

Интерфероновый статус человека. Проблемы стандартизации исследования и установления референсных значений

А.В. Лобов¹, Е.А. Погодина¹, П.И. Иванова¹, Н.В. Угарова¹, Е.В. Сорокина², И.Ж. Шубина³

¹ООО «Экзактэ Лабс»; Россия, 117246 Москва, Научный проезд, 20, стр. 2;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Антон Викторович Лобов lobov-anton@list.ru

Введение. Интерфероны – важнейший компонент неспецифической (врожденной) резистентности организма, история изучения которого начинается с открытия в 1957 г. и продолжается до сих пор. Прикладным аспектом изучения интерферонов является определение индивидуального интерферонов статуса (ИС) с оценкой чувствительности лейкоцитов к иммунореактивным препаратам. ИС – совокупность показателей, отражающих состояние неспецифической (врожденной) резистентности организма.

Цель исследования – рассмотреть проблемы стандартизации проведения исследования ИС с поиском возможных путей унификации метода и рассчитать референсные значения показателей ИС на основании большого массива данных.

Материалы и методы. Проведена ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в клинико-диагностическом отделе лабораторного центра ООО «Экзактэ Лабс» в период с сентября 2020 г. по август 2022 г. Исследования ИС выполняли с использованием наборов для иммуноферментного анализа на коммерческих реагентах. В статье приводится описание методики исследования ИС с акцентом на наименее стандартизованные процедуры.

Результаты. Рассчитаны референсные значения показателей ИС с использованием 3 непрямых методов. Анализ полученных результатов позволил выделить возрастные группы, для которых целесообразно установление референсных значений. Показана несогласованность полученных референсных значений с ранее принятыми, что свидетельствует о необходимости их корректировки.

Заключение. Рассмотренные проблемы проведения исследования и стандартизации метода определения ИС имеют практическое значение для унификации методологии и способа проведения исследования *in vitro*. Актуализированы референсные значения показателей ИС, что позволит избежать ошибок при интерпретации результатов и повысить клиническую значимость исследования.

Ключевые слова: интерфероновый статус, индуцированный интерферон, спонтанный интерферон, интерферон γ , интерферон α

Для цитирования: Лобов А.В., Погодина Е.А., Иванова П.И. и др. Интерфероновый статус человека. Проблемы стандартизации исследования и установления референсных значений. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):30–40. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-30-40

Human interferon status. Standardization of the tests and establishing reference values

Anton V. Lobov¹, Ekaterina A. Pogodina¹, Polina I. Ivanova¹, Natalia V. Ugarova¹, Ekaterina V. Sorokina², Irina Zh. Shubina³

¹Exacte Labs, LLC; Bld. 20, 2 Nauchny Proezd, Moscow 117246, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115552, Russia

Contacts: Anton Viktorovich Lobov lobov-anton@list.ru

Background. Interferons are the most important component of nonspecific (congenital) resistance of the body, the history of their discovery dates back to 1957 and the study is still ongoing. Evaluation of an individual interferon status (IS) with the estimation of the sensitivity of leukocytes to immune reactive drugs has a practical aspect. IS is a set of parameters indicating the state of nonspecific resistance.

Aim. To study the problems of standardizing the IS tests with the search for possible ways of standardizing the method and calculate reference values based on a large amount of data.

Materials and methods. A retrospective statistical processing was performed using the database of the IS tests performed in the clinical diagnostic department of the laboratory center of Exacte Labs LLC from September 2020 to August 2022. Enzyme immunoassay kits based on commercial reagents were used. The paper describes the methodology for studying IS with an emphasis on the least standardized procedures.

Results. Reference values were calculated using three indirect methods. The analysis of the results obtained made it possible to identify age groups for which it is advisable to establish reference values. The study results showed the inconsistency of the obtained reference values as compared with the previous ones, which indicates the need for their correction.

Conclusion. The considered problems of performing and standardizing the method for IS analysis are of practical importance for establishing a standard methodology and an *in vitro* method. The reference values have been updated to avoid errors in the interpretation of the results and to increase the clinical significance of the study.

Keywords: interferon status, induced interferon, spontaneous interferon, interferon γ , interferon α

For citation: Lobov A.V., Pogodina E.A., Ivanova P.I. et al. Human interferon status. Standardization of the tests and establishing reference values. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022; 21(4):30–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-30-40

Введение

Иммунная система человека включает неспецифическое звено (врожденный иммунитет) и специфическое звено (приобретенный иммунитет). Подобное разделение, в частности, обусловлено скоростью реагирования на антигенно-чужеродные молекулы. Врожденная система, как эволюционно более древняя, отличается высокой скоростью реагирования, но при этом ограничена репертуаром узнаваемых антигенов и возможными механизмами их элиминации. Специфическая (приобретенная) система иммунного ответа уступает по скорости ответа, однако обладает возможностями обучения, памяти и многочисленными механизмами антигенного противостояния, в том числе к эволюционно новым возбудителям и молекулам.

Функционирование обеих систем тесно связано, и первоначальный врожденный иммунный ответ зачастую является неотъемлемой частью запуска механизмов специфического иммунитета, в том числе с помощью интерферонов (ИФН).

Интерфероны – важнейший компонент неспецифической (врожденной) резистентности организма, история изучения которого начинается с его открытия А. Isaacs и J. Lindenmann в 1957 г. [1]. В настоящий момент у человека открыто 3 основных типа ИФН: I (альфа/бета, α/β), II (гамма, γ), III (лямбда, λ). В России изучение ИФН связано с трудами Ф.И. Ершова и А.С. Новохатского «Интерферон и его индукторы» (1980), В.Д. Соловьева и Т.А. Бектемирова «Интерфероны в теории и практике медицины» (1981) [2, 3].

