

На правах рукописи



КОЗАК ДАРЬЯ МИХАЙЛОВНА

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ
С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ЗНАЧЕНИЕ

1.5.4 – «Биохимия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Астрахань – 2025 г.

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный **Бойко Оксана Витальевна**

руководитель: доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры биологической химии и клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные **Терентьев Александр Александрович**

оппоненты: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ИФМХ Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Зарайский Михаил Игоревич

доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Северо – Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая Федеральное государственное бюджетное образовательное
организация: учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.241.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии») по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14 и на сайте организации <http://ion.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Шумакова А. А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Поиск и установление закономерностей функционирования в организме пациента новых биохимических маркеров для диагностики осложнений, возникающих при гемобластозах, представляют собой актуальную медицинскую задачу. Одним из главных препятствий успешного лечения, позволяющего достичь длительной полной клинико-гематологической, а в ряде случаев и молекулярной ремиссии, являются инфекционные осложнения различной степени тяжести, которые часто становятся непосредственной причиной смерти пациентов [Бидерман Б.В. и др. 2023; Eichhorst B. et al., 2024]. Основной причиной развития таких осложнений является вовлечение в опухолевый процесс клеток иммунной системы, сопровождающееся нарушением функциональных свойств иммунокомпетентных клеток и развитием синдрома вторичной иммунной недостаточности [Гуськова Н.К. и др. 2020; Зорникова К.В. и др. 2024; Allegra A. et al., 2021]. Функционирование защитных систем пациентов, находящихся в группе риска и патологические процессы, протекающие при гемобластозах, в настоящее время активно изучаются как отечественными, так и зарубежными исследователями. Однако спектр имеющихся сообщений по данному направлению лишь ограниченно характеризует некоторые параметры биохимических процессов в организме больных и их связь с возникающими инфекционными осложнениями.

В последние годы интерес ученых и специалистов в ряде отраслей медицины направлен на исследование диагностических возможностей неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина. Декларируется, что определение их уровня в биологических жидкостях человека важно для прогнозирования, диагностики и мониторинга течения заболеваний бактериальной, вирусной и грибковой этиологии, а их повышенное содержание в биологических жидкостях тесно ассоциировано с различными болезнями. Известно также, что увеличение концентрации этих соединений происходит на начальных стадиях инфекционного процесса и обычно предшествует повышению титра антител к возбудителю. При этом ни один из вышеперечисленных маркеров при инфекционных осложнениях гемобластозов изучен не был [Bartolomé F. et al., 2022; Cerreto M., 2023; Daniela Zarzosa-Moreno, 2020; Dogheim G.M. et al., 2022; O'Brien M. E., 2021; O'Brien M. E. et al., 2021].

Также обращает на себя внимание ограниченное количество публикаций по исследованию маркеров патогенности бактерий, занимающих лидирующие позиции среди возбудителей инфекций у пациентов с гематологическими заболеваниями. Наиболее изученными из них являются энтерококковый поверхностный протеин, субстанция агрегации, гиалуронидаза, желатиназа и цитоллизин. Считается установленным, что энтерококковый поверхностный протеин и субстанция агрегации стимулируют адгезию бактериальных клеток и участвуют в образовании биопленок, гиалуронидаза – повышает инвазивную способность и расщепляет гиалуроновую кислоту, желатиназа – участвует в образовании биопленок и гидролизует желатин, коллаген, гемоглобин, фибриноген, инсулин и другие белки, а цитоллизин разрушает эритроциты, макрофаги и лейкоциты [Костин Р.К. и др. 2023; Мальчикова А.О. и др. 2020; Повещенко А.Ф. и др. 2023; Du L., 2022; Fattizzo B. et al., 2021].

В связи с вышеперечисленными данными, возникает научно-практический интерес в изучении биохимического профиля лиц, склонных к формированию инфекционного синдрома при хроническом лимфолейкозе, а также выявлению индикаторно - показательных молекул микроорганизмов, совокупное диагностическое использование которых даст возможность достигнуть полноценной профилактики развития инфекционного синдрома при ХЛЛ, повысить эффективность коррекции проводимой терапии и снизить смертность больных от этой патологии.

Цель исследования:

Обоснование использования новых биохимических маркеров развития инфекционного синдрома при ХЛЛ.

Задачи исследования:

1. Определить преобладающие виды инфекционных осложнений у больных с ХЛЛ в зависимости от локализации патологического процесса и этиологии возбудителя.
2. Изучить влияние специфической химиотерапии на выработку неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина у пациентов с ХЛЛ.

3. Провести сравнительный анализ показателей уровня неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина у пациентов с ХЛЛ при наличии и отсутствии инфекционных осложнений.
4. Провести сравнительный анализ концентрации неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина сыворотки крови больных ХЛЛ в зависимости этиологии инфекционных осложнений.
5. Определить интенсивность продукции микроорганизмами вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека (МдЛФ) в зависимости от внешних условий с целью установления его диагностического значения, провести его выделение, очистку и определение физико-химических свойств.
6. Выявить прогностическое значение неоптерина, альфа-1-антитрипсина, лактоферрина и вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека для диагностики инфекционного синдрома различной этиологии при ХЛЛ.

Научная новизна исследования.

Впервые установлена взаимосвязь изменений концентрации неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина у больных ХЛЛ с инфекционным синдромом в зависимости от характера инфекционных осложнений, вида возбудителя и локализации инфекционного процесса, стадии основного заболевания, проводимых схем химиотерапии и определено их диагностическое значение.

Впервые установлены закономерности продукции микроорганизмами вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека в зависимости от концентрации лактоферрина в среде обитания бактерий, определено диагностическое значение системы ЛФ человека – МдЛФ микроорганизмов для прогнозирования формирования инфекционных осложнений у больных ХЛЛ.

Проведены выделение и очистка вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека, впервые определены его физико-химических свойства.

На основании результатов исследований получен Патент РФ № 2734670.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Определены биохимические изменения при наиболее часто встречающихся инфекционных осложнениях у пациентов с ХЛЛ.

Выявленные закономерности продукции микроорганизмами вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека, с последующим его выделением и очисткой, способствуют установлению химического состава живых организмов, а также пониманию функционирования отдельных молекул в биологических объектах.

Рекомендовано определение концентрации неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина в сыворотке крови больных ХЛЛ, а также продукции МдЛФ микроорганизмами, выделенными из организма больного и определения их устойчивости к лактоферрину человека, как высокоинформативных диагностических критериев для прогнозирования развития инфекционного синдрома, снижения числа рецидивов, а также своевременного назначения превентивного лечения.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили труды учёных в области биохимии человека и микроорганизмов. Полученные в ходе эксперимента результаты для оценки достоверности были статистически обработаны с применением методов оценки нормальности распределения и методов параметрического и непараметрического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Определение концентрации неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина в сыворотке крови больных ХЛЛ в динамике заболевания позволяет использовать их в качестве высокоинформативных диагностических критериев ранней стадии развития инфекционных осложнений и контроля ответа организма пациента на проводимую терапию.

2. Рекомендованный метод в сочетании с определением интенсивности продукции МдЛФ микроорганизмами и определением их устойчивости к лактоферрину человека, позволит своевременно снизить частоту рецидивов инфекционных осложнений и добиться своевременного ответа на проводимый объем противоинфекционных мероприятий.

3. Очищенный МдЛФ обладает молекулярной массой 85000 ± 5000 Да, изоэлектрической точкой 9,2. Интенсивность его продукции микроорганизмами зависит от концентрации лактоферрина в их местообитании: снижается при культивировании на питательной среде, содержащей лактоферрин, а

также у бактерий, выделенных от пациентов с инфекционным синдромом, уровень лактоферрина у которых повышен.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования внедрены в:

– учебный процесс кафедры факультетской терапии и профессиональных болезней с курсом последипломного образования (акт внедрения от 02.10.2023 г.) и кафедры фундаментальной химии (акт внедрения от 23.09.2024 г.) ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России;

– лечебный процесс гематологического отделения ГБУЗ АО «Александро-Мариинская областная клиническая больница» (акт внедрения от 20.06.2025 г.).

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Результаты диссертационного исследования были получены с использованием современных методов с применением высокоточного оборудования. Объем выборки и количество проведенных исследований позволили получить достоверные результаты при статической обработке данных. Были использованы строгие критерии включения и исключения при формировании групп сравнения. Результаты работы были доложены на следующих конференциях: на I Всероссийской конференции молодых терапевтов в рамках Терапевтического форума "Мультидисциплинарный больной" (г. Москва, май 2017); на научной конференции «Научные разработки: вчера, сегодня, завтра 2018 (Беларусь, май 2018); на VIII Съезде Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (НМОАГЭ) (г. Воронеж, май 2019); на V международной научно-практической веб-конференции Прикаспийских государств (г. Астрахань, октябрь 2020). IX Международной научно-практической конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины», в рамках II Каспийского научно-образовательного конгресса, организованного Правительством Астраханской области совместно с высшими учебными заведениями региона (г. Астрахань, май 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, 6 из которых в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, входящих в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus. Получен патент на изобретение №2734670.

Личный вклад автора. Автором были сформулированы цель и задачи исследования, выбраны методы исследования. Лично выполнены все экспериментальные исследования, включая сбор биологического материала пациентов и анализ полученных биохимических параметров, статистическая обработка полученных данных, анкетирование и изучение историй болезни пациентов, анализ литературы по исследуемой теме, подготовка публикаций по теме диссертации.

