. Podgórska, M. Elas, K. Urbańska, A.M. Jettten, A.T. Słominski, W. Józwicki, J. Orłowska-Heitzman, G. Dyduch, B. Romanowska-Dixon // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – N 1. – P. 9142; DOI: 10.1038/s41598-019-45161-8.
19. Nabeshima Y. Discovery of a-Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis / Y. Nabeshima // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* – 2009. – Vol. 85. – N3. – P. 125–141.
20. Norman A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor / A.W. Norman // *Endocrinology*. – 2006. – Vol. 414, N 12. – P. 5542–5548.
21. Panda S. Status of vitamin D and the associated host factors in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts: a cross sectional study / S. Panda, A. Tiwari, K. Luthra, S.K. Sharma, A. Singh // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2019. – Vol. 27. – P. 105419; DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105419.
22. Pham T.M. The Effect of Serum 25-Hydroxyvitamin D on Elevated Homocysteine Concentrations in Participants of a Preventive Health Program / T.M. Pham, J.P. Ekwari, S.S. Mastroeni, M.F. Mastroeni, S.A. Loehr, P.J. Veugeler // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 22. – T. 11, N8. – e0161368; DOI: 10.1371/journal.pone.0161368. eCollection 2016.
23. Sangouni A.A. A narrative review on effects of vitamin D on main risk factors and severity of non-alcoholic fatty liver Disease / A.A. Sangouni, S. Ghavamzadeh, A. Jamalzehi // *Diabetes Metab Syndr*. – 2019. – Vol. 13, T. 3. – P. 2260–2265; DOI: 10.1016/j.dsx.2019.05.013.
24. Sempos C.T. Developing vitamin D Dietary guidelines and the lack of 25-hydroxyvitamin D assay standardization: The ever-present past / C.T. Sempos, R.A. Durazo-Arzu, N. Binkley, J. Jones, J.M. Merkel, G.D. Carter // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2016. – Vol. 164. P. 115–119; DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.027.
25. T. Kulie Vitamin D / Kulie T., Groff A., Redmer J. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – F8–28;
26. Torres P.U., Klotho gene, phosphocalcic metabolism, and survival in Dialysis. / P. U. Torres // *J. Ren. Nutr.* – 2009. – Vol. 19. – P. 50–56.
27. Turner C. Effect of a 300000 IU loading Dose of ergocalciferol (Vitamin D2) on circulating 1,25(OH)2-vitamin D and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) in vitamin D insufficiency / C. Turner, N. Dalton, R. Inaoui, I. Fogelman, W.D. Fraser, G. Hampson // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2013. – Vol. 98, T. 2. – P. 550–556; DOI: 10.1210/jc.2012-2790. Epub 2013 Jan 2.
28. Wei H. Associations of the risk of lung cancer with serum 25-hydroxyvitamin D level and Dietary vitamin D intake: A Dose-response PRISMA meta-analysis / H. Wei, H. Jing, Q. G. Wei, Z. Heng // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Vol. 97, N 37. – P. 12282; DOI: 10.1097/MD.00000000000012282.
29. Zhu K. Serum 25-hydroxyvitamin D as a predictor of mortality and cardiovascular events: A 20-year study of a community-based cohort / K. Zhu, M. Knuiman, Divitini M., Hung J., Lim E.M., Cooke B.R., Walsh J.P. // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2018. – Vol. 88, N1. – P. 154–163; DOI: 10.1111/cen.13485.
30. Zittermann A. Vitamin D status, supplementation and cardiovascular Disease / A. Zittermann // *Anticancer Res.* – 2018. – Vol. 38, N2. – P. 1179–1186.

Для цитирования: Дрыгина Л.Б. Клиническое значение и особенности лабораторного определения витамина D. Медицинский алфавит. 2020;(5):40–45. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-40-45>

For citation: Drygina L.B. Clinical significance and features of laboratory determination of vitamin D. Medical alphabet. 2020; (5):40–45. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-40-45>



5

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ + АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ (ФАКТ PLUS 2020)

19–21 марта 2020 года, Москва

ФАКТ plus 2020

#СПЕШУНАФАКТ

#ТАЛАНТЫФАКТ

#ФАКТplus2020

#ФАКТplus2020

www.anticoagulants.ru

Гормонально-микроэлементный гомеостаз мальчиков с ожирением и задержкой полового развития

В. А. Попова, д.м.н., гл.н.с., врач-эндокринолог педиатрического отдела НИИ акушерства и педиатрии

А. А. Кожин, д.м.н., проф. кафедры патологической физиологии

Н. А. Друккер, д.б.н., доцент, гл.н.с. отдела медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии НИИ акушерства и педиатрии

С. Н. Селютина, к.б.н., н.с. отдела медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии НИИ акушерства и педиатрии

О. З. Пузикова, д.м.н., в.н.с., врач-эндокринолог педиатрического отдела НИИ акушерства и педиатрии

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

Hormone-microelement homeostasis of boys with obesity and delayed sexual development

V. A. Popova, A. A. Kozhin, N. A. Drukker, S. N. Selyutina, O. Z. Puzikova

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Резюме

Результаты обследований мальчиков-подростков с различной степенью ожирения и задержкой полового развития (ЗПР) показали, что содержание гормонов (кисспептина, лептина, тестостерона, гонадотропинов и др.) коррелировало с уровнем эссенциальных и токсических химических элементов в моче. Обнаружены корреляции между концентрацией в моче цинка, селена и уровня лептина, кисспептина и тестостерона. Это указывает на этиологическую детерминанту микроэлементоза в формировании ЗПР при ожирении у мальчиков — возможно, эффект высокого содержания свинца в моче.

Ключевые слова: конституционально-экзогенное ожирение, мальчики-подростки, микроэлементы, половые гормоны.

Summary

The results of examinations of adolescent boys with varying degrees of obesity and delayed sexual development (DSD) showed that the content of hormones (kisspeptin, leptin, testosterone, gonadotropins, etc.) correlated with the level of essential and toxic chemical elements in urine. Correlations between urine concentrations of zinc, selenium and levels of leptin, kisspeptin and testosterone were found. This points to the etiological determinant of microelementosis in the formation of DSD in boys — possibly the effect of high lead content in urine.

Key words: constitutional exogenous obesity, adolescent boys, microelements, sex hormones.

Цель работы: определение клинко-диагностической значимости исследований микроэлементно-гормонального гомеостаза при задержке полового развития (ЗПР) у мальчиков с избытком массы тела.

Увеличение процента мужского фактора в бесплодном браке обуславливает актуальность изучения репродуктивного здоровья у мальчиков-подростков с ожирением [1]. Цитируемые авторы показали, что функциональная задержка старта пубертата встречается в девять раз чаще у мальчиков, чем у девочек. Механизмы, лежащие в основе нарушений на ранних сроках онтогенеза, по мнению ряда авторов, во многом обусловлены десинхронизацией деятельности звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, в реализации которой участвует лиганд-рецепторная система кисспептина [2].

Обнаружено, что этот гормон стимулирует секрецию Гн-РГ прямым влиянием на Гн-РГ, содержащие нейроны, большинство из которых экспрессируют рецепторы KISS-1R. Они выполняют роль транзмиттеров в передаче сигналов от эстрогенов и андрогенов. Кроме того, кисспептин осуществляет посредническую функцию между лептином и Гн-РГ-секретирующим центром гипоталамуса, осуществляющим процесс прямой и обратной связи в пределах гонадной оси. Его показатели сигнализируют об энергетическом балансе в указанном центре. Система KISS-1/RISS-1R контролирует секрецию гонадотропинов, сексуальную дифференцировку мозга, старт пубертата и активацию фертильности [3]. Кисспептин в тесном взаимодействии с лептином рассматривается как

один из составляющих комплексов каскада регуляторных компонентов пубертата. Лептин воздействует на гипоталамус опосредованно через кисспептин, являясь модулятором кисспептиновой системы. Избыточно положительный энергетический баланс ингибирует экспрессию mRNA KISS-1 гена. Лептин контролирует функцию нейропептида Y, дифференцирующего пищевое поведение, активируя прием пищи.

Избыточный уровень лептина в молодом возрасте индуцирует снижение гонадотропной функции гипоталамо-гипофизарной системы и, следовательно, задержку пубертата. Величины его концентрации являются маркером энергетики организма и характера метаболических изменений. Помимо указанных гормональных продуктов, в становлении пубертата принимают

участие эссенциальные химические элементы (ХЭ), дисбаланс которых приводит к дисфункции нейроэндокринной регуляции репродуктивного комплекса.

Микроэлементозы индуцируют возникновение как дефицита, так и избытка массы тела, сопровождающихся целым рядом метаболических осложнений [4] в том числе аномалий полового развития. Токсичные ХЭ (свинец, кадмий и др.) являются физиологическими антагонистами важнейших эссенциальных ХЭ (цинк, селен, медь и др.). Как было показано в наших исследованиях, нарушение баланса указанных ХЭ сопровождается ЗПР и ожирением разной степени выраженности [5].

Уточнение роли ксипептина, лептина, микроэлементозов в процессах регуляции полового развития подростков и возникновении его аномалий представляет актуальную проблему клинической эндокринологии, раскрытие которой способствует расширению ограниченного круга терапевтических воздействий для коррекции ретенции пубертата. Палитра ХЭ в организме детерминирует секрецию либеринов и гормонов аденогипофиза. Последние наиболее опасны в эндемических территориях по определенным микроэлементам (МЭ) в условиях хронического оксидативного стресса, если не проводятся профилактические мероприятия еще в периконцепционный период.

Таким образом, в подростковом периоде следует уделять внимание предикторам репродуктивных расстройств, то есть факторам, предрасполагающим к формированию тех или иных патологий в механизмах регуляции генеративной системы. Необходимы исследования коррелятивных связей между гормональными показателями и данными аналитических исследований по определению ХЭ в биосубстратах организма при его разных функциональных состояниях.

Материалы и методы исследований

При диспансерном осмотре школьников г. Ростова-на-Дону были отобраны мальчики-подрост-

ки 13–14 лет с конституционально-экзогенным ожирением (КЭО) 1–2-й степени. Мальчиков разделили на две группы. Обследование подростков осуществляли при разрешении локального этического комитета и с информированного согласия родителей. Первую группу составили 20 подростков, у которых не было вторичных признаков полового созревания – в возрасте 13 лет отсутствовал объем тестикул, равный 3–4 мл. Во вторую группу входили 24 подростка с КЭО второй степени в стадии II–IV полового созревания по Таннеру. Группа сравнения состояла из 15 здоровых мальчиков аналогичного возраста с нормальной массой тела, находящихся во II–IV стадии полового созревания.

При обследовании школьников изучались семейный анамнез, характер пищевого поведения и физических нагрузок. Вычислялся индекс массы тела (ИМТ). У детей первой группы обследовали мошоночную область (УЗИ) с целью исключения морфологических нарушений репродуктивной системы и определения размеров тестикул. Подростков с явлениями крипторхизма и гипогонадизма, в этиологии которых могли участвовать хромосомные мутации, в обследование не брали, как и мальчиков с эндокринными заболеваниями, способствующими формированию ЗПР (сахарный диабет, гипопитуитаризм, гипотиреоз и др.). Установлено, что во время беременности матери не страдали поздними гестозами и другими осложнениями гестации и родов.

Перечень гормональных исследований включал определение в сыворотке крови уровней лютеинизирующего гормона (ЛГ), общего тестостерона (Т), инсулина, лептина, ингибина В, ксипептина методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки инсулинорезистентности (ИР) использовали индекс Саго, который в норме должен быть более 0,3. Биохимические исследования касались определения глюкозы, липидных фракций и выполнялись методами ИФА на анализаторе Alisei Radium (Италия). Кроме того, в утренней моче мальчиков-подростков опре-

деляли уровень концентрации МЭ – свинца (Pb), цинка (Zn), селена (Se), хрома (Cr), марганца (Mn) с помощью атомно-абсорбционного метода на анализаторе «Квант-Z» (ООО «Кортек», Россия).

Результаты биомедицинских исследований обрабатывали с помощью лицензионного пакета Statistica 6.0 в среде MeoCape 11.4.2 непараметрического корреляционного анализа по Спирмену. Достоверность показателей определена по коэффициенту Стьюдента (t). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При проведении антропометрических обследований было показано, что в первой группе у 60 % детей распределение подкожно-жировой клетчатки было равномерным, у 10 % был гиноидный тип ожирения, у 30 % – андрогинный. У мальчиков второй группы распределение подкожно-жировой клетчатки у всех имело равномерный характер. У 60 % пациентов первой группы и 33,3 % детей второй имели место повышение потливости, гипергидратоз ладоней, стоп.

Вегетососудистая дистония в виде неустойчивого АД определялась у 80 % пациентов первой группы и 41,6 % подростков второй. При оценке состояния кожных покровов стрии были обнаружены у 40 % детей первой группы и у 25 % подростков второй группы, *Acanthosis nigricans* – у 50 % мальчиков первой группы и 29,6 % подростков второй. У 60 % мальчиков первой группы и 20,8 % второй была ложная гинекомастия.

Анализ данных исследования углеводного обмена позволил установить, что у мальчиков первой группы уровень инсулина в крови натощак был несколько выше $19,9 \pm 3,3$ мкМЕ/мл, чем у подростков контрольной группы ($11,5 \pm 2,2$ мкМЕ/мл; $p = 0,07$). У мальчиков как первой, так и второй группы значение индекса Саго было снижено по сравнению с контролем ($0,31 \pm 0,02$, $0,35 \pm 0,03$ и $0,4 \pm 0,09$ соответственно; $p = 0,02$, $p = 0,08$). Тенденция к ИР возникает в результате модификации рецепторов инсулина, что обуславливает нарушение взаимодействия инсулина

Таблица 1
Гормональный профиль сыворотки крови мальчиков-подростков, прошедших диспансерное обследование

Группы подростков	Показатели					
	Тестостерон, нмоль/л	ЛГ, мкМЕ/млГ	АМГ, пг/мл	Кисспептин, нг/мл	Лептин, нг/мл	Ингибин В, пг/мл
Группа сравнения (n = 15)	16,2 ± 1,8	5,2 ± 0,5	15,6 ± 2,2	10,6 ± 1,1	18,8 ± 3,1	225,1 ± 10,2
Группа 1 (n = 20)	4,8 ± 0,3*, **	1,8 ± 0,1*, **	38,7 ± 3,2*, **	28,4 ± 1,9*, **	15,9 ± 2,2	171,2 ± 9,1*
Группа 2 (n = 24)	12,7 ± 1,5	4,4 ± 0,3	20,7 ± 2,3	19,2 ± 1,4	3,41 ± 0,3	199,7 ± 9,7

Примечание: * – значения, достоверно (p < 0,05) отличающиеся от данных контрольной группы; ** – значения, достоверно (p < 0,05) отличающиеся от данных второй группы.