Основным продуцентом ИФН- α являются лейкоциты, в связи с чем его называют лейкоцитарными

ИФН, а ИФН- β – фибробласты; оба подтипа обладают высокой противовирусной активностью и выполняют регуляторные функции в отношении Т-хелперов 1-го типа [4]. ИФН- γ обладает иммунорегуляторной, противовирусной и антипролиферативной активностью и продуцируется Т-лимфоцитами и НК-клетками [5]. В ответ на проникновение вирусов в клетку происходит секреция ИФН- α , основными функциями которого являются снижение белоксинтетической функции, что препятствует вирусной репликации, и повышение устойчивости соседних клеток к проникновению вирусов. ИФН- γ , секретируемый лимфоцитами, после распознавания антигенов (прямого или в результате антигенной презентации) реализует антипролиферативное и противовирусное (менее выраженное, чем у ИФН- α/β) действие, активирует макрофаги и гранулоциты, индуцирует экспрессию МНСII или МНСI, повышает активность НК-клеток и Т-киллеров, стимулирует дифференцировку и подавляет пролиферацию В-лимфоцитов. На рис. 1 представлено схематичное изображение основных эффектов ИФН- α и ИФН- γ .

В данной работе мы приводим описание алгоритма проведения исследования интерферонового статуса (ИС) в варианте исполнения с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), применяемого в клинико-диагностических лабораториях в настоящее время. Отсутствие стандартной методики проведения исследования ИС и использование различных подходов к регистрации результатов исследования ИС (биологическим или ИФА-методом) является актуальной проблемой, поскольку у врачей, получающих результаты анализа ИС от разных лабораторий,

возникают затруднения при их интерпретации. При этом использование разных способов регистрации результатов ограничивает возможность отслеживания изменений параметров ИС при наблюдении в динамике.

Одна из задач данной работы – показать преимущества проведения исследования ИС методом ИФА, как лучше поддающимся унификации, и описать его наименее стандартизованные этапы. Кроме того, в качестве важных задач мы определили: провести ретроспективный анализ базы данных результатов исследований ИС, определить референсные значения (РЗ) показателей ИС тремя непрямыми методами и предложить оптимальный; сравнить полученные РЗ с используемыми в настоящее время, оценить необходимость их корректировки и выделить возрастные группы, для которых целесообразно установление собственных РЗ. Унификация метода проведения исследования ИС *in vitro* в различных лабораториях и наличие актуальных РЗ, рассчитанных на основании большого массива данных, позволят избежать ошибок при интерпретации результата и повысить клиническую значимость анализа.

Цель исследования – рассмотреть проблемы стандартизации проведения исследования ИС с поиском

возможных путей унификации метода и рассчитать РЗ на основании большого массива данных.

Материалы и методы

Ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в клинико-диагностическом отделе лабораторного центра ООО «Экзактэ Лабс» в период с сентября 2020 г. по август 2022 г., проводилась с использованием 3 подходов для расчета РЗ: диапазон перцентиля 2,5–97,5, пределы $\pm 2SD$ и метод Bhattacharya для анализа данных. Общее количество проведенных исследований, включенных в анализ, – 4504 субъекта. Взрослые старше 18 лет составили 90 % (из них мужчины от 18 до 89 лет – 46,97 %, женщины от 18 до 94 лет – 53,03 %), дети до 18 лет – 10 % (из них мальчики – 49 %, девочки – 51 %).

Исследование ИС и определение индивидуальной чувствительности лейкоцитов (ИЧЛ) к иммуноактивным препаратам проводятся в цельной литий-гепариновой крови не позднее 30 ч после взятия. Краткий алгоритм проведения исследования представлен на рис. 2.

Базовый анализ ИС с использованием ИФА включает 5 показателей (количество ИФН- α/γ в ранее подготовленных пробах):

