

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЖЕЛЕЗА И ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В МОКРОТЕ: ОПЫТ ВАЛИДАЦИИ

А.В. Козлов, О.А. Гусякова, А.В. Лямин

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме

На сегодняшний день исследования мокроты в основном ассоциированы с работой противотуберкулезной службы, а в практике клиничко-диагностических лабораторий остаются ограничены микроскопическими методами. При этом описан опыт применения других методов исследования мокроты при различных нозологиях, однако в большинстве случаев это имеет характер научно-исследовательских работ, но не рутинной практики. Тем не менее, для определенной когорты пациентов, например, больных муковисцидозом, использование дополнительных методов исследования отделяемого трахеобронхиального дерева поможет расширить спектр диагностических возможностей и обеспечить персонализированный подход в терапии. Ввиду этиопатогенетических особенностей заболевания, инфекционные осложнения при муковисцидозе имеют первостепенное значение, так как развиваются за короткий период времени и в ряде случаев заканчиваются летальным исходом. При этом имеются данные о соотношении уровня железа и железосвязывающих белков в респираторном тракте больных муковисцидозом с тяжестью течения воспалительного процесса в легких и инфицирующей микрофлорой. В проведенном исследовании была оценена возможность анализа показателей обмена железа в мокроте после проведения валидирующих мероприятий.

Ключевые слова: мокрота, валидация, муковисцидоз, железо, ферритин, трансферрин.

DOI: 10.58953/15621790_2023_14_3-4_47

DETERMINATION OF THE IRON AND IRON-BINDING PROTEINS CONCENTRATION IN SPUTUM: VALIDATION EXPERIENCE

A.V. Kozlov, A.V. Lyamin, O.A. Gusyakova

Samara State Medical University, Samara, Russia

Summary

To date, sputum studies are mainly associated with the work of the tuberculosis service, and in the practice of clinical diagnostic laboratories remain limited to microscopic methods. At the same time, the experience of using other methods of sputum examination in various nosologies is described. However, in most cases this is in the nature of research work, but not routine practice. Nevertheless, for a certain cohort of patients, for example, patients with cystic fibrosis, the use of additional methods of examination of the separated tracheobronchial tree will help to expand the range of diagnostic capabilities and provide a personalized approach to therapy. Due to the etiopathogenetic features of the disease, infectious complications in cystic fibrosis are of paramount importance, since they develop in a short period of time and in some cases end in death. At the same time, there are data on the ratio of the level of iron and iron-binding proteins in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis with the severity of the inflammatory process in the lungs and the infecting microflora. In this regard, the study evaluated the possibility of analyzing the indicators of iron metabolism in sputum after validating measures.

Keywords: sputum, validation, cystic fibrosis, iron, ferritin, transferrin.

Введение

Муковисцидоз (МВ) или кистозный фиброз представляет собой одно из наиболее часто встречающихся наследственных заболеваний, которое передается по аутосомно-рецессивному принципу. Распространенность МВ различна и зависит от географических зон и этнической принадлежности: чаще всего кистозный фиброз выявляют в странах Западной Европы и Северной Америки — 1:2500–1:3000 новорожденных [18,23], намного реже в странах Юго-Восточной Азии — примерно 1:400 000 [12,14]. В России распространенность муковисцидоза ниже, чем в европейских странах и ориентировочно составляет 1:10000 новорожденных [1].

В этиологии МВ лежит мутация гена CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), кодирующего одноименный белок — трансмембранный регулятор муковисцидоза. В норме этот белок является цАМФ-зависимым транспортёром хлора, который опосредованно участвует в регуляции работы других ионных каналов, в том числе и натриевого [4]. Однако у пациентов с муковисцидозом вследствие мутации гена CFTR работа данного белка нарушена, что приводит к накоплению избыточного количества ионов хлора в клетке. Также за ионами хлора в клетку устремляются ионы натрия, являющиеся осмотически активными электролитами, что обуславливает усиленное всасывание воды с поверхности клеток и межклеточного пространства, следствием чего является сгущение секрета [2]. Клинически это проявляется поражением экзокринных желез в органах пищеварения (в первую очередь поджелудочной железы), стенках дыхательных путей и урогенитального тракта, что приводит к развитию тяжелых осложнений [3,5].