со своими рецепторами. Как известно, гиперинсулинемия усиливает синтез холестерина, липопротеинов низкой плотности и тормозит процесс липолиза, что ведет к развитию липотоксемии и ИР.

Для мальчиков обеих групп было характерно некоторое повышение уровня общего холестерина по сравнению с контролем (5,40 ± 0,42 против 5,10 ± 0,19 ммоль/л; p = 0,06), а также достоверное повышение уровня холестерина, липопротеинов низкой плотности (до 3,80 ± 0,35 против 2,80 ± 0,18 ммоль/л; p = 0,02) без существенных межгрупповых различий.

У мальчиков как первой, так и второй группы уровень лептина был достоверно повышен по сравнению с контролем (18,80 ± 3,10, 15,90 ± 2,20 и 3,41 ± 0,35 нг/мл соответственно; p = 0,002). Избыточный уровень этого гормона в детском возрасте индуцирует снижение гонадотропной функции гипоталамуса-гипофиза и, следовательно, задержку пубертата [5].

Морфометрия тестикул указывала на их значительное уменьшение в первой группе по сравнению с контролем и второй группой (2,7 ± 0,3; 13,5 ± 3,1 и 10,6 ± 2,5 мл соответственно). Обнаружено снижение уровня ЛГ и тестостерона у паци-

ентов первой группы по сравнению с контролем и второй группой (табл. 1).

Важная роль в половом созревании мужского организма принадлежит АМГ и ингибину В, уровень которого оказался достоверно сниженным. Уровень АМГ у мальчиков первой группы более чем в два раза превышал контрольные значения, что, вероятно, обусловлено дефицитом андрогенов. При анализе корреляционных связей между гормонами была выявлена отрицательная зависимость между уровнем АМГ и тестостероном (R = -0,69; p = 0,03). Высокая концентрация АМГ в крови при снижении уровня тестостерона указывала на ЗПР.

Уровень ингибина В у больных с ожирением первой группы был достоверно снижен по сравнению с контролем (p = 0,044). Отмеченная тенденция может привести к нарушению фертильности в зрелом возрасте. Очевидно, что обследуемых подростков первой группы можно отнести к контингенту риска по возникновению аномалий фертильности, поскольку созревание сперматогенного эпителия нарушается уже в начале пубертатного периода.

Что касается содержания кисспептина в сыворотке крови обследуемых детей, то его значение

в группе сравнения было значительно ниже и равнялось 10,6 ± 1,1 нг/мл, а у мальчиков с ожирением в первой группе – 28,4 ± 1,9 нг/мл. Показатель кисспептина во второй группе был также значительно выше значений в группе сравнения (19,2 ± 1,4 нг/мл; p < 0,05). Это свидетельствует о задержке активации системы «кисспептин – гипоталамус – гипофиз – гонады». Можно полагать, что имело место снижение чувствительности кисспептиновых рецепторов KISS-1R у мальчиков с ЗПР и ожирением.

Исследования Ю. И. Юхлиной с соавт. [3] подтверждают наши данные, показавшие, что при физиологических для возраста вариантах полового развития кисспептиновый уровень был невысоким и не имел различий при разных стадиях пубертата (Таннер ; Таннер IV, V), в то время как при ЗПР имел тенденцию к повышению. Анализ концентрации МЭ в моче наблюдавшихся пациентов (табл. 2) выявил более высокое содержание Pb у подростков первой группы.

Повышенное его содержание могло быть обусловлено геохимическими особенностями среды в условиях проживания подростков, обилием транспорта в крупном промышленном городе. Известна патогенетиче-

Таблица 2
Концентрация МЭ в моче мальчиков-подростков

Группы обследуемых	Показатели микроэлементов (мкг/л)				
	Pb	Zn	Se	Cr	Mn
Группа сравнения (n = 15)	11,1 ± 1,2*, **	135,7 ± 4,5*, **	10,6 ± 1,1*, **	2,5 ± 0,1*	2,6 ± 0,3*
Группа 1 (n = 20)	9,6 ± 0,7	202,7 ± 5,3*	15,6 ± 1,3	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,4
Группа 2 (n = 24)	8,2 ± 0,3	288,2 ± 5,3	18,2 ± 1,2	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,3

Примечание: * – значения, достоверно (p < 0,05) отличающиеся от данных контрольной группы; ** – значения, достоверно (p < 0,05) отличающиеся от данных второй группы.

ская роль повышенного содержания свинца в организме при ожирении, ИГ, нарушений толерантности к глюкозе и развитии сахарного диабета второго типа путем прямой стимуляции печеночного глюконогенеза. Ранее нами указывалось на снижение уровня тестостерона и ингибина В у детей с повышенным содержанием Pb [5]. Известно, что повреждающее действие свинца происходит вследствие дисрегуляции сопряженной работы звеньев гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси.

В первой группе мальчиков зафиксированы обратная корреляционная связь содержания Pb в моче с уровнем тестостерона ($R = -0,59$; $p = 0,042$), а также прямая корреляция с уровнем АМГ ($R = 0,49$; $p = 0,045$ соответственно) при отсутствии существенной связи между этими показателями у обследуемых детей второй группы. При этом низкая концентрация Zn по сравнению не только с контрольной группой ($p = 0,022$), но и второй группой ($p = 0,043$), снижение уровня которого при ожирении и положительная его динамика при нормализации массы тела уже давно отмечались рядом исследователей [6]. При этом установлена полиморфная метаболическая значимость свинца и важность его в физиологических процессах становления эндокринных функций.

Одной из гипотез, объясняющих благоприятное действие нормализации уровня Zn на лечение ожирения, является уменьшение лептинорезистентности. Нами выявлена обратная корреляционная связь между концентрацией Zn в моче и уровнем инсулина и лептина у мальчиков с ожирением по сравнению с контролем ($R = -0,44$ при $p = 0,041$ и $R = -0,62$ при $p = 0,053$ соответственно). Цинк, концентрируясь в органах половой системы, стимулирует развитие вторичных половых признаков. Ограничение цинка даже у здоровых молодых людей сопровождается значительным уменьшением концентрации тестостерона в сыворотке крови. Лечение цинксодержащими препаратами мужчин в течение 6 месяцев приводило к росту половых гормонов в крови.

Нами установлены прямая связь концентрации Zn в моче с уровнем

тестостерона и обратная корреляция с уровнем АМГ в крови у подростков первой группы ($R = 0,68$ при $p = 0,032$ и $R = -0,35$ при $p = -0,072$) при отсутствии существенной связи между этими показателями у обследуемых подростков из второй группы. Выявлено более низкое содержание селена (Se) в моче обследуемых по сравнению с контролем ($p = 0,044$). При этом установлена обратная корреляционная связь содержания Se в моче с уровнем инсулина и лептина в крови ($R = -0,48$ при $p = 0,051$ и $R = -0,45$ при $p = 0,042$ соответственно). Снижение уровня селена при ожирении у детей, не зависящее от пола и возраста, было также показано в результатах и других исследований [7]. Получены доказательства обратной корреляционной зависимости между уровнем Se и ИР.

Нами выявлена положительная корреляция между показателями тестостерона сыворотки крови и селена в моче у обследуемых первой группы и отрицательная с уровнем АМГ ($R = 0,69$ при $p = 0,031$ и $R = -0,38$ при $p = 0,066$ соответственно). В то же время существенной связи между этими результатами у обследуемых мальчиков второй группы не наблюдалось. Также определены положительные корреляции ($R = +0,71$ при $p = 0,032$) между ксипептином, тестостероном и цинком, селеном у мальчиков группы сравнения при снижении выраженности этой связи между указанными показателями у детей первой и второй групп (для первой – $R = +0,42$, для второй – $R = +0,49$).

Оптимальный уровень Zn и Se в эпителиальных клетках тестикул – основа развития мужской репродуктивной ткани. Указанные ХЭ являются составной частью белков-протекторов, предохраняющих сперматозоиды от окислительных процессов: селенопротеины mGPx4 и snGPx4 являются структурными компонентами зрелых сперматозоидов. Этим подчеркивается актуальность адекватного содержания данного микроэлемента в биосубстратах, особенно в период становления половых функций.

Обнаружена существенная корреляционная связь между содержанием селена, цинка и показателями ксипептина, обеспечивающими фи-

зиологическую фертильность. Данные гормоны осуществляют регуляцию секреции гонадотропин рилизинг-фактора [8, 9].

В первой группе пациентов с ожирением выявлено более низкое содержание хрома в моче по сравнению с контролем ($p = 0,044$), при этом значимой корреляции между уровнем Cr и показателями инсулина и лептина в крови не выявлено. Однако в других исследованиях показана связь ИР с уровнем Cr и продемонстрирован положительный эффект от включения в диету добавок Cr при лечении ожирения вследствие улучшения метаболических эффектов инсулина.

У мальчиков обеих групп фиксировали более низкое содержание Mn в моче по сравнению с контролем, достигающее степени достоверности в группе с ЗПР ($p = 0,045$). Функция этого МЭ заключается в обмене липидов, обеспечении как мужского, так и женского РЗ. Дефицит Mn может возникнуть на фоне эмоциональных перегрузок (усиленный расход), неадекватного питания, а также в результате накопления в организме его антагонистов, в частности ванадия. Марганец является одним из антиоксидантных питательных продуктов, который входит в состав металлоферментов и играет роль в метаболизме углеводов, протеинов и липидов. Есть данные о связи марганца в крови с наличием ожирения и ЗПР, хотя убедительные патогенетические объяснения этому феномену до настоящего времени не предложены [10]. Было отмечено, что для подростков первой группы более характерны низкие концентрации Zn, Se, Cr, Mn при повышенном уровне Pb в моче по сравнению с показателями не только контрольной, но и второй группы. Установлено, что у детей первой группы микроэлементоз вносит патогенетический вклад в развитие ожирения и ЗПР. Патогенез этого процесса отличается этапным характером по принципу порочного круга. Микроэлементоз, возникший под влиянием экопатогенных воздействий, мог способствовать поломке метаболических реакций, компенсирующих нарушения углеводного и жирового обменов, приводя к активации лептина, потенцирующего негативное

влияние дефицита Zn и Se. В то же время оптимальное содержание и соотношение МЭ, установленное у мальчиков второй группы, корректирует в определенных пределах возможные девиации нейроэндокринной регуляции обмена веществ и гормональных функций.

Микроэлементный дисбаланс у мальчиков-подростков с КЭО может являться важным стимулирующим ЗПР фактором и неблагоприятным прогностическим маркером возможного развития нарушений репродуктивной функции детей в более старшем возрасте. Следовательно, в алгоритм обследования у мальчиков с КЭО и нарушением темпов полового созревания следует, помимо изучения гормонального гомеостаза, внести определение микроэлементов. Ранняя диагностика микроэлемента у детей с ожирением позволит осуществить своевременную коррекцию дисбаланса МЭ, наряду с общепринятыми подходами к лечению КЭО станет способство-

вать минимизации рисков развития репродуктивных расстройств в зрелом возрасте.

Заключение

Результатами комплексного исследования подчеркнута взаимосвязь между микроэлементами и отклонениями в гормональном гомеостазе. Выявлены существенные коррелятивные связи с концентрацией МЭ в моче и уровнем ксипептина, тестостерона, лептина в крови, наиболее значимые в группе детей с нарушением темпов полового созревания. Предлагается модифицировать алгоритм этиологической диагностики ЗПР у мальчиков-подростков с ожирением, особенно в группах экологического риска.

Список литературы

1. Дедов И. И., Семичева Т. В., Петеркова В. А. Половое развитие детей: норма и патология. М.: Колорит студия 2002, 235 с.
2. Никитина И. А., Байрамов А. А., Ходулева Ю. А., Шабанов П. Д. Ксипептины в физиологии и патологии полового развития. Новые диагностические и терапевтические

возможности. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014, т. 12, № 4, с. 3–12.

3. Юхлина Ю. Н., Васильева Е. Ю., Нагорная И. И., Никитина И. А. Потенциал диагностических и терапевтических возможностей при задержке пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме у мальчиков. // Педиатрия, 2018, № 2, с. 78–82.
4. Попова В. А., Кожин А. А., Вербицкая О. Г. Этиологическая диагностика алиментарного ожирения у подростков. // Врач, 2016, № 12, с. 71–78.
5. Попова В. А., Кожин А. А., Пузикова О. З., Друккер Н. А. Микроэлементный дисбаланс как фактор, потенцирующий задержку полового развития у мальчиков-подростков с конституционально-экзогенным ожирением. // Педиатрия, 2019, 1, с. 223–227.
6. Prasad A. Zinc in humans: Health disorders and therapeutic effects. // Microelements in medicine. 2014, v. 15, N1, p. 3–12.
7. Blazewicz A., Klatka M., Astel A., Dolivar W. Serum and urinary selenium levels in obese children, cross sectional study // J. Trace Elem. Biol. Med. 2015, 29, P. 116–122.
8. Ярмолинская М. И., Ганберли Н. Ф., Айла-мзян Э. К. Значение ксипептина в регуляции функции репродуктивной системы. // Ж. Акушерства и женских болезней. 2016; LXV (6): 4–18. DOI: 10.17816/JOWD6564–18.
9. Jaysena C., Abbata A., Narayanswamy S. Direct comparison of the effects of intravenous kisspeptin-10, kisspeptin-54 and GnRH on gonadotropin secretion in healthy men. Hum. Reprod. 2015; 30 (8): 1934–1941. DOI: 10.1093/rep/DOV143.
10. Попова В. А., Кожин А. А., Мегидь Ю. И. Микроэлементозы и проблемы здоровья детей. // Педиатрия 2015, 95 (6): 141–144.