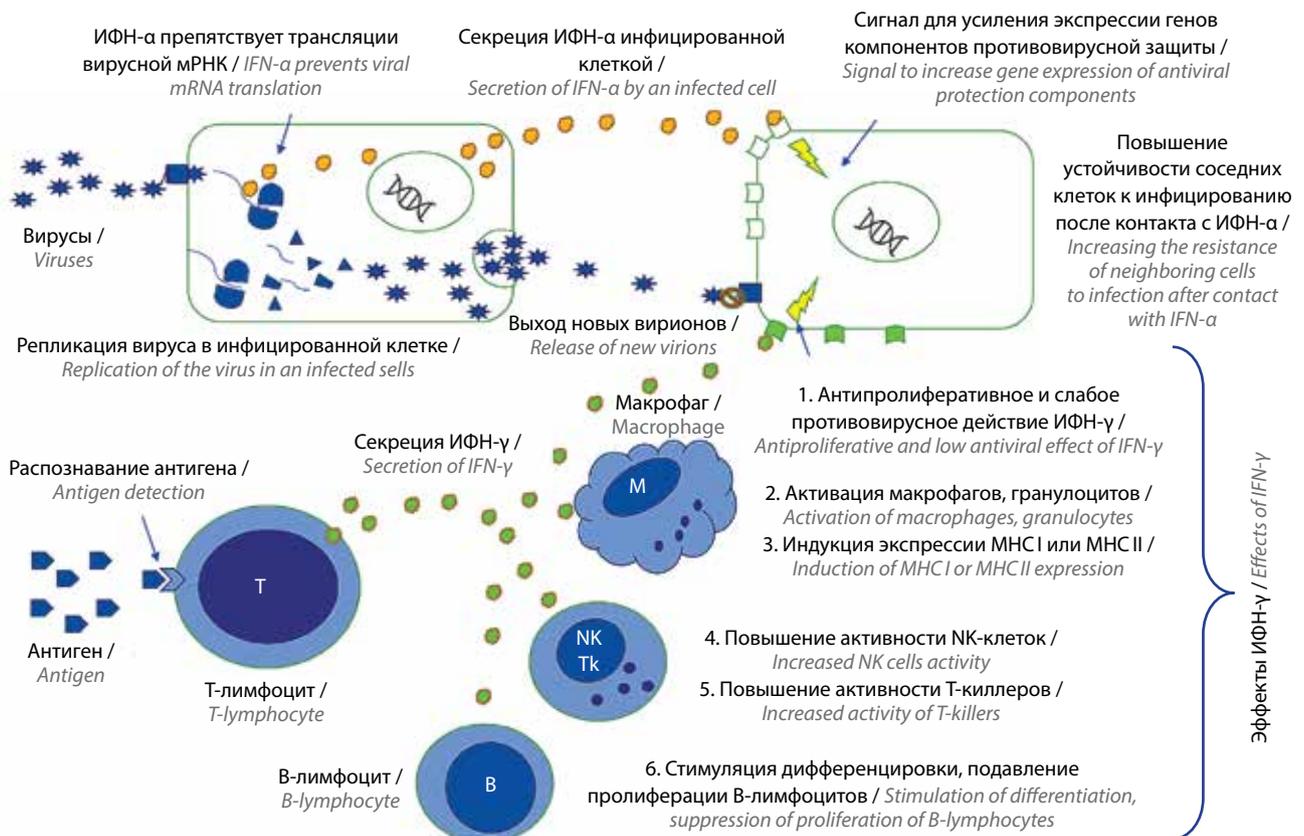


Рис. 1. Схематичное изображение основных эффектов интерферонов (ИФН) α и γ

Fig. 1. Schematic representation of the main effects of interferon (IFN) α and γ

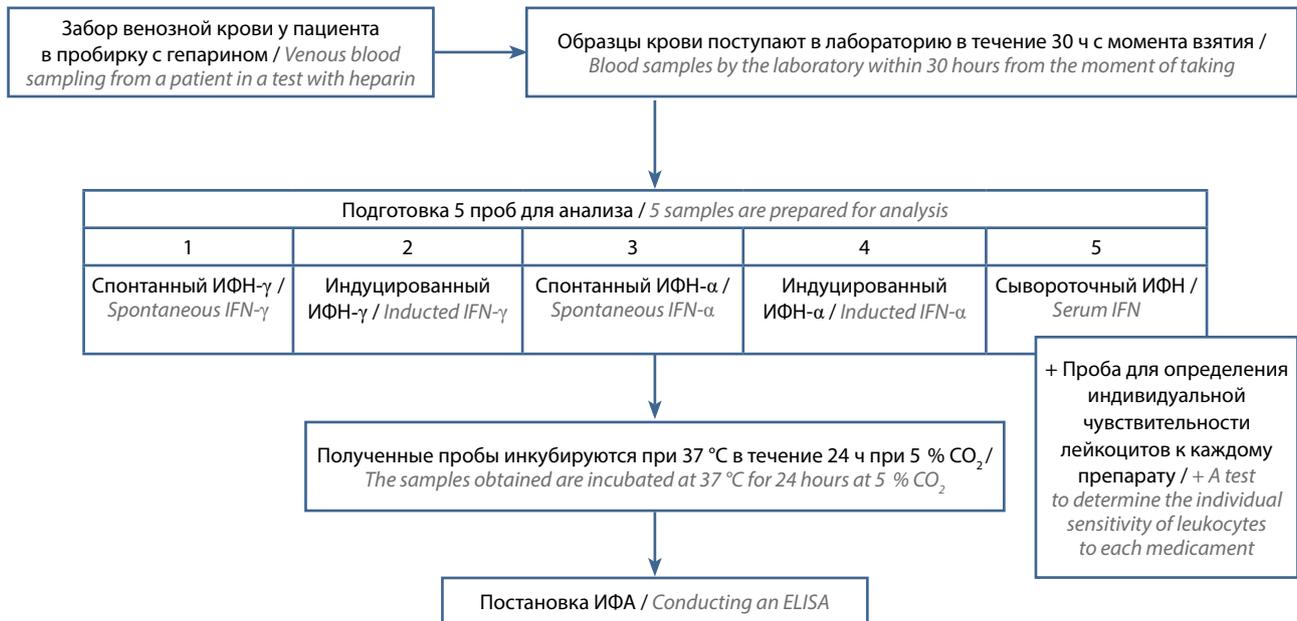


Рис. 2. Алгоритм проведения исследования интерферонового статуса и определения индивидуальной чувствительности к препаратам. ИФН – интерферон; ИФА – иммуноферментный анализ

Fig. 2. Algorithm for performing an interferon status analysis and detecting individual sensitivity to immune-active drugs. IFN – interferon; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

- сывороточный ИФН;
- спонтанный ИФН- α ;
- индуцированный ИФН- α ;
- спонтанный ИФН- γ ;
- индуцированный ИФН- γ .

При этом для каждого из них проводится индивидуальная пробоподготовка в 96-луночном планшете с U-образным дном и дополнительно для исследования ИЧЛ к каждому препарату.