Структура и объём диссертации: диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации и список цитируемой литературы, который содержит 211 наименований на русском и английском языках. Работа изложена на 184 листах, иллюстрирована 50 таблицами и 26 рисунками.

Этическая экспертиза. Исследования проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации (1968 г.) и ее последующих изменений. Обследование участников проводилось после получения от них письменного добровольного информированного согласия. Проведение исследований были одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (Протокол заседания № 5 от 16.12.2016 г.)

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1 Характеристика больных хроническим лимфолейкозом с инфекционными осложнениями

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач были проанализированы исходные характеристики 273 пациентов с ХЛЛ на разных стадиях заболевания и их клинико-гематологические характеристики в динамике за период с 2013 по 2023 гг. Пациенты состояли на амбулаторном наблюдении в консультативной поликлинике и проходили стационарное лечение в гематологическом отделении ГБУЗ АО «Александро-Мариинской областной клинической больницы».

Среди обследованных пациентов количество женщин составило 154 человека (56,4%), мужчины - 119 человек (43,6%), а также 30 человек здоровых доноров (контрольная группа) сопоставимых по возрастным критериям с основной группой (15 женщин и 15 мужчин). Средний возраст контрольной группы – $64,13 \pm 0,88$ года, средний возраст больных ХЛЛ $65,07 \pm 0,95$ лет. Включенными в исследование были все больные с подтвержденным диагнозом ХЛЛ в возрасте от 28 до 93 лет. Из группы исследования были исключены больные и умершие от лимфопролиферативных заболеваний с морфологически не подтвержденным диагнозом ХЛЛ. У всех больных диагноз ХЛЛ был верифицирован на основании исследования клинических данных, лабораторных исследований клеток периферической крови и костного мозга, а также проводилось иммунофенотипическое подтверждение моноклональной пролиферации лимфоцитов. Формулировка диагноза проводилась в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), одобренной на сорок третьей сессии Всемирной Ассамблеи здравоохранения в мае 1990 года. Определение стадий процесса проводилось согласно системе клинических стадий хронического лимфолейкоза по J. Binet (1989 г.), в которой выделяют три стадии: *A, B и C*.

В соответствии с целью нашей работы, структура исследования предусматривала несколько этапов изучения влияния инфекционных осложнений на течение, прогноз и исход ХЛЛ.

На первом этапе проводилось изучение влияния различных факторов течения ХЛЛ на частоту встречаемости и вид инфекционных осложнений различной этиологии и локализации процесса у больных ХЛЛ, а также зависимость частоты появления вторичных инфекций от возраста больного, стадии ХЛЛ, применяемой схемы химиотерапии.

На втором этапе изучалась чувствительность инфекционных агентов, вызывающих осложнения к основным группам антибактериальных и антимикотических препаратов. В процессе выполнения этого раздела работы был проведен анализ гистологических, иммунологических исследований; микробиологического исследования крови, мазков из зева и носа, мокроты, мочи, очагов воспаления кожных покровов и видимых слизистых при установлении диагноза инфекционного осложнения.

На третьем этапе были проведены серии лабораторных исследований, направленные на изучение закономерностей изменения уровня неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина у больных с ХЛЛ, синтеза бактериями МдЛФ. Определена связь полученных показателей с развитием инфекционных осложнений. Установлены основные физико-химические свойства МдЛФ.

2.2 Лабораторные методы исследования

Диагноз инфекционного осложнения выставлялся на основании объективного, клинического и инструментального обследования пациентов, а также лабораторного подтверждения этиологического инфекционного агента.

Инфекционные осложнения подразделялись на локализованные и генерализованные формы, а также в зависимости от вида возбудителя на вирусные, бактериальные и грибковые. Применение методов исследования возбудителей инфекционных осложнений ХЛЛ проводилось согласно приказу № 535 от 22 апреля 1985 года «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

Для подтверждения наличия инфекционных агентов у пациентов с клинически установленным диагнозом инфекционного осложнения применялись следующие лабораторные методы:

- выделение чистых культур возбудителей в бактериологических анализах мазков из носа и зева, бронхиального дерева (мокрота), мочи, воспалительных очагов и их посев на соответствующие питательные среды в зависимости от предполагаемого вида возбудителя. вирусные, бактериальные и грибковые;
- микроскопическое изучение патологических клеток (цитологический метод). Забор материала производился из очагов методами соскоба (при кожных проявлениях инфекционного процесса) и пункции (при висцеральной локализации инфекционного агента);
- метод иммуноферментного анализа сыворотки крови - изучение наличия антител (IgM и IgG) к вирусам Varicellazoster, Cytomegalovirus (CMV);
- подтверждение развития осложнения грибковой этиологии осуществлялось путем посева биоматериала (соскобов с кожных покровов, мокроты, материала, полученного путем бронхоскопии) на среду Сабуро, а также серологического исследования крови для определения наличия антигена галактоманна, так называемый «галактоманновый тест» (иммуноферментный анализ с целью выявления компонента клеточной стенки грибов *Aspergillus spp.*, высвобождаемый в процессе его роста) и маннана (Mn-антиген – один из основных компонентов клеточной стенки *Candida*, циркулирующий в крови при инвазивном кандидозе, выявляемый с помощью метода иммуноферментного анализа);
- для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и другим препаратам использовались методы: диско-диффузионный и метод серийных разведений антибиотиков в плотной среде (определение чувствительности к антибиотику отдельных вариантов штамма) или жидкой питательной среде (чувствительность штамма в целом).

Оценивая степень увеличения уровня неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина сыворотки крови относительно показателей контроля, были сформированы 3 группы: группа 1 – умеренное повышение исследуемого маркера до 10 раз, группа 2 - значительное от 10 до 20 раз, группа 3 – выраженное повышение более 20 раз от стандартных показателей. Определение концентрации неоптерина в сыворотке крови осуществляли методом ИФА с применением тестовых систем «Neopterin ELISA» фирмы «IBL INTERNATIONAL GMBH» – Hamburg, Germany (единицы измерения - нмоль/л). Определение концентрации альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови осуществляли методом ИФА с применением тестовых систем «IDK a1-Antitrypsin Clearance ELISA» фирмы «Immundiagnostik AG» – Bensheim, Germany (единицы измерения - мг/л). Определение концентрации лактоферрина и МдЛФ определяли методом иммуноферментного анализа (применялся набора реагентов «Lactoferrin, Human, ELISA kit» фирмы «Nycultbiotech» – Uden, The Netherlands) (единицы измерения - нг/мл).

Определение устойчивости микроорганизмов к лактоферрину человека проводили по следующей схеме:

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл физиологического раствора довели до концентрации 1020 по стандарту мутности (ГИСК им. Тарасевича). После этого в две пробирки вносили по 0,3 мл микробной взвеси. На каждый штамм приходилось две пробирки. Далее в опытную пробу добавляли 0,2 мл раствора лактоферрина в апоформе (так, чтобы его конечная концентрация составляла 400 нг/мл). В контрольную пробу вместо лактоферрина добавляли 0,2 мл физ. р-ра.

После инкубации проб ($t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин) останавливали реакцию добавлением во все пробы по 5 мл питательного бульона с последующим измерением оптической плотности – это ОП1. Для размножения устойчивых к действию лактоферрина микроорганизмов повторно инкубировали пробы при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение часа и затем измеряли оптическую плотность растворов – это ОП2. Бактерицидный эффект лактоферрина рассчитывали по формуле: $\Delta\text{ОПк} - \Delta\text{ОПo}/\Delta\text{ОПк}$, где $\Delta\text{ОПк}$ – изменения оптической плотности в контроле, $\Delta\text{ОПo}$ – изменения оптической плотности в опыте.

Определение продукции белка, иммунологически сходного с лактоферрином человека (МдЛФ) проходило следующие стадии:

Бактериологической петлей проводили посев в пробирки с 0,2 мл мясопептонного бульона суточной агаровой культуры микроорганизмов. Параллельно нами были проставлены контрольные пробы с МПБ, не содержащие микроорганизмов.

После инкубации всех пробирок в течение 24 ч $t=37^{\circ}\text{C}$, содержимое их центрифугировали (5000 об/мин в течение 45 минут). Предположение о присутствии МдЛФ в пробах подтверждали на основании результатов ИФА анализа с использованием тестовых систем для определения концентрации лактоферрина фирмы Nycult biotech (Netherlands). В пробах с МПА без бактерий МдЛФ отсутствовало.

Выделение и очистку белка, иммунохимически сходного с лактоферрином человека (МдЛФ) мы начинали с отделения балластных белков в 2М сульфате аммония (ч.д.а.). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость смешивали с ацетоном в соотношении 1:2 и центрифугировали при 1500 об/мин в течении 10 мин. Эта манипуляция значительно сокращает время выделения и повышает выход белка, т.к. избавляет от этапа обессоливания. Полученный осадок растворяют в фосфатном буфере pH=7,0, содержащем 0,3 мМ $\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, для насыщения лактоферрина железом.

Затем полученный раствор наносили на колонку (4,5x60 см) гепарин - сефарозы (Sigma, США) предварительно уравновешенную 20 мМ Трис-НС1, pH 7,5. Сорбент промывали 20 мМ Трис-НС1, pH 7,5, затем тем же буфером, содержащим 1% тритон X-100, и повторно - буфером уже без тритона до исчезновения оптического поглощения. Элюцию проводили с помощью линейного градиента концентраций NaCl от 0 до 1 М в 20 мМ Трис-НС1, pH 7,5. Полученные фракции диализовали против 10 мМ Трис-НС1, pH 7,5 в течение 16 ч при 4°C.