Для цитирования: Попова В. А., Кожин А. А., Друккер Н. А., Селюткина С. Н., Пузикова О. З. Гормонально-микроэлементный гомеостаз мальчиков с ожирением и задержкой полового развития. Медицинский алфавит. 2020; (5): 46–50. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-46-50>

For citation: Popova V. A., Kozhin A. A., Drukker N. A., Selyutina S. N., Puzikova O. Z. Hormone-microelement homeostasis of boys with obesity and delayed sexual development. Medical alphabet. 2020; (5): 46–50. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-46-50>

DOI: 10.33667/2078-5631-2020-5-50-53

Энзимодиагностика осложнений офтальмогерпеса

Н. А. Терехина, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии
С. Э. Реук, к.м.н., доцент кафедры биохимии

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь

Enzymodiagnosics of ophthalmoherpis complications

N. A. Teryokhina, S. E. Reuk

Perm State Medical University n.a. E. A. Wagner, Perm, Russia

Резюме

Цель исследования: оценить возможность использования ферментного анализа слезной и ротовой жидкостей для диагностики осложнений офтальмогерпеса у детей. При герпетическом кератите у детей выявлены отличительные особенности активности ферментов в зависимости от клинической формы и тяжести офтальмогерпеса, позволяющие оценить интенсивность воспаления, эффективность лечения и прогнозировать осложнения заболевания. Определение активности γ-глутамилтранспептидазы в слезе может быть использовано для выявления близорукости у детей дошкольного возраста. Исследование слезной жидкости позволяет расширить возможности неинвазивной диагностики офтальмогерпеса у детей.

Ключевые слова: офтальмогерпес, слеза, ферменты, дети.

Summary

The purpose of the study is to evaluate the possibility of using enzyme analysis of the tear and oral fluids to diagnose the complications of ophthalmoherpis in children. In case of herpetic keratitis in children, the distinctive features of enzyme activity are revealed depending on the clinical form and severity of ophthalmoherpis. This allows you to assess the intensity of inflammation, the effectiveness of treatment and predict the complications of the disease. Determination of γ-glutamyl transpeptidase activity in tears can be used to identify myopia in children of preschool age. The study of the tear fluid allows you to expand the possibilities of non-invasive diagnosis of ophthalmoherpis in children.

Key words: ophthalmoherpis, tear, enzymes, children.

Герпетическая инфекция занимает лидирующее место среди вирусных инфекций человека. Самыми распространенными клиническими проявлениями герпетического инфицирования детей являются герпетический стоматит и офтальмогерпес, на долю которых приходится до 70 % от числа вирусных заболеваний роговицы и слизистой полости рта [1]. Вирус простого герпеса (ВПГ), реплицируясь в лимфоцитах, приводит к изменению в клетках крови активности антиоксидантных ферментов [2]. Исследование слюны при остром герпетическом стоматите у детей можно использовать для оценки степени тяжести герпетической инфекции и прогноза состояния тканей полости рта. Отсутствие нормализации белков острой фазы воспаления в ротовой жидкости детей свидетельствует о незавершенности воспалительного процесса при герпетическом стоматите [3]. Разработаны способы прогнозирования рецидива герпетического кератита у взрослых людей по определению в слезе активности дегидрогеназ [4]. Для прогнозирования рецидива герпетического кератита у детей используется определение в слезе активности гликозидаз [5]. Офтальмогерпес у детей является причиной значительного снижения остроты зрения от помутнений роговицы, рефракционной амблиопии и корнеальной слепоты [6].

Цель работы: оценить возможность использования ферментного анализа слезной и ротовой жидкости для диагностики осложнений офтальмогерпеса у детей.

Материалы и методы

Объектом исследования служили слеза, ротовая жидкость и плазма крови 27 детей в возрасте от 2 до 14 лет, больных герпетическим кератитом. Группу сравнения составили 28 детей с нарушениями рефракции глаза, из них у 10 была установлена миопическая рефракция глаза, у 10 – гиперметропия и у 8 – различные виды немиопического астигматизма. В качестве контроля использовали биологические жидкости 58 здоровых

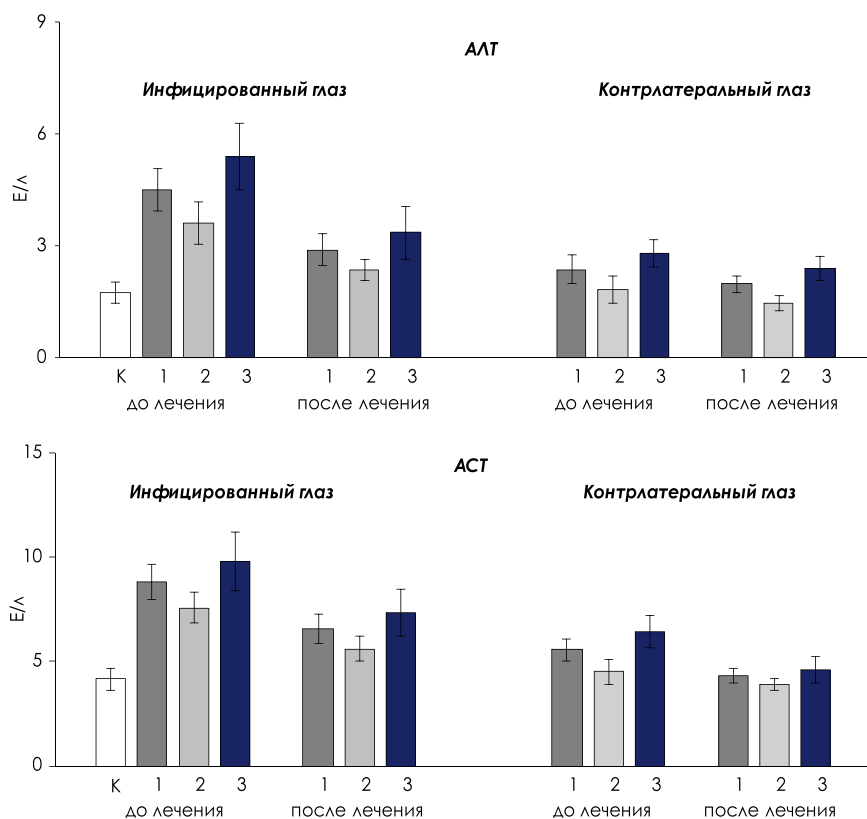


Рисунок 1. Активность аминотрансфераз в слезе детей при герпетическом кератите: К – контроль, 1 – герпетический кератит, 2 – древоидный герпетический кератит, 3 – глубокие формы.

детей. Слезу с наружной поверхности нижнего века собирали по методу [7], ротовую жидкость – по [3]. В слезе, ротовой жидкости, плазме крови изучали активность семи ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) по методу [8], кислой фосфатазы (КФ) по [9], щелочной фосфатазы (ЩФ) по [10], амилазы по [11], γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) по [12], лейцинаминопептидазы (ЛАП) по [13].

Результаты и обсуждение

В слезной жидкости здоровых детей активность ферментов, секретируемых слезной железой (КФ, амилаза), выше, чем в плазме крови. При герпетическом кератите у детей изменялась активность ферментов в слезе. Увеличение активности АЛТ и АСТ в 2,0–3,5 раза в слезной жидкости герпесинфицированного глаза у детей зависит от клинической формы офтальмогерпеса (рис. 1).

В слезе контрлатерального глаза при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением

доциклите с изъязвлением активность АСТ и АЛТ статистически значимо возрастает в 1,5 раза по сравнению с контролем. В плазме крови детей в период разгара заболевания активность изученных аминотрансфераз увеличивается только при глубоких формах офтальмогерпеса.

ЩФ в слезу попадает главным образом из эпителиальных клеток протоков слезных желез и эпителия роговицы глаза [14]. При герпетическом кератите активность ЩФ в слезе статистически значимо увеличивается в 1,5–2,5 раза по сравнению со здоровыми детьми (рис. 2). Активность этого фермента в слезе детей повышается при всех клинических формах заболевания, но максимально – при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением.

Основным источником КФ в слезе являются лизосомы секреторных клеток слезных желез и эпителий роговицы [14]. Деструкция лизосом этих клеток и повышенная лабильность клеточных мембран роговицы приводят к увеличению активности КФ

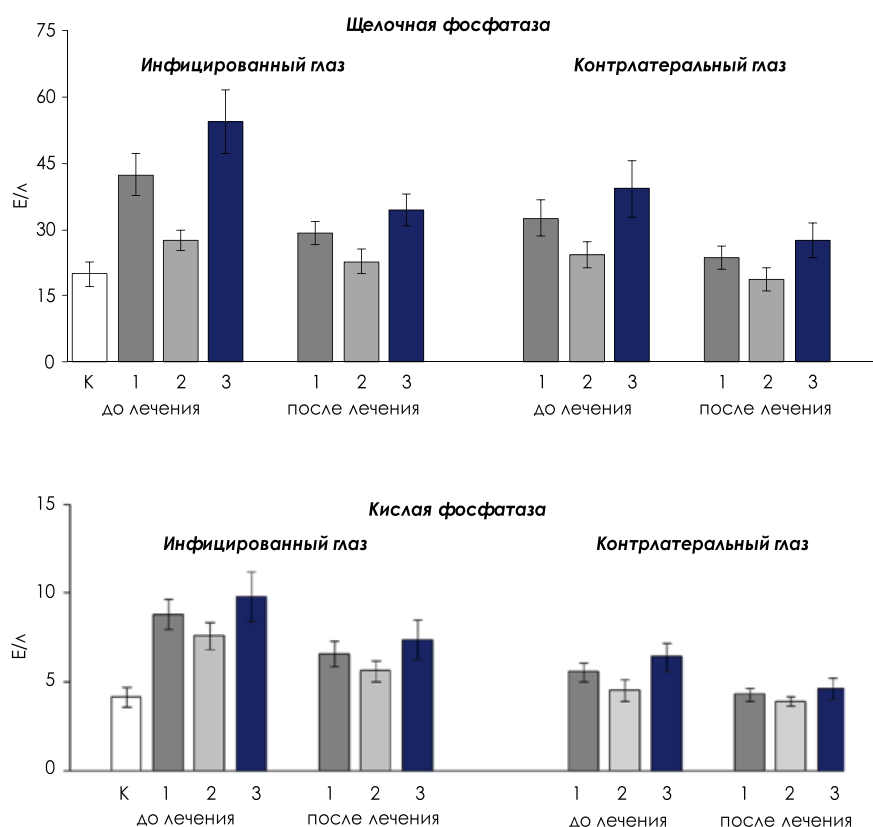


Рисунок 2. Активность фосфатаз в слезе детей при герпетическом кератите: К – контроль, 1 – герпетический кератит, 2 – древовидный герпетический кератит, 3 – глубокие формы герпетического кератита.

в слезе детей при всех клинических формах офтальмогерпеса не только в герпесинфицированном, но и в слезе контрлатерального глаза при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением (рис. 2). В ротовой жидкости статистически значимых изменений активности ферментов не выявлено.

Основным источником амилазы в слезе является слезная железа. Активность амилазы в слезной жидкости детей при всех клинических формах офтальмогерпеса статистически значимо снижается в 1,5 раза, что может быть связано с избыточным слезотечением в период разгара заболевания (табл. 1). После лечения герпетического кератита активность амилазы нормализуется только у 30–60% пациентов. Уменьшение активности фермента в слезе приводит к нарушению метаболизма углеводов в эпителиальных клетках роговицы, что ведет к отеку тканей переднего отдела глаза с последующим прогрессированием помутнения роговицы.

Активность ЛАП в 2,0–3,5 раза выше в слезной жидкости и плазме крови детей, больных герпетическим кератитом, по сравнению с контролем и зависит от клинической формы офтальмогерпеса (см. табл.). Повышается активность ЛАП в слезной жидкости при герпетическом кератите в результате выхода этого фермента из цитозоля разрушенных ВПГ клеток роговицы. Активность этого фермента статистически значимо увеличивается в плазме крови детей при древовидном герпетическом кератите в 1,5 и в 2,0 раза при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением по сравнению со здоровыми детьми. Высокая активность ЛАП в слезе и плазме крови при офтальмогерпесе является неблагоприятным признаком, отражающим интенсивность процессов деструкции тканей глаза, может быть критерием интенсивности процесса воспаления в роговице. Чрезмерная активация протеолиза может быть

причиной повреждения тканей и расширения очага воспаления.

На фоне лечения активность всех изученных ферментов в слезной жидкости инфицированного глаза детей нормализуется только при древовидном герпетическом кератите, а в слезе контрлатерального глаза – при всех формах клинических офтальмогерпеса. После перенесенного метагерпетического кератоиридоциклита с изъязвлением у 70–80% детей активность ферментов в слезе не нормализуется. Высокая активность ферментов в слезе детей после лечения офтальмогерпеса является прогностически неблагоприятным признаком и позволяет предположить субклиническую деструкцию клеток роговицы. Отсутствие нормализации активности изученных ферментов в слезе может быть использовано не только для прогнозирования рецидива заболевания, но и оценки эффективности лечения герпетической инфекции.