Самым тяжелым и опасным осложнением для пациентов с МВ является дыхательная недостаточность [1]. Этиопатогенетические особенности МВ обуславливают скопление в респираторном тракте пациентов большого количества вязкой, трудно отделяемой мокроты, что создает благоприятные условия для инфицирования. При этом основную угрозу для жизни больных представляют неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ), в частности *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, микроорганизмы *Burkholderia cepacia complex* (ВСС), инфицирование которыми приводит к хроническому инфекционно-воспалительному процессу в нижних дыхательных путях (НДП) больных МВ, характеризующимся периодическими обострениями. Инфицирование патогенами ВСС пациентов с муковисцидозом может приводить к развитию цепакия-синдрома, сопровождающегося лихорадкой, лейкоцитозом, бактериемией и деструктивной пневмонией. Зачастую эти осложнения могут приводить к тяжелому ухудшению состояния пациента за несколько часов и в ряде случаев заканчиваются летальным исходом.

В связи с вышесказанным, больным МВ регулярно проводят микробиологическое исследование для выявления возможных патогенов и назначения корректной антибиотикотерапии. Однако бактериологическое исследование — посев мокроты — дает возможность выделить и идентифицировать возбудителя, определить его количество и чувствительность к антибактериальным препаратам, но не дает возможности оценить общее состояние пациента и тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса в НДП. Также может

оказаться недостаточным назначение «классических» лабораторных маркеров воспаления (СОЭ, СРБ, количество лейкоцитов). Вследствие этого, появляется необходимость поиска альтернативных показателей инфекционных осложнений у пациентов с МВ.

Описан опыт определения в мокроте различных белков, ферментов и цитокинов [6,8,9,11,13,22]. Однако наибольший интерес представляют данные о содержании в мокроте больных МВ железа и железосвязывающих белков (ферритин, трансферрин, лактоферрин). Показано, что у пациентов с МВ данные показатели выше в 2–4 раза, а в некоторых случаях — в 20 раз, чем у пациентов с другими нозологиями (пневмония, ХОБЛ) [10,21]. Также отмечена зависимость уровня железа и ферритина в мокроте от течения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте: повышение концентрации этих показателей во время обострения или развития цепакия-синдрома и тенденция к их снижению после проведения терапии, при этом наблюдается корреляция с присутствием инфицирующей флоры — в большинстве случаев это были представители НФГОБ [13,16,17,19]. Известно, что железо является эссенциальным фактором для метаболизма бактерий, обеспечивающим функцию ряда белков и ферментов [7,15]. Однако, попадая в организм человека, микроорганизмы сталкиваются с дефицитом железа, так как его основная часть находится в секвестрированном с различными белками состоянии, а поверхность эпителиальных клеток практически не содержит свободного железа. В связи с этим, для сохранения жизнеспособности микроорганизмам необходимо развивать способы и механизмы его получения, которые могут являться дополнительными факторами патогенности, усугубляющими воспалительный процесс. Исходя из выше сказанного, можно предположить, что причиной повышения уровня показателей обмена железа в мокроте является потребность бактерий [19,24].

В РФ зарегистрирован набор реагентов для определения ферритина в сыворотке и плазме крови «Ферритин-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), однако в других биоматериалах в соответствии с законодательством эта методика может быть использована только для научно-исследовательских целей. Представляется интересным исследование мокроты с целью поиска дополнительных маркеров инфекционно-воспалительного процесса у пациентов с МВ, однако отсутствуют данные по валидации методик определения показателей обмена железа в мокроте, которые обеспечивают достоверность получаемых результатов.

Цель исследования: оценить возможность определения показателей обмена железа в мокроте с помощью рутинных для КДЛ методов исследования.

Материалы и методы исследования

Поскольку мокрота является патологическим секретом и в отсутствии раздражающих факторов её отхождения не происходит, образцы мокроты собирали в клинически здоровой группе курильщиков. В нее вошли 20 мужчин в возрасте от 25 до 35 лет со стажем курения от 10 лет, ежедневно выкуривающие от 10 до 30 сигарет и отмечающие отхождение небольшого количества мокроты слизистого характера. Критериями исключения из группы исследования являлись наличие острых и хронических болезней органов дыхания и сердечно-сосудистой системы, прием антибактериальных препаратов, а также выявление бактериального компонента в мокроте при проведении микробиологического исследования. Обследуемые сдавали мокроту ежедневно, в течение пяти дней.

Подготовка поступивших образцов мокроты к исследованию проводилась в соответствии с запатентованной авторской методикой (Патент РФ № 2686052). Образец мокроты объемом 5 мл однократно замораживали на 24 часа при -40°C . После размораживания в пробу вносили 1 мл раствора для обработки мокроты из набора Реал-Бест ДНК МВТС (АО «Вектор-Бест») с целью разжижения и гомогенизации материала. Далее исследуемый образец переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали в режиме 1700 g в течение 5 минут. После этого из пробирки отбирали супернатант, переносили в пробирку типа Эппендорф и проводили повторное центрифугирование в режиме 4500 g в течение 5 минут. Полученный супернатант переносили в сухую пробирку для измерения показателей обмена железа.