В отличие от обычного метода выделения МдЛФ, колонка с гепарин-сефарозой предварительно обрабатывалась 0,2 - 0,3% раствором формальдегида, с целью окисления минорных функциональных групп гепарина, что приводит к возрастанию его отрицательного заряда и, как результат, повышению аффинности по отношению к лактоферрину. Молекулярную массу лактоферрина определяли DC-Na-ПААГ-электрофорезом по методу Шаггера и фон Джагова, используя гель с концентрацией акриламида 8%. Также молекулярную массу оценивали по результатам гель-фильтрации.

2.3 Методы статистической обработки результатов

Для каждой выборки вычислялись показатели описательной статистики: количество наблюдений в исходной выборке (n), среднее арифметическое полученных значений (M), среднее квадратическое отклонение (m), стандартную ошибку среднего арифметического (t), минимальное (min) и максимальное (max) значение изучаемого признака, а также показатели относительных величин (%) и их ошибки. Вид распределения количественных данных анализировался с помощью критерия Шапиро-Уилка. После оценки соответствия нормальному закону распределения проводился выбор метода статистического анализа (параметрический или непараметрический). При нормальном распределении количественных переменных центральные тенденции и рассеяния признаков описаны с помощью среднего значения (M) и среднего квадратического отклонения (m). При распределении количественных признаков, отличным от нормального, описание проводилось с помощью медианы (Me) и 25% - 75% интерквартильного размаха (LQ;UQ). Доверительные интервалы (ДИ) рассчитывались для вероятности p=95%. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для того чтобы подобрать адекватный критерий статистической обработки результатов, исходные данные предварительно проверялись на нормальность распределения и равенство дисперсий в сравниваемых выборках. В первом случае использовался критерий χ^2 , во втором – критерий Фишера. Если данные отвечали требованиям для использования критерия Стьюдента, то использовался этот критерий. В ситуации, когда сравниваемые выборки являются связанными между собой, применяли T критерий для парных выборок, в двух несвязанных группах – критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна-Уитни. Так же нами был использован критерий Краскел-Уоллеса, который не требует нормального распределения исходных данных, например, для сравнения уровня того или иного показателя в трех выборках (например, у пациентов на трех стадиях болезни). Статистический анализ результатов проведен с использованием статистических программ Microsoft Excel и Statisticafor Windows.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характер, частота и этиологическая характеристика инфекционных осложнений хронического лимфолейкоза

Проведенный нами анализ показал, что локализованные формы инфекционных осложнения ХЛЛ наблюдались более чем в 70% случаев. Локализация процесса была представлена преимущественно поражением верхних и нижних дыхательных путей, мочеполовой системы, кожных покровов. Генерализация процесса имела место в 17% случаев.

Среди всех инфекционных осложнений у пациентов на различных стадиях ХЛЛ лидирующую позицию занимали процессы, вызванные бактериями (43,0% случаев). Чаще лабораторными методами подтверждались инфекции, вызванные представителями семейств: *Streptococcus* (45,59%), *Staphylococcus* (26,6%), *Enterobacteriaceae* (11,2%), *Moraxellaceae* (8,09%), *Pseudomonaceae* (5,3%), *Enterococcaceae* (4,7%).

Среди вирусных возбудителей, составлявших 31,0% всех осложнений ХЛЛ инфекционного генеза, наиболее часто встречались представители семейства *Herpesviridae* (род *Simplexvirus* - вирус герпеса 1 типа (HSV-1), род *Lymphocryptovirus* - вирус Эпштейна Барр (ВГЧ-4), подсемейство *Betaherpesvirinae* - цитомегаловирус (CMV)) на долю которых приходилось 56,6% осложнений вирусной этиологии как локализованной, так и генерализованной форм. Также при ИФА сыворотки крови пациентов с ХЛЛ обнаружены представители семейств *Orthomyxoviridae* (вирусы гриппа) (24,4%) и *Paramyxoviridae* (вирусы парагриппа) (19,4%).

Каждый четвертый случай осложнений ХЛЛ в наших исследованиях приходился на грибковые инфекции (26,0% всех осложнений). Среди данной группы осложнений этиологическими факторами являлись представители двух родов грибов – *Candida* (54,5%) и *Aspergillus* (45,5%), ни один из представленных патогенов не был причиной генерализации инфекционного процесса.

Соотношение возрастных групп пациентов относительно инфекционных осложнений различных систем органов представлено на рисунке 1.

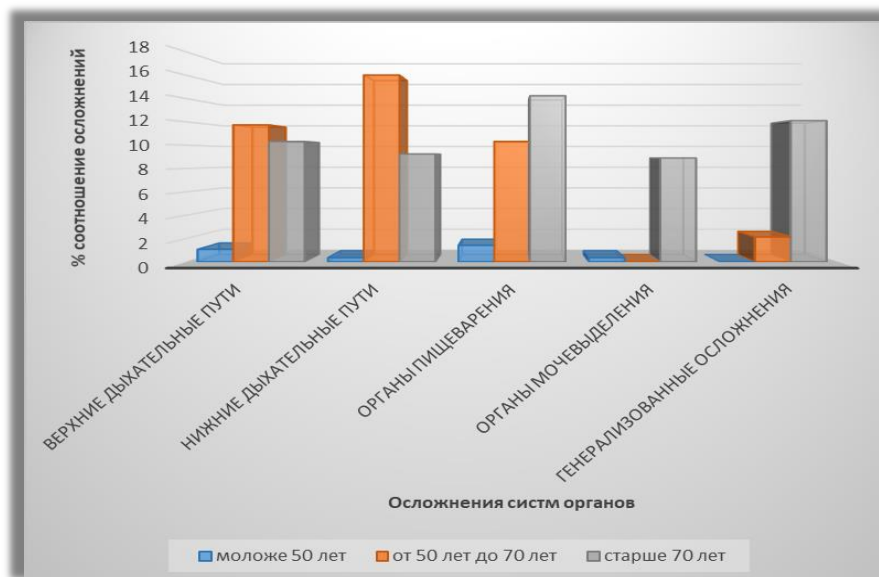


Рисунок 1 - Соотношение возрастных групп пациентов относительно инфекционных осложнений различных систем органов

Достоверных различий частоты возникновения инфекционных осложнений в зависимости от гендерного признака пациентов с ХЛЛ выявлено не было. Локализованные формы инфекционных осложнений несколько чаще наблюдались у мужчин (52,28%).

3.2 Изменения уровня неоптерина у пациентов с хроническим лимфолейкозом

Уровень неоптерина сыворотки крови условно-здоровых доноров находился в пределах от 0,3 нмоль/л до 7,1 нмоль/л, $M \pm m = 3,4 \pm 0,3$ нмоль/л.

Было установлено наличие статистически значимых отличий между выборками по уровню неоптерина среди пациентов на трех стадиях ХЛЛ в период стационарного лечения заболевания с наличием инфекционных осложнений в сравнении с контролем (период стационарного лечения ХЛЛ без инфекционных осложнений ($M \pm m = 3,9 \pm 0,4$ нмоль/л)) (таблица 1).

Таблица 1 - Концентрация неоптерина сыворотки крови больных ХЛЛ на разных стадиях ХЛЛ в период стационарного лечения заболевания

Уровень НП, нмоль/л	Стадия А (n=39)	Стадия В (n=56)	Стадия С (n=102)
Min величина	17,5	15,3	12,3
Max величина	115,6	119,3	120,5
Mid величина	49,2 $\pm$ 5,8	61,1 $\pm$ 5,8	70,1 $\pm$ 4,3
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем

Также выявлено наличие статистически значимых отличий между выборками по уровню неоптерина среди пациентов на трех стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения с наличием инфекционных осложнений в сравнении с контрольной группой (пациенты, состоящие на амбулаторном наблюдении в консультативной поликлинике без клинического, инструментального и лабораторного подтверждения наличия инфекционного осложнения, ($M \pm m = 2,1 \pm 0,2$ нмоль/л)) и в сравнении с пациентами с ХЛЛ с инфекционными осложнениями, находящимися на стационарном лечении (таблица 2). Полученный результат отражает меньшую тяжесть инфекционных осложнений и преобладание менее патогенных видов возбудителей у пациентов, находящихся на амбулаторном наблюдении ХЛЛ, и таким образом, демонстрирует высокую чувствительность неоптерина как диагностического маркера развития инфекционных осложнений ХЛЛ

Таблица 2 - Концентрация неоптерина сыворотки крови больных ХЛЛ на разных стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения течения заболевания

Уровень НП, нмоль/л	Стадия А (n=36)	Стадия В (n=41)	Стадия С (n=50)
Min величина	10,1	10,1	10,1
Max величина	66,4	81,9	68,5
Mid величина	27,3 $\pm$ 3,2	32,1 $\pm$ 4,7	36,3 $\pm$ 3,1
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*
	p ¹ <0,001*	p ¹ <0,001*	p ¹ <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем;
p¹ - value по сравнению с периодом стационарного лечения

Также установлены статистически значимые отличия между выборками по уровню неоптерина у впервые выявленных больных ХЛЛ на разных стадиях течения заболевания в сравнении с контрольной группой пациентов (пациенты с впервые выявленным диагнозом ХЛЛ без инфекционных осложнений, ($M \pm m = 5,44 \pm 0,86$ нмоль/л)) (таблица 3).