При офтальмогерпесе активность γ -ГТП в слезной жидкости детей статистически значимо повышается в 3–4 раза при всех клинических формах заболевания, но максимально в 4,5–5,0 раза при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением (см. табл.). В плазме крови детей при глубоких формах герпетического поражения роговицы активность этого фермента увеличивается в 1,5 раза. После лечения офтальмогерпеса активность γ -ГТП остается повышенной в слезе обоих глаз только при метагерпетическом кератоиридоциклите с изъязвлением. Повышение активности γ -ГТП в слезной жидкости детей, вероятно, связано с выходом фермента из пораженного вирусом эпителия роговицы. Вирус в инфицированных тканях, активируя γ -ГТП, способствует транспорту через биологические мембраны внутрь клеток аминокислот и включению их в вирус-специфические белки в пораженных тканях глаза. Таким образом, ВПГ интенсифицирует цикл собственного размножения.

Аметропические изменения глазного яблока являются частым осложнением офтальмогерпеса у де-

Таблица
Активность ферментов в слезной жидкости детей при офтальмогерпесе

Фермент	Контроль	Герпетический кератит	Древовидный герпетический кератит	Метагерпетический кератоиридоциклит с изъязвлением
Герпесинфицированный глаз				
ГТП (Е/л)	6,29 ± 0,44	23,25 ± 3,49*	18,78 ± 1,25*	27,03 ± 3,83*
ЛАП (Е/л)	4,73 ± 0,60	8,98 ± 1,29*	5,10 ± 0,72	12,08 ± 1,29*
Амилаза (мг/с·л)	148,21 ± 3,56	110,51 ± 6,57*	114,89 ± 10,05*	107,01 ± 8,88*
Контралатеральный глаз				
ГТП (Е/л)	6,29 ± 0,44	14,81 ± 1,68*	11,62 ± 1,82*	17,37 ± 2,51*
ЛАП (Е/л)	4,73 ± 0,60	5,30 ± 0,64	4,16 ± 0,63	6,21 ± 0,99
Амилаза (мг/с·л)	148,21 ± 3,56	133,98 ± 6,57	134,50 ± 7,86	133,56 ± 10,26

Примечание: * – $p < 0,05$.

тей и приводят к снижению остроты зрения. Поэтому представляет интерес изучение активности ферментов в слезной жидкости детей при различных формах нарушений рефракции глаза. Наиболее значительно при рефракционных нарушениях в слезной жидкости детей увеличивается активность γ -ГТП – в 1,5 раза по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$). Активность γ -ГТП в слезе миопического глаза детей достоверно возрастает в два раза и составляет $12,0 \pm 1,16$ Е/л. При гиперметропической рефракции глаза в слезе детей активность этого фермента составляет $7,15 \pm 0,76$ Е/л, что не отличается от группы контроля. Статистически значимых изменений активности γ -ГТП в слезной жидкости при простом, сложном и смешанном видах немиопического астигматизма не выявлено ($p > 0,05$).

Биохимические изменения склеры начинаются раньше, чем биомеханические изменения других отделов глазного яблока. У детей нарушения анатомо-морфологических размеров, увеличение передне-задней оси глаза при миопической рефракции ведут к натяжению, лабильности клеток тканей глазного яблока и слезной железы и выходу γ -ГТП в слезную жидкость. Существующие традиционные способы диагностики миопии функциональ-

но ограничены, особенно у детей младшего возраста. Разработан новый способ диагностики миопической рефракции глаза у детей дошкольного возраста: при активности γ -ГТП в слезной жидкости ребенка свыше 11 Е/л диагностируют близорукость. На основании результатов исследования получен патент на изобретение № 2549457 «Способ диагностики миопии у детей дошкольного возраста».

Выводы

При герпетическом кератите у детей выявлены отличительные особенности активности ферментов в зависимости от клинической формы и тяжести офтальмогерпеса, позволяющие оценить интенсивность воспаления, эффективность лечения и прогнозировать осложнения заболевания. Определение активности γ -ГТП в слезе может быть использовано для выявления близорукости у детей дошкольного возраста.

Список литературы

1. Azer T.N., Yin X.T., Tajfrouz D. et al. Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management // *Clin. Ophthalmol.* — 2017. — V. 11. — P. 185–191.
2. Терехина Н. А., Петрович Ю. А. Активность антиоксидантных ферментов и хемилюминесценция лимфоцитов периферической крови при инфицировании глаза вирусом простого герпеса // *Вопросы медицинской химии.* — 1992. — Т. 38, № 5. — С. 62–63.

3. Терехина Н. А., Реук С. Э., Петрович Ю. А., Атаманова Т. И. Белки острой фазы воспаления в слюне детей при герпетическом стоматите и гингивостоматите // *Российский стоматологический журнал.* — 2010. — № 4. — С. 17–19.
4. Терехина Н. А., Петрович Ю. А., Гольдфельд Н. Г. Прогнозирование рецидивов герпетического кератита с помощью определения активности дегидрогеназ слезы // *Вестник офтальмологии.* — 1988. — № 6. — С. 42–45.
5. Терехина Н. А., Реук С. Э., Петрович Ю. А. Использование ферментного анализа слезной жидкости для прогнозирования рецидива герпетического кератита у детей // *Вестник офтальмологии.* — 2007. — Т. 123, № 4. — С. 23–24.
6. Revere K., Davidson S. L. Update on management of herpes keratitis in children // *Curr. Opin. Ophthalmol.* — 2013. — V. 24, № 4. — P. 343–347.
7. Терехина Н. А., Петрович Ю. А., Батуева Р. А. Влияние метода сбора слезной жидкости на ее состав // *Лабораторное дело.* — 1989. — № 6. — С. 27–30.
8. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // *Amer. J. Clin. Path.* — 1957. — V. 28, № 1. — P. 56–63.
9. Hillmann G. Fortlaufende photometrische Messung der sauren Phosphatphosphatase Aktivität // *Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem.* — 1971. — V. 9, № 3. — P. 273–274.
10. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum // *J. Biol. Chem.* — 1946. — V. 164. — P. 321–329.
11. Caraway W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids // *Am. J. Clin. Pathol.* — 1959. — V. 32, № 1. — P. 97–99.
12. Szasz G., Weimann G., Staehler F. et al. New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity // *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* — 1974. — V. 12, № 5. — P. 228.
13. Nagel W., Willig F., Schmidt F. H. On amino acid arylamidase (so-called leucine aminopeptidase) activity in the human serum // *Klin. Wochenschr.* — 1964. — V. 42, № 1. — P. 446–449.
14. Петрович Ю. А., Терехина Н. А. Биохимия слезы и ее изменение при патологии // *Вопросы медицинской химии.* — 1990. — Т. 36, № 3. — С. 13–18.

Для цитирования: Терехина Н. А., Реук С. Э. Энзимодиагностика осложненного офтальмогерпеса. Медицинский алфавит. 2020; (5):50–53. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-50-53>

For citation: Teryokhina N. A., Reuk S. E. Enzymodiagnosics of ophthalmoherpetic complications. Medical alphabet. 2020; (5):50–53. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-50-53>

Современные тенденции в аналитическом определении витамина D

С. В. Хабаров, д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии¹, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач³, заслуженный врач России
Н. А. Вислоцкий, аспирант кафедры акушерства и гинекологии¹
О. В. Денисова, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач⁴
Д. Г. Навасардянтц, к.б.н., зав. клинко-диагностической лабораторией⁴

¹Медицинский институт ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула

²Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, г. Москва

³ООО «ВИТРОМЕД», г. Москва

⁴ООО «ДиаЛаб+», г. Москва

Current trends in analytical determination of vitamin D

S. V. Khabarov, N. A. Vislotskiy, O. V. Denisova, D. G. Navasardiyants

Tula State University, Tula; Federal Scientific and Clinical Centre for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Moscow; VITROMED Co., Moscow; DiaLab+ Co., Moscow; Russia

Резюме

Измерение содержания витамина D значительно возросло за последние годы. В большинстве исследований основное внимание уделялось 25(OH)D, который считается лучшим индикатором состояния витамина D, тогда как в настоящее время возник больший интерес к комбинированному измерению нескольких клинически значимых метаболитов этого витамина с помощью методики LC–MS/MS, позволяющей одновременно определять различные метаболиты витамина D в широком динамическом диапазоне. Многопанельные анализы LC–MS/MS, вероятно, улучшат будущие исследования относительно оптимальной комбинации метаболитов для оценки достаточности витамина D, а также помогут лучше понять его метаболизм в норме и при патологических изменениях в организме человека. В обзоре рассматриваются современные тенденции в аналитическом определении статуса витамина D и их применение в клинических исследованиях.

Ключевые слова: витамин D, витамин-D-статус, метаболизм, 25-гидроксивитамин D, метаболиты витамина D, иммуноферментный анализ, ИФА, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ВЭЖХ–МС/МС, стандартизация.

Summary

Measurement of vitamin D has increased significantly in recent years. Most studies focused on 25(OH)D, which is considered the best indicator of vitamin D status, while there is now more interest in the combined measurement of several clinically significant vitamin D metabolites using the LC–MS/MS technique, which allows simultaneous determination of various vitamin D metabolites over a wide dynamic range. Multi-panel LC–MS/MS analyses are likely to improve future research on the optimal combination of metabolites to assess vitamin D sufficiency, as well as help us better understand its metabolism in normal and pathological changes in the human body. The review examines current trends in analytical determination of vitamin D status and their application in clinical studies.

Key words: vitamin D, vitamin D status, metabolism, 25-hydroxyvitamin D, vitamin D metabolites, enzyme immunoassay analysis, EIA, liquid chromatography, mass spectrometry, LC–MS/MS, standardization.

В последние годы резко возросло число запросов на определение 25-гидроксивитамина D, который считается лучшим индикатором состояния витамина D, и на комбинированное измерение нескольких клинически значимых его метаболитов [1].

Термин «витамин D» в определенной степени условен. В настоящее время он объединяет более шести сходных по химическому строению биологически активных веществ (секостероидов), оказывающих влияние на 172 основных физиологических показателя здоровья человека, связанных с риском развития различных заболеваний [2, 3, 4]. Выделяют «классические» эффекты витамина D, связанные с его влиянием на кальцие-

во-фосфорный обмен и минеральную плотность костной ткани, и «неклассические» биологические эффекты. К «неклассическим» (внекостным) эффектам витамина относят торможение клеточной пролиферации и ангиогенеза, стимуляцию продукции инсулина и кателицидинов (противомикробных пептидов), ингибирование продукции ренина, противовоспалительное, иммуномодулирующее, антибактериальное, противоопухолевое и ряд других свойств [2, 5, 6, 7, 8].

Наиболее распространенными, изученными и клинически значимыми формами витамина D являются:

- витамин D₂ – эргокальциферол, образующийся из эргостерола под действием солнечного све-

та в растениях и поступающий в организм человека только с витаминными добавками, а также в очень малых количествах с пищей (хлебобулочные изделия, грибы, сыры с плесенью и продукты растительного происхождения);

- витамин D₃ – холекальциферол, на 90 % синтезирующийся в кератиноцитах кожи человека под действием ультрафиолетовых лучей длиной 290–315 нм из 7-дегидрохолестерола в ходе неферментативной реакции фотолиза через промежуточный изомер пре-витамина D₃, а также в незначительных количествах поступающий в организм с продуктами животного происхождения (жирная рыба [ло-

сось, тунец, скумбрия, сельдь], печень тресковых рыб [треска, пикша, минтай, путассу], говяжья печень, яичный желток); именно его рассматривают как «истинный» витамин D [6, 9, 10, 11].

Витамин D традиционно относят к группе жирорастворимых витаминов. Однако, в отличие от всех других витаминов, витамин D не является собственно витамином в классическом смысле этого термина: он биологически неактивен и только после двух реакций гидроксирования в организме превращается из холестерина в биологически активную гормональную форму; не является кофактором ни одного из известных энзимов; его биологическое действие проявляется вдали от места своего непосредственного синтеза [2, 5].

И поступивший с пищей, и кутанно синтезированный в организме витамин D (D_3 и D_2), всосавшись в тонком отделе кишечника, поступает в общий кровоток, объединяясь в составе хиломикронов с витамин-D-связывающим белком (*VDBP*), и транспортируется в печень, где под действием микросомального фермента *CYP2R1* подвергается первому гидроксированию по 25 атому углерода, образуя транспортную, функционально неактивную форму витамина 25(OH)D (кальцидиол). Транспортная форма 25(OH)D частично поступает в мышечную и жировую ткани, где может создавать депо с длительным сроком существования.

В комплексе с *VDBP* 25(OH)D поступает в кровь и транспортируется в почки, где в ходе второго гидроксирования при участии митохондриального фермента *CYP27B1* метаболизируется до биологически активной формы – 1,25-дигидроксивитамина D – кальцитриола ($1,25(OH)_2D_3$), либо до биологически неактивной формы – 24,25-дигидроксивитамина D ($24,25(OH)_2D$). Кроме того, все вышеперечисленные метаболиты подвергаются эпимеризации с образованием молекул с одинаковой структурой химических связей, но с различной стереохимической конфигурацией – на углероде 3 (3α и 3β) C 3-*epi*-25(OH)D, что приводит к получению продуктов с более низким белково-связывающим средством

и пониженной активностью по сравнению с их неэпимеризованными аналогами [10, 11, 12].

Общий циркулирующий 25(OH)D является суммарным показателем уровня $25(OH)D_3 + 25(OH)D_2$ и отражает количество витамина D, синтезированного в коже под действием УФ-облучения и получаемого с пищей и при приеме нативных препаратов витамина. Период полувыведения циркулирующего 25(OH)D составляет 2–3 недели. Активная форма витамина D – $1,25(OH)_2D_3$ имеет короткий период полужизни (менее 4 часов) и концентрацию в 1000 раз ниже, чем 25(OH)D (нмоль/л против пмоль/л). В процессе биотрансформации витамина D, катализируемой *CYP24A1*, *CYP27A1*, *CYP27B1*, *CYP3A4* и *CYP11A1*, образуется более 50 метаболитов, биологическое значение большинства из которых все еще неясно [7, 13, 14, 15]. Однако на сегодняшний день известно клиническое значение трех соединений витамина D:

- уровень 25(OH)D – оценка обеспеченности витамином D;
- уровень $1,25(OH)_2D$ – состояние биосинтеза витамина D;
- уровень $24,25(OH)_2D$ – биодegradация витамина D [13].