Определение уровня железа выполняли феррозиновым методом (набор реактивов Cobas Integra Iron, Швейцария). Концентрацию ферритина и трансферрина определяли методом иммунотурбидиметрического анализа с латексным усилением (наборы реагентов Cobas Integra Ferritin и Cobas Integra Transferrin, Швейцария). Все исследования проводились на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400+ (Roche Diagnostics, Швейцария)

Комплекс валидирующих мероприятий проводился в соответствии с основными нормативными документами: Приказ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»; ГОСТ Р 53133.1–2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинко-диагностических лабораториях»; ГОСТ Р 53022.3–2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных ис-

следований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»; ГОСТ Р 51352–2013 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний»; Протоколы института Клинических Лабораторных Стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)), (США).

Для проведения статистической обработки полученных данных использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2013, MedCalc (version 11.3.0) и StatTech (version 2.4.3, разработчик ООО «Статтех», Россия). При использовании названных программ определяли следующие показатели: среднее арифметическое (M) и его стандартная ошибка ($M \pm m$), медианы (Me) и квартили ($Q1$ – $Q3$).

Результаты исследования

В связи с особенностями мокроты как биологического материала для лабораторных исследований, на первом этапе исследования были определены коэффициенты внутрииндивидуальной биологической вариации ($CVi\%$) для последующего проведения валидации методик. Для расчета $CVi\%$ первоначально требовалось определить медиану, межквартильный размах и разброс значений для железа, ферритина и трансферрина. Полученные статистические значения позволяют определить $CVi\%$ по формуле:

$$CVi = \frac{\sqrt{MS \text{ within groups}}}{mean}$$

CVi – коэффициент внутрииндивидуальной вариации (%);
 $MS \text{ within groups}$ – среднеквадратичное отклонение индивидуального наблюдения от индивидуального среднего;
 $mean$ – среднее значение показателя.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации позволяют рассчитать общую аналитическую ошибку (allowable Total Error, TEa), что необходимо для дальнейшей валидации.

Валидация правильности результатов исследования с расчетом общей аналитической ошибки проводилась на основании протокола CLSI EP15-A2. Проведен анализ 20 проб валидируемым нами методом и методами сравнения. В качестве методов сравнения для определения ферритина был использован метод ИФА (Ферритин-ИФА-БЕСТ, Вектор-Бест, Россия), для определения содержания железа – спектрофотометрический метод реакции с хромазуролом В (Chema Diagnostica, Италия). Результат сравнения методик определения ферритина в мокроте представлен в таблице 1.

Полученные результаты позволили определить аналитическое смещение и стандартное отклонение различий, что в свою очередь позволяет определить

Таблица 1.

Сопоставление результатов определения ферритина в мокроте валидируемым методом (Cobas Integra Ferritin) и методом сравнения (Ферритин-ИФА-БЕСТ)

№ пар	Концентрация ферритина, мкг/мл		
	Валидируемый метод	Метод сравнения	Различие
1	112,8	124	-11,2
2	457,3	471	-13,7
3	147,6	159	-11,4
4	1713,7	1715	-1,3
5	210,5	212	-1,5
6	446,4	469	-22,6
7	2698,3	2701	-2,7
8	1051,1	1059	-7,9
9	45,4	48,3	-2,9
10	127,9	131	-3,1
11	2248,8	2265	-16,2
12	811,4	832	-20,6
13	28,9	28	0,9
14	488	499	-11,0
15	68,8	79	-10,2
16	1333,6	1347	-13,4
17	406,3	419	-12,7
18	207,5	212	-4,5
19	1051,1	1056	-4,9
20	219	236	-17

доверительные границы валидируемой методики. В соответствии с ГОСТом Р 53133.1–2008 была рассчитана общая аналитическая ошибка, составившая для результатов определения железа 34,3%, ферритина – 33,7%, трансферрина – 30%. В соответствии с протоколом CLSI EP-6A были определены рабочие диапазоны методики исследования: для железа они составили 2–72,5 мкмоль/л, для ферритина – 22–295 мкг/л, для трансферрина – 0,017–0,074 г/л. Высокие значения содержания ферритина, определяемые у пациентов с муковисцидозом, требуют предварительного разведения 1:20–1:60.