Компоненты и способы подготовки инкубационных смесей для последующего измерения разных типов ИФН и определения ИЧЛ:

- 1) проба для определения спонтанного ИФН- γ : питательная среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) 225 мкл, содержащая 10 % сыворотки эмбриональной телячьей (фетальной бычьей сыворотки, ФБС) («Панэко», Россия), + 25 мкл цельной крови пациента;
- 2) проба для определения индуцированного ИФН- γ : питательная среда RPMI-1640 200 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл фитогемагглютинаина (ФГА) («Панэко», Россия) + 25 мкл цельной крови пациента;
- 3) проба для определения спонтанного ИФН- α : питательная среда RPMI-1640 225 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл цельной крови пациента;
- 4) проба для определения индуцированного ИФН- α : питательная среда RPMI-1640 200 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл стандартного индуктора ИФН- α + 25 мкл цельной крови пациента;

5) проба для определения содержания общего сывороточного ИФН: цельную кровь центрифугируют при 3000 об/мин, полученную плазму (170 мкл) отбирают в планшет и хранят при -20°C ;

6) проба для определения ИЧЛ: в стерильный планшет вносится питательная среда RPMI-1640 175 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл препарата (концентрация рассчитывается на основании C_{\max} , разовой или суточной дозы для каждого препарата) + 25 мкл цельной крови пациента.

Подготовленные пробы инкубируют при 37°C в течение 24 ч во влажной камере CO₂-инкубатора. По окончании инкубации проводится отбор 170 мкл супернатанта опытных образцов из инкубационного планшета в пустой полипропиленовый планшет. Все пробы хранятся при -20°C до проведения анализа.

Для количественного определения ИФН использовались зарегистрированные коммерческие тест-системы на основе ИФА, такие как гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8752) и альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ (А-8758) производства АО «Вектор Бест» (Россия), согласно инструкции производителя. Измерение оптической плотности микропланшета для ИФА проводилось спектрофотометром iMark (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Расчет концентрации выполнялся с использованием калибровочных образцов из соответствующих наборов реагентов при помощи программного обеспечения MPM 6.3 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с построением графика кусочно-линейной аппроксимации согласно инструкциям к наборам реагентов.

В данной работе были использованы обезличенные ретроспективные данные проведенных исследований ИС населения.

Результаты

Критерии отбора данных для непрямых методов вычисления референсных значений

В ходе работы были проанализированы ретроспективные данные, полученные в результате выгрузки базы данных из лабораторно-информационной системы по исследованиям ИС, проведенным в период с сентября 2020 г. по август 2022 г. С целью установления РЗ непрямими методами из расчета были исключены:

- 1) для показателя индуцированного ИФН- α – данные 674 субъектов, результаты которых не отвечали следующим критериям: значения концентраций сывороточного и спонтанных фракций ИФН <10 пг/мл; уровень индуцированного ИФН- γ >100 пг/мл, что соответствует нижней границе РЗ этого показателя; величина индуцированного ИФН- α >50 пг/мл, что отражает двукратное снижение ранее установленной нижней границы.
- 2) для показателя индуцированного ИФН- γ – данные 1091 субъекта, результаты которых не отвечали следующим критериям: значения концентраций сывороточного и спонтанных фракций ИФН <10 пг/мл; уровень индуцированного ИФН- α >100 пг/мл, что соответствует нижней границе РЗ этого показателя; величина индуцированного ИФН- γ >50 пг/мл, что отражает двукратное снижение ранее установленной нижней границы;

Для показателей спонтанного и сывороточного ИФН- γ/α критерии включения не применялись.

Проблемы стандартизации метода исследования интерферонового статуса

В настоящее время проведение исследования ИС предлагается многими лабораториями клинико-диагностического профиля в нашей стране, однако этот анализ выходит за рамки классических рутинных тестов, для которых есть регламентированная методология и доступные тест-системы, имеющие все необходимые реагентные компоненты в составе и утвержденную инструкцию. При этом существуют принципиально отличающиеся подходы к регистрации результатов. В одном случае это биологический метод, основанный на оценке задержки деструкции монослоя диплоидной культуры фибробластов или культуры клеток почки зеленой мартышки (Vero) после внесения тест-вируса (вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита мышей); во втором случае это количественное определение ИФН- α и ИФН- γ методом ИФА.

Предшествующий указанным методам «макрометод», проводившийся на выделенных лимфоцитах

и требующий большого объема крови, в настоящее время не применяется [3, 6].

Методология проведения исследования ИС и ИЧЛ базируется на патентах и трудах С. С. Григорян, Ф. И. Ершова [7–9] и описана в практических рекомендациях [10].

Выполнение исследования ИС требует участия высококвалифицированных специалистов, обладающих компетенциями преимущественно в области клеточной биологии, и наличия большого перечня оборудования и реагентной базы. При этом проведение исследования в варианте количественного определения ИФН методом ИФА с использованием коммерчески доступных тест-систем обладает рядом преимуществ, связанных с отсутствием необходимости поддержания клеточных линий (Vero, ФЛЭЧ, ЛЭЧ, ФЭЧ, М-19, М-22 и т. п.), использования тест-вируса (вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита мышей), и большими возможностями для стандартизации методики и объективной регистрации результатов с помощью спектрофотометра. В связи с этим в настоящее время предпочтение отдается варианту с методом ИФА.

Использование коммерческих наборов для определения ИФН стандартизует этап регистрации результатов исследования, однако перед исследователем встает ряд не описанных в доступных источниках вопросов этапа пробоподготовки. Основными из них являются количество эталонных индукторов (ЭИ) для добавления в инкубационную смесь и необходимая концентрация иммуноактивных препаратов для определения ИЧЛ.