Таблица 3 - Концентрация неоптерина сыворотки крови у впервые выявленных больных ХЛЛ на разных стадиях течения заболевания

Уровень НП, нмоль/л	Стадия А (n=29)	Стадия В (n=30)	Стадия С (n=27)
Min величина	11,9	10,1	34,3
Max величина	105,8	89,2	59,1
Mid величина	52,64±8,0	37,12±3,0	44,45±5,1
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем

Анализ концентрации неоптерина у больных ХЛЛ при присоединении инфекционных осложнений различной этиологии показал, что самый высокий уровень неоптерина зафиксирован на стадии С ХЛЛ при присоединении генерализованных бактериальных осложнений. При обследовании данной категории пациентов имели место клинические, лабораторные и инструментальные признаки заболеваний органов дыхания от верхних отделов (синуситы, фарингиты, бронхиты) до нижних отделов (бактериальные пневмонии), а также бактериальная патология мочевыделительной системы (циститы и нефриты). Наименьшие значения $M \pm m$ были у пациентов из группы с осложнениями вирусной этиологии. У пациентов с грибковой патологией дополнительно имелись хронические заболевания бактериальной или вирусной этиологии в стадии латентного течения, которые давали более высокие значения неоптерина, чем при вирусных инфекциях, но не превышали таковые показатели при инфекциях бактериальных. Таким образом, превышение уровня неоптерина при бактериальных осложнениях статистически значимо были выше по третьему порогу ($p < 0,001$). Концентрация неоптерина сыворотки крови у больных ХЛЛ в зависимости от формы и этиологии инфекционных осложнений представлена на рисунке 2.

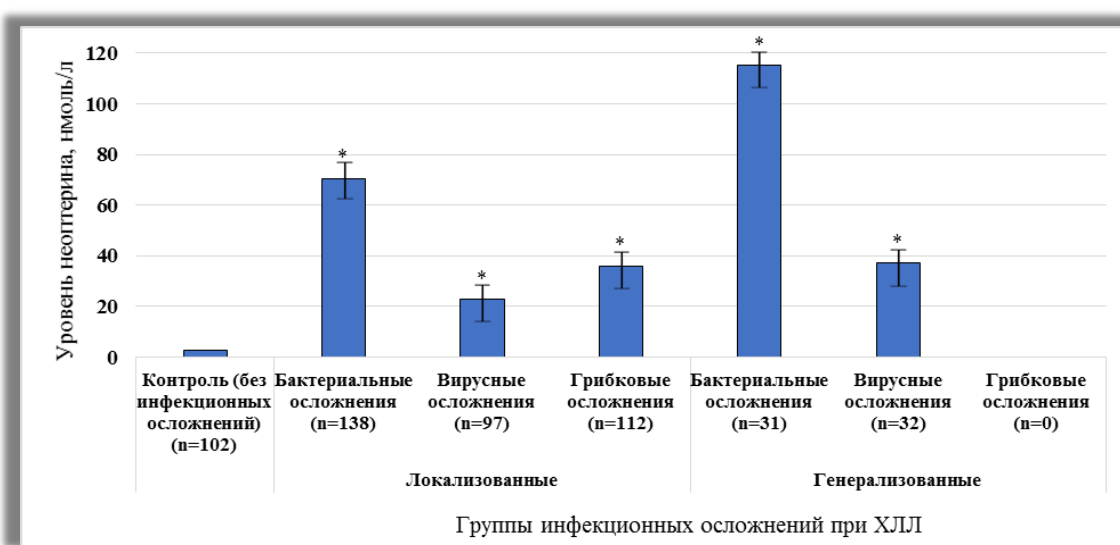


Рисунок 2 - Концентрация неоптерина сыворотки крови у больных ХЛЛ в зависимости от формы и этиологии инфекционных осложнений.

Примечание: * – значение достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Дисперсионный анализ показал высокую степень силы влияния инфекционных осложнений на уровень неоптерина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ. Сила влияния возбудителей при стадии В ХЛЛ составила 77%. Сохранилась высокая сила влияния и при стадии С ХЛЛ – 78%. Наибольшее же влияние на увеличение уровня неоптерина наблюдается при стадии А ХЛЛ – 84%, что можно объяснить большим сохранением функциональных возможностей иммунной системы и, как следствие, адекватной реакции на внедрение возбудителя (таблица 4).

Таблица 4 - Сила влияния инфекционных осложнений бактериального, вирусного и грибкового генеза на уровень неоптерина сыворотки крови больных ХЛЛ (метод однофакторного дисперсионного анализа)

Разнообразие (источник вариации)	Дисперсии (суммы квадратов, SS)	Числа степеней свободы (v)	Вариансы (средние квадраты, σ²)	F	F- критическое	Сила влияния (%)
Стадия А ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	72357,84	4	18089,46	158,29	2,45	84***
Случайное (внутригрупповое)	12424,89	109	114			
Общее	84782,73	113	750,28			
Стадия В ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	136898,00	4	34224,50	141,78	2,43	77***
Случайное (внутригрупповое)	37173,77	154	241,39			
Общее	174071,77	158	1101,72			
Стадия С ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	212695,88	4	53173,97	186,48	2,61	78***
Случайное (внутригрупповое)	57314,81	201	285,15			
Общее	270010,70	205	1317,12			

Примечание: ***- $F > 0,999$, где F-показатель достоверности по Фишеру.

При проведении анализа силы влияния на уровень неоптерина у пациентов с ХЛЛ проводимого лечения химиопрепаратами (схемы R-CHOP, FCR, BR, Хлорамбуцил (лейкеран)) в сравнении с результатами, полученными, при изучении влияния этиологических факторов инфекционного генеза, было выявлено преобладание силы влияния возбудителей инфекции - более 79% против 35% влияния схем химиотерапевтического лечения. Поэтому при трактовке показателей уровня неоптерина в сыворотке крови у пациентов с ХЛЛ можно условно пренебречь возможным влиянием препаратов химиотерапевтического ряда, так как основное воздействие на его продукцию клетками, принадлежит именно возбудителям инфекции.

3.3. Изменения уровня альфа-1-антитрипсина у пациентов с хроническим лимфолейкозом

Уровень альфа-1-антитрипсина сыворотки крови условно-здоровых доноров находился в пределах от 0,7 мг/л до 3,4 мг/л, $M \pm m = 1,7 \pm 0,1$ мг/л.

При сравнении уровня альфа-1-антитрипсина у пациентов в период стационарного лечения на трех стадиях ХЛЛ и имевших инфекционные осложнения в сравнении с контролем (период стационарного лечения без инфекционных осложнений ($M \pm m = 52,9 \pm 7,1$ мг/мл)) были выявлены статистически достоверные отличия (таблица 5).

Таблица 5 - Концентрация альфа-1-антитрипсина на разных стадиях ХЛЛ в период стационарного лечения заболевания

Уровень альфа-1-антитрипсина, мг/л	Стадия А (n=39)	Стадия В (n=56)	Стадия С (n=102)
Min величина	10,1	14,2	17,2
Max величина	42,3	44,3	48,3
Mid величина	32,6±2,4	34,5±2,2	33,7±2,7
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем

Аналогично результатам, полученным при изучении концентрации неоптерина, так же было установлено наличие статистически значимых отличий по уровню альфа-1-антитрипсина между группами пациентов на трех стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения с наличием инфекционных осложнений в сравнении с контрольной группой (пациенты с ХЛЛ без инфекционного осложнения, состоящие на амбулаторном наблюдении ($M \pm m = 3,4 \pm 0,2$ мг/л)), а также с пациентами с ХЛЛ с инфекционными осложнениями, находящимися на стационарном лечении (таблица 6). Таким образом, концентрация альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови, равно, как и концентрация неоптерина, является высокочувствительным маркером развития инфекционных осложнений у пациентов с ХЛЛ и тяжести их течения.

Таблица 6 - Концентрация альфа-1-антитрипсина на разных стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения

Уровень альфа-1-антитрипсина, мг/л	Стадия А (n=36)	Стадия В (n=41)	Стадия С (n=50)
Min величина	17,2	17,2	14,3
Max величина	39,2	36,3	42,2
Mid величина	25,3±1,8	24,7±1,2	25,1±0,9
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*
	p ¹ <0,05*	p ¹ <0,05*	p ¹ <0,05*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем;
p¹ - value по сравнению с периодом стационарного лечения

Выявлены статистически значимые отличия у впервые выявленных пациентов с ХЛЛ с наличием инфекционных осложнений в сравнении с контрольной группой (впервые выявленных пациентов с ХЛЛ без инфекционных осложнений ($M \pm m = 11,4 \pm 0,8$ мг/мл)) (таблица 7).

Таблица 7 - Концентрация альфа-1-антитрипсина сыворотки крови у впервые выявленных пациентов с ХЛЛ на разных стадиях течения заболевания

Уровень альфа-1-антитрипсина, мг/л	Стадия А (n=29)	Стадия В (n=30)	Стадия С (n=27)
Min величина	16,2	14,2	19,3
Max величина	41,3	41,2	40,3
Mid величина	28,8±2,3	29,5±1,3	30,9±5,2
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем (без инфекционных осложнений)

Среднестатистические значения альфа-1-антитрипсина, исходя из критериев этиологического фактора и формы осложнений, представлены на рисунке 3. Каждый из этиологических факторов, вызывающих генерализованные инфекционные осложнения, провоцировал большее повышение уровня альфа-1-антитрипсина, чем при инфекциях локального характера. Вирусозависимые осложнения, как при локальных, так и при генерализованных формах способствовали увеличению альфа-1-антитрипсина статистически значимо больше, чем бактериальные ($p < 0,05$). У каждого пациента из групп с бактериальными, вирусными и грибковыми осложнениями уровень альфа-1-антитрипсина превышал контрольные значения более чем в 2 раза.

