

Биобанк как источник образцов для определения референтных интервалов концентраций циркулирующих в крови цитокинов, хемокинов и факторов роста

Сушенцева Н. Н.¹, Попов О. С.¹, Апалько С. В.¹, Уразов С. П.¹, Анисенкова А. Ю.^{1,2},
Миновичкин А. К.¹, Агафьина А. С.¹, Щербак С. Г.^{1,2}

¹СПб ГБУЗ "Городская больница № 40". Сестрорецк; ²ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет".
Санкт-Петербург, Россия

Цель. Определение референтных интервалов концентраций 38 цитокинов, хемокинов и факторов роста, а также измерение содержания исследуемых аналитов у пациентов с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) с использованием биоматериала из репозитория биобанка.

Материал и методы. В исследование были взяты 303 образца сыворотки и плазмы крови от 281 условно-здорового донора, 242 образца от 224 пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и 164 образца от 152 пациентов с ССЗ из коллекции биобанка СПб ГБУЗ "Городская больница № 40". Во всех образцах методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа была определена концентрация 38 цитокинов, хемокинов и факторов роста.

Результаты. На базе измеренных концентраций в группе условно-здоровых доноров вычислены непараметрические 95% референтные интервалы с 90% доверительным интервалом. Для большинства аналитов не наблюдалось половозрастных особенностей. У доноров >65 лет была снижена концентрация макрофагального воспалительного белка 1-альфа (Macrophage inflammatory protein-1- α) и повышены уровни интерлейкина-8 и хемокина интерферон- γ -индуцированного белка 10 (Interferon-inducible protein 10). У доноров молодого возраста (18-35 лет) наблюдался более низкий уровень фактора некроза опухоли-альфа (Tumor necrosis factor- α). В группах с нейродегенеративными и ССЗ обнаружены множественные отклонения от вычисленных референтных значений.

Заключение. Определенные референтные интервалы предназначены для оценки концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста, определяемых в сыворотке или плазме крови с помощью реагентов Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (Merck, Millipore) на приборе MAGPIX, и не подразумевают прямого трансфера на иные аналитические методики.

Ключевые слова: референтный интервал, цитокины, хемокины, факторы роста, мультиплексный анализ, интерлейкины, биобанк.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 01/09-2022

Рецензия получена 18/09-2022

Принята к публикации 23/10-2022



Для цитирования: Сушенцева Н. Н., Попов О. С., Апалько С. В., Уразов С. П., Анисенкова А. Ю., Миновичкин А. К., Агафьина А. С., Щербак С. Г. Биобанк как источник образцов для определения референтных интервалов концентраций циркулирующих в крови цитокинов, хемокинов и факторов роста. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(11):3396. doi:10.15829/1728-8800-2022-3396. EDN NEVOCC

Biobank as a source of samples for determination of concentration reference ranges for cytokines, chemokines and growth factors circulating in the blood

Sushentseva N. N.¹, Popov O. S.¹, Apalko S. V.¹, Urazov S. P.¹, Anisenkova A. Yu.^{1,2}, Minochkin A. K.¹, Agafyina A. S.¹, Shcherbak S. G.^{1,2}

¹City Hospital № 40. Sestroretsk; ²Saint Petersburg State University. Saint-Petersburg, Russia

Aim. To determine the reference ranges of concentrations of 38 cytokines, chemokines and growth factors, as well as to measure the content of these analytes in patients with neurodegenerative and cardiovascular diseases (CVDs) using biomaterial from the biobank repository.

Material and methods. The study included 303 serum and plasma samples from 281 healthy donors, 242 samples from 224 patients with neurodegenerative diseases, and 164 samples from 152 patients with CVDs from the biobank of the of St. Petersburg City Hospital № 40.

In all samples, the concentration of 38 cytokines, chemokines, and growth factors was determined by multiplex immunofluorescence assay.

Results. Based on the measured concentrations in the group of healthy donors, non-parametric 95% reference ranges with 90% confidence intervals were calculated. For the majority of analytes, no sex and age differences were observed. In donors >65 years of age, the concentration of macrophage inflammatory protein-1- α was reduced and the levels of interleukin-8 and the chemokine interferon-inducible protein 10 were increased. Young donors (18-35 years) had lower

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: navicula@yandex.ru

[Сушенцева Н. Н.* — биолог, ORCID: 0000-0002-5100-5229, Попов О. С. — специалист, ORCID: 0000-0003-1778-0165, Апалько С. В. — биолог, зав. лабораторией, ORCID: 0000-0002-3853-4185, Уразов С. П. — врач-кардиолог, ORCID: 0000-0002-5441-2911, Анисенкова А. Ю. — руководитель научно-исследовательской деятельности, доцент кафедры последилового медицинского образования, ORCID: 0000-0001-5642-621X, Миновичкин А. К. — врач-невролог, ORCID: 0000-0002-1190-0886, Агафьина А. С. — врач-невролог, ORCID: 0000-0003-2598-4440, Щербак С. Г. — главный врач, зав. кафедрой последилового медицинского образования, ORCID: 0000-0001-5047-2792].

levels of tumor necrosis factor- α . In groups with neurodegenerative and cardiovascular diseases, multiple deviations from the calculated reference values were found.