Важность концентрации ЭИ и препаратов, используемых в инкубационных смесях, обусловлена рядом факторов. Наиболее важным из них является недопущение применения как экстремально высоких доз ЭИ и препаратов, которые могут оказать токсический эффект, так и низких концентраций, неспособных оказать достаточное стимулирующее влияние на лейкоциты или в случае с препаратами корректирующее/корректирующее действие. При этом в доступных источниках, патентах [7] отражается только объем (20 мкл) добавляемого раствора ЭИ и указание на использование разовой и/или суточной терапевтической дозы для иммуноактивных препаратов.

Унификация используемых концентраций эталонных индукторов

Важный аспект проведения исследований клинико-диагностического профиля – достижение максимально возможной меж-/внутрилабораторной воспроизводимости полученных результатов. В случае с проведением исследования ИС наиболее уязвимыми в плане стандартизации и при этом оказывающими существенное влияние на результат являются

концентрации применяемых ЭИ. Для оценки индуцированного синтеза ИФН лейкоцитами *in vitro* в качестве индуктора синтеза ИФН- α применяется вирус болезни Ньюкасла. ЭИ синтеза ИФН- γ – ФГА (митоген). Возможным решением может служить установление и использование оптимальных концентраций ЭИ. При этом надо учитывать, что в качестве ЭИ ИФН- α используется вирус болезни Ньюкасла, инфекционный титр которого может меняться в разных сериях, о чем свидетельствует наш собственный многолетний опыт. Поэтому следует проводить сравнительные испытания каждой новой серии с текущей для корректировки необходимого объема и концентрации ЭИ. Это позволяет минимизировать влияние вариабельности инфекционного титра ЭИ на результат исследования и обеспечивает возможность корректной оценки изменения результатов ИС пациентов в динамике.

Важным аргументом в пользу необходимости подбора оптимальной концентрации ФГА (индуктора ИФН- γ) является использование результатов ФГА-индуцируемых проб для расчета корректирующего действия иммуноактивного препарата. Для расчета ИЧЛ к препаратам в качестве базового уровня используют значение концентрации, полученное после инкубации стандартной разведенной крови пациента с ФГА, которую сравнивают с аналогичной, но с добавлением препарата.

В зависимости от значений коэффициента корректирующего действия различают 5 вариантов индивидуальной чувствительности к иммуноактивным препаратам [7, 10]:

- <1 – иммуноотсичность (подавление продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной);
- 1 – отсутствие чувствительности (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной не определяется);
- 2 – слабая чувствительность (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 2 раза);
- 3 – умеренно выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 3 раза);
- 4 – выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 4 раза);
- >4 – сильно выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной более чем в 4 раза).

Принципиальным является подбор концентрации ФГА, способной стимулировать лейкоциты периферической крови таким образом, чтобы, с одной сто-

роны, сила активации была достаточной для синтеза значимого уровня ИФН- γ , с другой стороны, чтобы сохранить потенциал к увеличению секреции ИФН- γ иммуноактивным препаратом. При высокой концентрации ФГА в среде с лимфоцитами происходит их чрезмерная активация с массивным цитокиновым выбросом, что приводит к их истощению. К тому же высокая концентрация измеряемого ИФН- γ нивелирует возможное его повышение за счет корректирующего действия препарата. Некорректный подбор концентрации ФГА может существенно исказить результаты исследования ИС. В случае с использованием неоправданно низкой концентрации ФГА результат исследования будет ошибочно отражать недостаточность индуцированной секреции ИФН- γ . При этом на фоне низкого значения индуцированного ИФН- γ иммуноактивные препараты могут оказать выраженный псевдоэффект кратным увеличением секреции ИФН- γ , что, в свою очередь, приведет к ошибочной интерпретации результата врачами-клиницистами и неоправданному назначению препаратов для коррекции системы ИФН.

Иммуноактивные препараты для определения индивидуальной чувствительности лейкоцитов

Определение ИЧЛ к иммуноактивным препаратам является важной составляющей исследования ИС. В основе лежит потенциальная возможность иммуномодулирующих препаратов влиять на секрецию ИФН, повышая резистентность организма преимущественно к вирусным заболеваниям. Наиболее оптимальным и распространенным вариантом определения ИЧЛ в исследовании ИС является измерение ИФН- γ в образцах плазмы крови, предварительно инкубированной с ФГА и исследуемым препаратом, и сравнения полученного значения с уровнем ИФН- γ в пробе, предварительно инкубированной только с ФГА [7].

Проблема унификации метода заключается в отсутствии стандартизованных указаний оптимальных концентраций используемых препаратов. В патенте С.С. Григоряна, Р.А. Арутюняна [7] имеется лишь упоминание о целесообразности использования разовой или суточной терапевтической доз. Понимая, что для получения релевантной информации о влиянии препарата на лейкоциты крови необходимо приблизить концентрацию препарата *in vitro* к физиологически возможной, целесообразно определять оптимальную концентрацию каждого препарата путем его титрования, опираясь на данные C_{max} . Проведение серий установочных экспериментов с использованием различных концентраций препаратов по обе стороны от C_{max} позволит определить оптимальную для дальнейшего использования концентрацию. Критически важным при этом является

определение токсических концентраций для недопущения использования таковых.

Определение индивидуального корректирующего действия иммуноактивных препаратов (ИФН и его индукторы, вакцины, иммуномодуляторы), способных наилучшим образом оказывать влияние на состояние пациента с профилактической и лечебной целью, является важным шагом к персонализированной медицине. Коррекция дефектов системы ИФН позволяет повысить резистентность организма, оказывать положительное влияние при различных патологических состояниях.