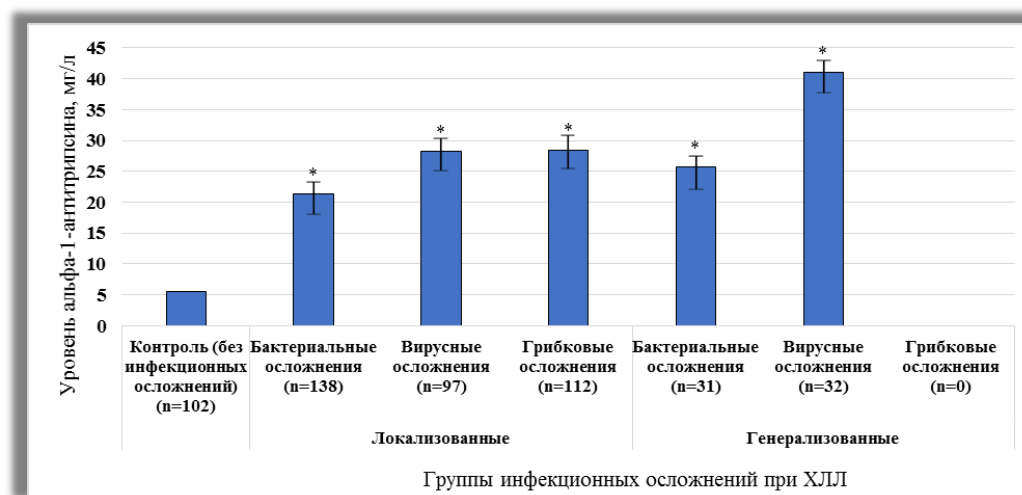


Рисунок 3 - Концентрация альфа-1-антитрипсина сыворотки крови у больных ХЛЛ в зависимости от формы и этиологии инфекционных осложнений.

Примечание: * – значение достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Дисперсионный анализ показал высокую степень силы влияния инфекционных осложнений на уровень альфа-1-антитрипсина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ вне зависимости от стадии течения основного заболевания. Сила влияния возбудителей при стадии В ХЛЛ составила 86%, несколько меньшее влияние было зафиксировано при стадии С ХЛЛ – 83%. Наибольшее же влияние на увеличение уровня альфа-1-антитрипсина наблюдается при стадии А ХЛЛ (88%), что можно объяснить большим сохранением функциональных возможностей организма пациентов (таблица 8).

Таблица 8 - Сила влияния инфекционных осложнений бактериального, вирусного и грибкового генеза на уровень альфа-1-антитрипсина сыворотки крови больных ХЛЛ (метод однофакторного дисперсионного анализа)

Разнообразие (источник вариации)	Дисперсии (суммы квадратов, SS)	Числа степеней свободы (v)	Вариансы (средние квадраты, σ2)	F	F- критическое	Сила влияния (%)
Стадия А ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	16010,33	4	4002,58	235,96	2,45	88***
Случайное (внутригрупповое)	1848,95	109	16,96			
Общее	17859,28	113	158,04			
Стадия В ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	22161,24	4	5540,31	258,42	2,43	86***
Случайное (внутригрупповое)	3301,52	154	21,43			

Продолжение таблицы 8

Общее	25462,86	158	161,15			
Стадия С ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	27689,43	4	6922,35	274,49	2,41	83***
Случайное (внутригрупповое)	5068,92	201	25,21			
Общее	32758,36	205	159,79			

Примечание: ***- $F > 0,999$, где F-показатель достоверности по Фишеру.

Одновременно обращает внимание факт различий уровня альфа-1-антитрипсина при инфекционных осложнениях ХЛЛ и при отсутствии таковых, в условиях применения химиотерапии (рисунок 4). Данные показатели статистически значимо отличались в группах с бактериальными, вирусными и грибковыми осложнениями в соотношении 1:2,4; 1:1,7 и 1:1,9 соответственно. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ выявил значимую силу влияния схем химиотерапевтического лечения ХЛЛ на изменение уровня альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови (96%).

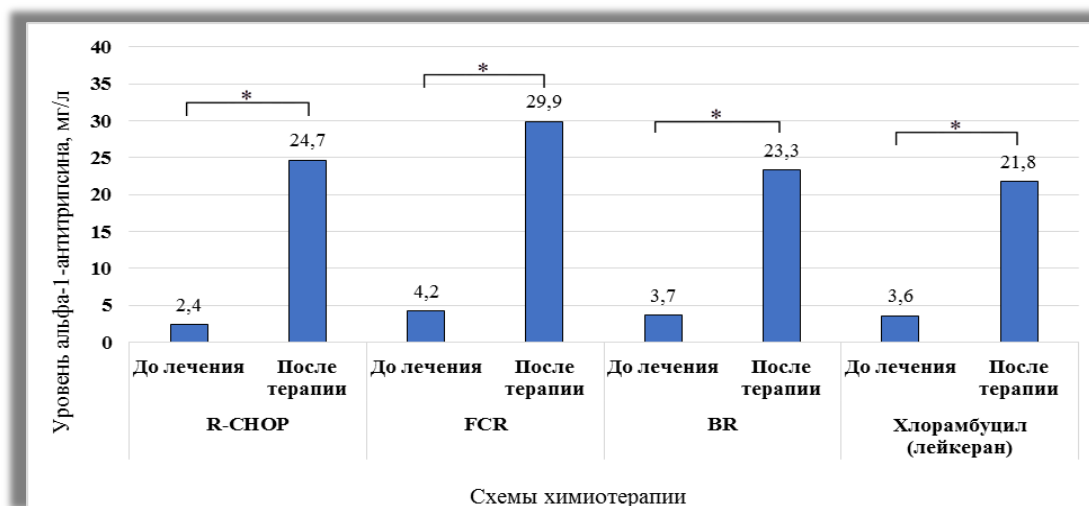


Рисунок 4 - Влияние различных схем химиотерапии на изменение уровня альфа-1-антитрипсина у больных ХЛЛ

Примечание: * – различия до и после лечения статистически значимы (значения p для Т критерия для парных выборок $< 0,05$)

Полученные результаты, могут быть объяснены реализацией цитопротекторного действия альфа-1-антитрипсина в ответ на цитотоксическое действие химиопрепаратов и полностью согласуются с актуальными результатами других исследователей. В частности, публикации последних лет подтверждают, что альфа-1-антитрипсин обладает иммунорегуляторным и противовоспалительным свойствами, что было продемонстрировано на нескольких моделях заболеваний, включая диабет I типа, волчанку, остеопороз и инсульт [Kaneva M.K. et al., 2021, Strnad P. et al., 2020].

3.4. Изменения уровня лактоферрина у пациентов с хроническим лимфолейкозом

Уровень лактоферрина сыворотки крови условно-здоровых доноров находился в пределах от 755 нг/мл до 998 нг/мл, $M \pm m$ составило 876 ± 17 нг/мл нг/мл.

При сравнении уровня лактоферрина в трех выборках у пациентов на трех стадиях ХЛЛ в период стационарного лечения были выявлены статистически значимые отличия между выборками по уровню

лактоферрина в сравнении с контролем (период стационарного лечения без инфекционных осложнений ($M \pm m = 1221 \pm 22$ нг/мл) (таблица 9).

Таблица 9 - Концентрация лактоферрина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ на разных стадиях ХЛЛ в период стационарного лечения заболевания

Уровень ЛФ, нг/мл	Стадия А (n=39)	Стадия В (n=56)	Стадия С (n=102)
Min величина	2756	3095	3012
Max величина	3996	5596	5975
Mid величина	3491 $\pm$ 35	4449 $\pm$ 35	4651 $\pm$ 43
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем

Сравнивая уровни лактоферрина сыворотки пациентов на трех стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения, в сравнении с контрольной группой (пациенты, находящиеся на амбулаторном наблюдении без инфекционных осложнений ($M \pm m = 1196 \pm 21$ нг/мл)) и группой пациентов на стационарном лечении с инфекционными осложнениями в соответствующих стадиях ХЛЛ, можно сделать вывод о наличии статистически значимых отличий между сравниваемыми группами (таблица 10). Таким образом, уровень лактоферрина сыворотки крови так же, как и уровень неоптерина и альфа-1-антитрипсина, отражает тяжесть течения инфекционного процесса, осложнившего течение ХЛЛ, и может быть использован в качестве прогностического.

Таблица 10 - Концентрация лактоферрина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ на разных стадиях ХЛЛ в период амбулаторного наблюдения течения заболевания

Уровень ЛФ, нг/мл	Стадия А (n=36)	Стадия В (n=41)	Стадия С (n=50)
Min величина	2425	2731	2657
Max величина	3624	3952	4472
Mid величина	3193 $\pm$ 46	3398 $\pm$ 35	3666 $\pm$ 42
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*
	p ¹ <0,001*	p ¹ <0,001*	p ¹ <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем;
p¹ - value по сравнению с периодом стационарного лечения

Установлены статистически значимые отличия у впервые выявленных пациентов с ХЛЛ с наличием инфекционных осложнений с контрольной группой (впервые выявленные пациенты с ХЛЛ без инфекционных осложнений ($M \pm m = 1004 \pm 18$ нг/мл)) (таблица 11).