Conclusion. Certain reference intervals are intended to evaluate the concentrations of cytokines, chemokines and growth factors determined in blood serum or plasma using Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 reagents (Merck, Millipore) on the MAGPIX system and do not imply a direct transfer to other analytical methods.

Keywords: reference interval, cytokines, chemokines, growth factors, multiplex analysis, interleukins, biobank.

Relationships and Activities: none.

Sushentseva N. N.* ORCID: 0000-0002-5100-5229, Popov O. S. ORCID: 0000-0003-1778-0165, Apalko S. V. ORCID: 0000-0002-3853-4185, Urazov S. P. ORCID: 0000-0002-5441-2911, Anisenkova A. Yu. ORCID:

0000-0001-5642-621X, Minochkin A. K. ORCID: 0000-0002-1190-0886, Agafiyina A. S. ORCID: 0000-0003-2598-4440, Shcherbak S. G. ORCID: 0000-0001-5047-2792.

*Corresponding author: navicula@yandex.ru

Received: 01/09-2022

Revision Received: 18/09-2022

Accepted: 23/10-2022

For citation: Sushentseva N. N., Popov O. S., Apalko S. V., Urazov S. P., Anisenkova A. Yu., Minochkin A. K., Agafiyina A. S., Shcherbak S. G. Biobank as a source of samples for determination of concentration reference ranges for cytokines, chemokines and growth factors circulating in the blood. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(11):3396. doi:10.15829/1728-8800-2022-3396. EDN NEVOCC

ИЛ — интерлейкин, СПб ГБУЗ — Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФНО- α — фактор некроза опухоли-альфа.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Для концентраций большинства цитокинов, хемокинов и факторов роста в периферической крови в настоящий момент референтные интервалы отсутствуют.
- Показатели концентраций, измеренные с помощью тест-систем разных производителей, значительно различаются.

Что добавляют результаты исследования?

- Методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа определены локальные референтные интервалы для 38 цитокинов хемокинов и факторов роста на выборке популяции Санкт-Петербурга и Ленинградской области с использованием панели реагентов Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1.
- Концентрация некоторых цитокинов и хемокинов у условно-здоровых людей различается в разных возрастных группах.

Key messages

What is already known about the subject?

- There are currently no reference intervals for most cytokines, chemokines, and growth factors in peripheral blood.
- Concentrations measured with test kits from different manufacturers vary considerably.

What might this study add?

- Local reference intervals for 38 chemokine cytokines and growth factors were determined by multiplex immunofluorescence assay in a sample of the population of St. Petersburg and the Leningrad Oblast using the Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1.
- The concentration of some cytokines and chemokines in apparently healthy people varies in different age groups.

Введение

Несмотря на огромное количество научных исследований, посвященных изучению роли цитокинов, хемокинов и факторов роста в норме и при различных заболеваниях, долгое время диагностическая ценность определения системных уровней большинства этих маркеров не была очевидна. Сложность комплексной оценки цитокинового статуса заключается в том, что изменения концентраций тех или иных аналитов не являются специфичными для отдельных заболеваний и состояний [1]. Кроме того, описана широкая вариабельность спонтанной и индуцированной продукции цитокинов, связанная с генетическими

полиморфизмами кодирующих их генов [2]. В клинической практике преимущественно применяют результаты количественных тестов на основные провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α) и интерлейкины (ИЛ) 6 и 8 (ИЛ-6 и ИЛ-8). В последнее время в связи с распространением новой коронавирусной инфекции COVID-19 (COrona Virus Disease 2019) широкое распространение получило определение уровня ИЛ-6, отражающего наличие и тяжесть основного летального осложнения COVID-19 — цитокинового шторма.

Из-за отсутствия практики массового определения большинства цитокинов, хемокинов и фак-

Таблица 1

Половозрастная структура обследованных групп пациентов

Группа	Количество пациентов	Пол	Количество биообразцов
Условно-здоровые доноры			
Молодые пациенты (18-35 лет)	41	Ж=20, М=21	42
Взрослые пациенты (36-64 года)	175	Ж=65, М=110	187
Пациенты старшего возраста (от 65 лет)	65	Ж=35, М=30	74
Всего	281	Ж=120, М=161	303
Пациенты с нейродегенеративными заболеваниями			
Молодые пациенты (18-35 лет)	19	Ж=4, М=15	22
Взрослые пациенты (36-64 года)	148	Ж=29, М=119	160
Пациенты старшего возраста (от 65 лет)	57	Ж=25, М=32	60
Всего	224	Ж=58, М=166	242
Пациенты с ССЗ			
Молодые пациенты (18-35 лет)	19	Ж=9, М=13	22
Взрослые пациенты (36-64 года)	69	Ж=48, М=21	77
Пациенты старшего возраста (от 65 лет)	64	Ж=49, М=15	65
Всего	152	Ж=106, М=49	164

Примечание: Ж — женщины, М — мужчины, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания.