Аналитическую специфичность методик при исследовании показателей обмена железа в мокроте определены

Таблица 2.

Результаты проведения эксперимента на открытие

Показатель	% открытия	Пропорциональная ошибка	TEa	TEa > пропорциональная ошибка
Железо	95,75%	4,25%	34,3	+
Ферритин	98,7%	1,3%	33,7	+
Трансферрин	97,25%	2,75%	30	+

для с помощью эксперимента на открытие в соответствии с ГОСТом Р 51352–2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний» и протоколом CLSI EP7-A2. Полученные значения процента открытия для всех аналитов находились в пределах 90–100%, что отвечает критериям приемлемости нормативных документов (Таблица 2).

Для валидации прецизионности методик исследования показателей обмена железа в мокроте был использован протокол CLSI EP5-A2. Первоначально было необходимо вычислить межсерийный коэффициент вариации (CV%), составивший для железа 4,65%, для ферритина – 2,56%, для трансферрина – 6,02%. Полученные резуль-

таты вместе с вычисленными до этого значениями общей аналитической ошибки и аналитического смещения позволили определить аналитическую эффективность методики, соответствующую мировому уровню приемлемости для определения концентрации железа и ферритина, и хорошему уровню приемлемости для определения концентрации трансферрина.

Установлено соответствие внутрисерийной воспроизводимости метода исследования показателей обмена железа в мокроте критериям Приказа № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» и ГОСТа Р 53133.1–2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях».

Определение критической разницы (RCV%) для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении изменений показателей обмена железа в мокроте было проведено согласно ГОСТу Р 53022.3–2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Полученные коэффициенты RCV для железа, ферритина и трансферрина использовались в дальнейшем для определения коэффициента персональной разницы (PCV%), позволяющем оценить клиническую значимость изменения количества железа и железосвязывающих белков в мокроте (Таблица 3).

Таким образом, проведенные мероприятия по валидации методик позволят в дальнейшем использовать рассмотренные методики для определения железа и железосодержащих белков в мокроте, что предоставляет возможность дополнительно оценить тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса, вызванного неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами в легких у пациентов с МВ, в том числе, при динамическом наблюдении.

Обсуждение результатов

Стандартизация преаналитического этапа и алгоритмов пробоподготовки образцов мокроты, а также

проведение валидирующих мероприятий подтверждает возможность использования образцов мокроты для исследования с целью выявления возможных маркеров тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов бактериального генеза в НДП у больных МВ. Для демонстрации эффективности таких исследований можно привести клинический пример.

Пациентка М., 14 лет, 10.04.2020 сдала мокроту при плановом микробиологическом исследовании, одновременно был проведен анализ показателей обмена железа в мокроте: содержание железа составило 6 мкмоль/л, ферритина 533 мкг/л, трансферрин не определялся. 06.05.2020 больная экстренно поступила в областной центр муковисцидоза с диагнозом: муковисцидоз, легочно-кишечная форма, тяжелое течение, обострение. В анамнезе: хронический высеv бактерий из *Burkholderia cepacia complex*. На момент поступления предъявляла жалобы на периодическое повышение температуры до 40°C, боль за грудиной, затрудненное дыхание, одышку, ощущение «неполного вдоха», усиление кашля и затруднение отхождения мокроты; температура тела 39,1°C, SaO₂ 93% при постоянной ингаляции кислородной смесью, ЧДД 40 в минуту. Общее состояние тяжелое, нестабильное. По результатам бактериологического исследования – посева мокроты – на момент поступления выявлено два штамма *Burkholderia cepacia* 105 с резистентностью к фторхинолонам, цефалоспорином IV поколения, ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином. По результатам лабораторного исследования мокроты уровень железа составил 25,7 мкмоль/л, ферритина 1222 мкг/л.

PCVжелеза 76,6% >RCV железа 48,3% – изменение клинически значимо;

PCV ферритина 56,3% >RCV ферритина 35,1% – изменение клинически значимо.

Таким образом, проведение валидирующих мероприятий позволяет использовать мокроту в качестве биологического материала для определения концентрации железа и железосодержащих белков, при этом показатели обмена железа в мокроте у пациентов с МВ соотносятся с наличием инфицирующей микрофлоры и состоянием больного и могут использоваться в качестве дополнительного критерия оценки тяжести инфекционно-воспалительного процесса.

Таблица 3.