Клиническая значимость исследования интерферонов статуса

Исследование ИС позволяет оценивать состояние неспецифической резистентности организма, которое является значимым показателем врожденного иммунитета и служит интегральным критерием функционального состояния системы ИФН [10].

Оценка ИЧЛ пациента к различным иммуноактивным препаратам дает возможность выбрать терапевтически наиболее эффективный препарат и определить оптимальную тактику лечения с мониторингом показателей ИС в динамике.

Показания для назначения исследования ИС могут быть следующими: острые и хронические формы вирусных инфекций, рецидивирующие оппортунистические инфекции, аллергические и аутоиммунные заболевания, врожденные и приобретенные дефекты системы ИФН, мониторинг показателей ИС как критерия эффективности и контроля предложенной терапии, клинические исследования иммуноактивных препаратов.

Базовая оценка показателей ИС может выявить различные состояния организма.

- Острая фаза инфекционного заболевания сопряжена с повышением уровня сывороточного ИФН и снижением показателей индуцированной выработки ИФН. При аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, крапивница) уровень циркулирующего ИФН коррелирует с тяжестью заболевания.
- Снижение ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов крови в сочетании с наличием продукции спонтанного ИФН- α и/или ИФН- γ и отсутствием циркулирующего в крови сывороточного ИФН может свидетельствовать о персистирующей вирусной или другой внутриклеточной инфекции.
- Снижение ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов крови в сочетании с отсутствием циркулирующего в крови сывороточного ИФН свидетельствует о дефектности системы ИФН, что может быть и причиной, и следствием острых

и хронических вирусных заболеваний и рассматриваться как показание для ИФН-стимулирующей терапии.

- Хронические вирусные инфекции (герпес, гепатит), рассеянный склероз и др. сопровождаются подавлением всех показателей ИС.
- Аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др.) характеризуются подавлением индуцируемой продукции ИФН- α .
- Подавленная индуцируемая продукция ИФН- γ сопровождается злокачественными образованиями (острый лимфолейкоз и др.).

Результаты исследования ИС следует рассматривать в комплексе с остальными лабораторными и клинико-anamnestическими данными. Оценка выявляемых изменений может служить ориентиром при диагностике, лечении и прогнозе заболеваний как вирусной, так и невирусной этиологии.

Определение референсных значений

Интерпретируя результаты полученного анализа, врач, помимо клинической картины, прежде всего, ориентируется на РЗ. Для недопущения ошибочной трактовки результата проведенного исследования необходимо с особой осторожностью подходить к установлению референсных интервалов. Референсный интервал – статистический показатель, двумя пределами ограничивающий центральный 95 % диапазон РЗ [11]. Несмотря на то что в действующем руководстве CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов) рекомендуется прямой метод определения референсных интервалов [12], члены комитета IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины) считают оправданным в ряде случаев использование непрямого метода [13], с помощью которого проводилось уточнение РЗ для исследования ИС в данной работе. Референсные интервалы при непрямом методе рассчитываются с помощью специальных математических инструментов, в частности с использованием анализа Bhattacharya и его модификаций [12], методов Hoffman [14], F. Arzideh и соавт. [15], которые менее чувствительны к присутствию патологических результатов по сравнению с классическими параметрическим или непараметрическим методами. Упомянутые выше не прямые методы предъявляют жесткие требования к нормальному распределению данных [16, 17] и требуют предварительного исключения выпадающих, патологичных результатов методами Рида или Tukey, попытка применения которых для имеющихся данных выявила их несоответствие критериям распределения.

Поскольку базовое исследование ИС включает 5 показателей, которые характеризуют интерфероновую систему как компонент врожденного иммунитета и в меньшей степени общее состояние иммунной системы, были предложены критерии ретроспективного включения субъектов, которые опираются на все показатели, для исключения попадания в анализируемую выборку патологических результатов.

Ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в период с сентября 2020 г. по август 2022 г., проводилась с использованием 3 подходов для расчета РЗ: диапазон перцентиля 2,5–97,5, пределы $\pm 2SD$ и метод Bhattacharya для анализа данных. Как указано выше, в анализ были включены данные по 4504 субъектам: дети до 18 лет – 10 % (из них мальчики – 49 %, девочки – 51 %), взрослые старше 18 лет – 90 % (из них мужчины от 18 до 89 лет – 46,97 %, женщины от 18 до 94 лет – 53,03 %).

В табл. 1 представлены результаты анализа базы данных по ретроспективному уточнению РЗ отобранной группы субъектов, в табл. 2 – результаты указанного анализа с разделением на возрастные группы (до 18 лет и от 18 лет). Данные, приведенные в табл. 1, 2, отражают результаты расчетов по определению РЗ для групп, удовлетворяющих предложенным критериям включения (проведен расчет параметрическим методом двух стандартных отклонений в обе стороны от среднего значения ($\pm 2SD$); непараметрическим методом вычислен диапазон перцентиля 2,5–97,5;

показаны результаты, полученные методом Bhattacharya, только для показателя индуцированного ИФН- α , данные для расчета остальных показателей не отвечают требованиям нормального распределения).

Результаты вычислений, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют о наличии расхождения с ранее принятыми РЗ и необходимости их корректировки. Расчет РЗ методом Bhattacharya удалось провести только для показателя индуцированного ИФН- α , данные для остальных показателей не отвечают требованиям нормального распределения и расчет не представляется возможным. Поэтому использование этого метода неприменимо к расчету РЗ для всего исследования. Результаты расчетов путем вычисления $\pm 2SD$ и диапазона 2,5–97,5-го перцентиля показали весьма схожие значения. Поскольку РЗ, полученные методом расчета 2,5–97,5-го перцентиля, больше приближены к ранее установленным РЗ, которые, безусловно, требуют корректировки, предлагается отдать приоритет этим значениям.