торов роста, тест-системы, одобренные для клинического применения, малочисленны. Соответственно, не установлены и интервалы нормальных значений. Определение референтных интервалов требует наличия большой выборки условно-здоровых доноров [3]. Биобанки могут являться удобным и надежным источником биоматериала для данного типа исследований. Практика получения охарактеризованного материала из репозитория может значительно уменьшать количество временных, человеческих и материальных ресурсов, необходимых при формировании выборок.

Цель настоящей работы — определение референтных интервалов концентраций 38 цитокинов, хемокинов и факторов роста, а также измерение содержания исследуемых аналитов у пациентов с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) с использованием биоматериала из репозитория биобанка.

Материал и методы

Используемый биоматериал

Для определения концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста использовали замороженную сыворотку и плазму крови из коллекции биобанка Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения (СПб ГБУЗ) "Городская больница № 40". Документы в рамках научно-исследовательского проекта "Биобанкирование и биомедицинские исследования образцов тканей и жидкостей человека" были одобрены Экспертным советом по этике СПб ГБУЗ "Городская больница № 40" на заседании № 119 от 09 февраля 2017г. У всех участников исследования было получено письменное информированное добровольное согласие на помещение их биоматериала в биобанк с последующим использованием в научных целях.

Пациенты были разделены на три группы согласно основному диагнозу: группа пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз), группа пациентов с ССЗ и условно-здоровые испытуемые доноры. Каждая группа далее была разделена на подгруппы по возрастному критерию: (1) молодые пациенты 18-35 лет, (2) взрослые пациенты 36-64 лет, (3) пациенты старшего возраста от 65 лет. Подробно половозрастная структура выборок представлена в таблице 1.

Определение концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста

Определение концентрации аналитов в биообразцах осуществляли с использованием панелей реагентов для одновременного определения 38 человеческих цитокинов, хемокинов и факторов роста Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (Merck, Millipore) согласно инструкции производителя. Для детекции результата использовали оборудование для мультиплексного анализа MAGPIX (Luminex). Полный список определяемых аналитов представлен в таблице 2.

Статистическая обработка данных

Для проверки гипотезы о нормальном распределении данных использовался тест Шапиро-Уилка; показано, что характер распределения исследуемых данных не соответствовал нормальному распределению.

Для выявления межгруппового различия (как между возрастными группами, так и между группами заболеваний) в уровнях концентрации исследуемых аналитов использовался однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, в качестве *post hoc* анализа использовался тест Данна с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

Для группы условно-здоровых испытуемых был вычислен непараметрический 95% референтный интервал с 90% доверительным интервалом. Для исключения выбросов использовалось расстояние Кука, для вычисления референтного интервала использовался бутстреппинг.

Таблица 2
Определяемые биомаркеры

Обозначение	Наименование
sCD40L	Растворимый лиганд CD40
EGF	Эпидермальный фактор роста
Eotaxin	Эотаксин
FGF-2	Основной фактор роста фибробластов
FIt-3L	Лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3
Fractalkine	Фракталкин
G-CSF	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GRO	онкоген, регулирующий рост
IFN- α 2	Интерферон альфа 2
IFN- γ	Интерферон гамма
IL-10	Интерлейкин-10
IL-12p40	Интерлейкин-12p40
IL-12p70	Интерлейкин-12p70
IL-13	Интерлейкин-13
IL-15	Интерлейкин-15
IL-17A	Интерлейкин-17A
IL-1ra	Антагонист рецептора интерлейкина 1
IL-1 α	Интерлейкин-1 альфа
IL-1 β	Интерлейкин-1 бета
IL-2	Интерлейкин-2
IL-3	Интерлейкин-3
IL-4	Интерлейкин-4
IL-5	Интерлейкин-5
IL-6	Интерлейкин-6
IL-7	Интерлейкин-7
IL-8	Интерлейкин-8
IL-9	Интерлейкин-9
IP-10	Хемокин-10
MCP-1	Моноцитарный хемотаксический белок-1
MCP-3	Моноцитарный хемотаксический белок-3
MDC	Макрофагальный хемокин
MIP-1 α	Макрофагальный воспалительный белок 1-альфа
MIP-1 β	Макрофагальный воспалительный белок 1-бета
TGF- α	Трансформирующий фактор роста-альфа
TNF- α	Фактор некроза опухоли-альфа
TNF- β	Фактор некроза опухоли-бета
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов

Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25-Q75)]. Статистический анализ и графическая презентация данных осуществлены при помощи языка программирования R версии 4.0.3 (<https://www.R-project.org/>).