При этом уровень общего 25(OH)D является в медицине наиболее значимым для мониторинга количества витамина D в организме в целом и выявления дефицита всех его форм [2, 9, 16].

Концентрация кальцитриола в крови считается самым лучшим показателем уровня витамина D, чем циркулирующий $1,25(OH)_2D$, поскольку последний жестко регулируется и его уровни строго удерживаются между пределами, даже когда начинают происходить неблагоприятные эффекты. Этот анализ является наиболее точным, поскольку высокая концентрация облегчает его измерение.

При этом эксперты в области витамина D стремятся к еще большему улучшению стандартизации и воспроизводимости анализов в разных лабораториях.

Уровень суммарного содержания 25(OH)D в крови очень вариабелен и зависит от многих причин: рациона питания (мясо, морепродукты или растительная пища); присутствия

в рационе пищевых или прямых добавок витамина D; географического проживания обследуемого; времени года (зима – лето); степени естественной инсоляции; цвета кожи; наличия острых или хронических заболеваний (поражение почек, печени, костей [рахит, остеопороз, остеопороз], ЖКТ [включая мальабсорбцию и бариатрические операции], ожирения); расовых, социально-экономических, культурных и религиозных традиций (характера питания и ношения одежды, препятствующей доступу солнечных лучей); приема лекарственных препаратов, замедляющих 25-гидроксирование витаминов группы D в печени (глюкокортикоиды, антиретровирусные, противогрибковые, противоэпилептические препараты, холестирамин, пероральные антикоагулянты). На сегодня недостаточность, а в большей степени дефицит 25(OH)D представляют собой пандемию, затрагивающую преобладающую часть общей популяции, включая детей и подростков, беременных женщин, кормящих матерей, лиц старше 60 лет [16, 17, 18, 19, 20].

Однако эксперты считают широкий популяционный скрининг населения на дефицит витамина D ненужным и рекомендуют проводить скрининг только пациентам, имеющим вышеуказанные факторы риска его развития [21, 22].

Взаимосвязь дефицита витамина D с широчайшим кругом хронических заболеваний – сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологией, артериальной гипертензией, диабетом, ожирением, опухолевыми, инфекционными заболеваниями и др. указывает на необходимость определения уровней различных метаболитов витамина D для расширения диагностических возможностей.

Определение $1,25(OH)_2D$ может быть целесообразным при врожденных или приобретенных нарушениях метаболизма витамина D и фосфатов, например при хронической болезни почек, фосфат-теряющей нефропатии, онкогенной остеопорозии, наследственном псевдовитамин D-зависимом рахите (также известном как витамин D-зависимый рахит типа 1), хронических гранулематозных заболеваниях и некоторых лимфомах, когда

может иметь место дефицит или, наоборот, избыток активности фермента 1 α -гидроксилазы как почечного, так и внепочечного происхождения [10].

Доказана значимость 24,25(OH)₂D в диагностике редкого генетического расстройства – идиопатической детской гиперкальциемии, обусловленного инактивирующей мутацией *CYP24A1*.

В настоящее время существуют различные методы для определения содержания витамина D [2, 8, 23]:

1. не прямые (иммунохимические) методы, использующие измерение определенного параметра соответствующей тест-системы в результате связывания лиганда со связывающим агентом, и включающие радиоиммунологический анализ (*Radioimmunoassay, RIA*), иммуноферментный анализ (*Enzyme Immunoassay Analysis, EIA*); иммунохемилюминесцентный анализ на микрочастицах (*Chemiluminescent Immunological Analysis, CLIA*), в том числе методы конкурентного связывания белка (*CPBA, CLPBA*);
2. прямые методы, основанные на непосредственном измерении уровня анализируемого вещества, к которым относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) как самостоятельная методика или в сочетании с масс-спектрометрией (*Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric, LC-MS/MS*).

RIA, который в основном использовался клиническими лабораториями в 1980-х и начале 1990-х годов, оставаясь высокочувствительным методом, основанным на реакции «антиген – антитело» с применением антител, меченных радионуклидом и применяемым для определения веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях (10⁻¹²–10⁻¹⁵ г/л), в последнее время не столь широко применяется в клинической лабораторной практике, что связано в первую очередь с ограниченным сроком годности радиоактивной метки. *RIA* постепенно уступил место ручным, а затем автоматизированным *EIA*.

В настоящее время в большинстве клинических лабораторий содержа-

ние 25(OH)D в крови определяется иммунохимическими методами *EIA* [24, 25, 26].

Ведущие производители лабораторного оборудования производят реагенты для выполнения данного исследования на автоматических анализаторах, которые в значительной степени заменили ручные анализаторы, что увеличило пропускную способность и уменьшило сложность.

1. *Roche Diagnostics (cobas E 601)* – 27-минутный конкурентный анализ. В качестве связывающего вещества в тест-системе *Elecsys Vitamin D total* используется белок, связывающий витамин D (*VDBP*), который присоединяется к витамину 25(OH)D₂ и витамину 25(OH)D₃. Метод детекции – электрохемилюминесценция. Линейность – 7,5–175,0 нмоль/л; коэффициент вариации (*CV*) – 2,2–6,8%.
2. *Siemens Healthcare Diagnostics (Advia Centaur)* – 18-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Между количеством витамина D в образце пациента и количеством относительных световых единиц, зарегистрированных системой, существует обратная зависимость. Линейность – 10,5–375,0 нмоль/л; *CV* – 4,8–11,1%.
3. *Beckman Coulter (Unicel DXI 800)* – 39-минутный двухстадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 5,0–525,0 нмоль/л; *CV* – 5,6–9,3%.
4. *Abbott Diagnostics (Architect)* – 36-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 20–400 нмоль/л; *CV* – 2,4–4,6%.
5. *DiaSorin (Liason)* – 35-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 10–375 нмоль/л; *CV* – 2,9–5,5%.

Автоматизированные методы исследования требуют небольшого объема пробы, благодаря амплифицирующему характеру имеют широкий диапазон измерений, производят оценку за минимально короткий период времени и, как правило, обладают

достаточно высокой точностью, чувствительностью и специфичностью, хотя не всегда удовлетворяют критериям приемлемости.

Правильность определения 25(OH)D методами *EIA* зависит от специфики используемого антитела (насколько хорошо антитела распознают D₂ и D₃), полноты отделения 25(OH)D от *VDBP*, перекрестной реактивности антител с другими циркулирующими в крови метаболитами витамина D.

Кроме того, недоучет наличия примесей, поглощающих в УФ-спектре, 24,25(OH)₂D, диастереоизомеров α -кольца или эпимеров, что характерно для повсеместно используемого *EIA* на витамин D, усложняет точное измерение концентраций его метаболитов и приводит к завышению обеспеченности организма витамином D на 8–16% [10, 13]. Это особенно важно для образцов от детей в возрасте до 1 года, в котором C3-эpi-25(OH)D составляет основную долю от общего количества 25(OH)D.

Учитывая эти обстоятельства, использование *EIA* для измерения 25(OH)D не рекомендуется в конкретных группах пациентов, включая пациентов на гемодиализе, с остеопоротической и печеночной недостаточностью, беременных женщин и лиц, получающих добавку D₂, и, с осторожностью, оправданно в неисследованных группах пациентов [27, 28].

Если производителям иммуноанализа удастся усовершенствовать новые поколения автоматизированных иммуноанализов, они могут преодолеть проблемы, с которыми сталкиваются сегодня, и оказаться надежными в диагностике пациентов.

HPLC – современный и высокоточный референсный физико-химический метод, открытый в начале XX века отечественным ботаником-физиологом и биохимиком растений М. С. Цветом, позволяет разделять и идентифицировать компоненты сложных смесей, как жидких, так и газообразных.

Широкое применение и признание с начала 1930-х годов *HPLC* в медицине связано, прежде всего, с ее исключительно универсальными аналитическими возможностями, позволяющими изучать как смеси ионов или молекул, так и смеси различ-

ных ферментов, витаминов, гормонов, лекарственных препаратов и других органических и неорганических соединений.

Данным методом исследуются различные биологические объекты, такие как кровь, ее сыворотка и плазма, моча, слюна, спинномозговая жидкость, желчь, желудочный сок, пот, амниотическая жидкость, грудное молоко, гомогенаты органов и тканей [29].

HPLC обладает высокой эффективностью и селективностью разделения, которое проводится в мягких условиях (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом), что очень важно при анализе термически и химически биологически активных соединений [30]. В результате различные компоненты соединений становятся разделенными. Каждый из них затем входит в масс-спектрометр для ионизации атомов и молекул и последующего разделения образующихся ионов в электрическом или магнитном поле. Это позволяет выявлять химические компоненты или аналиты в химическом образце, определять количество каждого химического вещества в нем и проводить анализ структуры сложных молекул. В 1978 году было опубликовано первое описание метода *LC-MS/MS* для измерения 25(OH)D, и в настоящее время данный метод рассматривается как «золотой стандарт» для обнаружения и количественного определения 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ и других метаболитов витамина D [11, 23, 31, 32].

Метод *HPLC* с последующей тандемной *MS*, когда используется более одного масс-спектрометра для разделения больших ионов на более мелкие ионы для детального анализа, считается референсным для точной количественной оценки содержания 25(OH)D. *HPLC / LC-MS/MS* обеспечивают сопоставимые результаты уровня 25(OH)D и позволяют одновременно измерять и обе его формы – 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃, что особенно важно при лабораторном контроле приема лекарственных препаратов витамина D [26, 30].

Однако применение методов, основанных на *LC-MS/MS*, требует использования дорогостоящего оборудования, а их сложность – высококвалифицированного персонала для эксплуатации и технического обслуживания. Для

уменьшения фонового шума и увеличения чувствительности необходимо наличие стандартов, калибраторов и растворителей особой чистоты; проведение пробоподготовки приводит к увеличению времени выполнения теста [32]. Недостатки современных приборов *LC-MS/MS* могут быть решены более простым в использовании прибором и внедрением полностью автоматизированных систем *LC-MS/MS*.

Методы *LC-MS/MS*, хотя и являются более точными, на сегодняшний день являются привилегией специализированных и исследовательских лабораторий. Большинство лабораторий по-прежнему зависят от ручного и автоматизированного иммуноанализов. Ручные иммуноанализаторы все еще могут быть хорошо приспособлены для измерения 25(OH)D в группах пациентов, где адекватная пробоподготовка решает проблемы специфичности метода. Автоматизированные иммуноанализаторы все еще могут быть пригодны для определения уровня 25(OH)D в больших группах здоровых людей, где примеси и метаболиты менее важны. Однако измерение 25(OH)D в клинических условиях значительно выигрывает от перехода от *EIA* к *LC-MS/MS*.

В целом измерение метаболизма витамина D значительно выиграло от введения *LC-MS/MS* в клинических лабораториях. Это позволило значительно улучшить специфичность и точность, а также дало возможность совместно измерять несколько метаболитов одновременно [12, 30, 34, 35]. Он уже доказал свою большую пользу в диагностике многочисленных состояний, и новые поколения более чувствительных приборов *LC-MS/MS* позволяют дополнительно тщательно изучить на сегодняшний день необъяснимые состояния, связанные с метаболизмом витамина D.

До настоящего времени сохраняется значительная внутри- и межлабораторная вариабельность в результатах определения витамина D (особенно при низких его концентрациях) как между различными методами, так и лабораториями, использующими одинаковые методы, что может привести к неправильной диагностике дефицита/недостаточности витамина D [16, 24, 26, 36].

С 1995 года функционирует международная программа по контролю качества исследований метаболитов витамина D *DEQAS (International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites)*. В *DEQAS* значения, полученные конкретными лабораториями для рассылаемых ежеквартально образцов сыворотки, сравниваются как со средними значениями для конкретного метода (*Method Mean, MM*) определения витамина D, средними значениями всех методов, используемых лабораториями, участвующими в программе *DEQAS (All-Laboratory Trimmed Mean, ALTM)*, а также универсальным стандартом, разработанным Национальным институтом стандартов и технологий США (*National Institute of Standards and Technology, NIST*). Программа присуждает сертификат качества, если целевая производительность лаборатории соответствовала нахождению 80% всех результатов в диапазоне $\pm 30\%$ от *ALTM*. Однако, несмотря на попытки стандартизировать анализ и свести к минимуму его вариабельность, существующее смещение для измеренных концентраций витамина D часто все еще выше желательного критерия.

Другим путем преодоления вариабельности методов оценки уровня витамина D в крови является применение стандарта, по которому метод может быть валидирован. Так, *NIST* разработан стандарт для определения метаболитов витамина D (*SRM 972a*) и калибровочный раствор для определения 25(OH)D₂ + 25(OH)D₃ (*SRM 2972*).

Поскольку последствия низких концентраций витамина D при несkeletalных заболеваниях все еще частично неизвестны, необходимы международные руководящие рекомендации по установлению значимых диапазонов в любое время года независимо не только от экологических и личных факторов, но и от инструментальной изменчивости. Для преодоления этой проблемы была разработана Всемирная программа стандартизации с использованием международных стандартов калибровки [16, 22]. В 2010 году Управление пищевых добавок (*Office of Dietary Supplements, ODS*) *NIST*, Национальный институт здоровья (*National Institute of Health, NIH*), Центр по контролю и профилактике заболеваний (*Center for Disease*

Control and Prevention, CDC) в Атланте и Справочная лаборатория витамина D Гентского университета объединили экспертные знания и создали программу стандартизации витамина D (*Vitamin D Standardization Program, VDSP*), которая представляет собой международную совместную работу по стандартизации и сопоставимости по времени, местоположению и лабораторной процедуре измерений статуса витамина D, и координировали ее работу [18, 37].

Оценка статуса витамина D должна проводиться путем определения уровня общего 25(OH)D в сыворотке крови надежным методом. Рекомендуется проверка надежности используемого в клинической практике метода определения 25(OH)D относительно международных стандартов (*DEQAS, NIST*). При определении концентрации 25(OH)D в динамике рекомендуется использование одного и того же метода (*EIA* против *LC-MS/MS*) и одной и той же конкретной лаборатории [24].