Важным выводом из проведенного исследования является необходимость разделения РЗ по возрастным группам – до и после 18 лет, что, несомненно, отражает и физиологические особенности.

Исследование ИС позволяет получить информацию о состоянии системы ИФН. Индукция выработки ИФН с использованием ЭИ показывает возможность лейкоцитов крови вырабатывать ИФН- γ/α , при этом количество секретированных типов ИФН зависит от степени индуцирующего влияния (концентрации

Таблица 1. Результаты расчета референсных значений, пг/мл

Table 1. Results of the calculation of the reference values, pg/ml

Показатель интерферонового статуса Interferon status parameters	Ранее принятые РЗ Previously accepted RV	Результаты расчета новых РЗ The results of the calculation of new RV		
		$\pm 2 SD$	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, $\pm 2 SD$
Сывороточный ИФН Serum IFN	0–10	0–12,8	0–14,5	N/A
Спонтанный ИФН- α Spontaneous IFN- α	0–50	0–8,5	0–14,5	N/A
Индукцированный ИФН- α Induced IFN- α	100–500	58–759	60–759	41–1349
Спонтанный ИФН- γ Spontaneous IFN- γ	0–100	0–9,6	0–9,5	N/A
Индукцированный ИФН- γ Induced IFN- γ	100–2000	135–4467	123–3715	N/A

Примечание. Здесь и в табл. 2: РЗ – референсные значения; ИФН – интерферон; SD – стандартное отклонение; N/A – метод статистической обработки неприменим, поскольку полученные значения для расчета не отвечают требованиям нормального распределения.

Note. Here and in table 2: RV – reference values; IFN – interferon; SD – standard deviation; N/A – the method of statistical processing is not applicable, because the obtained values for calculation do not satisfy the requirements of a normal distribution.

Таблица 2. Результаты расчета референсных значений для групп, удовлетворяющих предложенным критериям включения, с разделением на группы по возрасту, пг/мл

Table 2. The results of the calculation of the reference values for groups meeting the proposed inclusion criteria, divided into groups according to the age, pg/ml

Показатель интерферонового статуса Interferon status parameters	Ранее принятые РЗ Previously accepted RV	Результаты расчета новых РЗ The results of the calculation of new RV					
		До 18 лет Up to 18 y. o.			От 18 лет Over 18 y. o.		
		±2 SD	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, ±2 SD	±2 SD	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, ±2 SD
Сывороточный ИФН Serum IFN	0–10	0–13,3	0–14	N/A	0–12,7	0–14,5	N/A
Спонтанный ИФН-α Spontaneous IFN-α	0–50	0–9,3	0–13	N/A	0–8,4	0–9,3	N/A
Индукцированный ИФН-α Induced INF-α	100–500	59–1122	59–1023	79–794	59–708	60–708	36–1445
Спонтанный ИФН-γ Spontaneous INF-γ	0–100	0–7	0–7,8	N/A	0–10	0–9,7	N/A
Индукцированный ИФН-γ Induced INF-γ	100–2000	69–2291	78–2570	N/A	155–4677	151–3802	N/A

ЭИ). Однако целесообразно оценивать степень силы секреции, соотнося ее с количеством лимфоцитов в реакционной смеси (их количество физиологически значительно различается в популяции), или, по крайней мере, если количество лейкоцитов находится в диапазоне установленных РЗ, – по результатам общего анализа крови. Широкий диапазон физиологического колебания количества лейкоцитов в популяции не позволит интерпретировать результат и делать заключение в отрыве от клинической картины и данных как минимум общего анализа крови.

Спорным остается наличие верхней границы РЗ для индуцированных типов ИФН, поскольку важным диагностическим критерием является оценка функциональной полноценности и потенциальной возможности секреции ИФН лимфоцитами, и превышение верхней границы РЗ может ввести в заблуждение, показывая сомнительную клиническую значимость.

Заключение

Стандартизация проведения исследований клинико-диагностического профиля наиболее сложно реализуема для методов, которые не имеют утвержденного алгоритма с описанием всех этапов проводимого анализа, а основываются на патентах, практических рекомендациях и пр. В случае с исследованием

ИС в варианте исполнения с использованием коммерческих ИФА-наборов стандартизован 2-й этап исследования, который подразумевает количественное определение ИФН в образцах, подготовленных на 1-м этапе. На этапе пробоподготовки перед исследователем встает ряд не описанных в доступных источниках вопросов. Основными из них являются количество ЭИ для добавления в инкубационную смесь и необходимая концентрация иммуоактивных препаратов в реакционной смеси для определения ИЧЛ. Подбор оптимальных концентраций ЭИ и препаратов с их стандартизацией является краеугольным камнем для качественного проведения исследования ИС и ИЧЛ и возможности его межлабораторной воспроизводимости.