Результаты

Во всех образцах, полученных от включенных в исследование пациентов, были определены концентрации 38 цитокинов, хемокинов и факторов

роста (таблица 3). Для большинства определяемых аналитов различий в зависимости от пола и возраста выявлено не было. У практически здоровых доноров >65 лет концентрация макрофагального воспалительного белка 1 альфа (Macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α) была ниже ($p < 0,05$), а уровни ИЛ-8 ($p < 0,05$) и хемокина 10 (Interferon-inducible protein 10, IP-10) выше ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно), чем в остальных возрастных группах. У доноров молодого возраста (18-35 лет) наблюдался более низкий в сравнении с прочими возрастными группами уровень ФНО- α ($p = 7,6 \times 10^{-4}$).

На базе измеренных концентраций в группе условно-здоровых доноров были рассчитаны непараметрические 95% референтные интервалы с 90% доверительным интервалом (таблица 4). В группах пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и ССЗ обнаружены множественные отклонения от вычисленных референтных значений. Наиболее значимые отличия наблюдаются для некоторых ИЛ и хемокинов. Например, в группе пациентов с нейродегенеративными заболеваниями уровень ИЛ-12 оказался выше, чем у условно-здоровых доноров и пациентов с ССЗ ($p < 0,0001$). У условно-здоровых доноров обнаружены более высокие концентрации ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5 ($p < 0,0001$ для всех случаев) и ИЛ-7 ($p = 0,0043$). У пациентов с ССЗ в сравнении с условно-здоровыми лицами определяются более низкие ($p < 0,0001$) концентрации макрофагального воспалительного белка 1-бета (MIP-1 β). В старшей возрастной группе пациентов с ССЗ в сравнении с пациентами с нейродегенеративными заболеваниями и условно-здоровыми донорами наблюдаются более низкие ($p < 0,0001$) уровни моноцитарного хемотаксического белка 1 (Monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1).

Обсуждение

Среди всех способов определения концентраций цитокинов мультиплексное обнаружение привлекательно своей высокой пропускной способностью, а также возможностью комплексно оценивать изменения в сложной сети цитокинов [4]. Важно отметить, что данные, полученные с применением разных тест-систем, могут в значительной степени различаться. Например, значительные различия в концентрациях некоторых аналитов можно найти при сравнении полученных в настоящем исследовании референтных интервалов и концентраций 17 цитокинов и хемокинов, определенных тем же методом, но с использованием реагентов и оборудования другого производителя [5]. Крупное исследование по сопоставимости данных концентраций 18 цитокинов и хемокинов, проведенное с использованием мультиплексных панелей от 4 различных производителей, также показало, что получаемые данные значительно разнятся при ис-

Таблица 3

Концентрации анализов (пг/мл) в крови пациентов разных возрастных групп [Me (Q25-Q75)]