Таблица 11 - Концентрация лактоферрина сыворотки крови у впервые выявленных пациентов с ХЛЛ на разных стадиях течения заболевания

Уровень ЛФ, нг/мл	Стадия А (n=29)	Стадия В (n=30)	Стадия С (n=27)
Min величина	2156	2252	3881
Max величина	4941	4161	4400
Mid величина	3967±39	3541±34	4193±35
P-value (критерий Краскел-Уоллеса)	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем (без инфекционных осложнений)

Сравнение уровня лактоферрина у пациентов с бактериальными, вирусными и грибковыми осложнениями с группой пациентов без инфекционных осложнений выявило наличие статистически значимых отличий между выборками (таблица 12).

Таблица 12 - Анализ различия концентрации лактоферрина у пациентов с ХЛЛ при присоединении инфекционных осложнений различной этиологии

Уровень ЛФ, нг/мл	Группа без инфекционных осложнений (n=102)	Этиология инфекционных осложнений		
		Бактериальная (n=169)	Вирусная (n=129)	Грибковая (n=112)
Min величина	1121	3146	3028	2542
Max величина	1548	5961	3944	3798
Mid величина	1258±28	5761 ± 40	3601± 26	3241 ± 33
Статистическая значимость (критерий Стьюдента)		p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*

Примечание: * - различия статистически значимы;
p - value по сравнению с контролем (группа без инфекционных осложнений)

Выявленное в нашей работе значительное повышение концентрации лактоферрина при присоединении инфекционного синдрома вне зависимости от его генеза объясняется, прежде всего, поливалентным действием, которое оказывает лактоферрин как на организм человека, так и на возбудителя инфекции. Апоформа лактоферрина обладает бактериостатическим и бактерицидным действием как из-за его способности улавливать трехвалентное железо, блокируя доступность железа хозяина для микроорганизмов, так и благодаря взаимодействию с микробной поверхностью, приводящему к повреждению мембраны бактериальной клетки и изменению ее проницаемости. Известно также, что лактоферрин способен ингибировать проникновение вируса путем связывания с клеточными рецепторами или вирусными частицами. Кроме того, лактоферрин может вызывать митохондриальную и каспазо-зависимую регулируемую гибель клеток и апоптозоподобную активность у патогенных дрожжей [Kobayashi-Sakamoto M. et al., 2022; Kell D.B. et al., 2020; Ward J.L. et al., 2022].

Проведенный дисперсионный анализ показал высокую степень силы влияния инфекционных осложнений на уровень лактоферрина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ. Сила их влияния при стадии В ХЛЛ составила 72%. Сохранилась высокая сила влияния и при стадии С ХЛЛ – 74%. Наибольшее же влияние на увеличение уровня лактоферрина наблюдается при стадии А ХЛЛ – 81%, что, как и в случае с неоптерином и альфа-1-антитрипином можно объяснить большим сохранением функциональных возможностей клеток организма пациентов, отвечающих за выработку лактоферрина (таблица 13).

Таблица 13 -Сила влияния инфекционных осложнений бактериального, вирусного и грибкового генеза на уровень лактоферрина сыворотки крови пациентов с ХЛЛ (метод однофакторного дисперсионного анализа)

Разнообразие (источник вариации)	Дисперсии (суммы квадратов, SS)	Числа степеней свободы (v)	Вариансы (средние квадраты, σ2)	F	F- критическое	Сила влияния (%)
Стадия А ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	85467,71	4	19650,33	174,29	2,45	81***
Случайное (внутригрупповое)	15876,62	109	453			
Общее	88954,54	113	971,48			
Стадия В ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	234523,67	4	47321,12	166,95	2,43	72***
Случайное (внутригрупповое)	43256,52	154	359,39			
Общее	26519,46	158	2379,66			
Стадия С ХЛЛ						
Факториальное (межгрупповое)	349754,43	4	64276,98	201,63	2,61	74***
Случайное (внутригрупповое)	64239,78	201	348,81			
Общее	383727,56	205	2661,76			

Примечание: ***- $F > 0,999$, где F-показатель достоверности по Фишеру.

Результаты сравнения уровня лактоферрина до и после применения различных схем химиотерапии указывают на наличие статистически значимых отличий между выборками. Все схемы (R-CHOP, FCR, BR, Хлорамбуцил (лейкеран)) достоверно влияли на снижение уровня лактоферрина ($p < 0,001$) в сравнении с исходными показателями (рисунок 5).

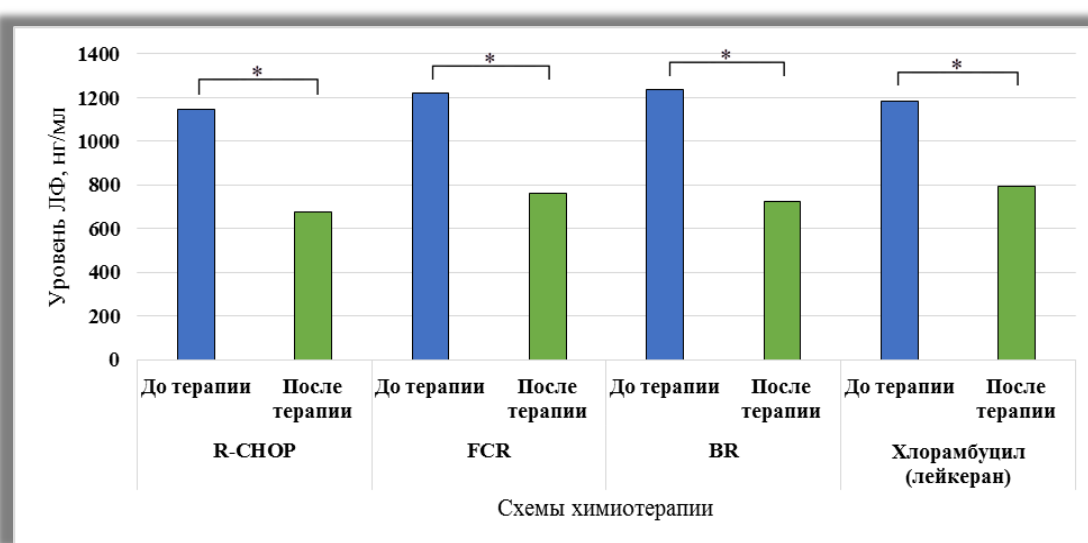


Рисунок 5 - Влияние различных схем химиотерапии на изменение уровня лактоферрина у больных ХЛЛ
Примечание: * – различия до и после лечения статистически значимы (значения p для Т критерия для парных выборок $< 0,05$).

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ также показал статистически значимую силу влияния схем химиотерапевтического лечения на изменение уровня лактоферрина в сыворотке крови (32%). Однако, в сравнении с результатами, полученными при изучении влияния этиологических факторов (бактериального, вирусного и грибкового генеза) на увеличение концентрации лактоферрина, выявлено преобладание силы влияния инфекционных патогенов (в среднем более 79%), что делает лактоферрин ценным диагностическим маркером для прогнозирования инфекционных осложнений при ХЛЛ.

3.5. Установление закономерностей синтеза бактериями белка, иммунологически сходного с лактоферрином человека и его физико-химические свойства

Обсуждая роль микроорганизмов в продукции различных биологически активных соединений, следует отметить, что наряду с традиционными исследованиями в области инфекционной патологии, направленными на совершенствование приемов диагностики, профилактики и лечения инфекционного синдрома при ХЛЛ, на повестку дня в качестве приоритетной, выдвигается задача оценки эпидемиологической значимости отдельных штаммов. Многочисленные и разнообразные микроорганизмы вынуждены постоянно приспосабливаться к адаптивно меняющейся среде организма хозяина, где они существуют и где человек контролирует инфекцию, в связи с чем, выявленное нами повышение устойчивости к лактоферрину штаммов, выделенных от больных, представляется вполне логичным.

Выживаемость микроорганизмов, выделенных от пациентов с инфекционным синдромом при ХЛЛ, после инкубации с лактоферрином человека представлена на рисунке 6.