Многообразие методов расчета РЗ результатов лабораторных анализов свидетельствует об отсутствии универсального подхода, который отвечал бы всем требованиям. Предпочтение отдается прямым методам, когда исследуется популяция условно здоровых субъектов с заранее установленными критериями включения. Однако и такой подход не лишен недостатков, обусловленных экономическими соображениями, ограничивающими, в первую очередь, количество субъектов для исследования, и критериями, определяющими состояние здоровья участников, применение которых не исключает попадания патологических результатов в выборку. Непрямые

методы позволяют использовать и обрабатывать большие массивы информации, ежедневно генерируемые клинико-диагностическими лабораториями. Преимуществом такого подхода является анализ данных большого количества субъектов без проведения целенаправленных мероприятий по предварительному отбору, при этом базы данных, содержащие информацию по тысячам субъектов, нивелируют влияние патологических значений за счет большой выборки и позволяют формировать референс-зависимые возрастные группы. Основная проблема при ретроспективном расчете РЗ с использованием накопленной

базы данных — необходимость поиска и исключения выпадающих патологических значений субъектов, но методы статистического анализа и наличие дополнительных данных для установления критериев ретроспективного включения в значительной степени решают эту задачу.

Предложенные в данной работе уточнения РЗ с распределением на возрастные группы могут значительно повысить диагностическую значимость проводимого исследования, исключая некорректную интерпретацию полученных результатов, и в большей степени коррелировать с клинической картиной.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kopitar-Jerala N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. *Front Immunol* 2017;8:873. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00873
2. Ершов Ф.И., Новохватский А.С. Интерферон и его индукторы. М.: Медицина, 1980. 173 с.
Ershov F.I., Novokhvatskiy A.S. Interferon and its inducers. Moscow: Meditsina, 1980. 173 p. (In Russ.).
3. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 400 с.
Solovyov V.D., Bektemirov T.A. Interferon in the theory and practice of medicine. Moscow: Meditsina, 1981. 400 p. (In Russ.).
4. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарства). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 368 с.
Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs). Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 368 p. (In Russ.).
5. Плейфайер Ж., Чейн Б.М. Наглядная иммунология. 20-е изд. перераб. и дополн. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 120 с.
Pleyfeyer G., Cheyne B.M. Transparent immunology. 20th edn. revised and enlarged. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 120 p. (In Russ.).
6. Doldi K., Leroux M., Augustin R. et al. Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations. *J Interferon Res* 1985;5(1):55–64. DOI: 10.1089/jir.1985.5.55
7. Григорян С.С., Арутюнян Р.А. Способ определения индивидуальной чувствительности лейкоцитов крови людей к лекарственному препарату. Патент РФ № 2324705, 15.06.2009.
Grigoryan S.S., Arutyunyan R.A. The method for determining the sensitivity of the individual human blood leukocytes to the drug. Patent RU No. 2324705 dated 15.06.2009. (In Russ.).
8. Григорян С.С., Майоров И.А., Иванова А.М. и др. Оценка интерфероновый статус людей по пробам цельной крови. Вопросы вирусологии 1988;3(4):433–6.
Grigoryan S.S., Maiorov I.A., Ivanova A.M. et al. Evaluation of the interferon status of people on samples of whole blood. *Voprosy virusologii = Questions of Virology* 1988;3(4):433–6. (In Russ.).
9. Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Носик Н.Н. Интерфероновый статус в норме. *Иммунология* 1986;3:52–4.
Ershov F.I., Gotovtseva E.P., Nosik N.N. Interferon status is normal. *Immunology* 1986;3:52–4.
10. Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю. Определение интерфероновый статус как показателя неспецифической резистентности организма человека. Практические рекомендации. М., 2018. 26 с.
Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Tabakov V.Yu. Determination of interferon status as an indicator of nonspecific resistance of the human body. Practical recommendations. Moscow, 2018. 26 p. (In Russ.).
11. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов. *Лабораторная служба* 2019;8(2):36–44. DOI: 10.17116/labs2019802136
Evgina S.A., Saveliev L.I. Modern theory and practice of reference intervals. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory service* 2019;8(2):36–44. (In Russ.). DOI: 10.17116/labs2019802136
12. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline – third edition. Wayne, Pa., USA: CLSI, 2010.
13. Jones G., Haeckel R., Loh T. et al. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(1):20–9. DOI: 10.1515/cclm-2018-0073
14. Hoffmann R.G. Statistics in the practice of medicine. *JAMA* 1963;185:864–73. DOI: 10.1001/jama.1963.03060110068020
15. Arzideh F., Wosniok W., Gurr E. et al. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(8):1043–57. DOI: 10.1515/CCLM.2007.250
16. Concordet D., Geffré A., Braun J.P. et al. A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta* 2009;405(1–2):43–8. DOI: 10.1016/j.cca.2009.03.057
17. Mining your routine data for reference intervals: Hoffmann, Bhattacharya and maximum likelihood. The Lab-R-torian. Available at: <https://labrtorian.com/2017/09/05/mining-your-routine-data-for-reference-intervals-hoffman-bhattacharya-and-maximum-likelihood> (accessed 05.10.2022).

Вклад авторов

А.В. Лобов, Е.А. Погодина, П.И. Иванова, Н.В. Угарова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;

И.Ж. Шубина, Е.В. Сорокина: разработка дизайна статьи, подготовка текста, анализ источников литературы.

Author's contributions

A.V. Lobov, E.A. Pogodina, P.I. Ivanova, N.V. Ugarova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, collection and analysis of literature data, writing the article;

I.Zh. Shubina, E.V. Sorokina: review design development, text preparation, analysis of literary sources.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Лобов / A.V. Lobov: <https://orcid.org/0000-0002-4703-5863>

Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>

П.И. Иванова / P.I. Ivanova: <https://orcid.org/0000-0002-3481-2854>

Н.В. Угарова / N.V. Ugarova: <https://orcid.org/0000-0001-5588-5596>

Е.В. Сорокина / E.V. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1188-6578>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 14.10.2022. Принята к публикации: 11.11.2022.

Article submitted: 14.10.2022. Accepted for publication: 11.11.2022.