Аналит	Условно-здоровые доноры			Пациенты с нейродегенеративными заболеваниями			Пациенты с ССЗ		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
EGF	208,6 (58,01-271,08)	137,35 (16,09-340,58)	90,54 (9,78-194,9)	17,16 (0-135,73)	38,07 (0-180,55)	93,72 (26,51-173,43)	29,66 (0-35,01)	102,2 (22,98-278,1)	73,42 (0-173,2)
FGF-2	20,02 (16,58-46,21)	26,96 (16,33-53,79)	35,25 (16,89-81,86)	44,43 (18,8-83,58)	46,64 (13,93-79,8)	85,35 (49,8-173,08)	0 (0-61,71)	28,51 (14,61-45,44)	39,58 (2,58-52,83)
Eotaxin	123,25 (99,39-143,1)	128,5 (92,26-193,83)	125 (75,56-190,62)	112,4 (82,61-187,75)	108,1 (75,97-180,85)	171,18 (138,46-226,9)	73,46 (57,57-96,29)	104,4 (47,92-187,25)	48,9 (15,86-71,11)
TGF-α	6,94 (2,93-8,87)	4,4 (0,09-8,7)	3,75 (0,02-7,99)	1,3 (0-6,47)	0,13 (0-3,05)	4,96 (0,92-8,6)	0,39 (0-4,83)	5,9 (0,99-8,52)	4,42 (0-11,31)
G-CSF	23,44 (13,9-41,46)	12,7 (0-37,02)	17,22 (0,73-34,42)	5,84 (0-22,28)	7,16 (0-22,52)	31,64 (12,19-53,53)	50,99 (21,91-67,47)	5,96 (0-36,7)	23,22 (0-26,47)
Flt-3L	1,77 (0-30,84)	5,89 (0-38,79)	0 (0-22,17)	0 (0-1,38)	0 (0-11,83)	0 (0-4,32)	0 (0-44,89)	0 (0-22,83)	0 (0-0)
GM-CSF	7,66 (1,51-30,63)	4,92 (0-11,46)	6,54 (1,74-11,91)	3,79 (0,59-10,63)	3,18 (0-9,72)	9,85 (0-27,9)	0 (0-2,7)	0,24 (0-3,76)	1 (0-4,59)
Fractalkine	71,32 (18,43-130,3)	51,38 (16,58-144,65)	48,19 (12,16-120,62)	31,67 (11,08-94,12)	37,66 (7,61-96,88)	51,68 (32,9-129,53)	51,94 (39,02-149,1)	33,01 (0,86-69,89)	16,04 (0,86-40,84)
IFN-α2	14,52 (2,9-49)	13,69 (0-32,5)	10,28 (0-22,15)	4,24 (2,01-25,68)	4,43 (0-16,84)	6,45 (0-23,14)	0 (0-37,29)	0 (0-12,96)	0 (0-12,13)
IFN-γ	27,1 (18,76-42,5)	8,17 (2,64-19,83)	9,53 (1,61-21,17)	5,33 (0,98-14,18)	9,11 (0,53-21,02)	10,36 (5,71-24,01)	1,69 (0-12,26)	5,08 (0-18,58)	2,24 (0-13,42)
GRO	1364 (843,2-3029,25)	1539 (812,4-2365,75)	1554,83 (807-2419,42)	1050,5 (412,92-1549,75)	1054 (479,06-1815,5)	1957,92 (1416,71-2928,02)	392,55 (230,62-1160,95)	1613,5 (955,57-2310,75)	1579 (1303-1994)
IL-10	0 (0-0,83)	0 (0-0,53)	0 (0-1,71)	0 (0-0)	0 (0-2,75)	4,73 (0-12,36)	0 (0-3,7)	0 (0-0)	0 (0-0)
MCP-3	0 (0-7,14)	0 (0-3,12)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-12p40	0 (0-54,93)	0 (0-0)	0 (0-0)	2,82 (2,57-3,39)	2,62 (0-3,01)	6,77 (0-19,75)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
MDC	787,5 (708,65-937,1)	678,2 (503,6-907,62)	658 (509,87-805,62)	661,8 (446,25-880,68)	803,4 (662,19-1076)	752,46 (576,03-1015,55)	619,7 (428,7-660,6)	699,9 (567,4-872,2)	446,3 (355,2-559,9)
IL-12p70	3,67 (0,16-20,63)	0,76 (0-5,11)	0,55 (0-4,23)	0,53 (0-6,71)	0 (0-6)	1,09 (0-12,61)	0 (0-0,7)	0,17 (0-3,97)	0 (0-0)
IL-13	0 (0-12,91)	0 (0-2,03)	0 (0-0)	0 (0-0,14)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-15	0,74 (0-1,87)	0,73 (0-2,65)	0 (0-2,11)	0,07 (0-1,29)	0 (0-1,07)	0 (0-4,71)	0 (0-2,7)	0 (0-1,01)	0 (0-0,02)
sCD40L	3941,38 (991,84-6379)	3161,5 (365,6-6824,13)	2421 (183,4-8239)	271,96 (184,82-689,92)	578,3 (141,6-5081,28)	6348,85 (3389,42-11378,6)	803,3 (214,5-4047,6)	1620,89 (214,37-5563,32)	2369,5 (115,28-7094,44)
IL-17A	10,46 (4,19-12,95)	4,78 (1,2-13,04)	5,77 (1,62-14,76)	1,94 (0,19-5,14)	2,83 (0-10,81)	5,66 (0-22,1)	0,43 (0-1,75)	3,47 (0,46-8,44)	0,18 (0-8,6)
IL-17A	17,86 (2,56-36,96)	0 (0-22,82)	7,35 (0-39,2)	1,7 (0-39,34)	16,47 (0-65,06)	28,38 (7,15-48,13)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-1α	0 (0-13,62)	0 (0-43,44)	6,37 (0-30,4)	12,12 (0-32,36)	13,13 (0-42,62)	10,72 (0-36,3)	0 (0-0)	0 (0-23,68)	30,42 (0-1060,25)
IL-9	0,11 (0-1,52)	0 (0-0,41)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-1β	0 (0-0)	0 (0-1,49)	0 (0-1,92)	0,18 (0-0,62)	0 (0-0,3)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-2	1,66 (0-3,72)	0,22 (0-1,69)	0,02 (0-1,53)	0 (0-0,67)	0 (0-0,03)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,08)	0 (0-0)
IL-3	2,1 (0-2,36)	0,08 (0-2,13)	0 (0-1,56)	0 (0-0,48)	0 (0-0,1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-4	13,85 (7,92-18,93)	10,95 (0-23,64)	11,44 (3,33-26,9)	5,84 (0-17,37)	0 (0-5)	4,11 (0-6,57)	0 (0-3,71)	0 (0-9,63)	0 (0-13,25)
IL-5	3,21 (0-3,71)	0,62 (0-3,62)	0,51 (0-3,97)	0 (0-0,97)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,26)	0 (0-0,23)
IL-6	0 (0-0)	0 (0-4,45)	0 (0-4,72)	0 (0-3,07)	0 (0-1,62)	0 (0-4,41)	0 (0-7,75)	0 (0-5,84)	0 (0-0)