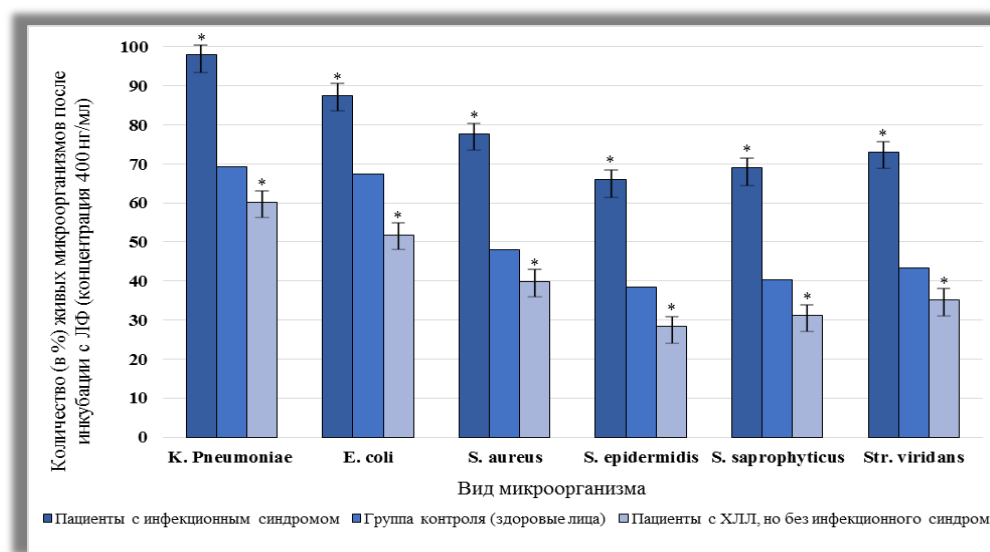


Рисунок 6 - Выживаемость микроорганизмов, выделенных от пациентов с ХЛЛ и условно-здоровых лиц, после инкубации с лактоферрином человека

Примечание: * – значение достоверности $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Дальнейшие исследования бактерий, выделенных от больных и здоровых лиц продемонстрировали различный уровень продукции МдЛФ, а именно: у штаммов, полученные от пациентов с ХЛЛ и инфекционным синдромом синтез МдЛФ составил в среднем $9,6 \pm 1,1$ нг/мл, что с достоверностью $p < 0,05$ ниже, чем у штаммов, выделенных от здоровых лиц $M \pm m = 17,9 \pm 2,2$ нг/мл. У микроорганизмов, выделенных от пациентов с ХЛЛ без инфекционного синдрома $M \pm m = 18,4 \pm 2,5$ нг/мл.

Установлено, что интенсивность синтеза МдЛФ напрямую зависела от наличия лактоферрина в среде, что было выявлено нами на этапе определения устойчивости микроорганизмов к лактоферрину человека. При этом все культуры продуцировали МдЛФ, как в присутствии человеческого лактоферрина в среде культивирования, так и в его отсутствии, однако, среднее значение концентрации ($M \pm m$) МдЛФ в среде без лактоферрина составляло $24,6 \pm 2,3$ нг/мл, а в среде, содержащей лактоферрин на 37,5% ниже - только $15,3 \pm 1,7$ нг/мл ($p < 0,05$).

Объяснение полученных результатов заключается в том, что ЛФ человека и МдЛФ, как было нами установлено после его выделения и очистки, имеют сходные физико-химические свойства. Отличия между ними заключаются, прежде всего, в электрофоретической подвижности. По полученным нами данным, относительная электрофоретическая подвижность МдЛФ равна $0,41 \pm 0,006$, в то время как лактоферрина, полученного из молока человека составляет $0,47 \pm 0,003$. В принципе, этот факт можно рассматривать как еще одно подтверждение наличия нескольких изоформ лактоферрина, обладающих идентичной молекулярной массой, иммунологически сходных, но отличающихся сродством к различным ионогенным группам (рисунок 7).

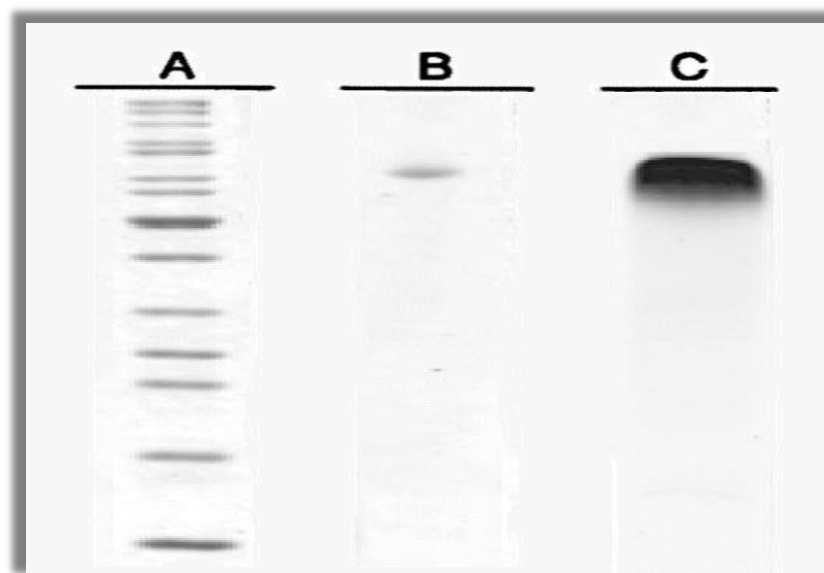


Рисунок 7 - Электрофореграмма МдЛФ, выделенного на ионообменном сорбенте.

А – стандарты молекулярных масс (Sigma, США); В – стандарт человеческого лактоферрина (Sigma, США); С – МдЛФ

Диссоциация комплекса лактоферрина с Fe^{3+} изученная двумя методами: при низких концентрациях хелатирующих анионов (диссоциация Fe^{3+} происходит одновременно от двух железосвязывающих центров лактоферрина) и при высоких концентрациях хелатирующих анионов (диссоциация Fe^{3+} от двух железосвязывающих центров происходит раздельно) показала, что лактоферрин, насыщенный железом (холоЛФ) обладает характерным спектром поглощения в видимой области. Спектры оказались схожим для белков бактерий, животных и человека. Не обнаружено различий между белками бактерий и человека в опытах по диссоциации комплекса лактоферрина с Fe^{3+} (рисунок 8).

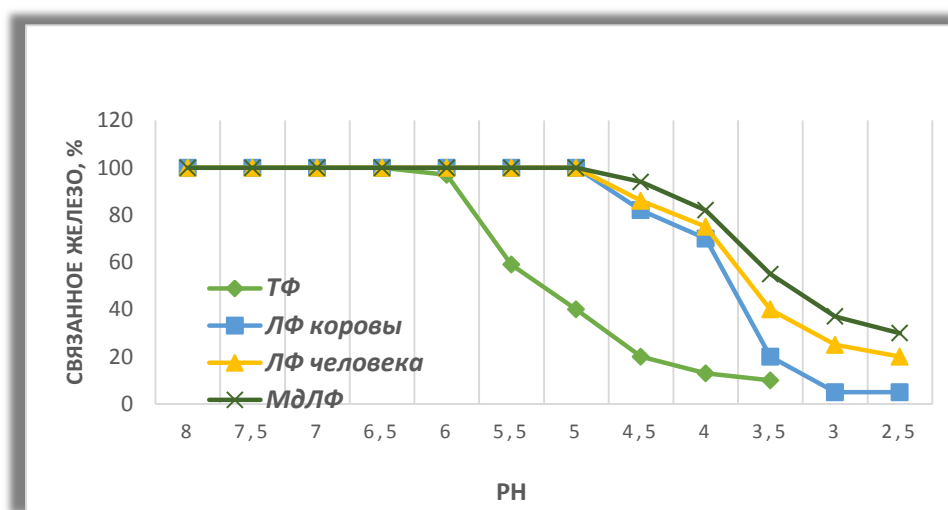


Рисунок 8 - pH-зависимость высвобождения железа, показанная для сывороточного ТФ человека, ЛФ человека, ЛФ коровы и МдЛФ

Сводные результаты по физико – химическим свойствам вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Физико-химические свойства МдЛФ

Свойства	МдЛФ
Молекулярная масса	85000±5000
Относительная электрофоретическая подвижность в агаре	0,42±0,005
Коэффициент диффузии в агарозе см ² сек ⁻¹	3,1 x 10 ⁻⁷
Гидрофобность	Элюируется с фенилсефарозы 0,4М сульфатом аммония
Осаждение сульфатом аммония, % насыщения и диапазон осаждения	50 – 75
Полное осаждение	75
Осаждение 50% этанолом	Не осаждается
Осаждение 60% ацетоном	Полное (обратимое)
Осаждение 0,9М хлорной кислотой	Необратимое
Изоэлектрическая точка	9,2
Отношение к температуре	Устойчив при 65°C - 30 минут

В связи с этими данными было ожидаемо, что в питательной среде, содержащей ЛФ человека, синтез бактериями МдЛФ тормозится по принципу отрицательной обратной связи. Тем же механизмом отрицательной обратной связи объясняется и сниженная продукция МдЛФ штаммами, выделенными от больных с инфекционным синдромом по сравнению со штаммами, полученными от условно – здоровых доноров в связи с повышением концентрации ЛФ в сыворотке при бактериальных инфекциях, которое было доказано и описано в многочисленных статьях и обзорах [Drago-Serrano M.E. et al., 2017; Hassoun L.A. et al., 2017; Khanum R. et al., 2022; Shini V.S. et al., 2022].

Очевидно, что синтез бактериями МдЛФ необходим им потому, что, действуя внеклеточно, МдЛФ, как и ЛФ человека, по-видимому, ослабляет разветвление цепи свободнорадикальных реакций и защищает микроорганизм-продуцент. С другой стороны, он позволяет продуценту успешно конкурировать в своеобразной «битве за железо» с другими бактериями, которые в такой ситуации начинают испытывать блокаду железозависимых ферментов, в том числе и окислительных, и теряют способность размножаться. Некоторые исследователи, даже несмотря на то, что ЛФ является своего рода

каноническим антибактериальным агентом, предлагают применять его в качестве пребиотической составляющей при создании лекарственных препаратов и приводят сведения, подтверждающие его эффективность в этом качестве. Так бычий ЛФ, например, оказывает пребиотическое действие, значительным и дозозависимым образом. [Wróbel M. et al., 2022].