Расчет критической разницы показателей обмена железа в мокроте для динамического наблюдения

Аналит	CVA	CVi	RCV
Железо	4,65%	16,8%	48,3%
Ферритин	2,56%	12,4%	35,1%
Трансферрин	6,02%	15,3%	45,5%

Список литературы

1. Баранов А.А., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. и соавт. Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России // Педиатрическая фармакология. – 2014. – № 6. – С. 16–23.
2. Вахарловский В.Г., ред. Муковисцидоз: генетика, клиника, патогенез, диагностика, лечение, профилактика: Методическое пособие/ СПб.; 2012. 35 с.
3. Горина Ю.В., Симонова О.И., Томилова А.Ю., Рославцева Е.А. Алгоритм посиндромной комплексной терапии при муковисцидозе у детей: современный подход // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – № 5. – С. 30–38.
4. Иващенко Т.Э., Баранов В.С., ред. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза/ СПб.: Интермедика, 2002. – 256с.
5. Саперов В.Н. Практическая пульмонология: Учебное пособие/ Чебоксары: ЧГУ, 2006. – 658 с.
6. Суркова Е.А., Булгакова Т.В., Сологуб Т.С. и соавт. Миелопероксидаза и лактоферрин у больных муковисцидозом// Медицинская иммунология. – 2004. – № 1–2. – С. 67–74.
7. Berlutti F., Morea C., Battistoni A. et al. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*//*International journal of immunopathology and pharmacology*. – 2005. – Vol. 18. – P. 661–670. doi: 10.1177/039463200501800407
8. Britigan B., Hayek M., Doebbeling B., Fick R. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis// *Infection and immunity*. – 1993. – Vol. – 61. – P. 5049–5055. Doi: /10.1128/iai.61.12.5049-5055.1993
9. Cantin A., Ouellet C., Cloutier A., McDonald P. Airway Mucins inhibit oxidative and non-oxidative bacterial killing by human neutrophils// *Front Pharmacol* 2020 Sep 30;11:554353. doi: 10.3389/fphar.2020.554353
10. Ghio A., Roggli V., Soukup J. et al. Iron accumulates in the lavage and explanted lungs of cystic fibrosis patients//*Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. – 2013. – Vol. 12. – P. 390–398. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.010
11. Giacalone V., Dobosh B., Gaggari A. et al. Immunomodulation in cystic fibrosis: why and how?// *International journal of molecular sciences*. 2020 May 8;21(9):3331. doi: 10.3390/ijms21093331
12. Hodson M., Geddes D., Bush A. *Cystic fibrosis*/London: Hodder Arnold; 2007. – 503 p.
13. Hunter R., Asfour F., Dingemans J. et al. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways//*mBio*, 2013 Aug 20;4(4):e00557-13. doi: 10.1128/mBio.00557-13.
14. Mehta G., Macek M., Mehta A. & European Registry Working Group. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries // *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*/ 2010. 9 Suppl 2, S5–S21. doi: 10.1016/j.jcf.2010.08.00
15. Nairz M., Haschka D., Demetz E., Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection // *Front Pharmacol*. 2014 Jul 16;5:152. doi: 10.3389
16. Reid D., Carroll V., O'May C. et al. Increased airway iron as a potential factor in the persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis.// *The European respiratory journal*. – 2007. – Vol.30. – P. 286–292. doi: 10.1183/09031936.00154006.
17. Reid D., Withers N., Francis L. et al. Iron deficiency in cystic fibrosis: relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection//*Chest*. – 2002. – Vol.121. – P. 48–54. doi: 10.1378/chest.121.1.48.
18. Rowe S., Miller S., Sorscher E. Cystic fibrosis//*The New England journal of medicine*. – 2005. – Vol.352. – P. 1992–2001. doi:10.1056/nejmra043184.
19. Semler D., Goudie A., Finlay W., Dennis J. Aerosol phage therapy efficacy in *Burkholderia cenocepacia* complex respiratory infections//*Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – Vol.58. – P. 4005–4013. doi: 10.1128/AAC.02388-13.
20. Shapiro S. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease// *Biochemical Society transactions*. – 2002. – Vol.30. – P. 98–102.
21. Stites S., Walters B., O'Brien-Ladner A. et al. Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis//*Chest*. – 1998. – Vol.114. – P. 814–819.
22. Wagner C., Schultz C., Mall M. Neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 12 in cystic fibrosis lung disease//*Mol Cell Pediatr*. 2016 Dec;3(1):25. doi: 10.1186/s40348-016-0053-
23. Wilschanski M. Novel therapeutic approaches for cystic fibrosis//*Discovery medicine*. – 2013. – Vol.15. – P. 127–133.
24. Whitby P., Vanwagoner T., Springer J. et al. *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source// *Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 55. – P. 661–668.