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Условно-здоровые доноры			Пациенты с нейродегенеративными заболеваниями			Пациенты с ССЗ		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
IL-7	1,91 (0-6,37)	0,53 (0-3,73)	0,87 (0-5,38)	0 (0-3,11)	0 (0-0,21)	0 (0-5,22)	0 (0-0)	0 (0-3,66)	0 (0-0,64)
IL-8	11,36 (8,3-21,83)	13,95 (7,01-27,28)	22,64 (9,35-36,4)	3,87 (0,26-12,32)	7,68 (2,12-24,25)	24,94 (12,07-42,67)	9,88 (5,38-23,79)	10,15 (3,14-20,32)	0 (0-7,72)
IP-10	257 (153,85-474,48)	329,45 (213,55-510,28)	506,05 (312,72-839,53)	286,08 (205,69-476,92)	502,6 (274,9-810,4)	250,15 (203,07-398,56)	416,3 (331,5-444,1)	265,3 (183,85-572,6)	228,7 (126-970,7)
MCP-1	535,73 (397,33-710,81)	614 (377,95-880,8)	553,85 (337,15-833,22)	358,16 (285,83-602,35)	470,1 (290,6-810,9)	678,61 (463,94-860,23)	512,16 (387,57-731,65)	632,67 (388,39-950,52)	306,05 (0-665,27)
MIP-1α	16,25 (7,94-20,75)	9,2 (3,32-21,11)	4,9 (0-13,34)	1,7 (0-9,65)	7,22 (0-11,94)	5,44 (0-13,52)	2,71 (0-3,06)	7,48 (0-13,16)	3,79 (0-5,22)
MIP-1β	35,33 (18,67-54,8)	29,87 (16,08-48,06)	29,79 (15,76-47,67)	17,67 (13,28-30,17)	20,99 (10,63-35,99)	29,95 (17,51-48,14)	0 (0-15,89)	20,45 (0-36,89)	17,74 (3,79-18,63)
TNF-α	5,34 (2,07-11,21)	10,29 (6,02-14,99)	11,32 (7,22-15,68)	6,33 (4,76-11,15)	10,5 (5,57-13,8)	14,14 (7,4-18,54)	6,36 (4,19-8,48)	8,6 (4,92-14,66)	8,25 (3,24-18,45)
TNF-β	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
VEGFA	80,38 (16,75-151,57)	93,25 (22,42-180,4)	88,56 (28,77-147,45)	3,01 (2,22-20,71)	26,47 (3,03-113,43)	115,93 (72,53-243,19)	85,22 (8,14-170,68)	82,3 (0-236,24)	0 (0-65,37)

Примечание: возрастные группы обозначаются следующим образом: (1) молодые пациенты — 18-35 лет, (2) взрослые пациенты — 36-64 лет, (3) пациенты старшего возраста — от 65 лет, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания.

пользовании материалов разных производителей. При этом межлабораторная воспроизводимость остается высокой, а дисперсия при использовании разных серий реагентов — минимальной [6]. Сравнение результатов определения концентраций ФНО-α и интерферона гамма (IFN-γ), измеренных с использованием разных методик, также продемонстрировало, что в зависимости от применяемой технологии получаемые значения могут значительно различаться [7].

Обнаруженные возрастные особенности концентраций MIP-1α, ИЛ-8, IP-10 и ФНО-α в рамках обследованной выборки не противоречат другим исследованиям. В работе ученых из Корейской Республики концентрация цитокинов у различных групп (65+ и 40-) имеет возраст-зависимый характер [8]; в другом исследовании выявляют линейный рост концентрации ИЛ-6 и ФНО-α с возрастом испытуемых [9]. Существуют доказательства того, что у детей разного возраста также отмечаются изменения уровня концентрации провоспалительных цитокинов [10, 11]. В целом секреция многих из исследуемых аналитов зависима от возраста здорового организма; результаты настоящего исследования помогут определить, проявляется ли возрастная зависимость в патологических состояниях.