Таким образом, микробные стратегии получения железа и, в том числе, синтез МдЛФ, можно рассматривать как один из факторов, определяющих формирование и устойчивость микробных ассоциаций, играющих важную роль в функционировании нормомикробиоценозов и патологических микробиоценозов организма хозяина.

С точки зрения прогнозирования развития инфекционного синдрома при ХЛЛ и определения потенциальной опасности, выделяемых из организма пациента инфекционных патогенов, большое значение имеет оценка не только количества колониеобразующих единиц и вид микроорганизма, но и анализ патогенного потенциала выделенных штаммов.

4. ВЫВОДЫ

1. Локализованные инфекционные осложнения ХЛЛ зафиксированы в 73% случаев, генерализация процесса имела место у 17% больных. Среди возбудителей преобладали Г+ микроорганизмы - в 69,8% всех осложнений бактериальной этиологии, среди вирусов - представители семейства Herpesviridae - в 56,6% осложнений, из грибковой микрофлоры лидирующая позиция принадлежала грибам рода *Candida* - 54,5% осложнений.

2. Применяемые для лечения ХЛЛ схемы химиотерапии не влияют на изменение уровня неоптерина ($p > 0,05$) и оказывают статистически значимое влияние на повышение уровня альфа-1-антитрипсина ($p < 0,001$) и лактоферрина ($p < 0,05$).

3. Концентрация неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина в сыворотке крови достоверно отражает отсутствие (наличие) инфекционных осложнений у больных ХЛЛ и составляет: неоптерина $2,1 \pm 0,2$ нмоль/л ($50,1 \pm 1,9$ нмоль/мл, $p < 0,001$), альфа-1-антитрипсина $3,4 \pm 0,2$ мг/л ($29,3 \pm 0,7$ мг/л, $p < 0,001$), лактоферрина 1196 ± 20 нг/мл (4952 ± 65 нг/мл, $p < 0,001$), что объясняется поливалентным действием, которое оказывают эти соединения как на организм человека, так и на возбудителей инфекции.

4. Наибольшее значение концентрации неоптерина регистрируется при осложнениях ХЛЛ бактериальной этиологии: $M \pm m = 76,5 \pm 2,2$ нмоль/л ($p < 0,001$), по сравнению с осложнениями микотической и вирусной этиологии - $22,1 \pm 0,9$ нмоль/л и $33,3 \pm 1,6$ нмоль/л соответственно. Идентичная закономерность характерна для концентрации лактоферрина при присоединении инфекционных осложнений: бактериальных - 4415 ± 41 нг/мл, вирусных - 3601 ± 26 нг/мл и грибковых - 3156 ± 33 нг/мл. Наиболее высокий уровень альфа-1-антитрипсина имеет место у пациентов при инфекционных осложнениях вирусной этиологии: $M \pm m = 30,3 \pm 0,7$ мг/л, затем грибковой - $28,4 \pm 1,0$ мг/л и бактериальной этиологии - $22,2 \pm 0,3$ мг/л.

5. Интенсивность синтеза МдЛФ микроорганизмами подчиняется механизму регуляции по принципу отрицательной обратной связи и зависит от концентрации лактоферрина в среде их обитания: $M \pm m = 24,6 \pm 2,3$ нг/мл при культивировании в питательной среде без лактоферрина; в среде, содержащей лактоферрин $M \pm m = 15,3 \pm 1,7$ нг/мл ($p < 0,05$). У штаммов, выделенных от пациентов с ХЛЛ и инфекционным синдромом $M \pm m = 9,6 \pm 1,1$ нг/мл, что меньше, чем у штаммов, выделенных от здоровых лиц $M \pm m = 17,9 \pm 2,2$ нг/мл ($p < 0,05$) и меньше, чем у микроорганизмов, выделенных от пациентов с ХЛЛ, но без инфекционного синдрома $M \pm m = 18,4 \pm 2,5$ нг/мл ($p < 0,05$).

6. Формирование инфекционного синдрома при ХЛЛ возможно при достижении предлагаемыми маркерами следующих значений на стадии А: неоптерина $\geq 27,3 \pm 3,2$ нмоль/л, альфа-1-антитрипсина $\geq 25,3 \pm 1,8$ мг/л, лактоферрина $\geq 3193 \pm 46$ нг/мл; на стадии В: неоптерина $\geq 32,1 \pm 4,7$ нмоль/л, альфа-1-антитрипсина $\geq 24,7 \pm 1,2$ мг/л, лактоферрина $\geq 3398 \pm 35$ нг/мл; на стадии С: неоптерина $\geq 36,3 \pm 3,1$ нмоль/л, альфа-1-антитрипсина $\geq 25,1 \pm 0,9$ мг/л, лактоферрина $\geq 3666 \pm 42$ нг/мл. Вне зависимости от стадии ХЛЛ потенциально опасными для развития инфекционного синдрома следует считать выделенные микроорганизмы, для которых характерным является: устойчивость к ЛФ человека (количество выживших клеток $\geq 98,03 \pm 7,2\%$) с одновременным уменьшением синтеза вещества, иммунологически сходного с ЛФ человека ($MдЛФ \leq 9,6 \pm 1,1$ нг/мл).

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В обследовании пациентов с ХЛЛ целесообразно использование комплексной клинико-лабораторной диагностики с определением концентрации неоптерина, альфа-1-антитрипсина и лактоферрина в сыворотке крови. Данный подход позволяет как прогнозировать вероятность развития инфекционного синдрома, так и оценить динамику процесса и эффективность проводимой терапии.

2. Параллельно с обследованием пациентов, рекомендуется проводить определение устойчивости микроорганизмов, выделенных из организма больного, к лактоферрину человека и уровень синтеза ими МдЛФ для своевременного назначения превентивного лечения.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, рецензируемых в базах данных Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ

1. Бойко О.В., Ахминеева А.Х., Гудинская Н.И., Бойко В.И., **Козак Д.М.**, Бендюг В.А. Биохимические и иммунологические маркеры в диагностике патологических состояний // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 9-3. - С. 327-329.

2. **Козак Д.М.**, Бойко О.В., Овсянникова Е.Г., Гудинская Н.И., Доценко Ю.И. Вопросы диагностики хронического лимфоцитарного лейкоза и его осложнений // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - №6. С. 191 – 193.

3. Бойко О.В., **Козак Д.М.** Закономерности изменения уровня А1 – антитрипсина у пациентов с хроническим лимфолейкозом // Молекулярная медицина. – 2020. - Т.18. - №4. – С. 60-64. DOI:10.29296/24999490-2020-04-10.

4. Бойко О.В., **Козак Д.М.** Концентрация неоптерина у пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от этиологии инфекционных осложнений // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2020. – Т.23. - №7.- С. 45-51. DOI:10.29296/25877313-2020-07-08.

5. Бойко О.В., Доценко Ю.И., Гудинская Н.И., Бойко В.И., Мухамедзянова Р.И., **Козак Д.М.**, Стенькин Ф.С. Влияние поллютантов на биохимические свойства микроорганизмов // Гигиена и санитария. - -2020. – Т. 99. - № 4. – С. 368 – 378. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-4-368-378.

6. Oksana Boiko, Aleksandr Nikolaev, **Daria Kozak**, Natalia Gudinskaya, Maksim Sakharov, Polina Gudinskaya, Yuri Dotsenko Isolation and purification of protein that is immunologically similar to human lactoferrin // Archiv – Euromedika. – 2021.- vol. 12. - num. 2, p.10 – 12. DOI: 10.35630/2199-885X/2021/11/2/2.

в других изданиях

7. **Козак Д.М.** Неоптерин: иммунологический маркер инфекционных осложнений у больных хроническим лимфолейкозом // Modern scientific researches. – 2018. – Том 3. - №04 – 03. – С.109 – 114. DOI: 10.30889/2523–4692.2018-04-03-052.

8. **Козак Д.М.**, Бойко О.В., Овсянникова Е.Г. Оценка заболеваемости хроническим лимфолейкозом в Астраханской области // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. - 2018. - № 6. - С. 45-53.

в материалах научных конференций

9. Бойко В.И., **Козак Д.М.**, Бендюг В.А., Бойко О.В., Турдугулова Р.Т. Методы комплексной оценки иммунного статуса работников Астраханского газоперерабатывающего завода // Сборник научных трудов "Актуальные проблемы современной науки" с материалами X Юбилейной Международной Телеконференции. – 2013. - Том 2 - №1. – С. 32.

10. **Козак Д.М.**, Бойко О.В., Овсянникова Е.Г., Левитан Б.Н., Щербак Л.А. Инфекционный синдром у стационарных пациентов с хроническим лимфолейкозом // Материалы I Терапевтического форума «Мультидисциплинарный больной», I Всероссийской конференции молодых терапевтов. - 2017. - С 44.

11. Щербак Л.А., Теплый А.Д., Овсянникова Е.Г., **Козак Д.М.** Прогноз риска развития хронического лимфолейкоза // Материалы I Терапевтического форума «Мультидисциплинарный больной», I Всероссийской конференции молодых терапевтов. - 2017.- С 142.

12. **Козак Д.М.** Изменение клеточного состава лейкоцитарной формулы общего анализа крови при инфекционных осложнениях хронического лимфолейкоза (тезисы) // Морфология. - 2019. - Т. 155 - № 2. - С. 153.

патент РФ

13. **Козак Д.М., Бойко О.В.** Способ диагностики инфекционных осложнений у больных хроническим лимфолейкозом// Патент № 2734670 от 21.10.2020.