В конечном счете измерение метаболитов витамина D является и будет иметь важное значение для диагностики ряда различных состояний. Дальнейшие усилия по стандартизации анализов повысят общее качество методов диагностики и обеспечат клиницистов надежными результатами.

Выводы

Два аналитических метода, наиболее часто используемые для оценки уровня витамина D (*EIA* и *LC-MS/MS*), определяют 25(OH)D, но по разным принципам. Самую большую разницу между результатами методов обуславливают наличие метаболитов, поскольку хроматографические методы могут различать метаболиты витамина D, тогда как методы *EIA* измеряют лишь общий его уровень.

Для большинства целей достаточно рассмотреть состояние витамина D человека путем определения общей концентрации 25(OH)D в сыворотке крови (сумма 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃).

Определение уровня витамина D методом *EIA* в настоящее время является скрининговым тестом, а методом *LC-MS/MS* – референсным (экспертным) исследованием в ряде групп па-

циентов, включая беременных женщин, пациентов в ходе интенсивной терапии, пациентов с печеночной недостаточностью, пациентов на гемодиализе и остеопоротических больных, где *EIA* оказались ненадежными. Поэтому у этих пациентов не рекомендуется измерение 25(OH)D с помощью автоматизированного иммуноанализа.

Список литературы

- Rodd C, Sokoro A, Lix LM, et al. Increased rates of 25-hydroxy vitamin D testing: Dissecting a modern epidemic. *Clin Biochem*. 2018; 59: 56–61. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.07.005.
- Витамин D и репродуктивное здоровье женщины. Под ред. И.Е. Зазерской. СПб: Эко-Вектор. 2017; 151 с.
- Громова О. А., Торшин И. Ю. Микронутриенты и репродуктивное здоровье: руководство. М: ГЭОТАР-Медиа, 2019; 672 с.
- Dahl SR, Thorsby PM, Hvardan mǎle vitamin D-status? *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2014; 134: 729–31. DOI: 10.4045/tidsskr.13.0981.
- Шварц Г.Я. Ренессанс витамина D: Молекулярно-биологические, физиологические и фармакологические аспекты. Медицинский совет. 2015; 18: 102–10.
- Доброхотова Ю.Э., Боровкова Е.И., Залеская С.А. и соавт. Витамин D3 и здоровье женщины. *Гинекология*. 2019; 21: 1: 44–51. DOI: 10.26442/2079-5696-2019.1.190235.
- Tuckey RC, Cheng CYS, Slominski AT. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *J Steroid Biochem*. 2019 Feb; 186: 4–21. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.09.003.
- Vázquez-Lorente H, Herrera-Quintana L, Quintero-Osso B, et al. Current trends in the analytical determination of vitamin D. *Nutr Hosp*. 2019; 36 (6): 1418–23. DOI: 10.20960/nh.02713.
- Громова О. А., Торшин И. Ю. Витамин D. Смена парадигмы. Под ред. Е.И. Гусева, И.И. Захаровой. М: ГЭОТАР-Медиа, 2017; 576 с.
- Dirks NF, Ackermans MT, Lips P, et al. The When, What & How of Measuring Vitamin D Metabolism in Clinical Medicine. *Nutrients*. 2018 Apr; 10 (4): 482. DOI: 10.3390/nu10040482.
- Kwak HS, Chung HJ, Cho DH, et al. Efficacy of the Measurement of 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Levels by Using PerkinElmer Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Vitamin D Kit Compared With DiaSorin Radioimmunoassay Kit and Elecsys Vitamin D Total Assay. *Ann Lab Med*. 2015 Mar; 35 (2): 263–5. DOI: 10.3343/alm.2015.35.2.263.
- Jenkinson C, Taylor AE, Hassan-Smith ZK, et al. High throughput LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of multiple vitamin D analytes in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016; 1014: 56–63. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.01.049.
- Грибальс А.В., Гришина Т.Р., Громова О.А. и соавт. Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии витамин-D-зависимых патологий. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016; 4: 9–18.
- Gao C, Bergagnini-Kolev MC, Liao MZ, et al. Simultaneous quantification of 25-hydroxyvitamin D3-3-sulfate and 25-hydroxyvitamin D3-3-glucuronide in human serum and plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with DAPTAD-derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017 Aug; 1060: 158–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.017.
- Hoofnagle AN, Eckfeldt JH, Lutsey PL. Vitamin D-Binding Protein Concentrations Quantified by Mass Spectrometry. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8; 373 (15): 1480–2. DOI: 10.1056/NEJMc1502602.
- Ferrari D, Lombardi G, Banfi G. Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017; 27: 3, 030501. DOI: 10.11613/BM.2017.030501.
- Aydin CG, Dinçel YM, Arkan Y, et al. The effects of

- indoor and outdoor sports participation and seasonal changes on vitamin D levels in athletes. *SAGE Open Med*. 2019; 7. DOI: 10.1177/2050312119837480.
- Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr*. 2016 Apr; 103 (4): 1033–44. DOI: 10.3945/ajcn.115.120873.
 - Reid IR. What diseases are causally linked to vitamin D deficiency? *Arch Dis Child*. 2016; 101: 185–9. DOI: 10.1136/archdischild-2014-307961.
 - Woodford HJ, Barrett S, Pattman S. Vitamin D: too much testing and treating? *Clin Med*. 2018; 18: 196–200. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-3-196.
 - Дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение и профилактика: клинические рекомендации М.: Российская ассоциация эндокринологов ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ. 2015; 77 с.
 - Siggelkow H. Vitamin-D-Analytic. *Diabetology*. 2016; 12: 248–53. DOI: 10.1007/s11428-016-0099-0.
 - Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, et al. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Practical Laboratory Medicine*. 2015; 2: 1–14. DOI: 10.1016/j.plabm.2015.04.001.
 - Atef SH. Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018; 175: 136–7. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.011.
 - Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015 Jun; 25 (2): 203–12. DOI: 10.11613/BM.2015.020.
 - Alfieri B, Cavalier E, Perez-Lopez FR. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays. *Eur J of Clin Nutr*. 2020; 74 (3): 1–17. DOI: 10.1038/s41430-019-0553-3.
 - Kleine C, Obi Y, Streja E, et al. Seasonal variation of serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of bone and mineral disorder in dialysis patients. *Bone*. 2019; 124: 158–65. DOI: 10.1016/j.bone.2019.03.003.
 - Li L, Zeng Q, Yuan J, et al. Performance evaluation of two immunoassays for 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Biochem Nutr*. 2016 May; 58 (3): 186–92. DOI: 10.3164/jcbn.15-61.
 - Oberson JM, Bénéf S, Redeuil K, et al. Quantitative analysis of vitamin D and its main metabolites in human milk by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2020; 412 (2): 365–75. DOI: 10.1007/s00216-019-02248-5.
 - Nair H, Clark W. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier Science. 2017. 304 p. ISBN: 9780128008713.
 - Nikooyeh B, Samiee SM, Farzami MR, et al. Harmonization of serum 25-hydroxycalciferol assay results from high-performance liquid chromatography, enzyme immunoassay, radioimmunoassay, and immunochemiluminescence systems: A multicenter study. *J Clin Lab Anal*. 2017; 31. DOI: 10.1002/jcla.22117.
 - Van den Ouweland J. Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Trends Analyt Chem*. 2016; 84: 117–30. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.005.
 - Karadźiewicz-Lada M, Głowska A. A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *J Sep Science*. 2016; 39: 132–48. DOI: 10.1002/jssc.201501038.
 - Couchman L, Moniz CF. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017; 9 (4): 97–104. DOI: 10.1177/1759720X17692500.
 - Abu Kassim NS, Shaw PN, Hewavitharana AK. Simultaneous determination of 12 vitamin D compounds in human serum using online sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2018; 1533: 57–65. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.012.
 - Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Lab. Med.*, 2018. DOI: 10.1016/j.cll.2018.05.007.
 - Le Goff C, Souberbielle J-C, Delvin E, Cavalier E. Le dosage de la vitamine D: considérations pré-analytiques et analytiques. *Annales de Biologie Clinique*. 2015; 73 (11): 79–92. DOI: 10.1684/abc.2014.1002.



Возможности применения нейромышечной электростимуляции для лечения полинейропатии при непереносимости глютена (клиническое наблюдение)

Е. Р. Баранцевич, д.м.н., проф., зав. кафедрой неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения

Е. Е. Смирнов, студент V курса, член студенческого научного общества кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения

А. А. Потапчук, д.м.н., проф., зав. кафедрой медицинской реабилитации и адаптивной физической культуры

А. В. Артемова, ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения

Ю. В. Эмануэль, к.м.н., доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Possibilities of using neuromuscular electrostimulation for treating polyneuropathy in gluten intolerance (clinical observation)

E. R. Barantsevich, E. E. Smirnov, A. A. Potapchuk, A. V. Artyomova, Y. V. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

В статье представлено клиническое наблюдение пациента 54 лет с сенсомоторной полинейропатией и впервые выявленной целиакией. Показано, что лабораторные методы обследования пациентов с полинейропатией являются обязательными для выявления этиологии процесса в большинстве случаев. Обращено внимание на возможность развития полинейропатии при непереносимости глютена без явных патологических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта. Отражена важность не только соблюдения безглютеновой диеты для лечения, но и применения импульсных токов в виде экспоненты для снижения болевых ощущений, улучшения трофики мышечной ткани, увеличения мышечной силы и восстановления глубокой чувствительности. Нейромышечная электростимуляция является эффективным методом терапии.

Ключевые слова: электростимуляция, полинейропатия, глютен, целиакия, реабилитация.

Summary

The article presents a clinical observation of a 54-year-old patient with sensorimotor polyneuropathy and newly diagnosed celiac disease. It was shown that laboratory methods for examining patients with polyneuropathy are required to identify the etiology of the process in most cases. Attention is drawn to the possibility of developing polyneuropathy with gluten intolerance without obvious pathological manifestations of the gastrointestinal tract. The importance of not only observing a gluten-free diet for treatment, but also the use of pulsed currents in the form of an exponent to reduce pain, improve trophism of muscle tissue, increase muscle strength and restore deep sensitivity is reflected. Neuromuscular electrical stimulation is an effective therapy.

Key words: electrical stimulation, polyneuropathy, gluten, celiac disease, rehabilitation.

Полинейропатия может быть синдромом многих патологических состояний, к ним относятся патология щитовидной железы, диабет, уремия, патология печени, порфирия, саркаидоз, системные заболевания соединительной ткани, антифосфолипидный синдром, дефицит витаминов B₁₂, B₆, B₁, E, фолиевой кислоты, интоксикации алкоголем, лекарственными препаратами, свинцом, мышьяком, множественная миелома, моноклональная гаммапатия неопределенного значения, другие парапротеинемии, инфекционные заболевания, например лепра, ВИЧ, болезнь Лайма, дифтерия

и др., целиакия, непереносимость глютена и др. Отдельно выделяют хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), острую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ОВДП), полинейропатию (ПНП), вызванную антителами к миелинассоциированному гликопротеину и др. [1, 2, 3].

С учетом многогранной этиологии полинейропатии, необходим комплексный подход в диагностике, при котором большую роль играет лабораторная медицина. Если у пациента наблюдается клиническая картина острой или хронической демиелини-

зирующей полирадикулоневропатии и получены соответствующие данные при ЭНМГ-исследовании, используют исследование ликвора [4].

При ПНП могут наблюдаться поражения сенсорных, моторных и вегетативных волокон. Наиболее опасными для жизни пациента являются ПНП с нарушениями вегетативной нервной системы, следует обратить особое внимание на кардиальную автономную невропатию [5]. Болевой невропатический синдром наблюдается при поражении тонких (мало- и немиелинизированных) нервных волокон. В данном случае отсутству-

ют изменения при ЭНМГ. Нарушения глубокой чувствительности и развитие сенситивной атаксии с возможными падениями наблюдаются при поражении толстых чувствительных нервных волокон [6].

В дебюте большинства ПНП симптомы возникают в дистальных отделах ног, и по мере прогрессирования заболевания процесс распространяется на верхние конечности. Однако бывают и исключения, например при мультифокальной моторной невропатии, когда вначале развивается асимметричный дистальный верхний парез с гипотрофиями мышц при отсутствии чувствительных нарушений.

Хронической рецидивирующей или прогрессирующей формой приобретенного аутоиммунного заболевания периферической нервной системы является ХВДП [6]. ХВДП встречается в 5 % случаев полинейропатий [7], при этом чаще заболевают мужчины среднего возраста [8]. Для взрослых, как правило, прослеживается связь с инфекционным процессом, вакцинацией, хирургическим вмешательством.

Следует также учитывать демиелинизирующую полинейропатию, вызванную антителами к миелин-ассоциированному гликопротеиду (анти MAG антитела). В крови у пациентов выявляются анти-MAG-антитела. В клинике преобладают онемение и сенситивная атаксия с частыми падениями. Моторный компонент встречается относительно редко. Данная аутоиммунная полинейропатия отличается плохим ответом на лечение плазмаферезом и внутривенным иммуноглобулином. Применяют сильные цитостатики.

Паранеопластические ПНП (синдром Денни-Брауна) развиваются при различных локализациях опухоли. Неврологические проявления могут предшествовать манифестации онкологического процесса на несколько лет. Для диагностики используют антинейрональные антитела: Hu (ANNA 1), Yo-1 (PCA1), CV2, Ma2, Ri (ANNA2), амифизин.

Отдельно следует выделять полинейропатии, которые развиваются при нарушениях, связанных с глютенном. Нарушения, связанные с глю-



Рисунок 1. Нейромышечный электростимулятор «Тренажер Маркелова».

тенном, – это спектр системных аутоиммунных процессов с различными проявлениями. В организме развивается аномальная иммунологическая реакция на поглощенный глютен у генетически восприимчивых людей. К глютензависимым заболеваниям относят целиакию, чувствительность к глютену без целиакии, аллергию на глютен.