Наличие большого количества отклонений от референтных значений концентраций аналитов в группах пациентов с нейродегенеративными и ССЗ, а также высокая дисперсия значений внутри этих групп полностью соответствует современным представлениям о неспецифической роли цитокинов в патогенезе множества состояний, в т.ч. при болезни Альцгеймера [12], рассеянном склерозе [13], атеросклерозе, инфаркте миокарда, ишемической болезни сердца [14].

Интересно, что еще относительно недавно считалось, что в норме большинство цитокинов в крови здоровых доноров отсутствуют. В настоящее же время присутствие практически всех этих соединений можно обнаружить, хоть и в небольших концентрациях. Это объясняется не только повышением чувствительности современных методик, но и повышением требований к преаналитическому этапу [7]. Именно на преаналитическом этапе из-за нарушений техники и временных рамок забора, транспортировки, процессинга и хранения биоматериала может происходить как стимуляция клеток крови, индуцирующая выброс цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, так и распад белковых молекул под действием протеаз. Использование замороженного биоматериала из биобанков позволяет избежать сложностей, связанных с организацией преаналитического этапа, поскольку весь материал в коллекции соответствует единым требованиям. Все отклонения от стандартных протоколов документируются и могут

Референтные интервалы

Аналит	Молодые пациенты (18-35 лет)	Взрослые пациенты (36-64 года)	Пациенты старшего возраста (от 65 лет)
	Референтный интервал, пг/мл		
EGF	13,3-349,1	0-638,6	0-361,4
FGF-2	7,1-64,3	0-138,8	0-146,5
Eotaxin	56,4-244	21-308,4	16,1-318,3
TGF- α	0-10,6	0-17,6	0-28,9
G-CSF	0-46,4	0-110,8	0-161,4
Flt-3L	0-55,3	0-104,6	0-66,1
GM-CSF	0-35,7	0-80	0-49,8
Fractalkine	0-154	0-405,1	0-267,2
IFN- α 2	0-67,1	0-108,7	0-107,6
IFN- γ	0-88,6	0-61,5	0-43,8
GRO	159,7-4396	0-4267,8	32,4-4356
IL-10	0-8,5	0-11,3	0-29,7
MCP-3	0-84,8	0-169,4	0-180,7
IL-12p40	0-69,3	0-82,3	0-61,9
MDC	455,2-1187	134,5-1306,7	105,9-1551,1
IL-12p70	0-49,5	0-42,2	0-28
IL-13	0-107,8	0-178,7	0-229,1
IL-15	0-5,7	0-8,7	0-5,7
sCD40L	98-8095,9	0-14336,8	0-19282,2
IL-17A	0-46,6	0-41,1	0-32,8
IL-1RA	0-83,7	0-165,7	0-225,8
IL-1 α	0-163,7	0-295,2	0-147,2
IL-9	0-5,7	0-3,7	0-3,2
IL-1 β	0-22,7	0-5	0-14
IL-2	0-5,8	0-6,9	0-15
IL-3	0-3,8	0-4,2	0-2,7
IL-4	0-35,7	0-84,8	0-137,4
IL-5	0-4,6	0-28,4	0-36,2
IL-6	0-19,8	0-14,1	0-28,6
IL-7	0-9,4	0-24	0-40,9
IL-8	0-54,5	0-90,5	0-88,5
IP-10	116,3-532,2	98,5-1070,9	68,9-1276,8
MCP-1	118,6-1136,8	198,7-1286,5	71,2-1158,4
MIP-1 α	0-29,6	0-51,9	0-55,5
MIP-1 β	0-86,3	0-88,8	0-91,4
TNF- α	0-29,6	0-24,9	0-26,1
TNF- β	0-60,6	0-207,5	0-116,4
VEGFA	0-361,7	0-347,2	0-406,4

быть учтены при формировании экспериментальных выборок. Составление выборки для подобного исследования требует как сбора подробного анамнеза пациентов для исключения сочетанных и сопутствующих заболеваний, так и формирования достаточно большой группы исследуемых пациентов. На настоящий момент общемировой практикой является привлечение биобанков для сбора биоматериала и выбора необходимой группы испытуемых. Будущее развитие биобанкирования позволит проводить исследования, масштаб которых был невозможен ранее.

Заключение

Определенные референтные интервалы могут быть использованы при измерении уровней цитокинов, хемокинов и факторов роста в сыворотке и плазме крови с помощью панели реагентов Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (Merck, Millipore) на приборе MAGPIX и не подразумевают прямого трансфера на иные аналитические методики.