Немедикаментозные технологии реабилитации больных широко применяются в практическом здравоохранении, в том числе для лечения больных с ПНП [9].

Так, метод электромиостимуляции (нейромышечная стимуляция, мио-стимуляция) успешно применяется в реабилитации пациентов с двигательными нарушениями [10]. В основе нейромышечной электростимуляции лежит электрическая стимуляция посредством передачи тока с заданными характеристиками от миостимулятора к телу человека через электроды.

При воздействии нейромышечной электростимуляции включаются саногенетические механизмы, формируется новый двигательный стереотип, снижается болевой синдром, улучшается чувствительность, в том числе мышечно-суставная. Электростимуляция значительно увеличивает скоростно-силовые качества. Нейромышечная электростимуляция оказы-

вает трофическое действие на мышечные и нервные структуры. В случае глютенной полинейропатии патогенетическим влиянием выступают оба механизма действия, так как наблюдаются аксонопатия, демиелинизация и атрофия мышц, тем более что при нейромышечной электростимуляции происходит восполнение дефицита нервной импульсации [11].

Нейромышечный электростимулятор «Тренажер Маркелова» (рис. 1) выпускается ООО «МВ Барбел» в г. Петрозаводске (Республика Карелия) (лицензия № ФС-99-04-003468 от 14 марта 2016 года). Прибор является собственным изобретением разработчиков (патент на изобретение № 77926).

Краткие характеристики прибора: форма сигнала в виде экспоненты, что максимально соответствует физиологическому нервному импульсу и сближает его с произвольным движением, частота импульсов – 50 Гц, время нарастания сигнала – 0,5 мс, время воздействия импульса – 0,8 мс, время снижения сигнала – 1,5 мс, период повторения импульса – 20 мс, сила тока – до 25 мА, стимуляция группами по 20 стимулов, длительность импульсного воздействия и длительность паузы – соответственно 200–500 и 1500–5000 мс.

У нейромышечного электростимулятора (тренажер Маркелова) есть несколько преимуществ:

- компактность (прибор удобен при эксплуатации в режиме стационара благодаря возможности использования у постели больного, его легко переносить);
- простота в управлении, использовании (доступная инструкция, удобный и понятный интерфейс, что позволяет использовать прибор в домашних условиях);
- большое разнообразие электродов, что позволяет выбрать наиболее подходящий вариант прибора (по форме, размеру, цене) для каждого случая и для конкретной патологии.

Клиническое наблюдение

Приведем результаты клинического наблюдения пациента с ПНП, который наблюдался с 2018 по 2019 год

Таблица 1
Лабораторные тесты

Наименование теста, норма	Результаты
Клинический анализ крови	Уровень гемоглобина и гематокрита ближе к нижней границе нормы: тенденция к нормоцитарной, нормохромной анемии, возможно, анемии хронического заболевания. Остальные показатели без особенностей
Функциональное состояние печени (АСТ, АЛТ, билирубин, ГТП, ЩФ)	Патологии не выявлено
Функциональное состояние почек (креатинин, мочевины, мочевая кислота): • более 90 мл/мин./1,73 м² – норма • 60–89 мл/мин./1,73 м² – группа риска • менее 60 мл/мин./1,73 м² – ХБП	СКФ – 69 мл/мин./1,73 м ²
Функциональное состояние щитовидной железы (ТТГ, антитела к ТПО)	Патологии не выявлено
Углеводный обмен (глюкоза, гликированный гемоглобин, инсулин, С-пептид)	Патологии не выявлено
Липидный обмен Целевые значения липидного спектра: • холестерин – менее 5,0 ммоль/л • ЛПНП – менее 3,0 ммоль/л • ЛПВП – более 1,0 ммоль/л • триглицериды – менее 1,7 ммоль/л	Холестерин – 6,8 ммоль/л ЛПНП – 3,5 ммоль/л ЛПВП – 0,9 ммоль/л Триглицериды – 1,8 ммоль/л Атерогенная дислипидемия Пациент имеет умеренный сердечно-сосудистый риск
Белковый обмен (общий белок, альбумин)	Патологии не выявлено
Фосфорно-кальциевый обмен (кальций общий, фосфор в крови). ЩФ-патологии не выявлено: • D 325(ОН) – норма • менее 20 нг/мл – дефицит • 20–30 нг/мл – недостаточность • 30–100 нг/мл – оптимальный уровень	Недостаточность витамина D 325(ОН) – 21,07 нг/мл
Электролитный обмен (калий, натрий, магний, хлор)	Патологии не выявлено
СРБ	В пределах референтного интервала
Фибриноген	В пределах референтного интервала
Системные заболевания соединительной ткани: АНФ, ЭНА	В пределах референтного интервала
Общий анализ мочи	Без особенностей
Копрограмма	Энтеропатия, в том числе мыла +++
Ферритин, железо сыворотки крови	В пределах референтного интервала
Антинейрональные антитела	Не выявлены
АНЦА	В пределах референтного интервала
Уровень витаминов В1, В6, В12, фолиевой кислоты	В пределах референтного интервала
Гомоцистеин • норма – 5,00–12,00	18,60 мкмоль/л
Волчаночный антикоагулянт	Не выявлен
Антикардиолипиновые антитела	В пределах референтного интервала
Кал на скрытую кровь	Отрицательный результат
Кальпротектин • норма – менее 50 – не обнаружены	75 мкг/г
Целиакия	
Комбинированный тест для диагностики целиакии	
Антитела к тканевой транглутаминазе TG2 классов IgA: • норма – 0,00–7,00 – не обнаружены	111,00 Ед/мл – обнаружены
Антитела к тканевой транглутаминазе TG2 классов IgG: • норма – 0,00–7,00 – не обнаружены	241,00 Ед/мл – обнаружены
Генетика целиакии: типирование HLA-DQ2 и HLA-DQ8 для определения риска целиакии	Выявлен гаплотип риска целиакии: HLADQ8, включающий аллельные гены DQA1*03:01 и DQB1*03:02. Генотип пациента – HLADQA1*03:01; *05:01; HLA-DQB1*03:01; *03:02

на кафедре неврологии и мануальной медицины ФПО. Это один из многих примеров, когда терапия, в том числе с использованием нейромышечного электростимулятора (тренажер Маркелова), была эффективной.

Пациент, 54 года, жалобы на боль и жжение в стопах, постепенно прогрессирующую слабость в стопах,

атрофию мышц стоп, шаткость при ходьбе, трудности с интерпретацией поверхности, по которой идет, особенно без контроля зрения. Пациент утратил возможность вождения автомобиля, так как не мог пользоваться педалями в большей степени из-за нарушения мышечно-суставного чувства. Заболевание развивалось постепенно, первые симптомы,

вероятно, появились больше года назад. Эпидемиологический, страховой анамнез без особенностей. Травмы отрицает. Частые кожные высыпания, лечился от atopического дерматита с нестойкими результатами. Иммуноглобулиновой Е-зависимой аллергии не выявлено. Артериальное давление 140/80 мм рт. ст. без терапии. Пациент не курит.

Для выявления причин развития полинейропатии проведены скрининговые и уточняющие лабораторные тесты (табл. 1). Лабораторные исследования выполнялись в лабораторной службе «Хеликс», сертифицированной по международным стандартам качества ISO 9001:2008 (SGS United UK System & Services Certification), ISO 15189:2012 (Bureau Veritas Certification Holding). Лабораторная служба является участником российской (ФСВОК) и международных (EQAS, RIQAS, Bio Rad) программ внешнего контроля качества.

Выявленный синдромокомплекс

Эмоциональная неустойчивость. Тревожное расстройство (по Госпитальной шкале тревоги 15 баллов). Полинейропатия сенсомоторная: боль и жжение в стопах, гиперпатия в стопах, снижение мышечного-суставного чувства в стопах, снижение вибрационной чувствительности в стопах, коленных суставах, в меньшей степени в кистях; угнетение карпорадиальных и ахилловых рефлексов с двух сторон, снижение остальных глубоких рефлексов, уступчивость в разгибателях стопы и голени, атрофия мышц стоп и голеней. Сенситивная атаксия. Постуральный тремор пальцев рук. Синдром Горнера справа. Шейный мышечно-тонический синдром. Атерогенная дислипидемия. Гипергомоцистеинемия. Дефицит витамина D₃. Остеопения.

По результатам лабораторных тестов не получены данные за паранеопластический процесс, системное воспаление, ХБП, патологию щитовидной железы, печени, нарушения в углеводном, белковом, электролитном обменах. Не выявлены маркеры системного заболевания соединительной ткани, антифосфолипидного синдрома. Отсутствует дефицит витаминов группы В и фолиевой кислоты. Выявленные дислипидемия, недостаточность витамина D₃, гипергомоцистеинемия, на наш взгляд, не объясняют заболевание пациента.

Учитывая результаты клинического анализа крови (уровень гемоглобина и гематокрита ближе к нижней границе нормы: тенденция к нормоцитарной, нормохромной анемии,



Рисунок 2. Электрод типа «носки».

возможно, анемии хронического заболевания), энтеропатию, по данным копрограммы, увеличенный уровень кальпротектина, пациенту проведены фиброгастродуоденоскопия (ФГДС) и колоноскопия, которые не выявили явной патологии. Обращает на себя внимание наличие остеопении, по данным денситометрии. При дообследовании выявлены гены предрасположенности к целиакии и маркеры, подтверждающие это заболевание.

Терапия

Назначение безглютеновой диеты, препаратов витамина D₃, кальция, витаминов B₆, B₁₂ и фолиевой, альфа-липоевой кислоты в течение месяца не принесло достаточного улучшения со стороны симптомов полинейропатии. Поэтому на втором месяце начато лечение к терапии добавили курс электростимуляции. Методами контроля были клиническое исследование позитивных и негативных сенсорных симптомов, моторного дефицита и состояния глубоких рефлексов на верхних и нижних конечностях. Для оценки выраженности полинейропатии применялась шкала интегрированной оценки степени выраженности клинических проявлений невропатии или полинейропатии. Для выявления тревоги и (или) депрессии использовалась Госпитальная шкала тревоги и депрессии. Исследования проводились дважды: до начала терапии и спустя 6 месяцев. Электростимуляция проводилась на приборе с использованием электрода «носки» по 20 минут 20 процедур через день. Характеристика тока: монофазный, в виде экспоненты; сила тока регу-

лировалась индивидуально до 25 мА, стимуляция группами по 20 стимулов, в трех режимах. Первый и третий режимы – по 5 минут, второй режим – 10 минут. Длительность импульсного воздействия для первого режима – 200 мс, длительность паузы – 15 000 мс. Длительность импульсного воздействия для второго режима – 500 мс, длительность паузы – 2 000 мс. Длительность импульсного воздействия для третьего режима – 300 мс, длительность паузы – 5 000 мс.

Электрод «носки», предварительно смоченный водой, накладывался (надевался) на стопы. Для пациентов удобен подбор электрода «носки» (рис. 2), так как они выпускаются разных размеров: М, L, XL.

Обсуждение

Известно, что при электростимуляции происходит воздействие на сосуды, приводящее к увеличению кровотока, улучшению лимфодренажа, активации обмена веществ в стимулируемых мышцах. Этим обусловлена эффективность реабилитации при сенсомоторной полинейропатии.

Биохимические и физиологические свойства мышечных волокон зависят в большей степени от активности мышцы, поэтому электростимуляция является эффективным способом лечения денервационной атрофии.

При использовании электростимуляции для ускорения регенерации нерва в реиннервируемых мышцах увеличивается содержание мышечных волокон, а доля соединительной ткани снижается. Поэтому снижение степени атрофии за счет нарастания мышечной массы у нашего пациента было ожидаемо.

Критериями оценки эффективности и безопасности лечения выбраны шкала интегрированной оценки степени выраженности клинических проявлений невропатии или полинейропатии и Госпитальная шкала тревоги и депрессии [12] (табл. 2).

После первого курса процедур состояние субъективно улучшилось. Пациент начал периодически садиться за руль.

В результате лечения степень снижения болевой чувствительности уменьшилась, при этом вибра-



КЛИНИКА МАРКЕЛОВА

Лицензия ЛО-10-01-000942 от 21.08.2015



**Электростимулятор
МВ 6.03**

**ЛПЧУ «Клиника Маркелова»
осуществляет медицинскую
деятельность по следующему
спектру услуг:**

- Лечебная физкультура (индивидуальные и групповые занятия)
- Занятия на адаптированных тренажерах
- Тренировка мышц позвоночника с использованием противосколиозного жилета
- Массаж (аппаратный с использованием Электростимулятора МВ 6.03 и аксессуаров к нему, ручной, детский)

ЛПЧУ «Клиника Маркелова»

Адрес: Республика Карелия, город Петрозаводск, ул. Гвардейская, дом 60
(проезд — автобус № 5)

Режим работы: пн—пт с 09:00 до 20:00, суб., вс. — выходной

Телефон для записи и консультаций: (8142) 59-54-45

E-mail: clinicmb@mail.ru

Skype: clinicmb

http://www.markeltren.ru

Вопросы по приобретению Электростимулятора МВ 6.03 и аксессуаров к нему отражены на данном сайте в разделе «Контакты»

Таблица 2
Шкала интегрированной оценки степени выраженности клинических проявлений
невропатии или полинейропатии

Рефлексы глубокие 1) сохранены (0) 2) снижены (3) 3) низкие (6) 4) не вызываются (9)	Атрофия (гипотрофия) мышц 1) нет (0) 2) легкая (гипотрофия мышц едва заметная) (4) 3) умеренная (хорошо заметная гипотрофия) (7) 4) выраженная (атрофия мышц) (9)
Болевая чувствительность 1) сохранена (0) 2) снижена незначительно (гиперестезия) (3) 3) снижена значительно (гиперпатия) (5) 4) анестезия (7)	Мышечная слабость 1) нет (0) 2) легкая (3) 3) умеренная (6) 4) выраженная (9)
Вибрационная чувствительность 1) сохранена (0) 2) снижена (3) 3) отсутствует (6)	Вегетативно-сосудистые проявления (цианоз, бледность, зябкость) 1) нет (0) 2) незначительные (2) 3) значительные (включая вегетативно-трофические проявления) (5)
Снижение других видов чувствительности (температурная, тактильная) 1) нет (0) 2) есть (3)	
Парестезия, жжение, онемение 1) нет (0) 2) есть (4)	
Интенсивность боли (по ВАШ) 1) нет боли (0) 2) легкая боль (0–3) (3) 3) умеренная боль (4–6) (5) 4) сильная боль (7–10) (7)	Распространенность клинических нарушений 1) нерв (0) 2) фокально несколько нервов (2) 3) полиочаговость (верхние или нижние конечности) (4) 4) «заинтересованность» четырех конечностей (7)
Частота приступов боли за сутки 1) нет приступов (0) 2) до 3 (1) 3) от 3 до 10 (3) 4) больше 10 или постоянная боль (5)	Зона локальных клинических нарушений 1) нет нарушений (0) 2) до основания пальцев (3) 3) пальцы и кисть (стопа) (5) 4) до середины предплечья (голеней) (7) 5) до локтевого изгиба (или колена) и выше (9)
Интенсивность боли при пальпации 1) нет боли (0) 2) незначительная (2) 3) умеренная (4) 4) выраженная (6)	
Аллодиния 1) нет (0) 2) есть (5)	

Таблица 3
Динамика результатов терапии

Шкала	До начала терапии	Через 6 месяцев лечения
Шкала интегрированной оценки степени выраженности клинических проявлений невропатии или полинейропатии	65 баллов	46 баллов
Госпитальная шкала тревоги и депрессии	15 баллов	7 баллов

ционная чувствительность улучшилась незначительно. Атрофии и мышечная слабость стали легко выраженными, однако изменения сохранялись на четырех конечностях. Снизилась интенсивность боли, пропали аллодинии, и уменьшилась зона локальных клинических нарушений – с середины голени до пальцев и кисти.

Катамнез составил 6 месяцев, 7 месяцев с начала безглютенной диеты. Пациент водит машину, регулярно занимается физической культурой, пытается соблюдать режим питания, работает. В табл. 3 представлена положительная динамика показателей вследствие правильно назначенной диеты, терапии и физических методов лечения.

Для цитирования: Баранцевич Е.Р., Смирнов Е.Е., Потапчук А.А., Артемова А.В., Эмануэль Ю.В. Возможности применения нейромускулярной электростимуляции для лечения полинейропатии при непереносимости глютена (клиническое наблюдение). Медицинский алфавит. 2020;(5):59–64. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-59-64>

For citation: Barantsevich E.R., Smirnov E.E., Potapchuk A.A., Artyomova A.V., Emanuel Y.V. Possibilities of using neuromuscular electrostimulation for treating polyneuropathy in gluten intolerance (clinical observation). Medical alphabet. 2020; (5):59–64. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-59-64>

Заключение

1. Лабораторные методы обследования пациентов с полинейропатией являются обязательными для выявления этиологии процесса в большинстве случаев.
2. Глютенная полинейропатия зачастую протекает без серьезных признаков патологии желудочно-кишечного тракта.
3. В комплексной терапии пациентов с полинейропатией может быть эффективным применение импульсных токов в виде экспоненты для снижения болевых ощущений, улучшения трофики мышечной ткани, увеличения мышечной силы и восстановления глубокой чувствительности. Нейромускулярная электростимуляция является эффективным методом терапии.

Список литературы

1. Martyn C., Hughes R. Epidemiology of peripheral neuropathy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1997, Apr, 62(4): 310–318.
2. Hughes R.A. Peripheral neuropathy. BMJ, 2002, 324 (7335): 466–469.
3. Dick P., Thomas P.K. Peripheral neuropathy. Philadelphia: Elsevier Saunders – 4th ed. 2005, V.1, 2: 2754.
4. Строков И. А., Ахмеджанова Л. Т., Яхно Н.Н. Мультифокальная моторная невропатия. Клиническое, электрофизиологическое и иммунологическое исследование. Неврологический журнал. 2008, 3: 12–17.
5. Tesfaye S., Boulton A.J., Dyck P.J. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. Diabetes Care, 2010, Oct, 33(10): 2285–2293.
6. Пирадов М.А., Супонова Н.А. Аутоиммунные заболевания нервной системы: состояние проблемы и перспективы. Вестник Российской академии медицинских наук 2015; 70 (2): 183–187.
7. Левин О.С. Полинейропатии. М.: МИА, 2005. 496 с.
8. Супонова Н.А., Никитин С.С., Пирадов М.А. Воспалительные полинейропатии: проблемная ситуация в России. Современные наукоемкие технологии 2010; (2): 114–115.
9. Dotsenko V.I., Kurenkov A.L., Kochetkov A.V. The theoretical study and practical use of technology in the functional programmable electromyostimulation neurologicheskoy walking in patients with. Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny. 2012; 2: 21–28.
10. Витензон А.С., Петрушанская К.А. Физиологические обоснования метода искусственной коррекции движений посредством программируемой электростимуляции мышц при ходьбе. Российский журнал биомеханики. 2010; 14 (2): 7–27.
11. DeSantana J. M. et al. Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation for treatment of hyperalgesia and pain. Current rheumatology reports. 2008; 10 (6): 492.
12. Верес А.И., Нечипуренко Н.И., Ходулев В.И., Забродец Г.В., Войтов В.В. Разработка шкалы интегрированной оценки невропатии. Медицинские новости. 2014; (1): 54–57.



**18-20 МАРТА
2020 ГОДА**

КАФЕДРА
КД

**XXV ЮБИЛЕЙНАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

НАУКА И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МОСКВА, МВЦ «КРОКУС ЭКСПО», 65–66 КМ МКАД



Председатель Оргкомитета
ДОЛГОВ
Владимир Владимирович
Доктор медицинских наук, профессор

Организаторы

- Министерство здравоохранения Российской Федерации
- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации
- Федерация лабораторной медицины
- Научно-практическое общество специалистов лабораторной медицины
- Общество медицинской биофизики
- Российское научное медицинское общество терапевтов
- Российское научное общество по патофизиологии
- Российское общество медицинских генетиков
- Российское общество гельминтологов
- Конгресс-оператор ООО «МЕДИ Экспо»

Оргкомитет конференции
(по вопросам научной программы)
Председатель Оргкомитета:
Доктор медицинских наук, профессор
Владимир Владимирович Долгов
vvdolgov@inbox.ru

По вопросам
публикации тезисов
+7 (495) 945-82-22
kafedra-kdl@list.ru
www.labdiag.ru

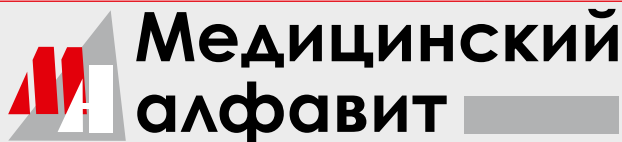
Менеджер проекта
Князева Анастасия
knyazeva@mediexpo.ru
+7 (495) 721-88-66 (доб. 112)
+7 (926) 611-23-94

Регистрация участников
Николай Скибин
reg@mediexpo.ru
+7 (495) 721-88-66 (доб. 111)
+7 (929) 646-51-66

**Выставка
«Лабораторная
диагностика —
2020»**

В дни работы
конференции будет
проходить выставка
современного
лабораторного
оборудования, реактивов,
расходных материалов

БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2020 год



Название организации (или Ф.И.О.) _____
 Адрес (с почтовым индексом) _____
 Телефон: _____ E-mail: _____ Контактное лицо: _____

- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Стоматология**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Современная лаборатория**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Эпидемиология**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Обозрение**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Неотложная медицина**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Диагностика и онкотерапия**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Современная поликлиника**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Кардиология**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Практическая гастроэнтерология**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Неврология и психиатрия**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Современная гинекология**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Современная функциональная диагностика**» – 4 выпуска в год (1800 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Дерматология**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ «Медицинский алфавит». Серия «**Ревматология в общей врачебной практике**» – 2 выпуска в год (900 руб. в год) ☐
☐ Спецвыпуск: «**Эндокринология**»
☐ Спецвыпуск: «**Урология**»

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

Извещение	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773
	(номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА
Кассир	(наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2020 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Квитанция	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773
	(номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА
Кассир	(наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2020 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____

Как подписаться

1. Заполнить прилагаемый бланк-заказ и квитанцию об оплате. 2. Оплатить квитанцию в любом отделении Сбербанка у кассира с получением кассового чека. Журналы высылаются по указанному в квитанции или бланке адресу. 3. Отправить бланк-заказ и скан квитанции с кассовым чеком, выданным кассиром банка на e-mail: medalfavit_pr@bk.ru, или podpiska.ma@mail.ru. Оплата через банки-онлайн издательством временно не принимается и будет возвращена на Ваш счет.

3 в 1: Коагулометр, Агрегометр и Модуль преаналитической оценки образцов.

CS-2000i

Технология мультиволнового анализа.

Определение оптимальной длины волны для измерения в зависимости от уровня интерферирующих веществ.

Расширенные возможности калибровок:

- Сравнение калибровочных кривых
- Перенос калибровочных данных между анализаторами
- Перерасчет ранее полученных результатов по новой калибровке.

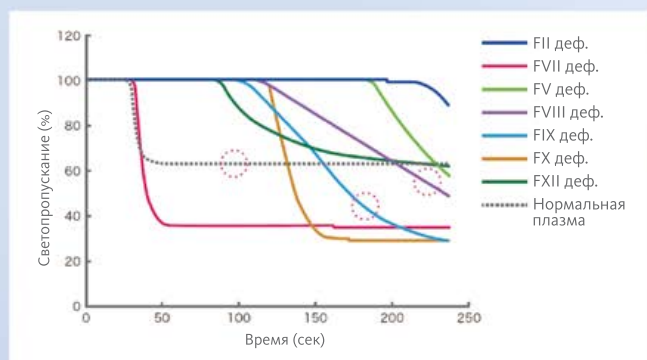
Легкое обслуживание анализатора.

Напоминание о необходимости проведения обслуживания.

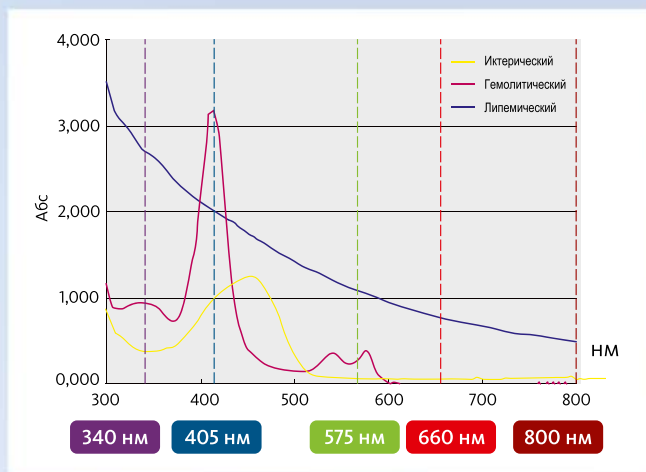
Срочный анализ (STAT).

Возможность загрузки срочных образцов в любую позицию на борту анализатора

Легкая загрузка штативов с образцами

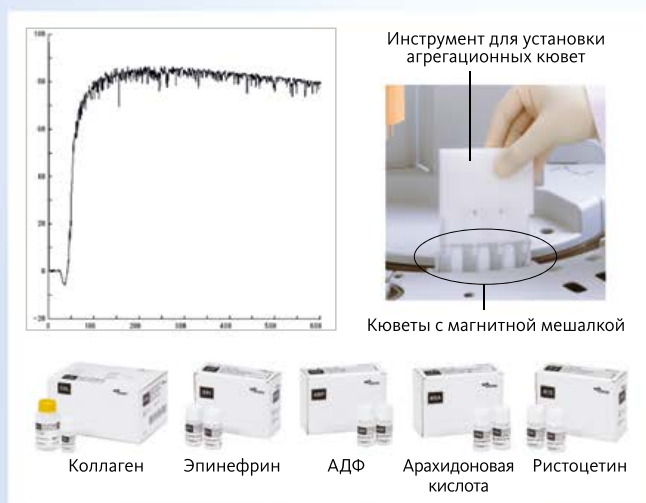


Оптический метод позволяет анализировать реакцию кривую и выявлять ДВС у пациентов



Встроенный преаналитический модуль:

- Проверка уровня наполнения пробирки
- Определение концентрации интерферирующих веществ (Гемолиз, Иктеричность и Липемия)



Возможность измерения агрегации тромбоцитов

Автоматическое измерение агрегации тромбоцитов при помощи установки специальных кювет с магнитной мешалкой.





БИОФИЗИЧЕСКАЯ АППАРАТУРА

Оборудование для службы крови и трансфузиологии

Основные отличия размораживателей - использование специализированного блока обеззараживания теплоносителя, снижающего риск бактериального загрязнения пакетов или флаконов в соответствии с ГОСТ Р 53420-2009 "Кровь донорская и ее компоненты", а также использование технологии "Бережное оттаивание", исключающей механические воздействия на размораживаемый объект.

Приборы предназначены для быстрого и бережного размораживания и подогрева свежемороженой плазмы, компонентов крови, эритроцитсодержащих компонентов, растворов и замороженного криопреципитата, а также для подогрева растворов в контейнерах или флаконах.



РП 2-01, РП 4-02
«Бережное оттаивание»



РАЗРАБОТКА  **ПРОИЗВОДСТВО**  **СЕРВИС**

"Бережное оттаивание" - самая безопасная технология оттаивания и согревания плазмы, крови, компонентов крови, эритроцитсодержащих компонентов и инфузионных растворов, применяемая во всех размораживателях компании "БФА".

г. Москва, улица Дубнинская, дом 79 Б, строение 2
Телефон: +7 (495) 602-06-69
e-mail: market@oobfa.ru
Сайт: oobfa.ru