Благодаря наличию полной информации о состоянии здоровья доноров и истории транспортировки, процессинга и хранения образцов, биобанки являются надежным источником биоматериала для

определения референтных интервалов в тех случаях, когда тест-система позволяет использовать замороженный биоматериал.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Demyanov AV, Kotov AYu, Simbirtsev AS. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Cytokines and Inflammation*. 2003;2(3):20-35. (In Russ.) Демьянов А. В., Котов А. Ю., Симбирцев А. С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике. *Цитокины и воспаление*. 2003;2(3):20-35.
2. Shevchenko AV, Konenkov VI, Prokof'ev VF, et al. Constitutional basis of the levels of spontaneous and induced production of cytokines TNA-A, IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 in healthy individuals of the European population of Russia. *Immunologiya*. 2016;37(5):232-8. (In Russ.) Шевченко А. В., Коненков В. И., Прокофьев В. Ф. и др. Конституциональные основы уровней спонтанной и индуцированной продукции цитокинов TNA-A, IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10 у здоровых лиц европеоидного населения России. *Иммунология*. 2016;37(5):232-8. doi:10.18821/0206-4952-2016-37-5-232-238.
3. Evgina SA, Saveliev LI. Current theory and practice of reference interval. *Laboratory service*. 2019;8(2):36-44. (In Russ.) Евгина С. А., Савельев Л. И. Современные теория и практика референтных интервалов. *Лабораторная служба*. 2019;8(2):36-44. doi:10.17116/labs2019802136.
4. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, et al. Cytokines: from clinical significance to quantification. *Adv Sci*. 2021;8(15):2004433. doi:10.1002/advs.202004433.
5. Ostanin AA, Chernykh ER. The comparative analysis of 17 cytokines level in serum and whole blood of healthy donors using the bioplex protein assay system. *Cytokines and Inflammation*. 2005;4(2):25-32. (In Russ.) Останин А. А., Черных Е. Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии. *Цитокины и воспаление*. 2005;4(2):25-32.
6. van Meijgaarden KE, Khatri B, Smith SG, et al. Cross-laboratory evaluation of multiplex bead assays including independent common reference standards for immunological monitoring of observational and interventional human studies. *PLoS One*. 2018;13(9):e0201205. doi:10.1371/journal.pone.0201205.
7. Arsentieva NA, Totolian AA. Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral blood from healthy individuals. *Medical Immunology*. 2018;20(5):763-74. (In Russ.) Арсентьева Н. А., Тотолян А. А. Методические сложности при определении содержания некоторых цитокинов в периферической крови практически здоровых лиц. *Медицинская иммунология*. 2018;20(5):763-74. doi:10.15789/1563-0625-2018-5-763-774.
8. Kim HO, Kim HS, Youn JC, et al. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med*. 2011;9(1):1-7. doi:10.1186/1479-5876-9-113.
9. Stowe RP, Peek MK, Cutchin MP, et al. Plasma cytokine levels in a population-based study: relation to age and ethnicity. *J Medical Biomed Sci*. 2010;65(4):429-33. doi:10.1093/gerona/glp198.
10. Berdat PA, Wehrle TJ, Küng A, et al. Age-Specific Analysis of Normal Cytokine Levels in Healthy Infants. *Clin Chem Lab*. 2003;41(10):1335-9. doi:10.1515/CCLM.2003.204.
11. Lagereva YG, Palitsyna OV, Ischenko NV. Age-dependent patterns of the baseline cytokine levels in unstimulated peripheral blood samples. *Russian Journal of Immunology*. 2021;24(2):283-90. (In Russ.) Лагерева Ю. Г., Палицына О. В., Ищенко Н. В. Возрастные особенности базового содержания цитокинов в нестимулированных образцах периферической крови. *Российский иммунологический журнал*. 2021;24(2):283-90. doi:10.46235/1028-7221-1007-ADP.
12. Minochkin AK, Lobzin VYu, Suchentseva NN, et al. New potential biomarkers of Alzheimer's disease: markers of endothelial dysfunction and neuroinflammation. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2022;14(2):35-42. (In Russ.) Миночкин А. К., Лобзин В. Ю., Сушенцева Н. Н. и др. Новые потенциальные биомаркеры болезни Альцгеймера: маркеры эндотелиальной дисфункции и нейровоспаления. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2022;14(2):35-42. doi:10.14412/2074-2711-2022-2-35-42.
13. Zheleznikova GF, Skripchenko NV, Alekseeva LA, et al. Cytokines of adaptive immunity in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Russian Journal of Immunology*. 2017;11(1):13-25. (In Russ.) Железникова Г. Ф., Скрипченко Н. В., Алексеева Л. А. и др. Цитокины адаптивного иммунитета в патогенезе рассеянного склероза. *Российский иммунологический журнал*. 2017;11(1):13-25.
14. Kuznik BI. Citokiny, ateroskleroz, infarkt miokarda i aтеротромбоз. *Problemy klinicheskoy mediciny*. 2012;1(4):18-26. (In Russ.) Кузник Б. И. Цитокины, атеросклероз, инфаркт миокарда и атеротромбоз. *Проблемы клинической медицины*. 2012;1(4):18-26.